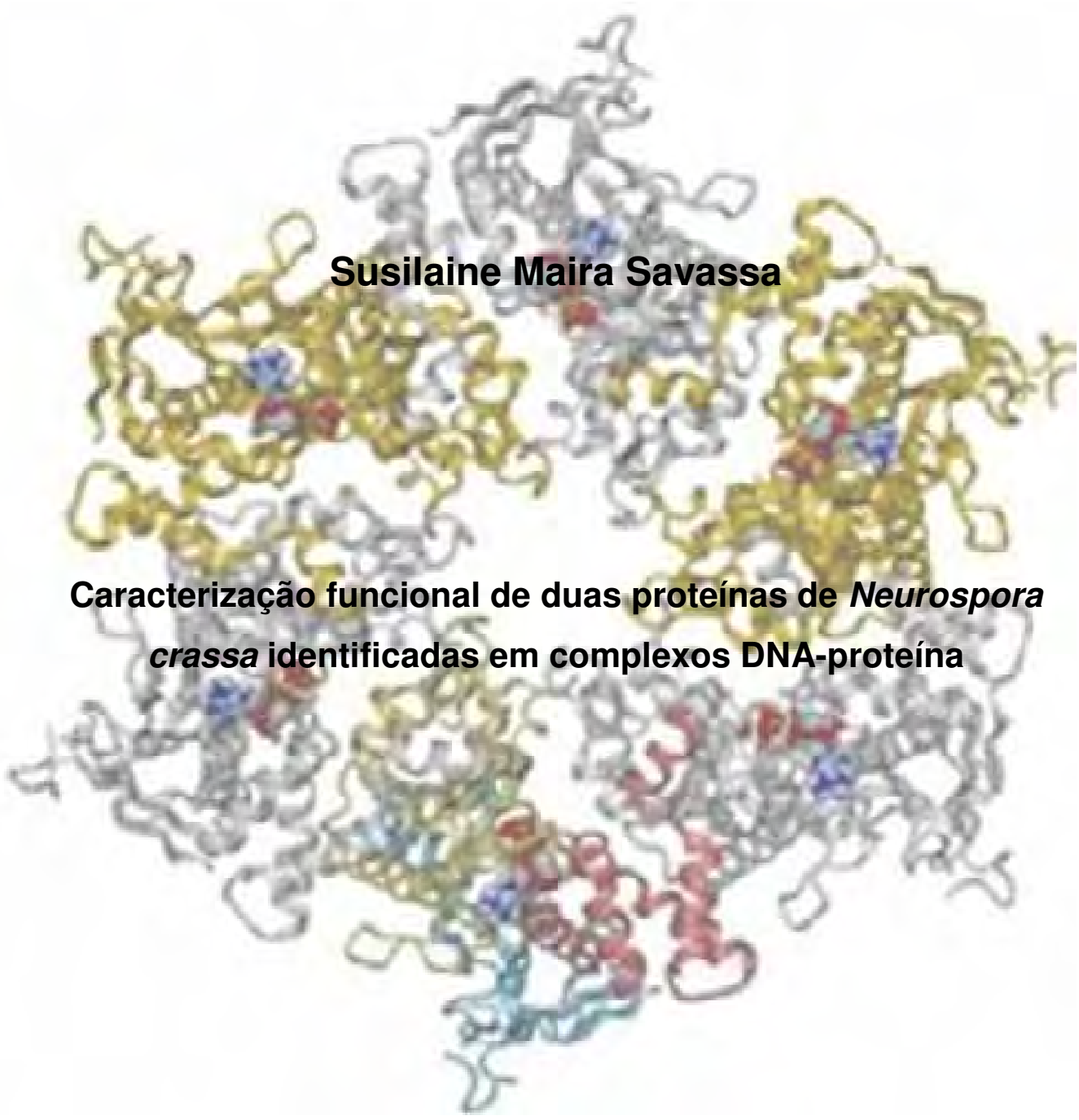
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



Susilaine Maira Savassa

Caracterização funcional de duas proteínas de *Neurospora crassa* identificadas em complexos DNA-proteína

ARARAQUARA

2013

SUSILAINE MAIRA SAVASSA

Caracterização funcional de duas proteínas de *Neurospora crassa* identificadas em complexos DNA-proteína

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

Orientadora: Prof. Dr. Maria Célia Bertolini

ARARAQUARA
2013

SUSILAINE MAIRA SAVASSA

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

Araraquara, 08 de março de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Maria Célia Bertolini (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Profª Drª Marcia Aparecida Silva Graminha
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara

Prof. Dr. Marcos Roberto de Mattos Fontes
Instituto de Biociências – UNESP, Botucatu

CURRICULARES

Susilaine Maira Savassa

1. Dados pessoais

Filiação: José Antonio Savassa e Margarida Conceição Gouveia Savassa

Nascimento: 03 de maio de 1986 – Salto-SP, Brasil

Endereço Pessoal: Avenida Alberto Toloi, 185 – Quitandinha
CEP: 14800-105 – Araraquara – SP

Endereço Profissional: Instituto de Química de Araraquara – UNESP
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química
Rua Prof. Francisco Degni, 55 – Quitandinha
CEP: 14800-900 – Araraquara – SP

Profissão: Licenciada em Química

2. Formação acadêmica

2011-2013: Mestrado em Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, área de concentração Biotecnologia. Título: Caracterização funcional de duas proteínas de *Neurospora crassa* identificadas em complexos DNA-proteína. Orientadora: Maria Célia Bertolini, Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, Araraquara, São Paulo, Brasil (em andamento).

2006-2010: Graduação Licenciatura em Química, Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, Araraquara, São Paulo, Brasil.

2003-2004: Técnico em Processos Químicos, Centro de Educação Profissional de Indaiatuba (CEPIN).

3. Atividades de pesquisa

3.1 Resumos apresentados em congressos

SAVASSA, S. M.; FREITAS, F. Z.; MAGRO, A. J.; FONTES, M. R. M.; BERTOLINI, M. C. Molecular Modeling of the Neurospora crassa NCU06679 ORF Product Suggests as a Putative Histone Acetyltransferase. Production and Purification of the Recombinant Protein. In: XLI Annual Meeting of the The Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (Sbbq), 2012, Foz do Iguaçu-PR.

SAVASSA, S. M.; ANTONIO, S.G; CATELANI, T. A.; CARVALHO, F. M. S.; SANTOS, C. P. Análise do Tamanho de Cristalito do Medicamento (ácido mefenâmico) em amostras comerciais. 2010. In: 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), 2010, Águas de Lindóia-SP.

SAVASSA, S. M.; KRAUS, J.; GUBBIOTTI, F. M. B.; TOZETTI, S. A. O.; ZANON, D. A. V. A experimentação como recurso pedagógico para o ensino de Eletrólise. In: VII Evento de Educação em Química (EVEQ),2010, Araraquara-SP.

SAVASSA, S. M.; ANTONIO, S.G.; CATELANI, T. A.; SANTOS, C. P. Polimorfismo de Fármacos e Difração de Raios X por Policristais. In: XXI Congresso de Iniciação Científica da UNESP (CIC), 2009, São José do Rio Preto-SP.

SAVASSA, S. M.; ADATI, R. D.; LIMA, S. A. M.; DAVOLOS, M. R.; JAFELICCI, M. Estudo do sistema misto [Eu(tta)3(H2O)2]:ácido esteárico para obtenção de filmes de Langmuir. In: 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), 2008, Águas de Lindóia-SP.

Dedico este trabalho
primeiramente a Deus, aos
meus pais José e Margarida e,
a minha irmã Lucilaine,
pessoas que amo muito.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus pelo dom da vida e pela força que me deu nesse período do mestrado, iluminando sempre meu caminho. Agradeço à minha orientadora Profª. Drª. Maria Célia Bertolini, por ter aceitado o início de lapidação dessa pedra bruta, através da transferência de seu conhecimento e pela dedicação com que me ajudou a conduzir este trabalho.

Agradeço a dedicação e ensinamento da minha "co" de coração a Drª. Fernanda Zanolli Freitas que me mostrou que quando se gosta do que faz, é possível enfrentar todos os obstáculos que aparecem no caminho. Agradeço também aos queridos "pós-docs" Rodrigo e Fernanda Cupertino por toda a paciência e por tirarem inúmeras dúvidas que apareceram neste período. Agradeço aos demais colegas de laboratório, Thiago, Stela, Flávia, Ana Paula, Eliane, Heloisy, Érick, Messias, que me acolheram e me ajudaram muito e à Carol que além de colega de laboratório é minha amiga de todas as horas. Agradeço também ao Tarcísio que sempre prepara muito bem nosso espaço de trabalho, além de proporcionar muitas risadas ao longo do dia.

Não posso deixar de agradecer também minhas amigas de apartamento, Ângela, Ana Flávia e Mariana (Zica) que me "aturam" todos os dias; obrigada por escutarem meus desabafos, por rirem comigo. Agradeço também a todos os amigos que fiz em Araraquara: Aninha, Sauna, Cupim, Ígor, Simone, Vinícius, Selma entre tantos outros que sempre estiveram presentes nos momentos bons e ruins. Agradeço às minhas irmãs de coração Ana Carolina e Thayz que me adotaram como parte da família e também à Alana; essas sempre me escutaram, me ajudaram, me animaram. Obrigada amigos queridos pelas risadas, bebedeiras e conversas jogadas fora.

Novamente agradeço à minha família: Minha mãe dona Margarida, que sempre me deu força, que sempre acreditou em mim e me fez chegar até aqui e me motiva sempre a ir além; ao meu pai seu José, pelo suporte; e à minha irmã Luci, que sempre está ao meu lado. Amo vocês.

Agradeço ao Instituto de Química que me acolheu desde a minha graduação e, no qual vivi os melhores anos da minha vida. Agradeço também aos funcionários da biblioteca e da seção de Pós-Graduação, além dos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Ao departamento de Bioquímica e Tecnologia Química e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do instituto de Química da UNESP de Araraquara pela oportunidade de realizar o curso de mestrado.

Á Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro concedido.

“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas” (Claude Lévi-Strauss, antropólogo e filósofo francês)

"Erros são, no final das contas, fundamentos da verdade".
(Carl Gustav Jung, psiquiatra suíço)

RESUMO

O fungo filamentoso *Neurospora crassa* é um organismo modelo muito utilizado para estudos de diversos aspectos da biologia dos eucariotos. Nosso laboratório tem utilizado este fungo para o estudo dos mecanismos moleculares e bioquímicos da regulação do metabolismo de glicogênio. A presente proposta de trabalho é uma consequência de experimentos anteriores realizados com o objetivo de identificar proteínas (fatores de transcrição ou não) que se ligam à região promotora do gene *gsn*, o qual codifica a enzima glicogênio sintase, regulatória do processo de síntese do carboidrato. Esses estudos combinaram experimentos de ensaios de retardamento em gel utilizando fragmentos do promotor *gsn* e proteínas do extrato total do fungo, acoplados à análise proteômica e identificação das proteínas por espectrometria de massas. Os experimentos resultaram na identificação de algumas proteínas do fungo, as quais podem ou não estar envolvidas na regulação da expressão do gene. Alguns estudos preliminares com estas proteínas foram anteriormente realizados no laboratório e apontaram um provável papel das mesmas na regulação do metabolismo do carboidrato em *N. crassa*. Duas dessas proteínas, as codificadas pelas ORFs NCU3482 e NCU06679 foram objeto de estudo neste trabalho. Portanto, o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização das linhagens mutantes nestas ORFs, além da produção e purificação das proteínas na forma recombinante. Foram realizadas análises morfológicas da linhagem mutante na ORF NCU06679, tais como: crescimento colonial e radial, crescimento linear e análise microscópica das extremidades das hifas. Esses experimentos foram realizados em comparação com a linhagem selvagem do fungo e, mostraram esta proteína está envolvida no processo de desenvolvimento do fungo, uma vez que seu crescimento e conidiação se apresentaram deficientes em relação à linhagem selvagem. Foram realizadas também análises da expressão dos genes *gsn* e *gpn* (codifica glicogênio fosforilase, enzima regulatória da degradação do glicogênio) pela técnica de PRC em tempo real, as quais mostraram diferenças no perfil de expressão dos dois genes ao longo do crescimento das linhagens selvagem e mutante. A proteína codificada pela ORF NCU06679 foi produzida na sua forma recombinante e as condições de purificação foram padronizadas neste trabalho. A produção e purificação da proteína recombinante codificada pela ORF NCU03482, fusionada à proteína SUMO também foi realizada neste trabalho. Experimentos preliminares para a produção de ambas proteínas fusionadas à GFP foram iniciados com o objetivo de identificar a localização celular de ambas.

Palavras-chave: *Neurospora crassa,* glicogênio, expressão gênica, proteína recombinante

ABSTRACT

The fungus *Neurospora crassa* has been widely used as a model organism for fundamental aspects of eukaryotic biology. We have been studying the biochemical and molecular mechanisms involved in glycogen metabolism regulation in this fungus. The present work is a consequence of previous experiments performed in the laboratory to identify proteins that bind to the promoter region of the *gsn* gene which encodes glycogen synthase, the regulatory enzyme in glycogen synthesis. Previous studies were performed by using a combination of DNA gel shift assay coupled to proteomic analysis, followed by identification of proteins by mass spectrometry. The assays resulted in the identification of proteins likely involved in the regulation of gene expression. Preliminary studies with these proteins have previously been carried out and suggested that they might have a role in the regulation of glycogen metabolism in *N. crassa*. Two of them, the ORFs NCU3482 and NCU06679 gene products were object of study in this work. The main objective was to characterize the mutant strains in both proteins and to produce and purify the recombinant proteins. Morphological analyzes were performed in the ORF NCU06679 mutant strain such as colony and radial linear growth and microscopic examination of the ends of the hyphae. These experiments showed that this protein is involved in the fungus development since growth and ability to conidiate were deficient when compared to the wild-type strain. The expression of *gsn* and *gpn* (encodes glycogen phosphorylase, the regulatory enzyme in glycogen degradation) genes were analyzed by qPCR and the results showed differences in gene expression of both genes during vegetative growth of the NCU06679 mutant strain when compared to the wild-type strain. The protein encoded by ORF NCU06679 was produced as a recombinant protein and the purification condition was established in this work. The NCU03482 gene product was produced fused to SUMO protein and its production and purification was also performed. Preliminary experiments to produce both proteins fused to GFP were initiated to identify the cellular location of both proteins.

Keywords: *Neurospora crassa*, glycogen, gene expression, recombinant protein

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Ciclo de vida de *Neurospora crassa* 22

Figura 02 - Representação esquemática da síntese e degradação do glicogênio em *N. crassa* 24

Figura 03 - O complexo RUVBL1/2 participa de diversos processos celulares 28

Figura 04 - O hexâmero RuvBL1 29

Figura 05 - Sobreposição do modelo teórico do produto da ORF NCU03482 e da helicase RUVBL1 humana 30

Figura 06 - A estrutura cristalográfica da proteína Nurf55 31

Figura 07 - Sobreposição do modelo teórico da NCU06679 e da NURF55 de *D. melanogaster* 32

Figura 08 - Mapa do vetor de expressão pETSUMO 51

Figura 09 - Representação esquemática do procedimento utilizado para a introdução de GFP no locus genômico 53

Figura 10 - Representação esquemática das proteínas codificadas pelas ORFs NCU06679 e NCU03482 57

Figura 11 - Alinhamento múltiplo de sequências polipeptídicas do produto da ORF NCU03482 de N. crassa com as proteínas RuvB-like 1 de H. sapiens, Rvb1p de S. cerevisiae e pontin de D. melanogaster 58

Figura 12 - Alinhamento múltiplo de sequências polipeptídicas da ORF NCU06679 de N. crassa com as proteínas histone-binding protein RBBP4 isoform a de H. sapiens e chromatin assembly factor 1 subunit, isoform B de D. melanogaster 59

Figura 13 - Amplificação de fragmentos correspondentes as ORFs NCU06679 e NCU03482 a partir do DNA genômico das linhagens selvagem e mutantes 61

Figura 14 - Purificação de homocários da linhagem nocauteada na ORF NCU03482 62

Figura 15 - Análise do crescimento das linhagens selvagem e mutante em meio sólido 63

Figura 16 - Análise morfológica das colônias e crescimento radial e da extremidade das hifas nas linhagens selvagem e mutante 65

Figura 17 - Análise do crescimento linear das linhagens selvagem e mutante na 65

ORF NCU06679 em race tubes

Figura 18 - Acúmulo de glicogênio nas linhagens selvagem e mutante 66

Figura 19 - Análise da expressão dos genes gsn e gpn nas linhagens selvagem e mutante ao longo do crescimento 68

Figura 20 - Análise da expressão dos genes gsn e gpn nas linhagens selvagem e mutante antes e após choque térmico 68

Figura 21 - Análise da expressão em E. coli Rosetta da proteína His::6679 70

Figura 22 - Análise da expressão em E. coli Rosetta da proteína His::6679 na condição de 12°C 71

Figura 23 - Análise da expressão em E. coli Rosetta da proteína His::6679 na condição de 30°C 71

Figura 24 - Análise da expressão em E. coli Rosetta da proteína His::6679 na condição de 37°C 72

Figura 25 - Purificação da proteína His::6679 produzida em E. coli 73

Figura 26 - Purificação e análise da proteína His::6679 produzida em E. coli em maior escala 74

Figura 27 - Análise da expressão em E. coli Rosetta da proteína SUMO::3482 induzida em diferentes temperaturas 76

Figura 28 - Análise da expressão em E. coli Rosetta da proteína SUMO::3482 induzida em diferentes temperaturas 76

Figura 29 - Purificação da proteína SUMO::3482 produzida em E. coli 77

Figura 30 - Purificação da SUMO protease produzida em E. coli 77

Figura 31 - Digestão da proteína SUMO::3482 com a SUMO protease 78

Figura 32 - Amplificações para a obtenção dos split markers 5' e 3' para as proteínas codificadas pelas ORFs NCU06679 e NCU03482 80

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

2YT	meio de cultura com extrato de levedo e triptona
AAA+	*ATPase associated with diverse cellular activities*
ATP	adenosina trifosfato
bar^r	resistência à fosfinotricina/basta
BSA	soroalbumina bovina
C-terminal	região carboxi-terminal
cDNA	DNA complementar
cm	centímetro
DEPC	dietil pirocarbonatp
dNTP	desoxirribonucleotídeos fosfatados
D.O.	densidade óptica
DTT	ditiotreitol
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
FGSC	*Fungal Genetics Stock Center*
FT	*flow through*
g	gravidade
G1P	glicose-1-fosfato
G6P	glicose-6-fosfato
GNN	enzima glicogenina de *N. crassa*
GPN	enzima glicogênio fosforilase de *N. crassa*
gpn	gene da glicogênio fosforilase de *N. crassa*
GS	glicogênio sintase
GSN	enzima glicogênio sintase de *N. crassa*
gsn	gene da glicogênio sintase de *N. crassa*
HAT	histona acetiltransferase
HDAC	histona deacetilase
HEPES	ácido N-(2-hidroxietilo)-piperazina-N'-2-etanesulfónico
hph	gene que codifica para higromicina B fosfotransferase

IPTG	isopropyl-beta-D-tiogalactopiranosídeo
kb	kilobase
kDa	kilodalton
KO	*knockout*
M	molar
Mb	mega base
mM	milimolar
MM	massa molecular
N-terminal	região amino terminal da proteína
NBT	cloreto p-nitroazul de tetrazólio
nm	nanômetro
ORF	*Open Reading Frame*
pb	pares de base
PCR	*Polimerase Chain Reaction*
PMSF	fluoreto de metilfenilssulfonil
qRT-PCR	*Real Time quantitative Reverse Transcription*
RNA	ácido ribonucleico
rpm	rotação por minuto
SDS	duodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
STET	sacarose Tris triton X-100 EDTA
TAE	tampão Tris-acetato-EDTA
TIP49	TBP (TATA-*binding protein)-interacting protein* 49
TBS	tampão Tris-salina
TBST	tampão TBS acrescido de Tween 20
TBT	TATA-*box binding protein*
TCA	ácido tricloroacético
TLCK	Nα-p-tosil-L-lisina-cloro
Tris	hidroximetilaminometano
UDP	uridina difosfato

UDPG	uridina difosfato glicose
UTR	*untranslated region*
UV	luz ultravioleta
V	volts
VM	meio mínimo de Vogel
WD40	domínio WD de interação proteína-proteína
X-GAL	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo
YE	extrato de levedo

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO **19**

1- O fungo *Neurospora crassa* 20

1.1- Ciclo de vida 21

1.2- Metabolismo do glicogênio e sua regulação no fungo *Neurospora crassa* 22

2- O produto da ORF NCU03482 – RuvB-*like* helicase 1 27

3- O produto da NCU06679- Histona acetiltransferase 30

OBJETIVOS **33**

MATERIAS E MÉTODOS **35**

1- Linhagens estudadas 36

1.1- *Neurospora crassa* 36

1.2- *Escherichia coli* 36

2- Meios de cultura 36

2.1- *N. crassa* 36

2.2- *E. coli* 38

3- Propagação das linhagens de N. crassa e obtenção dos conídios 38

4- Análise morfológica das linhagens mutantes e selvagem 38

4.1- Crescimento linear das hifas 38

4.2- Crescimento em meio sólido 39

4.3- Crescimento colonial e análise do crescimento radial 39

4.4- Visualização das extremidades das hifas 39

5- Análise computacional das proteínas estudadas 39

6- Extração de DNA genômico e confirmação dos nocautes gênicos 40

7- Obtenção da linhagem homocário mutante na ORF NCU03482 41

7.1- Obtenção através da produção de microconídios 41

7.2- Obtenção através da produção de esporos sexuais 41

8- Ensaio de choque térmico 42

9- Preparo de extrato celular bruto e determinação do conteúdo de glicogênio 42

10- Extração de RNA e análise da expressão gênica 43

10.1- Extração de RNA total 43
10.2- PCR quantitativo em tempo real 44
11- Clonagem da ORF NCU06679 por RT-PCR 44
12- Mini-extração de DNA plasmidial 45
13- Preparo e transformação das células competentes de *E. coli* 46
14- Ensaios de produção e purificação das proteínas recombinantes 46
14.1- Subclonagem da ORF NCU06679 em um vetor de expressão de *E. coli* 47
14.2- Ensaio de indução proteica e análise de solubilidade da proteína codificada pela ORF NCU06679 47
14.2.1- Ensaio de *Western Blot* 48
14.3- Produção e purificação da proteína recombinante codificada pela ORF NCU06679 em pequena escala 49
14.4- Produção e purificação da proteína recombinante codificada pela ORF NCU06679 em maior escala 49
14.5- Produção e purificação da proteína recombinante codificada pela ORF NCU3482 fusionada a proteína SUMO 50
15- Localização celular dos produtos das ORFs NCU03482 e NCU06679. Experimentos preliminares para a produção das proteínas fusionadas a GFP 52
15.1- Preparo dos *split markers* para a produção das proteínas fusionadas a GFP 52
15.2- Transformação de conídios do fungo 54
54
RESULTADOS E DISCUSSÃO **56**
1- Características bioquímicas das proteínas estudadas 57
2- Caracterização das linhagens mutantes 60
2.1- Confirmação dos nocautes gênicos 60
2.2- Purificação de homocário da linhagem mutante na ORF NCU03482 60
2.3- Análises morfológicas da linhagem mutante NCU06679 62
2.3.1- Crescimento em meio sólido 62
2.3.2- Crescimento colonial e radial 63
2.3.3- Determinação da taxa de crescimento linear das linhagens mutante e 64

selvagem

2.3.4- Determinação do acúmulo de glicogênio nas linhagens selvagem e mutante na ORF NCU06679 64

2.3.5- Análise da expressão dos genes gsn e gpn nas linhagens selvagem e mutante 66

3- Clonagem, produção e purificação das proteínas recombinantes 69

3.1- Clonagem da ORF NCU06679 e subclonagem em vetor de expressão 69

3.1.2- Ensaios de produção em E. coli e análise da solubilidade da proteína recombinante 69

3.1.3- Purificação da proteína recombinante 70

3.2- Produção e purificação da proteína recombinante codificada pela ORF NCU03482 fusionada à proteína SUMO 73

4- Localização celular dos produtos das ORFs NCU03482 e NCU06679. Experimentos preliminares para a produção das proteínas fusionadas a GFP 78

PRINCIPAIS CONCLUSÕES **81**

REFERÊNCIAS **84**

Introdução

1 - O fungo *Neurospora crassa*

O reino dos fungos é muito rico em diversidade, apresentando aproximadamente 1,5 milhões de espécies (HAWKSWORTH, 1991). Por apresentarem diferenças em sua morfologia, genótipos, meios de crescimento e reprodução, eles são muito utilizados para estudos biotecnológicos; visando o desenvolvimento de novos materiais e a produção de enzimas de uso industrial. Alguns fungos tais como *Trichoderma reesi* e *Aspergillus niger* são muito utilizados para a produção de enzimas extracelulares de interesse industrial (BRUNT, 1986; CHERRY, FIDANTSEF, 2003). Outros organismos já conhecidos como organismos modelos, *Neurospora crassa* e *Aspergillus nidulans* são muito utilizados para a expressão de genes heterólogos na área da pesquisa.

N. crassa é um fungo filamentoso que vive em habitats com climas tropicais e subtropicais. Este fungo possui coloração alaranjada e é encontrado na natureza em arbustos e troncos de árvores (JACOBSON et al., 2004). É um organismo anaeróbio restrito, não patogênico e, sendo um microrganismo haploide, apresenta durante seu crescimento vegetativo estruturas distintas de propagação, micro e macroconídios. O fungo também se apresenta como um organismo diploide durante a fase sexual de reprodução (METZENBERG, 1979).

É um organismo de fácil manipulação, com crescimento rápido em meio de cultura simples, tornando-se atraente para o uso em pesquisa (PERKINS, 1992). *N. crassa* é utilizado como organismo modelo em pesquisa básica desde os anos 60 sendo um dos fungos mais bem estudados dentre os fungos filamentosos (SCHULTE et al., 2002). Esse fungo foi utilizado para estudos pelos pesquisadores BEADLE e TATUM (1941). os quais elucidaram o papel dos genes envolvidos em seu metabolismo celular tendo como base a idéia “um gene – uma enzima”, abrindo caminho para diversos estudos bioquímicos, genéticos, fisiológicos e moleculares (DAVIS, PERKINS, 2002).

Seu genoma foi sequenciado em 2003 por GALAGAN e colaboradores apresentando-se organizado em 7 cromossomos, distribuídos em 10.082 genes. Na época em que o sequenciamento foi realizado somente 13% dos genes codificavam proteínas já conhecidas em bancos de dados, 46% dos genes codificavam proteínas hipotéticas e 41% deles codificavam proteínas que não possuíam ortólogos funcionais conhecidos. Um novo estudo sobre o genoma de *N. crassa* foi realizado em 2011 por WANG e colaboradores e mostrou que 40% dos genes codificam proteínas funcionalmente anotadas em bancos de dados e, há a estimativa de que ocorram 27.588 interações proteína-proteína entre as 3.006 proteínas do fungo. Esses dados mostram que mesmo depois de quase 10 anos do sequenciamento do genoma de *N. crassa* existe ainda um grande número de genes com funções desconhecidas, sendo, portanto um organismo muito promissor para o estudo de novos mecanismos genéticos e bioquímicos (DUNLAP et al., 2007).

1.1 - Ciclo de vida

N. crassa possui um ciclo de vida (Figura 1) com duas fases, vegetativa e sexual, e pode ser altamente influenciado por fatores do meio ambiente, como nutrientes, luz e temperatura. Na fase vegetativa existem estruturas de propagação chamadas conídios e na fase sexual é possível observar a presença de corpos de frutificação. É um fungo heterotálico, tendo dois tipos de indivíduos sexualmente compatíveis, **A** e **a**. Nenhuma diferença morfológica é observada em linhagens com *mating types* diferentes e quaisquer duas linhagens de tipos sexuais opostos são competentes para o cruzamento, sendo que tanto um tipo quanto outro pode se comportar como doador de núcleos ou receptor de núcleos (FINCHAM et al., 1979).

Durante a fase vegetativa de crescimento do fungo, o micélio é composto por hifas de núcleos haploides e a reprodução se faz por conídios, tanto macro como microconídios (Figura 1). Ambas as vias requerem interface água-ar e são reprimidas em culturas submersas. A macroconidiação é promovida por estruturas apicais denominadas conidióforos localizadas nas extremidades das hifas aéreas, as quais permitem a formação de cadeias de macroconídios multinucleados. Os macroconídios apresentam coloração laranja-rosado, produzem carotenoide (ZALOKAR, 1957a, 1957b) e se desenvolvem em condição com alta quantidade de açúcar e nitrogênio. Já em condição com baixa quantidade de açúcar e nitrogênio há o desenvolvimento de microconidios que apresentam uma coloração marrom-esverdeado, produzem melanina e carotenoide (TURIAN et al., 1967). 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 et al., 1976).

A fase sexual acontece quando há limitação de nitrogênio, a qual induz um tipo de agregação de hifas levando à formação de órgãos sexuais femininos (protoperitécio). O protoperitécio consiste de uma ascogônia e a partir desta, hifas especializadas chamadas tricógino projetam-se em direção ao ar por ação de feromônios. A fertilização ocorre quando uma célula de *mating type* oposto, podendo ser um macro ou microconídio, ou até mesmo um pedaço pequeno de micélio, entra em contato com o tricógino. Como resultado esse contato ocorre então a plasmogamia, associação de núcleos aos pares, que começam a se dividir sincronicamente para a formação de numerosas hifas ascógenas que passam a crescer para fora da ascogônia. Enquanto isso acontece, a capa micelial que envolve a ascogônia começa a desenvolver uma espécie de parede originando uma estrutura denominada peritécio maduro. Há a formação do asco inicial, os dois núcleos se fundem (cariogamia) e ocorre meiose, originando quatro núcleos haploides. Em seguida, ocorre uma

mitose resultando em oito núcleos haploides dentro do asco maduro, sendo quatro núcleos do *mating type* de cada esporo (ascósporo), os quais originarão um novo micélio.

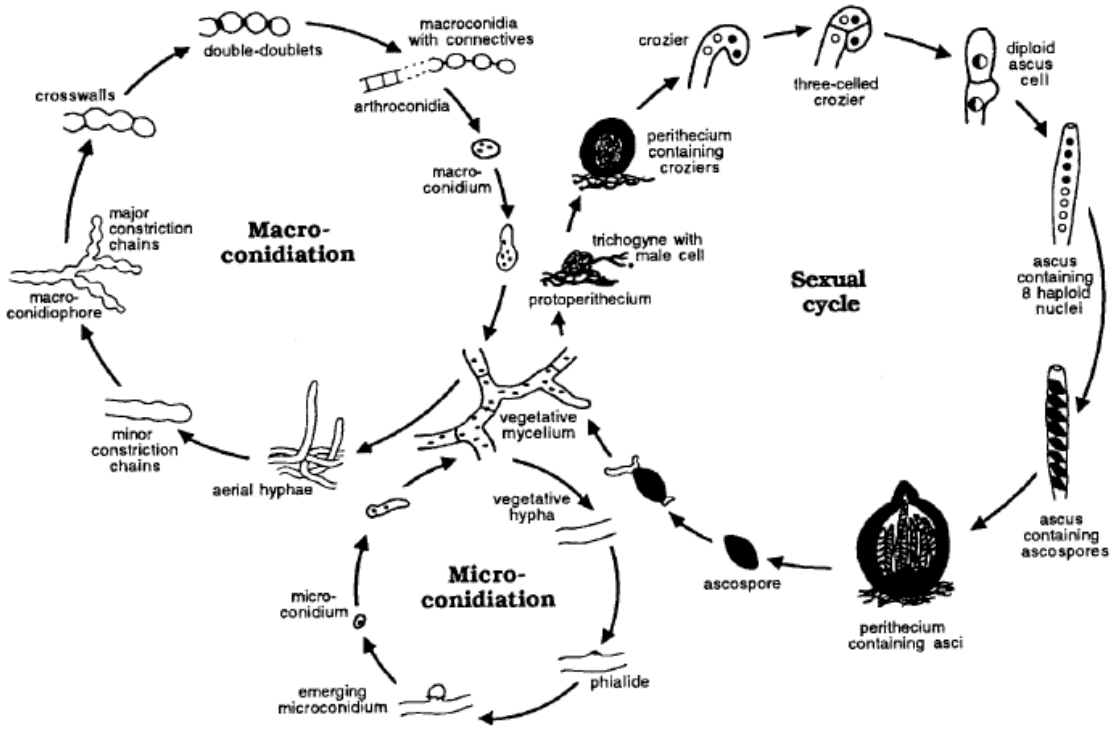


Figura 1- Ciclo de vida de *Neurospora crassa.* O ciclo de vida pode se apresentar como sexual ou assexual. No assexual há a formação de macro e microconídios e no sexual há a formação do protoperitécio, dependendo das condições do ambiente, que quando fertilizado se desenvolve produzindo ascósporos (BORKOVICH et al., 2004).

1.2 - Metabolismo do glicogênio e sua regulação no fungo *Neurospora crassa*

O glicogênio é um polímero de glicose muito encontrado na natureza tanto em microrganismos quanto em eucariotos superiores. Ele é utilizado como carboidrato de reserva e juntamente com o amido nas plantas ele é considerado a maior fonte de carbono e energia. Trata-se de um polissacarídeo em que os resíduos de glicose estão unidos covalentemente por ligações glicosídicas α-1,4 lineares e ligações α-1,6 que ocorrem a cada 4 resíduos e responsáveis pela ramificação da molécula (NELSON; COX, 2008).

Sua síntese e degradação constituem vias centrais no metabolismo das células vivas que regulam o armazenamento de energia e são conservadas nos diferentes organismos. A biossíntese do glicogênio envolve a ação de várias enzimas: (1) a glicogenina, uma proteína autoglicosilável que atua como uma molécula iniciadora para a biossíntese do glicogênio, (2) a glicogênio sintase que é a componente chave desta maquinaria enzimática catalisando a adição de ligações α-1,4 glicosídicas na extremidade não redutora do glicogênio, e (3) a glicosil-(4 →6)-transferase, que catalisa a formação das ligações ramificadas α-1,6 da molécula de glicogênio (NELSON; COX, 2008).

Para a síntese do glicogênio é necessário que a glicose entre na célula e seja fosforilada pela enzima hexoquinase para a formação de glicose-6-fosfato (G6P). A G6P pode ser usada para a síntese de glicogênio, metabolizada na via glicolítica para a produção de energia ou participar da via das pentoses para produção de pentoses e equivalentes redutores. Na síntese do glicogênio, G6P é primeiramente transformada em glicose-1-fosfato (G1P) pela enzima fosfoglicomutase, a qual será substrato para a produção de uridina difosfato-glicose (UDPG) pela ação da UDP-glicose pirofosforilase. Assim, as moléculas de UDPG são as doadoras diretas de resíduos de glicose para a síntese de glicogênio (ROACH, 2002; NELSON; COX, 2008). Para que haja o início da síntese de glicogênio é necessário a presença da enzima glicogenina (GNN em *N. crassa*), uma enzima auto-glicosilável, que transfere resíduos de glicose provenientes da UDPG a resíduo(s) de tirosina (ALONSO et al., 1995) até a formação de uma cadeia oligossacarídica. A elongação da síntese é realizada pela enzima glicogênio sintase (GSN em *N. crassa*), a qual transfere resíduos de glicose da UDPG para extremidades não redutoras da molécula. As ligações glicosídicas do tipo α-1,6, responsáveis pela ramificação da molécula de glicogênio são catalisadas pela enzima ramificadora glicosil-(α-1,6)-transferase. Estas ramificações ocorrem equidistantemente a cada 10-14 resíduos de glicose, tornando o polissacarídeo mais compacto e solúvel e aumentando assim o número de extremidades não redutoras na molécula.

A degradação do glicogênio é catalisada pela enzima glicogênio fosforilase (GPN em *N. crassa*) através de uma reação de fosforólise, na qual as ligações glicosídicas α-1,4 que unem dois resíduos de glicose são atacadas por fosfato inorgânico, liberando uma molécula de glicose-1-fosfato (G1P). A enzima atua repetidamente sobre as extremidades não redutoras da molécula de glicogênio até que restem apenas quatro resíduos de glicose distantes do ponto de ramificação. A etapa restante da degradação é realizada pela enzima oligo (1,6)→(1,4) glicotransferase (enzima desramificadora) que catalisa duas reações sucessivas: (1) transferência de três dos quatro resíduos de glicose restantes da ação da glicogênio fosforilase para a cadeia linear mais próxima através de sua atividade transferase e, (2) remoção do resíduo de glicose α-1,6 resultando em um polímero linear que será novamente substrato para a enzima glicogênio fosforilase. Resíduos de G1P, produtos finais da degradação do glicogênio, são novamente convertidos em G6P pela enzima fosfoglicomutase (NELSON; COX, 2008). Um esquema ilustrativo dos processos de síntese e degradação do glicogênio mostrando as enzimas existentes em *N. crassa* está apresentado na Figura 2.

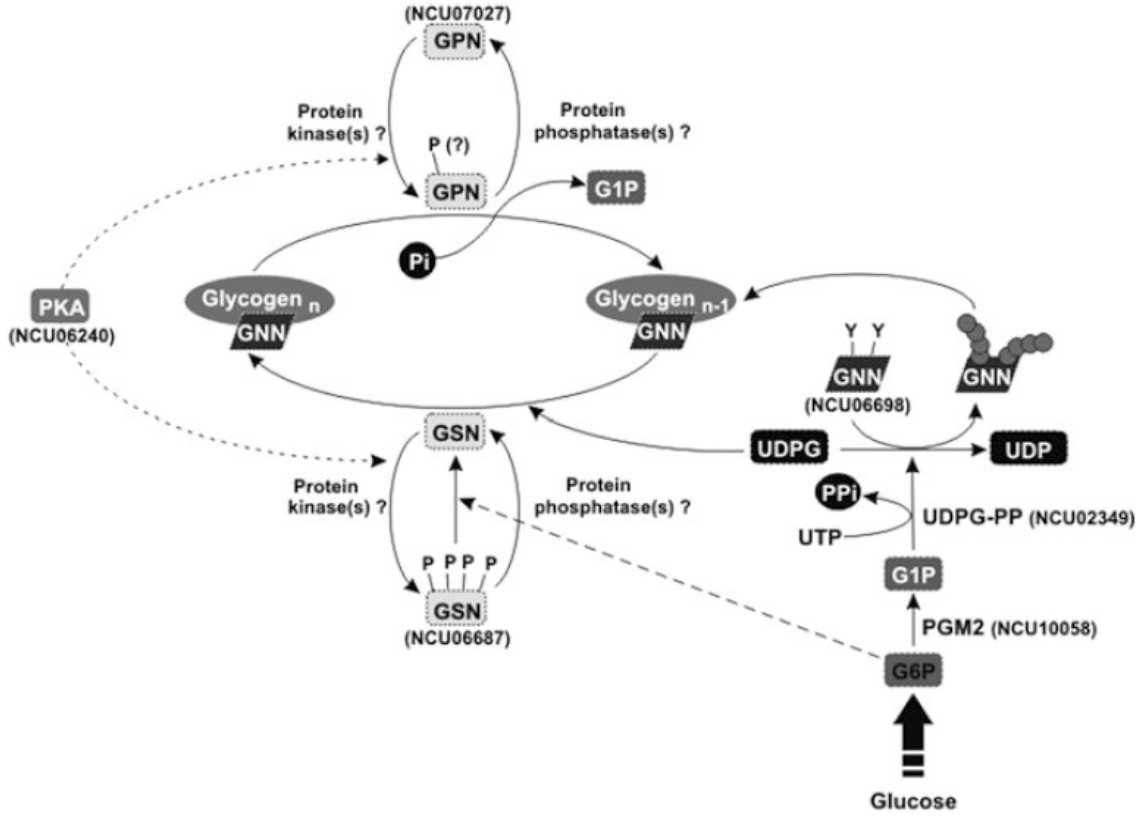


Figura 2- Representação esquemática da síntese e degradação do glicogênio em *N. crassa*. Glicose entra na célula e é convertida em UDPG, molécula doadora de glicose. A glicogenina (GNN), que é iniciadora da síntese de glicogênio, se autoglicosila, gerando extremidades não redutoras que permitem a elongação do glicogênio pela enzima glicogênio sintase (GSN), através de ligações glicosídicas α-1,4. A enzima glicogênio fosforilase (GPN) catalisa reações de fosforólise, liberando G1P. GSN e GPN são controladas por fosforilação reversível por meio da ação de proteínas quinases e fosfatases. Quatro sítios putativos de fosforilação são mostrados para GSN. As ORFs de *N. crassa* correspondentes aos produtos do metabolismo do glicogênio estão representadas entre parênteses. PGM2: fosfoglicomutase2, UDPG-PP: uridina 5'-difosfoglicose pirofosforilase, UDPG: uridina 5'-difosfoglicose, PKA: proteína quinase dependente de AMP cíclico (BERTOLINI et al., 2012).

Os processos de síntese e degradação do glicogênio são mecanismos muito bem conservados em eucariotos e possuem como enzimas regulatórias a glicogênio sintase (GS) e glicogênio fosforilase (GP). Essas enzimas estão sujeitas a diferentes tipos de regulação: modulação alostérica e controle pós-traducional, por ação de proteínas quinases e fosfatases (FRANÇOIS et al. 1988). A enzima GS sintase pode sofrer controle pós-traducional, via fosforilação multi-sítios através da ação de enzimas quinases e fosfatases e também por modulação alostérica, através do ligante G6P (HUANG & CABIB, 1974). Quando ela está na sua forma fosforilada ela se apresenta menos ativa e quando em sua forma desfofosforilada ela se apresenta ativa, isso porque a fosforilação causa redução na atividade enzimática, efeito que é revertido na presença de G6P. Além da modulação alostérica por G6P, a GS também pode apresentar atividade alterada na presença dos

inibidores ATP, UDP, fosfato inorgânico e outros intermediários metabólicos (PIRAS et al., 1968). A GP possui apenas um sítio de fosforilação, Ser14, que é modificado pela ação da proteína quinase fosforilase. Quando essa enzima se apresenta fosforilada ela é ativa e quando desfosforilada ela está na sua forma menos ativa (NELSON; COX, 2008). Também está sujeita à regulação alostérica, tendo como modulador AMP (TÉLLEZ-IÑÓN; TORRES, 1970; JOHNSON, 1992; MADSEN, 1986).

Tanto microrganismos quanto mamíferos sintetizam e acumulam glicogênio em períodos de abundancia de nutrientes e o degrada quando as células enfrentam períodos de estresse, como por exemplo, escassez de nutrientes (HARRIS, 1997). Assim, a variação do conteúdo de glicogênio celular em resposta a diversas situações ambientais indica que seu metabolismo é controlado por um complexo sistema regulatório. Diversos trabalhos relatam importantes variações no conteúdo de glicogênio em *Saccharomyces cerevisiae.* Foi observado que durante a situação de crescimento vegetativo as células de leveduras acumulam glicogênio quando a cultura inicia sua fase de crescimento estacionário. O acúmulo também foi observado durante algumas situações de estresse como quando as células foram submetidas a choque térmico (NI; LAPORTE, 1995) e durante a indução à esporulação e germinação de esporos.

Em *N. crassa,* vários aspectos do metabolismo de glicogênio, tanto estrutural como regulatório vêm sendo estudados pelo nosso grupo de pesquisa. Estudos mostraram a ocorrência de acúmulo de glicogênio durante a fase exponencial de crescimento vegetativo do fungo, a qual foi acompanhada por um aumento tanto da atividade da enzima glicogênio sintase, quanto nos níveis do transcrito *gsn* (gene codificador da glicogênio sintase), e que o glicogênio é degradado quando a cultura atinge a fase estacionária de crescimento (NOVENTA-JORDÃO et al., 1996, DE PAULA et al., 2002). Sob condição de choque térmico (transferência de 30 para 45°C), ao contrário do que ocorre em *S. cerevisae*, o nível do transcrito *gsn* sofre uma acentuada redução e retorna ao normal após a reincubação da cultura em sua temperatura fisiológica de crescimento (DE PAULA et al., 2002). Estes resultados mostraram que a regulação do metabolismo de glicogênio em *N. crassa* sob a condição de estresse de choque térmico deve envolver mecanismos moleculares diferentes dos descritos na levedura *S. cerevisiae*.

Com o objetivo de estudar a regulação da expressão do gene *gsn* na condição de estresse*,* estudos de caracterização molecular da região promotora do gene *gsn* foram realizados (FREITAS; BERTOLINI, 2004). Uma análise detalhada da região 5'-flanqueadora do gene permitiu a identificação de vários elementos de regulação transcricionais, dentre eles uma grande quantidade de HSEs (*Heat-Shock Elements)* e dois elementos STREs (*Stress Responsive Elements*), um deles *upstream* ao TATA Box canônico (STRE1) e outro

(STRE2) localizado dentro de um *intron* presente na região 5'-UTR do gene. Também foram identificados elementos STREs na região 3'-UTR do gene. Os HSEs são elementos de transcrição encontrados em múltiplas cópias nos promotores de genes responsivos ao choque térmico (BIENZ; PELHAM, 1987) e conferem uma forte indução frente ao estresse térmico, podendo agir tanto como elementos proximais ao TATA Box quanto como *enhancers* (PELHAM; BEINZ, 1982; BIENZ; PELHAM, 1986). Através de ensaios de retardamento em gel (*Electrophoretic Mobility Shift Assay,* EMSA) com duas regiões do promotor *gsn*, uma contendo elementos HSE e outra contendo a região correspondente ao STRE1, bandas de DNA de mobilidade reduzida foram observadas com extratos nucleares de células do fungo submetidas ao choque térmico. Estes resultados mostraram que proteínas foram capazes de ligar aos fragmentos de DNA do promotor de *gsn* nesta situação ambiental; o que demonstrou fortemente o envolvimento das regiões estudadas na regulação da expressão do gene durante a condição de estresse mencionada (FREITAS; BERTOLINI, 2004).

As sequencias STRE são definidas como elementos de ativação *cis* presentes nos promotores de genes que são induzidos em condições de estresse, dentre elas o choque térmico (MARTINEZ-PASTOR et al., 1996). Em *S. cerevisiae,* as respostas mediadas pelo elemento STRE nas diferentes formas de estresse são dependentes dos fatores de transcrição Msn2/4p, os quais migram para o núcleo das células nesta condição (MARTINEZ-PASTOR et al., 1996). Esses fatores de transcrição reconhecem os elementos STRE através de seus domínios de ligação ao DNA do tipo *zinc finger* e medeiam a transcrição de genes dependentes de STRE, sob diferentes formas de estresse. Ao realizar uma busca no banco de dados de *N. crassa* não foram encontradas proteínas ortólogas aos fatores de transcrição Msn2/4p de *S. cerevisiae*. Portanto, experimentos foram conduzidos com o objetivo de identificar proteínas (fatores de transcrição ou não) que ligam ao elemento STRE presente na região promotora do gene *gsn* e, desta maneira, poderiam participar na regulação da expressão do gene *gsn*. Esses estudos combinaram ensaios de retardamento em gel, acoplados à análise proteômica e identificação de proteínas por espectrometria de massas. Os experimentos realizados levaram à identificação de algumas proteínas do fungo, as quais podem ou não estar envolvidas na regulação do gene na condição de choque térmico (FREITAS et al., 2008). Algumas proteínas identificadas foram consideradas como potenciais alvos de estudo em função de domínios proteicos existentes em suas estruturas, os quais correlacionam com proteínas reguladoras da expressão gênica ao nível de transcrição.

O término do sequenciamento do genoma de *N. crassa* (GALAGAN et al., 2003), aliado aos avanços das metodologias disponíveis necessárias para a inativação de genes

específicos (NINOMIYA et al. 2004), deram início às análises da genômica funcional do fungo. O nocaute de todos os genes de *N. crassa,* através da inserção de uma marca de seleção por recombinação homóloga, tem como objetivo determinar a função de cada um deles, uma vez que muitos destes genes não possuem ortólogos em outros organismos, não existindo evidências de suas funções (DUNLAP et al., 2007). Linhagens contendo genes individualmente inativados começaram a se tornar disponíveis para a comunidade científica pelo *Fungal Genetics Stock Center* (FGSC, Kansas City, Missouri, USA). Assim, linhagens mutantes nas proteínas identificadas por Freitas et al. (2008), como capazes de se ligar ao promotor *gsn,* foram adquiridas pelo laboratório e permitiram iniciar estudos visando caracterizar a função de tais proteínas na regulação do metabolismo do carboidrato. O estudo com estas proteínas e com as linhagens do fungo nocauteadas nos genes codificadores das mesmas foram iniciados no laboratório por Santos (2010), e posteriormente continuado com a realização de novos experimentos de caracterização das proteínas. Duas das proteínas identificadas foram objeto de estudo neste trabalho: os produtos das ORFs NCU03482 e NCU06679.

2 – O produto da ORF NCU03482 – RuvB-*like* helicase 1

A proteína codificada pela ORF NCU03482 está anotada no banco de dados de *N. crassa* como uma RuvB-*like helicase* 1, uma helicase dependente de ATP. As helicases participam de complexos proteicos que atuam no processo de remodelagem da cromatina. A análise da sequencia polipeptídica revelou a presença dos domínios TIP49 [TBP (TATA-*binding protein)-interacting protein* 49] e AAA+ (*ATPase associated with diverse cellular activities*) na extremidade N-terminal. O domínio AAA+ é um domínio de ligação ao ATP que contém de 200 a 250 resíduos de aminoácidos e apresenta *motifs* conservados: o denominado Walker A (GXXXXGK[T/S], no qual X representa qualquer aminoácido) e o denominado Walker B (HHHHDE, no qual H representa aminoácidos hidrofóbicos), responsáveis pela atividade ATPásica (KARATA et al., 1999; RAPPAS et al., 2006). A busca por proteínas homólogas, por Blast, ao produto da ORF mostrou que a proteína de *N. crassa* apresenta uma identidade de 70% com a proteína RuvBL1 de *Homo sapiens* e 71% com a proteína Ruvb1p de *S. cerevisiae.*

As proteínas RUVBL1 e RUVBL2, também chamadas de Pontin e Reptin, respectivamente, ou ainda TIP49 e TIP48 são proteínas eucarióticas altamente conservadas, desde microrganismos até humanos, pertencentes à família das ATPases apresentando o domínio AAA+. Juntas, o complexo RUVBL1/2 forma um duplo hexâmetro e atua em vários complexos multimoleculares nucleares que requerem proteínas com

atividade ATPásica, incluindo complexos de remodelagem de cromatina, o complexo HAT, complexos de ribonucleoproteínas nucleolares (snoRNP) e o complexo transcriptase reversa da telomerase. O complexo RUVBL1/2 regula a transcrição através da interação com fatores de transcrição. Embora sejam proteínas nucleares são também detectadas no citoplasma, onde suas funções não são bem conhecidas (citado em IZUMi et al., 2010). São proteínas essenciais para a viabilidade e desenvolvimento em diversos organismos, tais como *S. cerevisiae* (QIU et al., 1998), *Drosophila melanogaster* (BAUER et al., 2000) e *Caenorhabditis elegans* (citado por IZUMI et al., 2012), uma vez que ambas proteínas participam de diversos processos celulares, como ilustrado na Figura 3.

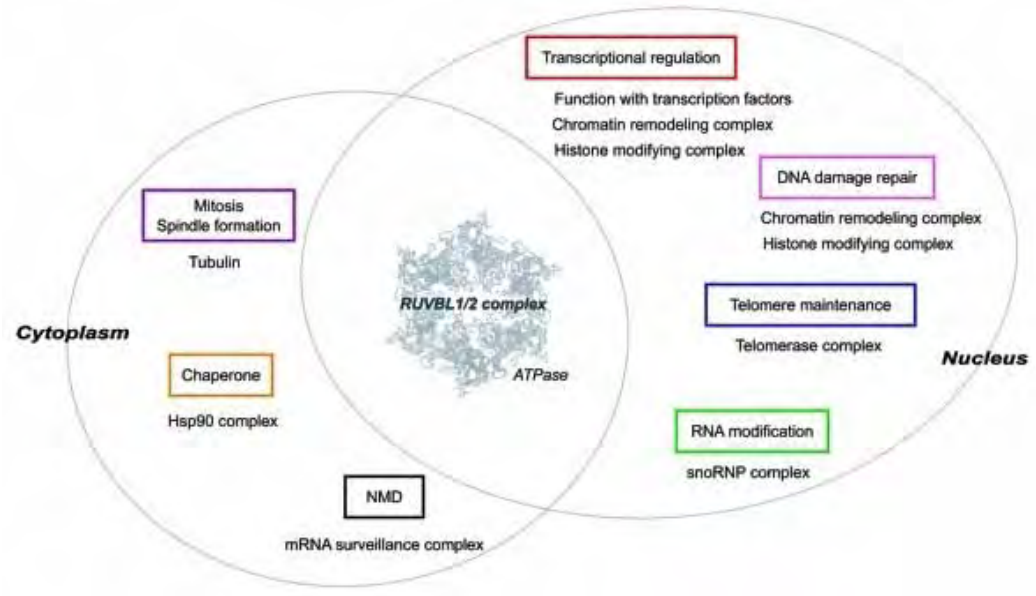


Figura 3- O complexo RUVBL1/2 participa de diversos processos celulares. O complexo é composto pelas proteínas RUVBL1 e RUVBL2 e estas duas proteínas possuem atividade ATPase. O complexo está localizado no núcleo e no citoplasma e participa de diversos processos celulares juntamente com outros componentes (como mostrado em cada caixa). A atividade ATPase é essencial para cada processo listado (IZUMI et al., 2012).

As proteínas RuvBL também se associam à tubulina, outro motor molecular, durante o processo de divisão celular (GARTNER et al., 2003). Adicionalmente, estas proteínas interagem com uma segunda proteína, que se liga ao elemento regulatório TATA-box presente em promotores, denominada TATA-*box binding protein* ou TBP, e é por esta razão que são conhecidas como TBP-*interacting protein* (TIP49 e TIP48).

A estrutura tridimensional da RuvBL1 (2c9o) humana foi elucidada por MATIAS et al. (2006) (Figura 4). O monômero contém três domínios proteicos (denominados DI, DII e DIII), sendo que dois são envolvidos na ligação ao ATP e um corresponde ao sítio de ligação ao DNA/RNA. Apresenta também os *motifs* Walker A e Walker B, que são *motifs* bem

conservados entre as proteínas da família AAA+. A RuvBL1 apresenta estrutura cristalográfica na forma de um hexâmero contendo um canal central, muito provavelmente local de interação com moléculas de DNA. A estrutura possui um diâmetro externo entre 94 e 117 Å e o canal central um diâmetro de aproximadamente 18 Å. Uma porção da parte externa se apresenta carregada positivamente, enquanto que a parte interna da estrutura se apresenta carregada negativamente indicando assim uma possível ligação e translocação de cadeias simples de DNA (MATIAS et al., 2006). Ensaios de retardamento em gel mostraram que a RuvBL1 de humano se liga a fragmentos de DNA simples e dupla fita e em RNA simples fita. Levando em consideração que o canal central se apresenta em um tamanho pequeno para acomodar cadeias de DNA dupla fita é possível que uma região fora do anel possa realizar essa interação (MATIAS et al., 2006).

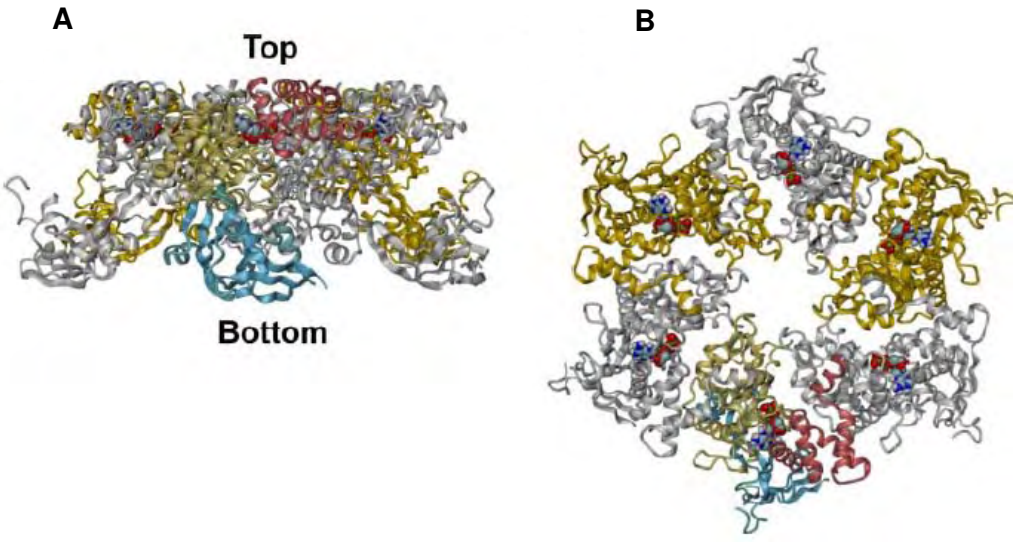


Figura 4- O hexâmero RuvBL1. Estrutura elucidada do hexâmero RuvBL1 por cristalografia. **A-** visão lateral da estrutura, **B-** visão superior da estrutura, sendo possível a visualização do canal central do hexâmetro (MATIAS et al.,2006).

Com base na estrutura da RuvBL1 de *H. sapiens* elucidada por MATIAS et al. (2006) a estrutura tridimensional do produto da ORF NCU03482 foi determinada por modelagem molecular em um trabalho em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Marcos Fontes (IB, UNESP, Botucatu) e está representada na Figura 5. Pode-se observar que a proteína de *N. crassa* apresenta uma alta similaridade com a proteína RUVBL1 humana, uma vez que há apenas uma região na proteína do fungo (29 resíduos de aminoácidos) não sobreposta no modelo, o que nos levou a concluir que o produto da ORF corresponde a uma *RuvB-like helicase 1*.

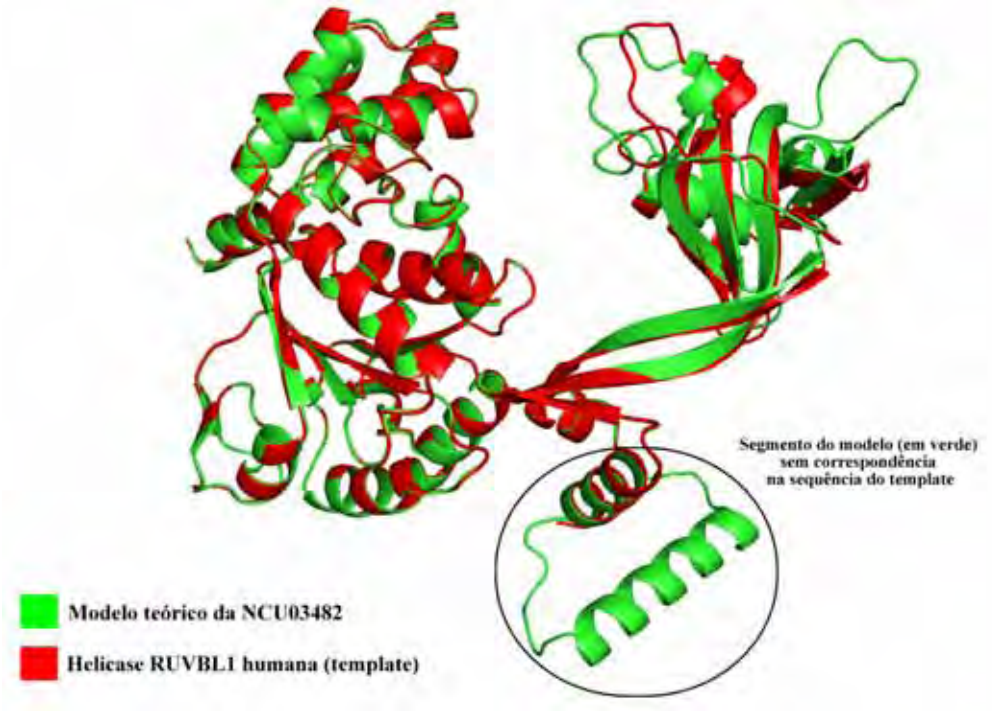


Figura 5- Sobreposição do modelo teórico do produto da ORF NCU03482 e da helicase RUVBL1 humana. Sobreposição da estrutura obtida por modelagem molecular da proteína de *N. crassa* com a estrutura de RUVBL1 humana elucidada por MATIAS et al. (2006). Em destaque há um segmento na proteína de *N. crassa* que não apresenta correspondência com a estrutura utilizada como molde (dados não publicados).

3 - O produto da NCU06679- Histona acetiltransferase

A proteína codificada pela ORF NCU06679 está anotada no banco de dados de *N. crassa* como uma *histone acetyltransferase* tipo B, subunidade 2 e apresenta seis domínios WD40 ao longo de sua sequência polipeptídica. Os domínios WD correspondem a um domínio conservado contendo de 44 a 60 resíduos de aminoácidos, sendo que na porção N-terminal, entre os resíduos de 11 a 24, normalmente existe o dipeptídeo glicina-histidina (GH) e na porção C-terminal o dipeptídeo triptofano-ácido aspártico (WD). Os domínios WD40 estão presentes em várias proteínas, envolvidas em diversos processos celulares, tais como transdução do sinal, transporte vesicular, montagem do citoesqueleto, controle do ciclo celular, entre outros (XU; MIN, 2011).

Essa proteína é bem conservada entre diferentes organismos. A busca por homólogos por Blast, mostrou que o produto desta ORF apresenta uma identidade de 50% com a proteína *histone-binding protein* RBBP4 *isoform* a de *H. sapiens* e 45% com a proteína *chromatin assembly fator* 1 *subunit, isoform* B de *Drosophila melanogaster.* A proteína codificada pela ORF NCU06679 pode fazer parte de complexos proteicos uma vez que uma proteína ortóloga, a Nurf55 de *D. melanogaster* é encontrada em diversos

complexos modificadores de cromatina, tais como HAT1 (*histone acetyltransferase* 1), HDAC1 (*histone deacetylase),* CAF-1 (*chromatin assembly fator*-1) entre outros (PARTHUN et al., 1996, TAUNTON, et al., 1996).

A estrutura cristalográfica da proteína Nurf55 foi elucidada primeiramente por SONG et al. (2008) com dados cristalográficos obtidos a uma resolução de 2,9 Å. Em outro trabalho realizado por NOWAK et al. (2011) a estrutura foi elucidada com dados cristalográficos obtidos com uma melhor resolução (1,75 Å) e está apresentada na Figura 6. A estrutura foi obtida juntamente com um peptídeo da histona H4 e revelou a presença de sete folhas β-*propeller*, um domínio característico da família de proteínas WD40. Na porção N-terminal é possível observar uma longa α-hélice (Figura 6B).

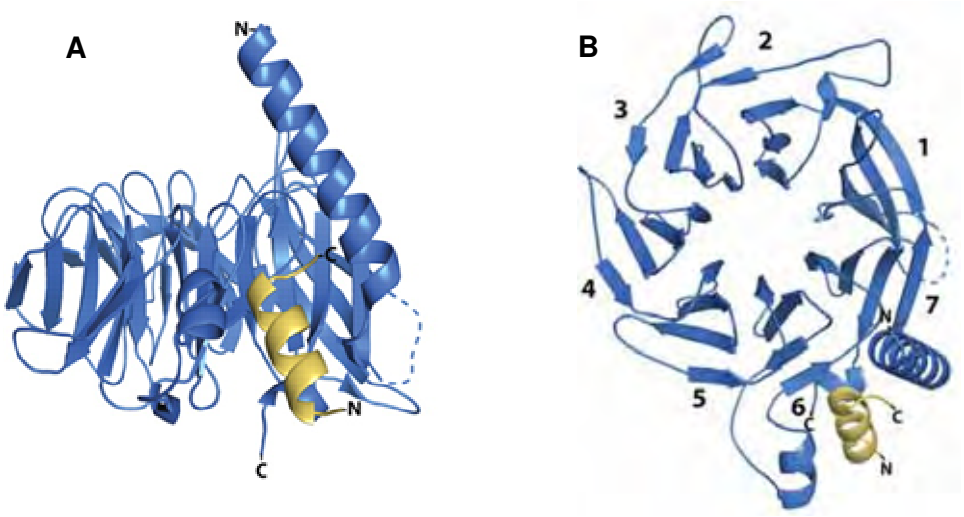


Figura 6- A estrutura cristalográfica da proteína Nurf55. Estrutura elucidada por cristalografia da proteína Nurf55 ligada com um peptídeo da histona H4 de *D. melanogaster* (2XYI). Em amarelo está representado o peptídeo da histona H4. **A-** visão frontal da estrutura, **B-** visão superior da estrutura. Os números indicam as folhas β-*propeller* (NOWAK et al., 2011).

Com base em um alinhamento de sequência realizado em um trabalho em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Marcos Fontes, a estrutura tridimensional do produto da ORF NCU06679 foi determinada por modelagem molecular baseada na estrutura da proteína Nurf55 de *Drosophila melanogaster* (NOWAK et al., 2011), a qual está representada nas Figuras 7 e 8. É possível observar a presença dos domínios β-*propeller*, característicos do domínio WD40 e na extremidade N-terminal a presença do domínio de ligação a proteínas histonas. Pode-se observar que a proteína de *N. crassa* apresenta uma alta homologia estrutural com a proteína NURF55 de *D. melonogaster*, uma vez que há apenas uma região na proteína do fungo não sobreposta no modelo.

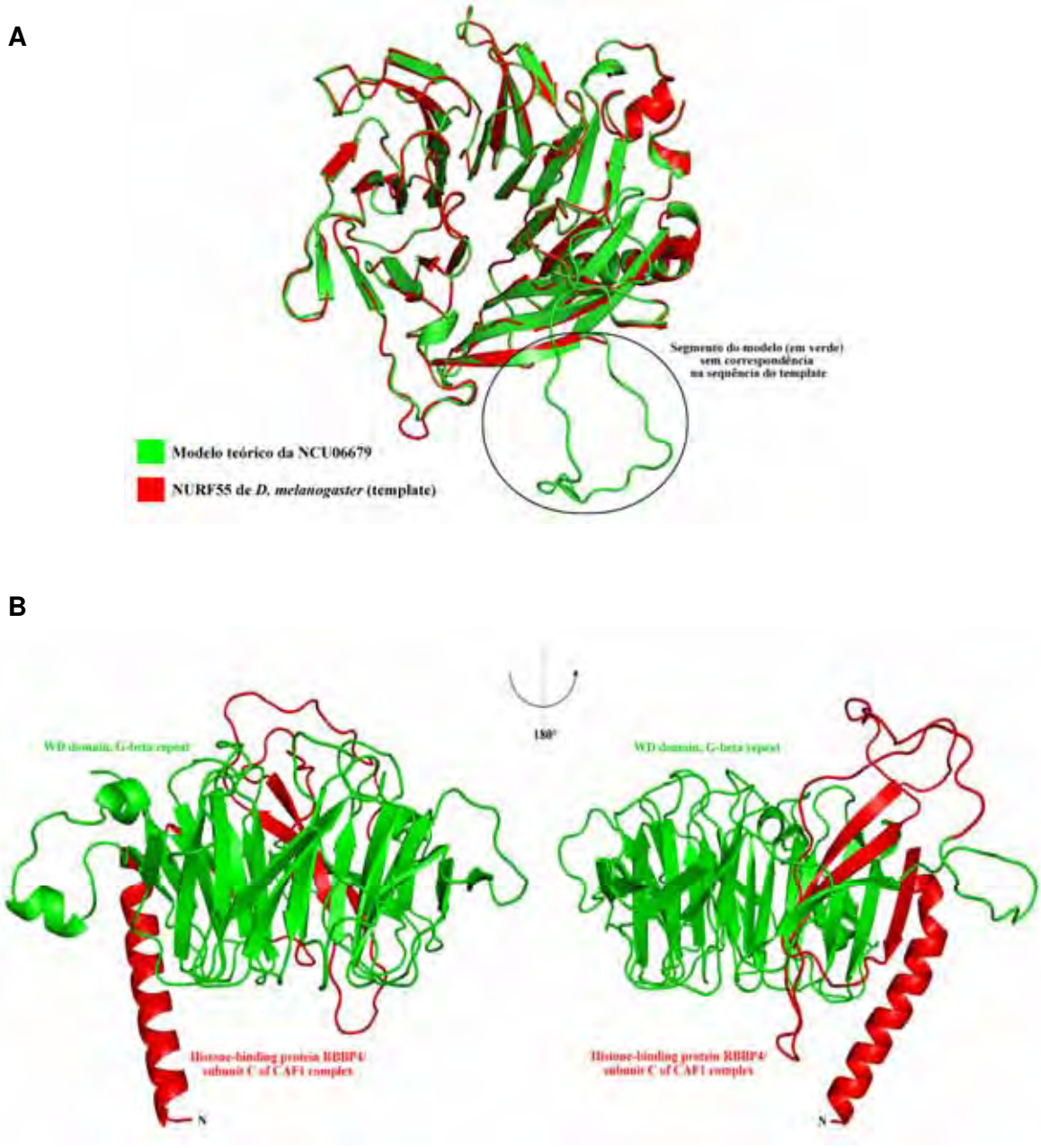


Figura 7- Sobreposição do modelo teórico da NCU06679 e da NURF55 de *D. melanogaster.* A- Sobreposição da estrutura obtida por modelagem molecular da proteína de *N. crassa* com a estrutura da NURF55 de *D. melanogaster* (NOWAK et al., 2011). Em destaque há um segmento que não apresenta correspondência com a estrutura utilizada como molde. **B**- Visão lateral em diferentes ângulos do modelo estrutural (dados não publicados).

Objetivos

O trabalho apresentado nesta Dissertação está inserido em um projeto maior do laboratório, o qual tem como objetivo identificar e caracterizar proteínas atuando como reguladoras do metabolismo de glicogênio no fungo *Neurospora crassa.* Como descrito anteriormente, duas proteínas descritas como componentes de grandes complexos proteicos reguladores da transcrição gênica foram identificadas anteriormente como prováveis reguladoras e alguns resultados preliminares haviam sido obtidos no laboratório. O presente trabalho teve como objetivo principal dar continuidade aos estudos já iniciados e os principais objetivos foram:

1- Caracterizar as linhagens mutantes nas proteínas RuvB-*like* 1 e histona acetiltransferase. Especificamente os objetivos foram:

- Avaliar o crescimento e a morfologia das linhagens mutantes para verificar se a ausência dessas proteínas poderia afetar o crescimento, a conidiação, a produção de hifas aéreas e a morfologia das hifas.
- Avaliar o conteúdo de glicogênio e a expressão dos genes que codificam as enzimas glicogênio sintase (*gsn*) e glicogênio fosforilase (*gpn*) na linhagens mutantes, a fim de verificar se essas proteínas estão envolvidas na regulação do metabolismo do glicogênio e na expressão dos genes.

2- Produzir as duas proteínas na forma recombinante para a utilização das mesmas em ensaios funcionais

- Produzir a proteína histona acetiltransferase em sua forma recombinante e padronizar suas condições de purificação.
- Produzir e padronizar as condições de purificação da proteína RuvB-*like* 1 fusionada a proteína SUMO para a obtenção da proteína recombinante em sua forma nativa.

3- Realizar ensaios de localização celular de ambas proteínas através da fusão com a proteína GFP.

Materiais e Métodos

1 - Linhagens estudadas

1.1 - *Neurospora crassa*

- FGSC#2489 (A) - Linhagem selvagem usada no sequenciamento do genoma do fungo
- FGSC#9718 (a, *mus-51::bar*^{r}*)* - Linhagem mutante usada na construção das linhagens mutantes nocauteadas em genes específicos
- FGSC#13915 (a) - Linhagem mutante na ORF NCU06679, homocário
- FGSC#13658 (a) - Linhagem mutante na ORF NCU03482, heterocário

As linhagens mutantes contendo genes específicos individualmente nocauteados pela inserção do gene de resistência à higromicina (*hph*) foram adquiridas pelo laboratório junto ao *Fungal Genetics Stock Center,* Kansas City, MO, USA.

1.2 - *Escherichia coli*

- DH10B
- Rosetta (DE3)pLys-S

2 - Meios de cultura

2.1 - *N. crassa*

- Meio mínimo de Vogel

O meio de cultivo utilizado para o crescimento e manutenção das linhagens foi o meio mínimo de Vogel (VM) (Vogel, 1956), acrescido de sacarose 2%, biotina (0,1 mg/mL) e 2% de ágar. 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:

150 g citrato de sódio.H_2O

250 g KH_2PO_4

100 g NH_4NO_3

10 g $MgSO_4.7H_2O$

5 g $CaCl_2.2H_2O$ (pré-dissolvido em água destilada)

5 mL de solução de elementos traços

Após a dissolução completa dos sais, o volume é ajustado para 1 L com água destilada, são adicionados 300 µL de clorofórmio como agente conservante e a solução é armazenada a 4ºC. A solução de elementos traços utilizada para o preparo do meio VM é obtida pela dissolução completa dos compostos citados a seguir, em 90 mL de água:

5 g ácido cítrico.H_2O

5 g $ZnSO_4.7H_2O$

1 g $Fe(NH_4)_2.(SO_4)_2.6H_2O$

0,25 g $CuSO_4.5H_2O$

0,05 g $MnSO_4.H_2O$

0,05 g H_3BO_3

0,05 g $Na_2MoO_4.2H_2O$

O meio mínimo de Vogel foi preparado contendo sacarose 2%, sais de Vogel 1X, biotina 0,1 mg/mL preparada em etanol 50% e ágar 2% para culturas de meio sólido. O pH do meio mínimo de Vogel é 5.8.

- *Bottom* agar

  Meio VM 1x

  FGS 1 x (como solução estoque 10 x - 200 g de sorbose, 5 g de frutose, 5 g de dextrose, q. s. p. 1 L de solução)

  ágar 1,5%

- *Top* agar

  D-sorbitol 2 M

  FGS 2 x

  ágar 1,5%

- *Synthetic Cross medium* (SC) - Solução estoque 2 x para 200 mL

  0,4 g KNO_3

  0,2 g K_2HPO_4

  0,04 g NaCl

  0,2 g $MgSO_4.7H_2O$

  0,04 g $CaCl_2.2H_2O$

  0,02 mL de solução estoque de biotina (0,1 mg/mL)

  0,04 mL de solução estoque de elementos traços

2.2 - *E. coli*

O meio de cultivo para o crescimento foi o meio 2YT com adição de glicose

1,6% triptona

1,0% extrato de levedura

0,5% NaCl

0,2% glicose

Para culturas sólidas, foi adicionado ao meio 2% de ágar.

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

Para a obtenção dos micélios utilizados nos experimentos, as diferentes linhagens foram crescidas em garrafas de vidro contendo 50 mL de meio VM a 30ºC por 3 dias em estufa e, em seguida foram expostas à luz até um total de 9 a 10 dias. Após esse período os conídios foram coletados, adicionando-se aproximadamente 10 mL de água destilada estéril à garrafa, seguida da filtração em gaze estéril para a retenção das hifas. A suspensão contendo os conídios foi então contada em câmara de Neubauer e utilizada como inóculo nos diferentes experimentos.

4 - Análise morfológica das linhagens mutantes e selvagem

Foram realizadas análises fenotípicas do fungo utilizando a linhagem selvagem FGSC#2489 e a mutante na ORF NCU06679.

4.1 - Crescimento linear das hifas

Para a determinação da taxa de crescimento das hifas, foi realizado a crescimento em *race tubes* que são tubos de vidro (40 cm de comprimento x 2 cm de diâmetro) contendo as extremidades curvadas em um ângulo de aproximadamente 45°. Os tubos foram parcialmente preenchidos com meio VM sólido. As linhagens foram então rejuvenescidas, os conídios coletados, e inoculados na concentração 10^7 conídios/mL em uma das extremidades do tubo, os quais foram expostos à luz durante a noite. Após esse período de incubação, a frente do crescimento foi marcada e denominada como tempo zero (t=0). Os tubos foram então incubados no escuro (para zerar o relógio biológico) e as marcações da taxa de crescimento foram realizadas a cada 12 h, até que a primeira linhagem atingisse a outra extremidade do tubo.

4.2 – Crescimento em meio sólido

Para analisar as diferenças na produção das hifas aéreas, pigmentação e conidiação, as linhagens selvagem e mutante foram inoculadas em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio VM sólido e incubadas a 30°C durante 3 dias. Em seguida, os frascos foram transferidos para a temperatura ambiente e luminosidade por mais 5 dias. Após 8 dias, o aspecto macroscópico das culturas foi analisado.

4.3 - Crescimento colonial e análise do crescimento radial

A análise do crescimento radial foi realizada em placas de Petri contendo meio VM suplementado com 2% de sacarose e meio VM suplementado com 2% de sacarose e 2% de extrato de levedo (VM+YE). Foram inoculados 5 µL de suspensões conidiais (10^7 conídios/mL) no centro das placas. As culturas foram então incubadas durante 24 h a 30°C. Após esse período, os raios das colônias foram determinados e o crescimento radial foi obtido. Imagens digitais das colônias foram obtidas com o auxílio de uma máquina fotográfica.

4.4 - Visualização das extremidades das hifas

Imagens das extremidades das hifas das colônias obtidas na análise descrita acima foram obtidas com o auxílio do estereomicroscópio trinocular SteREO Discovery.V8 (Zeiss) com câmera fotográfica acoplada.

5 - Análise computacional das proteínas estudadas

As sequências nucleotídicas das ORFs que codificam as proteínas estudadas e as sequências polipeptídicas foram identificadas no banco de dados do genoma de *N. crassa* (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/neurospora/MultiHome.html). A detecção e caracterização dos domínios presentes nas proteínas foram feitas por meio das informações disponíveis no genoma do fungo (http://www.fgsc.net/scripts/strainsearchform.asp) pelo SMART (http://smart.embl-heidelberg.de) e pelo banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

As sequências polipeptídicas foram comparadas com as sequências disponíveis no NCBI utilizando a ferramenta Blastp (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Para o alinhamento múltiplo das sequências polipeptídicas das proteínas de interesse e dos ortólogos funcionais caracterizados em outros organismos foi utilizado o programa ClustalW server (http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html) e os resíduos de aminoácidos

idênticos e conservados foram identificados por *Boxshade* 3.21 no site *Box Shade* Server (http://www.ch.embnet.org/software/.BOX_form.html).

6 - Extração de DNA genômico e confirmação dos nocautes gênicos

O DNA genômico das linhagens selvagem e mutantes foi extraído seguindo o método descrito por Weiland (1997). Os micélios foram coletados após crescimento vegetativo a 30°C, 250 rpm por 24 h, em seguida congelados e então pulverizados em gral de porcelana com nitrogênio líquido. O pó obtido foi transferido para tubos *Eppendorf* de 2 mL contendo 500 µL de tampão de extração (Tris-HCl 200 mM, pH 8,0, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, pH 8,0, SDS 1%) e 500 µL de uma solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico na proporção 25:24:1. Os tubos foram agitados em *vortex* e submetidos à centrifugação de 16.000 x *g*, 10 min, 4°C. O sobrenadante foi então transferido para outro tubo contendo 50 µL de acetato de sódio 3M, pH 5,2 e 950 µL de isopropanol, precipitado a -80°C por 30 min e centrifugado a 16.000 x *g*, 10 min, 4°C. O precipitado foi ressuspenso em 100 µL de água e submetido à digestão com RNAse A (10 mg/mL) a 37°C por 30 min. Em seguida, foi então realizada uma nova extração com 200 µL fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, a solução homogeneizada em *vortex* e novamente centrifugada a 16.000 x *g*, 10 min, 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo *Eppendorf* e submetida à nova precipitação a baixa temperatura com 40 µL de acetato de amônio 7,5 M e 750 µL de etanol absoluto gelado. Em seguida os tubos foram centrifugados a 16.000 x *g*, 10 min, 4°C e o precipitado lavado três vezes com 700 µL de etanol 70%, seco ao ar e ressuspenso em 50 a 100 µL de água. A quantificação e a qualidade das amostras foi analisada em espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare Life Scienses) através da relação das absorbâncias 260/280 nm.

A confirmação dos nocautes foi realizada com o DNA genômico através de PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para cada ORF (Quadro 1) em um termociclador Veriti 96 weel (Applied Biosystems). Para uma reação com volume final de 50 µL, utilizou-se 1 µL de DNA genômico (1 µg/µL), 0,5 µL (1,25 U) da enzima *Phusion DNA Polimerase* (Finnzymes), 1 µL dos oligonucleotídeos F e R (100 pmol/µL), 10 µL de 5 x *Phusion Buffer GC,* 1 µL de dNTP (10 mM cada) e 1,5 µL de DMSO. A mistura foi homogeneizada e submetida a PCR nas seguintes condições de reação para as duas linhagens mutantes: 98°C/30 seg; 98°C/5 seg, 64°C/ 30 seg, 72°C/15 seg por 30 ciclos e 72°C/10 min.

Os produtos das reações foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1x (Tris-HCl 400 mM, pH 8,0, ácido acético glacial 200 mM, EDTA 10 mM), contendo brometo de etídio 0,5 µg/ mL.

Quadro 1 - Oligonucleotídeos utilizados.

Nome	Sequência	Restrição
3482-F	5'-CCATATGGTGCAAATCAGCGAGG-3'	*Nde*I
3482-R	5'-CGGAATTCTCAACAAATAAACTCCTG-3'	*Eco*RI
NCU06679-F	5'-CATATGGCGCGCGACGAGATTGTC-3'	*Nde*I
NCU06679-R	5'-GAATTCCTAGTGACTAGATTGCTTC-3'	*Eco*RI

7 – Obtenção da linhagem homocário mutante na ORF NCU03482

7.1- Obtenção através da produção de microconídios

A linhagem mutante na ORF NCU03482 foi disponibilizada pelo FGSC como um hetorocário. Realizou-se então a tentativa de purificação de homocário dessa linhagem, para se observar se o mutante nulo é viável ou não. Para isso estimulou-se a microconidiação, uma vez que os microconídios apresentam apenas um núcleo através do inóculo de uma suspensão de conídios no seguinte meio:

0,1 x SC

0,5% sacarose

2% ágar

1 mM IAA (iodoacetamida)

0,5 mg/mL metioanina

0,5 mg/mL cisteína

0,2 mg/mL ácido aspártico

As culturas foram deixadas a 30°C em estufa durante 2 a 3 dias e depois de 7 a 10 dias expostas à temperatura ambiente. Os conídios foram coletados em água estéril e a solução conidial foi filtrada em sistema Millex – SV 5 µm e coletada em tubo Falcon estéril.

A suspensão de microconídios foi inoculada em placas de Petri contendo *bottom* agar e *top* agar e deixadas em estufa de 2 a 3 dias. As colônias obtidas foram então transferidas para tubos de ensaio contendo meio VM com higromicina B (50 a 200 µg/mL) e deixados em estufa de 2 a 3 dias e depois em condições ambiente de 7 a 10 dias. O DNA genômico foi extraído e a identificação realizada através de PCR com *primers* específicos.

7.2- Obtenção através da produção de esporos sexuais

Para isto foi realizado o cruzamento da linhagem mutante na ORF NCU03482 (a) com a linhagem FGSC#9718 (A), seguindo o procedimento a seguir.

Inicialmente a linhagem receptora FGSC#9718 foi inoculada em placas de Petri contendo meio SC e incubada à temperatura ambiente no escuro por 3 dias. Após esse período, uma suspensão conidial da linhagem mutante foi inoculada sobre a linhagem receptora e as placas foram incubadas na posição invertida por 10 dias à temperatura ambiente. Após este período observou-se a formação do peritécio (órgão de reprodução feminino) e os ascósporos foram coletados nas tampas das placas através da adição de 1 mL de água estéril. Os ascósporos foram coletados por centrifugação a 1.000 rpm por 5 min, 800 µL do sobrenadante foi desprezado e o restante foi utilizado para ressuspender as células. Um volume correspondente a 20 µL da suspensão foi plaqueado em uma placa contendo meio VM 1 x sólido contendo sacarose 1,5%. Estas placas foram incubadas a 65ºC por 50 minutos para a ativação dos ascósporos, bem como inativação das hifas e conídios. Após esta etapa, as placas foram mantidas à temperatura ambiente por 16 horas. Finalmente, com o auxílio de um estereomicroscópio, ascósporos em germinação foram removidos das placas, com o auxílio de uma espátula e inoculados em tubos de ensaio contendo meio sólido VM 1 x, sacarose 1,5%, acrescidos de higromicina 4 µg/µL e mantidos por 2 dias a 30ºC.

8 - Ensaio de choque térmico

O ensaio de choque térmico foi realizado com a linhagem selvagem FGSC#2489 e a mutante na ORF NCU06679. Uma suspensão de conídios (10^7 conídios/mL) foi inoculada em 300 mL de meio VM líquido e deixada sob agitação constante de 250 rpm por 24 h a 30°C. Após esse período, os micélios foram coletados por filtração a vácuo em papel de filtro e as amostras foram divididas em duas partes. Uma das partes foi congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C (amostra não submetida a choque térmico) e a outra foi transferida para outro frasco contendo meio VM líquido contendo 0,5% de sacarose, pré-aquecido a 45°C, e deixada nesta temperatura por 30 min (amostra submetida ao choque térmico). Em seguida essa amostra foi também coletada por filtração, rapidamente congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C.

9 - Preparo de extrato celular bruto e determinação do conteúdo de glicogênio

O conteúdo de glicogênio foi determinado nas células das linhagens selvagem e mutante na ORF NCU06679, submetidas ou não ao choque térmico. O procedimento utilizado foi o descrito por Freitas et al. (2008), como segue. Uma pequena quantidade do

micélio congelado foi pulverizado com nitrogênio líquido em gral de porcelana. Em seguida, o material foi transferido para um tubo *Eppendorf* de 1,5 mL contendo 1 mL de tampão de lise gelado (Tris-HCl 50mM, pH 8,0, NaF 50 mM, EDTA 1mM, PMSF 1mM, benzamidina 1mM, TLCK 10 µg/mL, antipaína 50 µg/mL e pepstatina A 1µg/mL) e homogeneizado em *vortex*. A mistura foi centrifugada a 10.000 x *g*, 10 min, 4°C, e o sobrenadante recolhido em um tubo *Eppendorf* novo. Uma alíquota foi utilizada para a determinação das proteínas totais do extrato celular pelo método de Hartree modificado utilizando soroalbumina bovina (BSA) como padrão (HARTREE, 1972).

Foram coletados 100 µL do extrato celular bruto, ao qual foi adicionado 25 µL de uma solução de TCA 50%. A solução foi centrifugada a 5.000 x *g*, 10 min, 4°C e o sobrenadante transferido para um novo tubo *Eppendorf*. Adicionou-se então 500 µL de etanol absoluto e a solução foi deixada durante 30 min a -80°C para a precipitação do glicogênio. Em seguida, a solução foi centrifugada a 16.000 *x g,* 10 min, 4°C para a coleta do glicogênio, o qual foi lavado duas vezes com 500 µL de etanol 66%, levemente seco ao ar, e ressuspenso em 400 µL de uma solução de acetato de sódio (acetato de sódio 50 mM, $CaCl_2$ 5 mM, pH 5,2). O glicogênio foi digerido com as enzimas α-amilase (1 µL de uma solução 10 mg/mL) e amiloglicosidade (1 µL de uma solução de 30 mg/mL) a 37°C por aproximadamente 15 h. Um volume de 12,5 µL de cada uma das amostras digeridas foi tomada para a determinação do conteúdo de glicose livre através do kit *Glicose PAP Liquiform* (Labtest), segundo as instruções do fabricante. O conteúdo de glicogênio foi expresso em µg glicogênio/mg de proteínas totais.

10 - Extração de RNA e análise da expressão gênica

Os experimentos de expressão gênica foram realizados na linhagem selvagem FGSC#2489 e na mutante na ORF NCU06679. Para isto, uma suspensão de conídios (aproximadamente 10^7 células/mL) foi inoculada em 1 L de meio VM líquido e colocada a 30ºC, sob agitação constante de 250 rpm. As amostras foram removidas nos tempos 12, 24, 48 e 72 h de crescimento, os micélios coletados por filtração em papel filtro, congelados em nitrogênio liquido e armazenados a -80ºC.

10.1 - Extração de RNA total

O procedimento utilizado para a extração de RNA total foi o que utiliza cloreto do lítio como descrito por SOKOLOVSKY et al. (1990) modificado. Uma pequena quantidade de micélio congelado foi pulverizada em gral de porcelana com nitrogênio líquido e o pó resultante foi transferido para tubos *Eppendorf* contendo uma mistura de 750 µL de tampão

de lise (Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, NaCl 0,6 M, EDTA 10 mM, SDS 4%) e 750 µL de fenol saturado em Tris-HCl 100 mM, pH 8,0. A suspensão foi homogeneizada em *vortex* durante 15 min, em temperatura ambiente e centrifugada a 17.700 x *g*, 10 min, 4ºC. O sobrenadante foi transferido para novo tubo contendo igual volume de clorofórmio e agitado em *vortex* rapidamente para homogeneização. Uma nova centrifugação foi realizada a 17.700 x *g*, 10 min, 4ºC. O RNA contido na fase aquosa foi precipitado com 0,75 volumes de uma solução de LiCl 8 M, mantido a 4ºC por 2 h e coletado a 17.700 x *g*, 10 min, 4ºC. O precipitado foi solubilizado em 300 µL de água tratada com DEPC e novamente precipitado com 30 µL de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 750 µL de etanol absoluto gelado a 4ºC, durante 5 min. O RNA total foi coletado a 17.700 x *g*, 10 min, 4ºC, lavado duas vezes com uma solução de etanol 70% gelada a 17.700 x *g*, 10 min, 4ºC, seco e dissolvido em 50-100 µL de água previamente tratada com DEPC. A concentração do RNA foi medida utilizando o espectrofotômetro NANOVUE™ PLUS.

10.2 – PCR quantitativo em tempo real

As análises da expressão gênica dos genes que codificam as enzimas glicogênio sintase (*gsn*) e glicogênio fosforilase (*gpn*) foram realizadas pela técnica de PCR em tempo real quantitativo (qRT-PCR).

Inicialmente as amostras de RNA (10 µg) foram tratadas com DNAse RQ1 RNAse-Free (Promega®). Após essa primeira etapa, utilizou-se para a síntese do cDNA o kit SuperScript III First Strand (Invitrogen®) e oligo DT. As análises de qRT-PCR foram realizadas no sistema StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems®) utilizando como fluoróforo SYBR® Green e como controle endógeno o gene *tub-2*. Os oligonucleotídeos específicos para os genes *gsn*, *gpn* e *tub-2* estão apresentados no Quadro 2. Foram realizadas 6 replicatas por experimento e os dados foram analisados com o *software* StepOne v2.1 (Applied Biosystems®).

11 - Clonagem da ORF NCU06679 por RT-PCR

A ORF NCU06679 foi amplificada com os oligonucleotídeos NCU06679-F/R e a clonagem da ORF NCU03482 havia sido realizada anteriormente no laboratório. O isolamento do cDNA da ORF NCU06679 foi realizado por RT-PCR a partir do RNA total de uma linhagem selvagem. Inicialmente, cerca de 6 µg do RNA total (item 10.1) foi tratado com a enzima DNase e utilizado para a síntese da primeira fita de cDNA (sscDNA). como descrito anteriormente. A reação de amplificação foi realizada utilizando 2 µL de sscDNA, 0,5 µL (1,25 U) da Enzima *Phusion DNA Polimerase* (Finnzymes), 1 µL dos

Quadro 2 - Oligonucleotídeos utilizados nas análises por PCR em Tempo Real.

Nome	Sequencia
Oligo-dTV	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTV-3'
qGSN-F	5'-TACCAAGCATCACCACCAACCTCT-3'
qGSN-R	5'-TGTCTGCGGCTCTTCTGGGTAAAT-3'
qGPN-F	5'-TGCCAATATCGAAATCACCCGCGA-3'
qGPN-R	5'-TCTCGATGGCCTCAAACACCTTGA-3'
4054Tub-F	5'-CCTCCACCTTCGTCGGTAACTCC-3'
4054Tub-R	5'-GGTACTGCTGGTACTCGGAGACG-3'

oligonucleotídeos F e R (100 pmol/µL), 10 µL de 5x *Phusion Buffer GC*, 1 µL de dNTP (10 mM cada) e 1,5 µL de DMSO. As condições da PCR foram: 98ºC/30 seg, 98ºC/5 seg, 64ºC/30 seg, 72ºC/30 seg por 35 ciclos, 72ºC/5 min.

O produto da reação de amplificação foi separado por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE contendo brometo de etídio, e em seguida, o fragmento de tamanho esperado foi excisado do gel e purificado utilizando o kit GeneClean II (BioMP). Após purificação, foi feita a ligação do fragmento no vetor pMOS-Blue (*Blunt Ended PCR Cloning* kit, GE Healthcare), nas condições indicadas pelo kit, a uma temperatura de 22ºC por 16 h e o produto da reação de ligação foi usado para transformar células competentes da linhagem de *E. coli* DH10B. Após transformação, a seleção dos transformantes foi feita através do plaqueamento em meio de cultura 2YT sólido suplementado com 100 µg/mL de ampicilina, na presença de 40 µg de uma solução de X-GAL (40 mg/mL). As colônias brancas resultantes do crescimento foram inoculadas em meio 2YT líquido e 100 µg/mL de ampicilina e submetidas à extração do DNA plasmidial. As construções plasmidiais foram confirmadas por análise de restrição e as células dos clones positivos foram armazenadas à -80ºC como cultura permanente em glicerol 16% estéril.

12 - Mini-extração de DNA plasmidial

O DNA plasmidial foi extraído pelo método de *boilling prep* descrito por Holmes e Quigley (1981). As colônias bacterianas isoladas foram inoculadas em 5 mL de meio 2YT + glicose 0,2% e crescidas a 37ºC durante uma noite, em seguida, cerca de 3 mL da cultura de células foram transferidos para tubos *Eppendorf* de 1,5 mL e as células coletadas duas vezes através de centrifugação a 16.000 x *g* por 2min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 350 µL de solução STET (Tris 10 mM, pH 8,0, sacarose 8%, Triton X-100 0,5%, EDTA 50 mM, pH 8,0, contendo 30 mg de lisozima). A mistura foi

aquecida em banho de água fervente por 40 seg, e em seguida, centrifugada a 16.000 x *g* por 15 min, 4°C.

Com uso de palitos de dente, o precipitado foi retirado e descartado, sendo os ácidos nucleicos precipitados com 40 µL de acetato de sódio 3 M, pH 5,2 e 420 µL de isopropanol. A seguir, o material foi centrifugado a 16.000 x *g* por 10 min, 4°C. O precipitado foi dissolvido em 100 µL de água pura e acrescentou-se 100 µL de fenol saturado com tampão. Essa mistura foi vigorosamente agitada em *vortex* e, posteriormente, centrifugada a 16.000 x *g* por 10 min, 4°C. Um volume de 90 µL da fase aquosa foi transferido para um tubo *Eppendorf* novo e o DNA plasmidial foi precipitado com 40 µL de acetato de amônio 7,5 M e 300 µL de etanol absoluto gelado a -80ºC por 15 min. O DNA plasmidial foi coletado por centrifugação e lavado duas vezes com 800 µL de etanol 70% gelado (16.000 x *g* por 5 min, 4°C). O DNA foi dissolvido em 20 µL de água após secagem ao ar.

13 - Preparo e transformação das células competentes de *E. coli*

Para o preparo das células competentes da linhagem DH10B de *E. coli*, células não competentes foram rejuvenescidas em 5 mL de meio 2YT e incubadas a 37ºC a 250 rpm, durante uma noite. Após a obtenção de células jovens, 500 µL deste crescimento foram inoculados em 100 mL de meio 2YT e a cultura incubada a 37ºC a 250 rpm até uma densidade óptica a 600 nm de aproximadamente 0,7. As células foram coletadas em tubos Falcon (50 mL) estéreis a 1.300 x *g,* 4 ºC por 15 min em microcentrífuga de mesa. Os concentrados celulares foram lavados com 40 mL de uma solução de $CaCl_2$ 100 mM gelada estéril e dissolvidos em 8 mL de $CaCl_2$ 100 mM estéril. As células competentes foram utilizadas para as reações de transformação.

Para a transformação, aproximadamente 5 µL da reação de ligação de cada uma das construções foram incubados em gelo por 30 min com 100 µL de células competentes. Em seguida, as suspensões foram submetidas ao choque térmico pela transferência para um banho a 42ºC por 2 min. Após o choque térmico, as suspensões foram adicionadas de 400 µL de meio 2YT e incubadas a 37ºC por 60 min. Após este período, as células foram plaqueadas em meio 2YT contendo o antibiótico específico.

14 - Ensaios de produção e purificação das proteínas recombinantes

A proteína codificada pela ORF NCU03482 já havia sido produzida no laboratório na forma recombinante fusionada a cauda poli-His, as condições de produção e purificação já haviam sido padronizadas e por este motivo não está sendo descrita nesse trabalho. A clonagem da mesma ORF no vetor pETSUMO também já havia sido realizada e as etapas

de produção e purificação foram realizadas neste trabalho. A utilização deste vetor leva à produção da proteína recombinante de interesse fusionada à proteína SUMO e contendo a cauda de poli-His na extremidade N-terminal para a purificação por cromatografia de afinidade. O vetor pETSUMO, assim como a construção plasmidial utilizada para a produção e purificação da SUMO protease foram gentilmente cedidos pela Profa. Dr. Ana Paula Araújo do Instituto de Física, USP, São Carlos.

A proteína codificada pela ORF NCU06679 foi produzida na forma recombinante, fusionada a uma cauda de poli-His na região N-terminal e purificada através de cromatografia de afinidade, utilizando Ni^{+2} e/ou Co^{+2} neste trabalho.

14.1 - Subclonagem da ORF NCU06679 em um vetor de expressão de *E. coli*

O vetor de expressão utilizado foi o pET-28a, o qual produz a proteína fusionada a uma cauda de seis resíduos de His na extremidade N-terminal. O inserto existente na construção plasmidial pMOS-6679 foi transferido para o vetor de expressão, conforme descrito a seguir. Um cassete de DNA de 1.341 pb foi removido da construção pMOS-6679 por digestão com as enzimas *Nde*I e *Eco*RI e inserido no vetor de expressão pET28a, digerido com as mesmas enzimas, gerando a construção pET28a-6679. O produto de ligação foi usado para transformar células de *E. coli* DH10B e os clones transformantes foram selecionados em meio contendo canamicina gerando a construção pET-6679. Após a extração do DNA plasmidial, os clones positivos foram confirmados por análise de restrição e sequenciamento de DNA. Culturas permanentes dos clones positivos foram realizadas e armazenadas a -80°C.

14.2 - Ensaio de indução proteica e análise de solubilidade da proteína codificada pela ORF NCU06679

O DNA plasmidial da construção pET-6679 foi utilizado para transformar células competentes de *E. coli* da linhagem produtora BL21-Rosetta(DE3)pLys-S. Um pré-inóculo fresco das células de *E. coli* carregando o plasmídeo foi preparado e inoculado em 200 mL de meio 2YT acrescido de canamicina 100 µg/mL e cloranfenicol 34 µg/mL. A cultura foi mantida a 37°C e 250 rpm durante 4 h, até uma DO_{600nm} de aproximadamente 0,6 – 0,8. Em seguida, a produção da proteína recombinante foi induzida pela adição de IPTG numa concentração final de 0,4 mM durante 4 h. Inicialmente, o ensaio de indução da proteína recombinante foi realizado juntamente com um controle positivo (pET-CopB), o qual produz a proteína CopB de *Xanthomonas* citri com aproximadamente 55 kDa e um controle negativo (pET28a vazio). Após o período de indução, as células foram coletadas a 35.000 x

g, 4°C, 20 min e ressuspensas em tampão de lise. Como a proteína foi produzida quase que exclusivamente na forma insolúvel, diferentes tampões de lise e outras condições de indução foram utilizados.

Os seguintes sistemas tampões foram avaliados:

Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 500 mM, NP400 ,5%, imidazol 150 mM, glicerol 5%

Hepes 50 mM, pH 7,0, NaCl 500 mM, NP40 0,5%, Imidazol 80 mM, glicerol 5%

Hepes 50 mM, pH 7,0, NaCl 500 mM, NP40 0,5%, Imidazol 150mM, glicerol 5%

Todos os tampões foram acrescidos de uma mistura de inibidores de proteases (PMSF 0,05 mM, benzamidina 1 mM, antipaína 5 µg/mL, pepstatina A 1 µg/mL e de TLCK 10 µg/mL. As culturas celulares foram também induzidas sob diferentes condições de temperatura de indução (12°C, 30°C e 37°C).

Para a lise, as células foram submetidas a três ciclos de choque térmico, alternando entre congelamento em N_2 líquido e água fria. O rompimento celular foi finalizado em sonicador, através de 5 ciclos de sonicação de 10 seg, com intervalos de 1 min em banho de gelo. Os restos celulares foram removidos por centrifugação a 20.800 x *g*, 4ºC, 20 min e o sobrenadante contendo a proteína recombinante foi coletado. As amostras foram quantificadas para proteínas e 20 µg/µL de proteína total foram fracionadas por SDS-PAGE.

14.2.1 – Ensaio de *Western Blot*

Para a confirmação da produção da proteína recombinante, o ensaio de *Western blot* foi realizado. Após o fracionamento por eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose em um sistema Mini Trans-Blot Eletrophoretic Transfer Cell (BioRad) usando o tampão de transferência (Tris-HCl 20 mM pH 8,0, glicina 150 mM, 200 mL/L de metanol) durante 2 h a 100 V/250 mA. A membrana foi incubada com uma solução de 6% de leite em pó desnatado em tampão 1 x TBST (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, 0,05% tween-20) com suave agitação durante 2 h para permitir o bloqueio da mesma. Após esse período, a membrana foi lavada com 1X TBST (3 vezes por 5 min) e incubada com anticorpo monoclonal anti-His conjugado com fosfatase alcalina (Sigma, diluição 1:10.000 em 1X TBST + 3% leite) por 2 h à temperatura ambiente, com agitação. Em seguida, a membrana foi novamente lavada três vezes com 1 x TBST e procedeu-se a revelação em 10 mL de tampão bicarbonato ($NaHCO_3$ 100 mM, $MgCl_2$ 1 mM, pH 9,8) adicionado de 100 µL NBT (cloreto p-nitroazul de tetrazólio) (30 mg/mL em 70% DMF) e 100 µL BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indol-fosfato de p-toluidina) (15 mg/mL em DMF).

14.3 - Produção e purificação da proteína recombinante codificada pela ORF NCU06679 em pequena escala

A purificação da proteína His::6679 foi primeiramente realizada por cromatografia de afinidade em bancada, usando resina de Ni^{2+}-NTA-agarose (Qiagen) ou His-Select Cobalt Affinity Gel (Sigma). A produção foi realizada em pequena escala. A produção da proteína foi induzida como descrito anteriormente e células foram ressuspensas em 5 mL do tampão de lise gelado (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 500 mM, NP400 5%, imidazol 150 mM, glicerol 5%) acrescido de inibidores de proteases, lisadas e o extrato celular centrifugado para a obtenção das frações do precipitado (P) e sobrenadante (S). O precipitado foi ressuspenso em 1 mL do mesmo tampão e uma amostra foi reservada para análise de SDS-PAGE (amostra P). Antes de seguir com a purificação da proteína recombinante contida no sobrenadante, uma alíquota foi reservada para a análise por SDS-PAGE (amostra S).

A proteína recombinante contida no sobrenadante (2 mL) foi inicialmente incubada com 200 µL da resina de Ni^{2+} previamente condicionada em tampão de lavagem (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, glicerol 10% v/v) contendo os inibidores de proteases (PMSF 0,05 mM, benzamidina 1 mM, antipaína 5 µg/mL, pepstatina A 1 µg/mL e TLCK 10 µg/mL) a 4°C e suave agitação, durante 2 h. Após o período de incubação, o sobrenadante (amostra FT1 – *flow through*) foi removido por centrifugação a 9.400 x *g,* 2 min, 4°C. A resina contendo a proteína recombinante foi lavada 5 x com tampão de lavagem gelado acrescido de inibidores de proteases e todas as lavagens foram coletadas e combinadas em uma única fração (FT2 – *flow through*) para verificar uma possível perda da proteína recombinante durante a etapa de lavagem. Depois de lavada a resina, a proteína foi eluída 2 x em 300 µL de tampão de eluição (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM, glicerol 10%, PMSF 0,05 mM, benzamidina 1 mM, antipaína 5 µg/mL, pepstatina A 1 µg/mL e TLCK 10 µg/mL) contendo 100, 200 e 300 mM de imidazol, respectivamente (frações E1, E2 e E3), totalizando 600 µL para cada fração. O procedimento da cromatografia com resina de Co^{+2} foi o mesmo adotado para a resina contendo Ni^{+2}. Todas as frações foram quantificadas e analisadas em gel SDS-PAGE 12%.

14.4 - Produção e purificação da proteína recombinante codificada pela ORF NCU06679 em maior escala

Um pré-inóculo fresco, contendo células de *E. coli* carregando a construção pET-6679 foi preparado e inoculado em 1 L de meio 2YT suplementado com glicose 0,2% acrescido de canamicina 100 µg/mL e cloranfenicol 34 µg/mL. A produção da proteína foi induzida como descrito anteriormente e as células foram ressuspensas em 50 mL de tampão de lise gelado (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM, imidazol 80 mM, glicerol

10%, Triton X-100 0,5%, Tween 20 0,5%) acrescido de uma mistura de inibidores de proteases. As células foram lisadas através de choque térmico e o rompimento celular foi finalizado por sonicação. Os restos celulares foram removidos por centrifugação e o sobrenadante contendo a proteína recombinante foi coletado e submetido a uma cromatografia de afinidade com coluna Histrap GE®.

Para a purificação da proteína a coluna foi inicialmente equilibrada em tampão A (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM, imidazol 100 mM, glicerol 10%). Cerca de 30 mL do sobrenadante, obtido anteriormente foi filtrado em membrana (0,22 μ) e aplicado na coluna e a mesma foi lavada com o mesmo tampão. A seguir, foi aplicado a tampão B (Tris-HCl, 50 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM, imidazol 1M, glicerol 10%) para a eluição da proteína em um gradiente de imidazol de 100 mM a 1 M. Frações de 2 mL foram coletadas durante a etapa de eluição da proteína e algumas frações foram analisadas em gel SDS-PAGE 12% para a identificação das frações cromatográficas contendo a proteína de interesse. As frações que mostraram maior grau de pureza da proteína foram reunidas e dialisadas contra o mesmo tampão de eluição, mas contendo concentrações decrescentes de imidazol (300 mM, 150 mM e finalmente sem imidazol).

14.5 - Produção e purificação da proteína recombinante codificada pela ORF NCU3482 fusionada a proteína SUMO

Para a produção da proteína recombinante fusionada à proteína SUMO, utilizou o vetor de expressão pETSUMO, mostrado na Figura 8. A sequência da ORF NCU03482 foi inserida no vetor com uso das enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI para produzir a proteína recombinante fusionada à proteína SUMO em sua porção N-terminal. Observando o mapa do vetor é possível notar que além da sequência codificadora da proteína SUMO, há também a sequência codificadora da cauda poli-His, a qual é importante para a purificação da proteína por cromatografia de afinidade. Pode-se notar também a presença de um sítio de clivagem para a enzima SUMO protease. Com a clivagem com esta protease é possível obter a proteína recombinante não fusionada. Após a etapa de clonagem no vetor de expressão realizou-se então sua produção e purificação.

Um pré-inóculo fresco, contendo células de *E. coli* carregando a construção pETSUMO-3482 foi preparado e inoculado em 1 L de meio 2YT suplementado com glicose 0,2% e acrescido de canamicina 100 μg/mL e cloranfenicol 34 μg/mL. A cultura foi mantida a 37°C e 250 rpm durante 4 h, até uma DO_{600nm} de aproximadamente 0,6 – 0,8. Em seguida, a produção da proteína recombinante foi induzida pela adição de IPTG numa concentração final de 0,4 mM, a 12°C, 180 rpm durante 20 h. Após indução, as células foram coletadas e ressuspensas em 50 mL de tampão de lise gelado (Hepes 50 mM, pH 7,0, NaCl 500 mM,

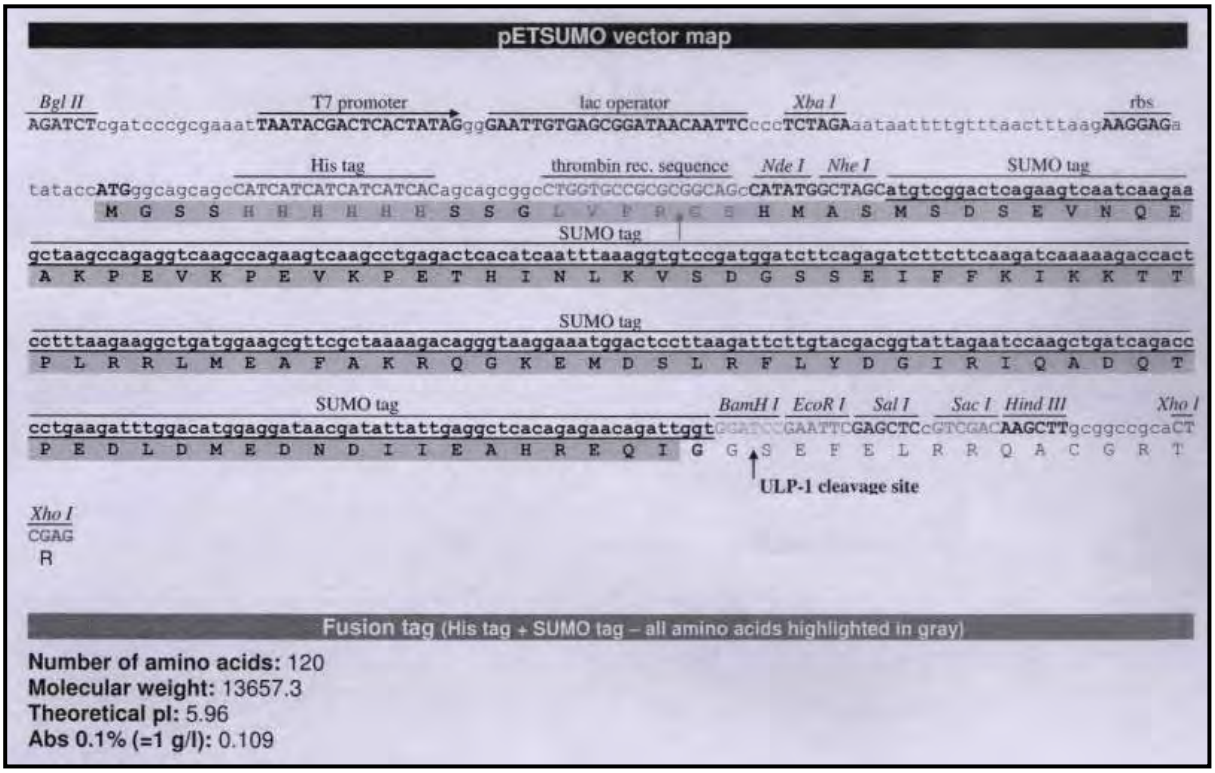


Figura 8 – Mapa do vetor de expressão pETSUMO. O mapa apresenta a sequência codificadora para a proteína SUMO e uma sequência codificadora para seis resíduos de histidina. O sítio de clivagem da SUMO protease também está representado.

imidazol 150mM, glicerol 5%) acrescido de uma mistura de inibidores de proteases. O rompimento celular foi realizado em sonicador, os restos celulares foram removidos por centrifugação e o sobrenadante contendo a proteína recombinante foi coletado e submetido a uma cromatografia de afinidade com coluna Histrap GE®.

Para a purificação da proteína a coluna foi inicialmente equilibrada em tampão A (Hepes 50 mM, pH 7,0, NaCl 500 mM, imidazol 150mM, glicerol 5%). Cerca de 30 mL do sobrenadante foi filtrado em membrana (0,22 μ) e aplicado na coluna. A seguir, foi aplicado o tampão B (Hepes 50 mM, pH 7,0, 500 mM NaCl, 1,5 M imidazol, 10% glicerol) para a eluição da proteína em um gradiente de imidazol de 150 mM a 1,5 M. Frações de 2 mL foram coletadas durante a etapa de eluição da proteína e algumas frações foram analisadas em gel SDS-PAGE 10% para a identificação das frações cromatográficas contendo a proteína de interesse. As frações que mostraram maior grau de pureza da proteína foram reunidas e dialisadas contra o mesmo tampão de eluição, mas contendo concentrações decrescentes de imidazol (300 mM, 150 mM e finalmente sem imidazol).

A protease SUMO foi também produzida e purificada para a utilização na clivagem e liberação da proteína recombinante de interesse. Para isto, um pré-inóculo fresco, contendo células de *E. coli* transformadas com o plasmídeo foi preparado e inoculado em 1 L de meio

2YT suplementado com glicose 0,2%, acrescido de canamicina e cloranfenicol. A cultura foi crescida até uma DO_{600nm} de aproximadamente 0,6 – 0,8 e a produção da proteína recombinante foi induzida pela adição de IPTG numa concentração final de 0,1 mM, a 18°C, 180 rpm durante 20 h. Após o período de indução, as células foram coletadas e ressuspensas em 30 mL de tampão de lise gelado (Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM, glicerol 10%) acrescido de uma mistura de inibidores de proteases. O rompimento celular foi realizado em sonicador, os restos celulares foram removidos por centrifugação e o sobrenadante contendo a proteína recombinante foi coletado e submetido a uma cromatografia de afinidade com coluna Histrap GE®.

Para a purificação da proteína a coluna foi inicialmente equilibrada no tampão de lise contendo imidazol 50 mM e eluída no mesmo tampão contendo imidazol 500 mM para a eluição da proteína em um gradiente de imidazol de 50 mM a 500 mM. Frações de 2 mL foram coletadas durante a etapa de eluição da proteína e algumas frações foram analisadas em gel SDS-PAGE 10% para a identificação das frações cromatográficas contendo a proteína de interesse.

15 – Localização celular dos produtos das ORFs NCU03482 e NCU06679. Experimentos preliminares para a produção das proteínas fusionadas a GFP

15.1 - Preparo dos *split markers* para a produção das proteínas fusionadas a GFP

Pelo fato das proteínas codificadas pela ORF NCU06679 e NCU03482 presentes no genoma do fungo ainda não possuírem uma função definida, experimentos foram iniciados com o objetivo de introduzir em ambas as sequências genômicas a proteína GFP na região C-terminal. Um esquema detalhado da estratégia utilizada está descrita na Figura 9. Para isso foi utilizado o vetor pZErO-GFP-*hph* (HONDA & SELKER, 2009) como DNA molde para a amplificação da sequência codificadora da GFP por PCR. Este fragmento de DNA possui 2.281 pb e foi amplificado utilizando o kit *Phusion DNA Polimerase* (Finnzymes) e os oligonucleotídeos 10XGly-F e LoxP-R (Quadro 3), nas seguintes condições: 35 ciclos de 98°C por 5 seg (desnaturação), 58°C por 5 seg (anelamento dos *primers*) e 68°C por 1 min (extensão), após desnaturação inicial de 98°C de 10 seg.

Em seguida, foram utilizados oligonucleotídeos para a amplificação de regiões *upstream* a cada ORF (6679GLY-F/R e 3482GLY-F/R) e *downstream* a cada ORF (6679Lox-F/R e 3482Lox-F/R) a partir do *stop codon,* contendo aproximadamente 1 kb cada uma. A sequência nucleotídica 5´-CCTCCGCCTCCGCCTCCGCCGCCTCCGCC-3´ (em

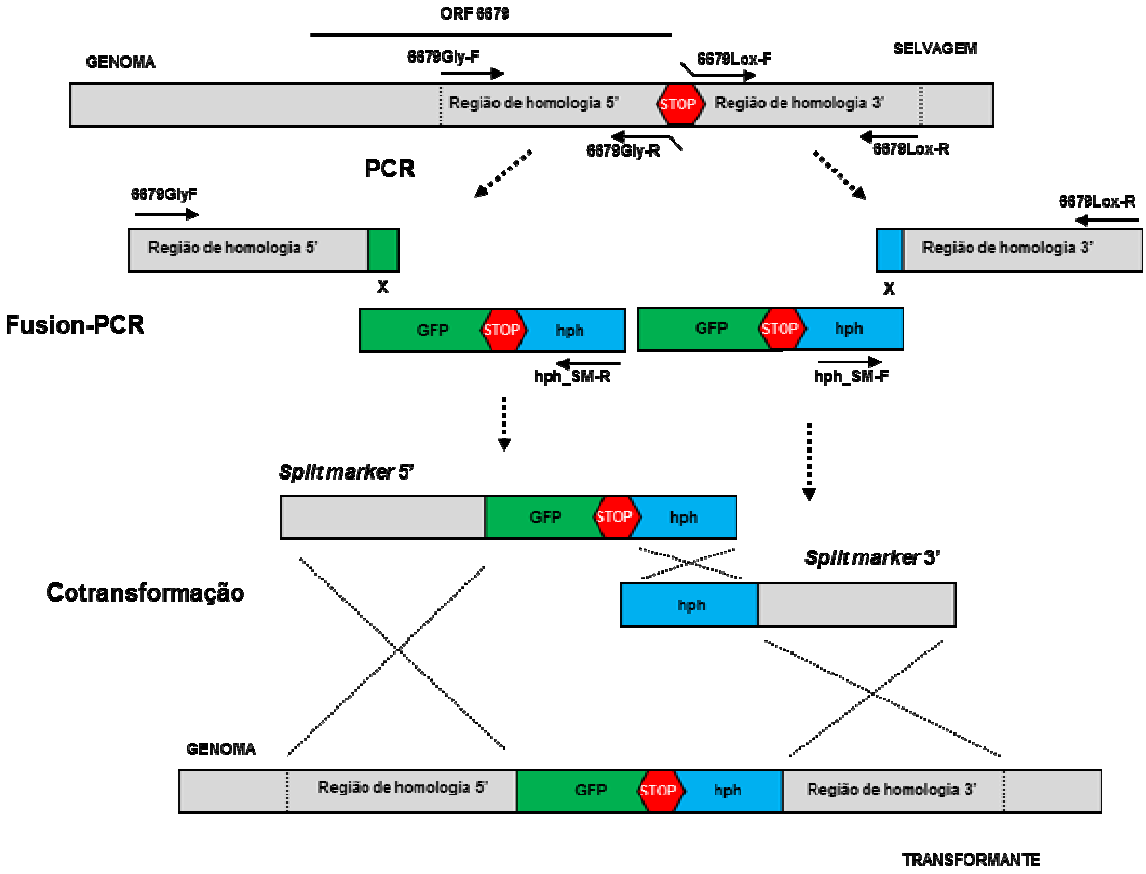


Figura 9- Representação esquemática do procedimento utilizado para a introdução de GFP no *locus* genômico. As etapas utilizadas estão descritas no texto (GONÇALVES, 2012).

Quadro 3 - Oligonucleotídeos utilizados para a inserção de GFP.

Nome	Sequência
10XGly-F	5'-GGCGGAGGCGGCGGAGGCGGAGGCGGAGG-3'
LoxP-R	5´-CGAGCTCGGATCCATAACTTCGTATAGCA-3´
hph_SM-F	5´-TCGCCTCGCTCCAGTCAATGACC-3´
hph_SM-R	5´-AAAAAGCCTGAACTCACCGCGACG-3
6679GLY-F	5'-AGAACCCCAAAGACAAGAGC-3'
6679GLY-R	5'-**CCTCCGCCTCCGCCTCCGCCGCCTCCGCC**GTGACTAGATTGCTTCGGTT-3'
6679Lox-F	5'-**TGCTATACGAAGTTATGGATCCGAGCTCG**GATGAGGAAACTTCGGCCTT-3'
6679Lox-R	5'-AGACGAAGTGGTTTGGGATT-3'
3482GLY-F	5'-GTCTGGACCCGAGCATCTAC-3'
3482GLY-R	5'-**CCTCCGCCTCCGCCTCCGCCGCCTCCGCC**ACAAATAAACTCCTGACCCT-3'
3482Lox-F	5'-**TGCTATACGAAGTTATGGATCCGAGCTCG**TCATCAGCTGTTGTTGTTTC-3'
3482Lox-R	5'-AGGGGGAGAGAGAGAAAGAT-3'

negrito nas sequências dos oligonucleotídeos 6679GLY-R e 3482GLY-R) foi adicionada na extremidade 5' dos oligonucleotídeos e corresponde à parte da sequência codificadora da extremidade N-terminal de GFP. A sequência 5´-TGCTATACGAAGTTATGGATCCGAGCTCG-3´ (em negrito e sublinhado nas sequências dos oligonucleotídeos 6679Lox-F e 3482Lox-F) foi adicionada na região 5´ dos oligonucleotídeos e corresponde à parte da sequência codificadora da extremidade C-terminal de Hph. As reações de amplificação tanto das regiões *upstream* como *downstream* ao *stop códon* de cada ORF foram realizadas nas mesmas condições para a amplificação da sequência nucleotídica codificadora de GFP, como descrito anteriormente.

Para a síntese do *splitmarkers* 5´ foram utilizados os primers 6679GLY-F e hph_SM-R (para a ORF NCU06679) e 3482GLY-F e hph_SM-R (para a ORF NCU03482) e aproximadamente 300 ng dos fragmentos de PCR obtidos anteriormente mais o fragmento obtido por PCR correspondente à GFP. Este fragmento da GFP contém na extremidade 3' a sequencia para o *stop codon* da GFP seguido da sequência codificadora do gene *hph.* A amplificação para a obtenção do fragmento final foi obtida por PCR de fusão. Para a síntese dos *splitmarker* 3´ foram utilizados os primers 6679LOX-R e hph_SM-F e 3482LOX-R e hph_SM-F e aproximadamente 300 ng dos fragmentos de PCR obtidos anteriormente. O fragmento de PCR da GFP é o mesmo fragmento utilizado para a amplificação do *splitmarker* 5´. Após a obtenção dos *splitmarkers,* 400 ng de cada um foram utilizados para a transformação de conídios da linhagem FGSC#9718 do fungo *N. crassa*. A obtenção do fragmento final é feita pelo próprio fungo.

15.2 - Transformação de conídios do fungo

A inserção das construções de DNA em *N. crassa* foi realizada através da eletroporação de conídios da linhagem FGSC#9718. Após sua coleta, este material foi centrifugado a 1.600 x *g,* o sobrenadante foi descartado e os conídios foram ressuspensos em 1,5 mL de uma solução de sorbitol 1M. Para a transformação do fungo *N. crassa* foram adicionados 400 ng de cada um dos *splitmarkers* a 50 µL da suspensão conidial e a mistura foi mantida em gelo por 10 min. Em seguida, transferiu-se o conteúdo do tubo para uma cubeta de eletroporação estéril e a transformação foi realizada por eletroporação em um eletroporador Gene Pulser II (BioRad), nas seguintes condições: 1500 Volts, 600 Ω, 25 µFaradays.

Após a eletroporação, foi adicionado 1 mL de sorbitol 1M à solução no interior da cubeta e 1/3 deste volume foi transferido para um tubo estéril contendo 5 mL de VM 1 x, sem fonte de carbono. Este tubo foi agitado a 200 rpm a 30ºC por 1 h para a recuperação dos conídios. Após esta etapa, foram adicionados 5 mL de *top* ágar pré aquecido a 55ºC. Os

tubos foram então agitados por inversão e dispensados em placa contendo *bottom* ágar contendo 4 µg/mL de higromicina e sorbose para induzir o crescimento colonial. Este material foi deixado a 30ºC por 2 dias para o aparecimento dos transformantes na forma colonial. As colônias isoladas foram transferidas para tubos de ensaio contendo 1 mL de meio mínimo de Vogel + sacarose 2% acrescidos de 4 µg de higromicina. As culturas foram crescidas até o aparecimento de conídios, os quais foram inoculados em culturas líquidas para a obtenção de micélios utilizados na extração de DNA genômico.

Esta parte do trabalho foi realizada em colaboração com um Pós-Doutorando do laboratório.

Resultados e Discussão

1 – Características bioquímicas das proteínas estudadas

A proteína codificada pela ORF NCU06679 está anotada no banco de dados do fungo como *histone acetyltransferase* tipo B, subunidade 2, e apresenta seis domínios WD40 ao longo da sequência polipeptídica. Este domínio é característico de proteínas que estão envolvidas com diversos processos celulares, entre eles proteínas reguladoras da transcrição gênica. A proteína codificada pela ORF NCU03482 está anotada como uma RuvB-like helicase e apresenta os domínios AAA+ e TIP49, presentes em proteínas com importantes funções em processos nucleares, tais como remodelagem de cromatina e regulação da transcrição. A figura 10 mostra representações esquemáticas de ambas proteínas.

A



B

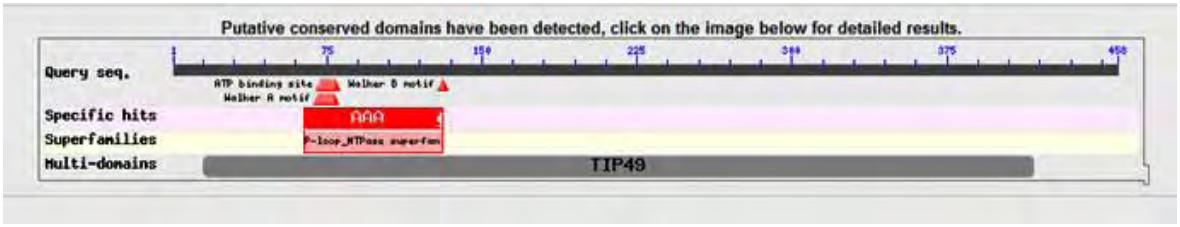


Figura 10- Representação esquemática das proteínas codificadas pelas ORFs NCU06679 e NCU03482. A– Proteína codificada pela ORF NCU06679. Os domínios WD40 estão representados por triângulos verdes. A região em rosa representa sequências com baixa complexidade ou domínios com funções desconhecidas (http://smart.embl-heidelberg.de). **B–** Proteína codificada pela ORF NCU03482. Os domínios AAA+ e TIP49 estão representados (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

Análises por Blast foram realizadas com os produtos das duas ORFs e a partir dos dados obtidos foram realizados alinhamentos de sequências com algumas proteínas identificadas como ortólogas. A Figura 11 mostra o alinhamento de sequências do produto da ORF NCU03482 com as sequências polipeptídicas de algumas proteínas ortólogas. A proteína de *N. crassa* apresenta identidade de 70% com a proteína RuvB-*like* 1 de *H. sapiens* e 71% de identidade com a proteína Rvb1p de *S. cerevisiae.* Pode-se observar que as regiões dos domínios AAA+ e TIP49, representadas em preto e vermelho, respectivamente, se mostram bem conservadas entre os diferentes organismos.

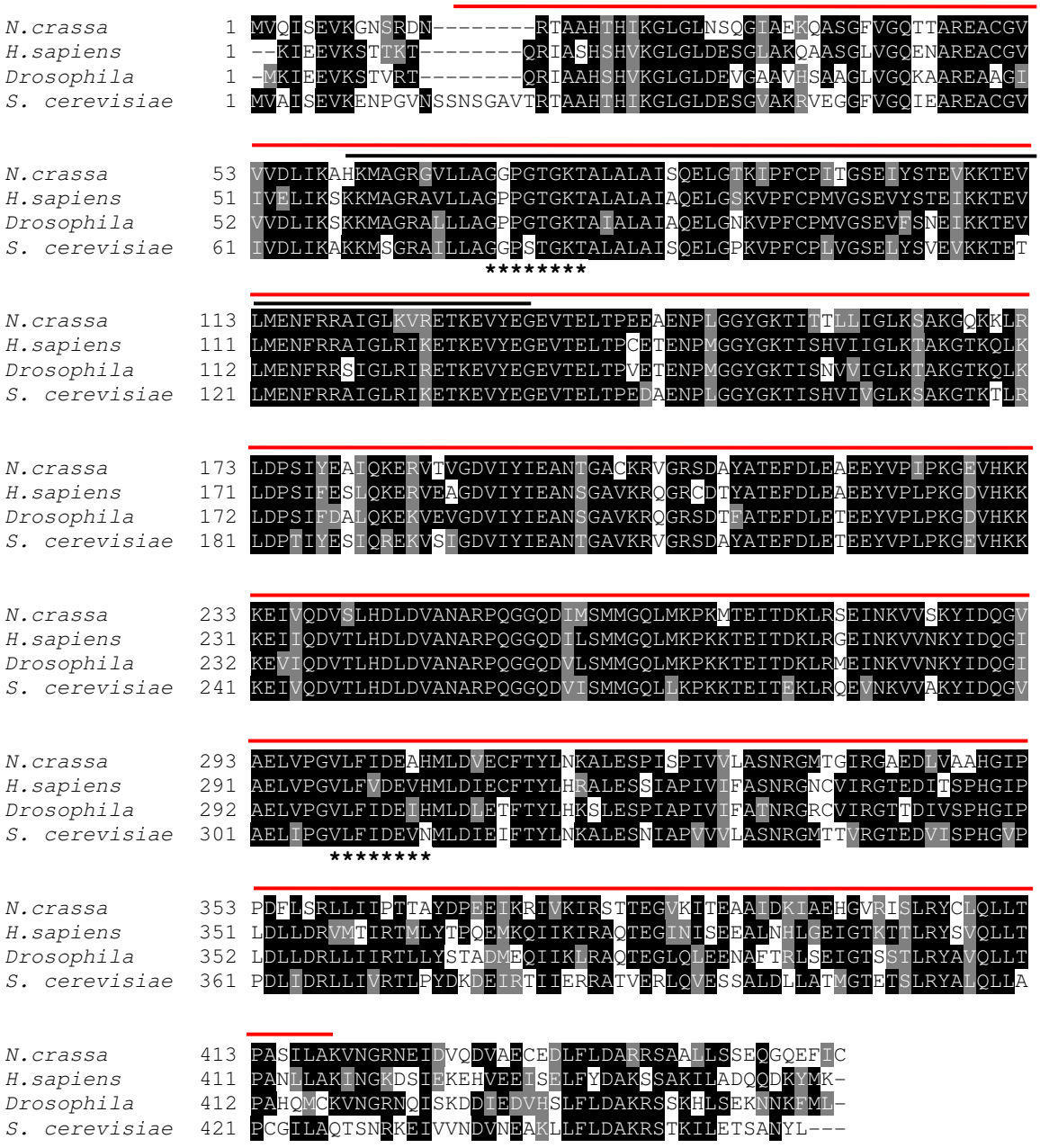


Figura 11- Alinhamento múltiplo de sequências polipeptídicas do produto da ORF NCU03482 de *N. crassa* com as proteínas RuvB-*like* 1 de *H. sapiens,* Rvb1p de *S. cerevisiae* e pontin de *D. melanogaster.* O alinhamento foi realizado por ClustalW e os aminoácidos idênticos (em preto) e as trocas conservativas (em cinza) foram identificados por BoxShade. O traço vermelho indica onde está situada a região do domínio de ligação Tip49 e o preto mostra a região do domínio AAA+. Os domínios Walker A e B estão mostrados com asterisco.

A Figura 12 mostra um alinhamento de sequências entre o produto da ORF NCU06679 e sequências polipeptídicas de algumas proteínas ortólogas. A proteína de *N. crassa* apresenta cerca de 50% de identidade com a proteína *histone-binding protein RBBP4 isoform a* de *Homo sapiens* e 45% de identidade com a proteína *chromatin assembly factor 1 subunit, isoform B* de *Drosophila melanogaster.* Pode-se observar que há conservação da região dos domínios WD 40 presentes na proteína, sinalizados pelo traço de cor preta.

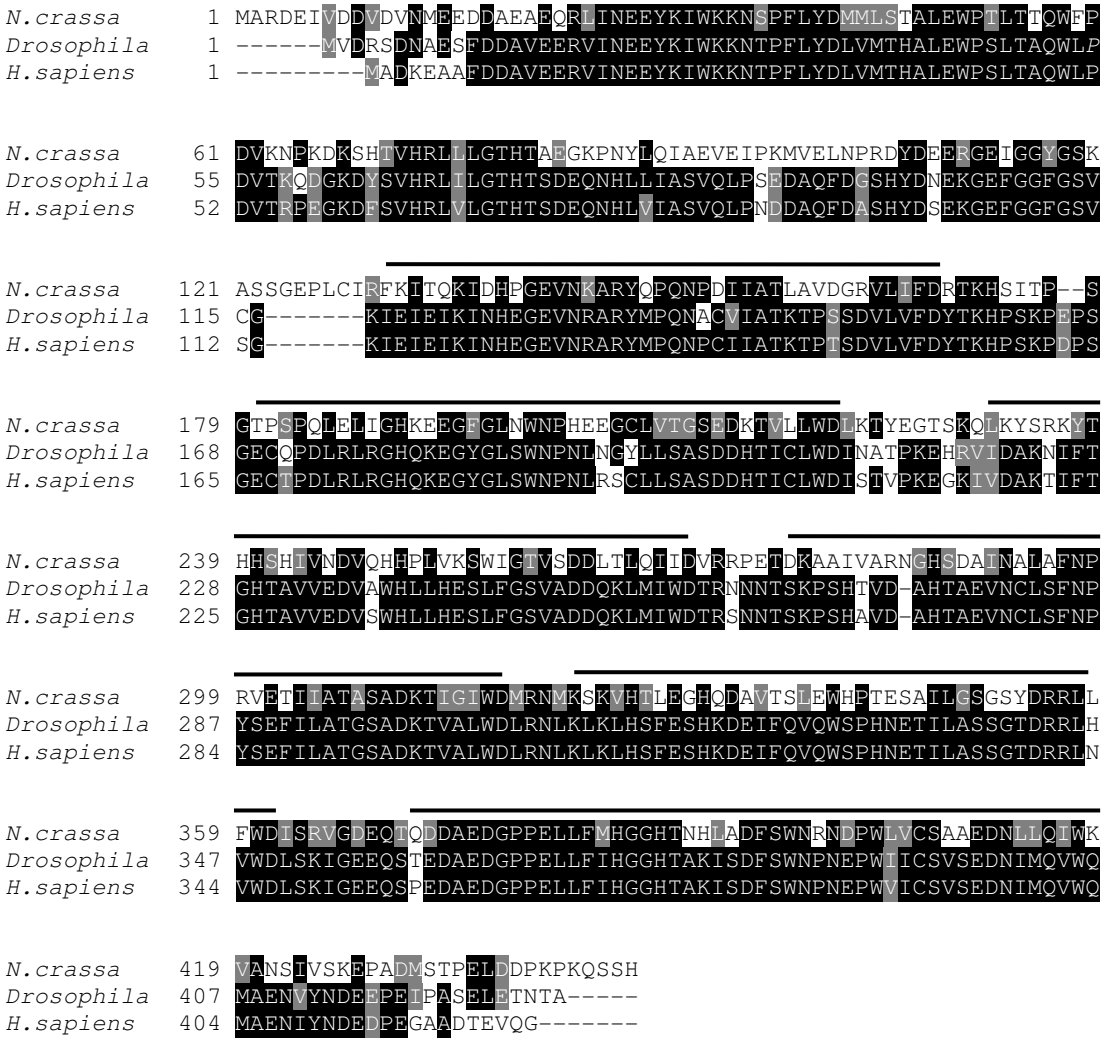


Figura 12- Alinhamento múltiplo de sequências polipeptídicas da ORF NCU06679 de *N. crassa* com as proteínas *histone-binding protein RBBP4 isoform a* de *H. sapiens* e *chromatin assembly factor 1 subunit, isoform B* de *D. melanogaster.* O alinhamento foi realizado por ClustalW e os aminoácidos idênticos (em preto) e as trocas conservativas (em cinza) foram identificados por BoxShade. O traço em preto indica onde estão localizadas as regiões dos domínios WD40 ao longo da sequência polipeptídica.

2 - Caracterização das linhagens mutantes

2.1 - Confirmação dos nocautes gênicos

A confirmação dos nocautes gênicos foi realizada uma vez que as linhagens mutantes não foram construídas em nosso laboratório. A linhagem mutada na ORF NCU03482 foi disponibilizada como um heterocário (de acordo com FGSC) possuindo núcleos geneticamente diferentes, portanto nem todos os núcleos contém a mutação na ORF específica. Já a linhagem mutante na ORF NCU06679 foi disponibilizada como um homocário, contendo o gene alvo nocauteado pela inserção da marca de seleção a higromicina, portanto apresenta todos os núcleos mutados. Para confirmar esta informação, foi realizada a extração do DNA genômico das linhagens mutantes e da selvagem (FGSC#9718), os quais foram utilizados para amplificar as sequências nucleotídicas por PCR. Na Figura 13A é possível observar a amplificação da ORF NCU06679 na linhagem selvagem através da presença de um fragmento de 1.341 pb e ausência de uma banda com tamanho aproximado no DNA genômico da linhagem mutante. Já com a linhagem mutante na ORF NCU03482 (Figura 14B) é possível observar que houve a amplificação do fragmento de 1.377 pb, tanto na linhagem selvagem como na linhagem mutante, o que é esperado para uma linhagem heterocária.

2.2 – Purificação de homocário da linhagem mutante na ORF NCU03482

Como descrito acima a linhagem mutada na ORF NCU03482 se apresenta como um heterocário. Na tentativa de se obter uma linhagem homocária nesta ORF, procedimentos foram realizados para a purificação de homocários. Um dos métodos utilizados foi a produção de microconídios, o quais são células uninucleadas. Para isso realizou-se a indução da microconidiação e com isso é possível realizar a separação de núcleos mutados e não mutados. Estes microconídios foram então separados por filtração e plaqueados em meio contendo sorbose para a formação de colônias. Estas foram separadas e crescidas em meio VM contendo ou não higromicina. A presença do antibiótico constitui um meio seletivo para a linhagem homocária, uma vez que o nocaute dos genes foi realizado através da inserção da marca de resistência à higromicina. Com os micélios obtidos a partir dessa seleção, o DNA genômico foi extraído e utilizado para PCR com os oligonucleotídeos específicos para a ORF NCU03482. Na Figura 14 é possível observar a amplificação da ORF em todas as colônias selecionadas, mostrando assim que a purificação de homocários não foi possível de ser realizada.

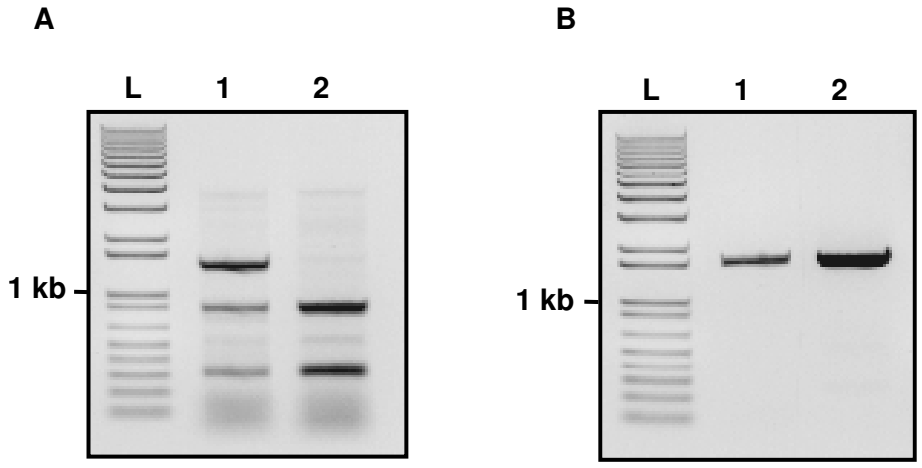


Figura 13– Amplificação de fragmentos correspondentes as ORFs NCU06679 e NCU03482 a partir do DNA genômico das linhagens selvagem e mutantes. A- Amplificação do fragmento correspondente à ORF NCU06679 contendo 1.341 pb.**1-** Linhagem selvagem FGSC#9718. **2-** Linhagem mutante na ORF NCU06679. **B-** Amplificação do fragmento correspondente à ORF NCU03482 contendo 1.377 pb. **1-** Linhagem selvagem FGSC#9718. **2-** Linhagem mutante na ORF NCU06679 **L**, ladder de DNA de 1 kb . Eletroforese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo 0,5 µg/mL.

Outro método utilizado foi através da produção de ascósporos resultantes do processo de reprodução sexual. Para isto foi realizado o cruzamento da linhagem mutante na ORF NCU03482 (a) com a linhagem FGSC#9718 (A), as quais apresentam *mating type* opostos. Após a indução de formação do protoperitécio em meio pobre de nitrogênio, as linhagens foram cruzadas resultando na formação do peritécio (órgão de reprodução feminino) e liberação dos ascósporos. Estes foram coletados e inoculados em meio VM sem higromicina. Após o início da germinação dos ascósporos, eles foram transferidos para meio VM contendo sorbose na presença do agente seletivo higromicina. Após transferência, o crescimento foi monitorado diariamente e foi possível observar que após 5 dias não houve crescimento neste meio, indicando que o nocaute da ORF NCU03482 torna o mutante inviável.

Sabe-se que a proteína RuvBL1, em geral, é uma proteína altamente conservada, desde levedura até humanos, e está associada a diversos processos celulares importantes (MATIAS et al., 2006). Trabalhos na literatura mostraram que o gene que codifica para a RuvBL1 é essencial para a viabilidade de *S. cerevisiae* (QIU et al., 1998), de *Drosophila melanogaster* (BAUER et al., 2000) e de *Caenorhabditis elegans* (citado por IZUMI et al., 2012). Como esse gene é essencial para diversos organismos, é provável que ele também seja essencial para *N. crassa,* o que explica a não obtenção do crescimento de culturas contendo apenas o núcleo mutado.

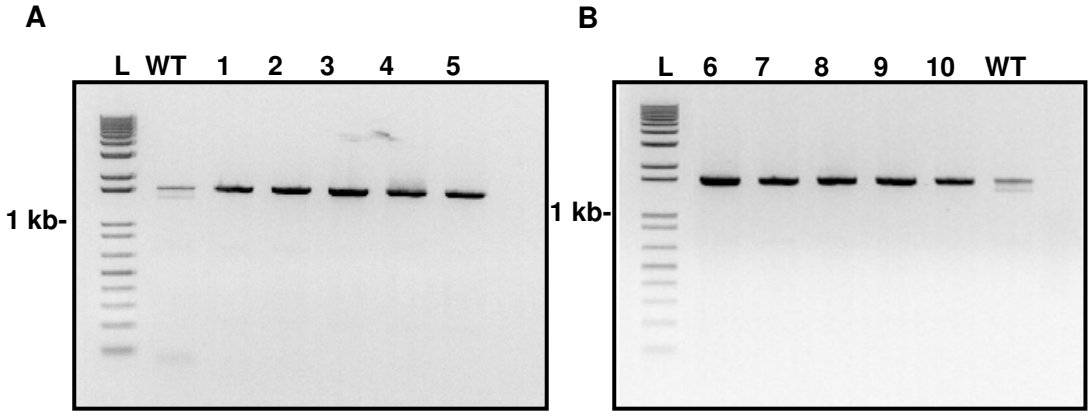


Figura 14- Purificação de homocários da linhagem nocauteada na ORF NCU03482. Amplificação do fragmento de 1.377 pb correspondente a ORF NCU03482. **A-** Amplificação da ORF nas linhagens utilizando o DNA genômico: **WT**- Linhagem selvagem, e das culturas denominadas **1**, **2**, **3**, **4**, **5**. **B**- Amplificação da ORF nas linhagens utilizando o DNA genômico: das culturas denominadas **6**, **7**, **8**, **9**, **10** e **WT**- Linhagem selvagem. Eletroforese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo 0,5 µg/mL.

2.3 - Análises morfológicas da linhagem mutante NCU06679

Devido ao fato da linhagem mutante na ORF NCU03482 ser heterocário, as análises morfológicas foram realizadas apenas com a linhagem mutante na ORF NCU06679 e comparadas à linhagem selvagem FGSC#2489. É interessante investigar se a ausência da proteína codificada por essa ORF pode afetar o crescimento e morfologia da linhagem mutante. Para isso foram realizadas análises de crescimento, bem como verificação da produção de hifas aéreas, conidiação e extremidades das hifas.

2.3.1 - Crescimento em meio sólido

A análise de crescimento da linhagem mutante juntamente com a linhagem selvagem foi avaliada em frascos contendo meio VM sólido incubado a 30°C durante 3 dias em estufa. Em seguida, esses frascos foram transferidos para a temperatura ambiente por mais 5 dias. Após esse período foi possível a avaliação da presença/ausência de hifas aéreas e pigmentação. Foi possível observar que a linhagem mutante apresentou crescimento semelhante ao da linhagem selvagem, porém com aspecto diferente. A linhagem selvagem (Figura 15A) apresentou produção de hifas aéreas e coloração alaranjada característica, devido à presença de pigmentos carotenoides. A linhagem mutante (Figura 15B) apresentou uma coloração um pouco menos acentuada, também apresentou hifas aéreas, porém com um aspecto “cotonoso”.

Os conídios foram coletados destas linhagens em água destilada, filtrados em gaze estéril e contados em câmara de Neubauer. A linhagem selvagem apresentou um número maior de conídios ($3,0x10^7$ conídios/mL) em comparação com a linhagem mutante estudada ($1,0x10^6$ conídios/mL), mostrando que a proteína deve estar participando de processos relacionados ao desenvolvimento do fungo.

A **B**



Figura 15 – Análise do crescimento das linhagens selvagem e mutante em meio sólido. Conídios foram inoculados no centro do meio de cultura, as linhagens foram mantidas inicialmente a 30°C por 72 h e, posteriormente, à temperatura e luminosidade ambiente por mais 5 dias. **A**- Linhagem selvagem (FGSC#2489), **B**- Linhagem mutante na ORF NCU06679.

2.3.2 - Crescimento colonial e radial

A análise do crescimento colonial foi realizada através da determinação dos raios das colônias das duas linhagens. Os conídios obtidos anteriormente foram inoculados no centro de placas de Petri e estas foram incubadas a 30°C por 24 h. Para essa análise foram testados dois tipos de meios de cultivo (VM e VM suplementado com extrato de levedo). O fungo *N. crassa* possui um cultivo muito simples e tem como exigência nutricional básica a biotina. O enriquecimento com extrato de levedo no meio de cultura tem como objetivo avaliar a capacidade da linhagem mutante em utilizar outros nutrientes presentes no meio extracelular. A análise do crescimento radial em diferentes meios de cultura está apresentada no Quadro 4, revelando que a linhagem mutante apresentou um crescimento um pouco menor quando comparado à linhagem selvagem.

Quadro 4 – Taxa de crescimento radial da linhagem selvagem e do mutante.

Linhagem	Crescimento Radial (cm/24 h)	
	VM	VM+YE
Selvagem	7,5 ± 0,06	6,8 ± 0,06
6679^{KO}	6,0 ± 0,12	4,4 ± 0,26

As imagens das colônias foram obtidas com o auxílio de uma máquina fotográfica e estão apresentadas na Figura 16 (à esquerda na figura). Observa-se que tanto a linhagem selvagem quanto a linhagem mutante apresentaram um crescimento um pouco menor no meio suplementado quando comparado com o meio sem suplementação. Porém no meio VM+YE ambas as linhagens apresentaram uma maior densidade devido ao leve aumento das hifas aéreas. A figura à direita mostra as extremidades das hifas das linhagens e é possível observar que as duas linhagens analisadas apresentaram extremidades com perfis semelhantes (crescidas em meio VM e em meio VM+YE), mostrando o não envolvimento da proteína neste processo.

2.3.3 - Determinação da taxa de crescimento linear das linhagens mutante e selvagem

A taxa de crescimento linear das linhagens foi analisada em *race tubes*. As linhagens foram inoculadas em uma das extremidades do tubo e estes foram incubados sob a luz branca durante uma noite. Após este período, a frente de crescimento foi marcada (tempo zero do relógio biológico) e, em seguida os tubos foram incubados no escuro. Esse período de exposição à luz e posterior incubação no escuro zera o relógio biológico. A frente do crescimento foi marcada a cada 12 h sob luz vermelha. A distância de crescimento foi medida (cm) e expressa em função das horas de crescimento até que a primeira das linhagens atingisse a outra extremidade do tubo. A Figura 17 mostra a taxa de crescimento das linhagens. O resultado mostra que a linhagem mutante apresentou um crescimento linear mais lento que a linhagem selvagem.

2.3.4 - Determinação do acúmulo de glicogênio nas linhagens selvagem e mutante na ORF NCU06679

A proteína codificada pela ORF NCU06679 foi identificada em complexos DNA-proteína formados com proteínas nucleares presentes em micélios submetidos a choque térmico e um fragmento do promotor *gsn*. Portanto, foi realizada a quantificação de

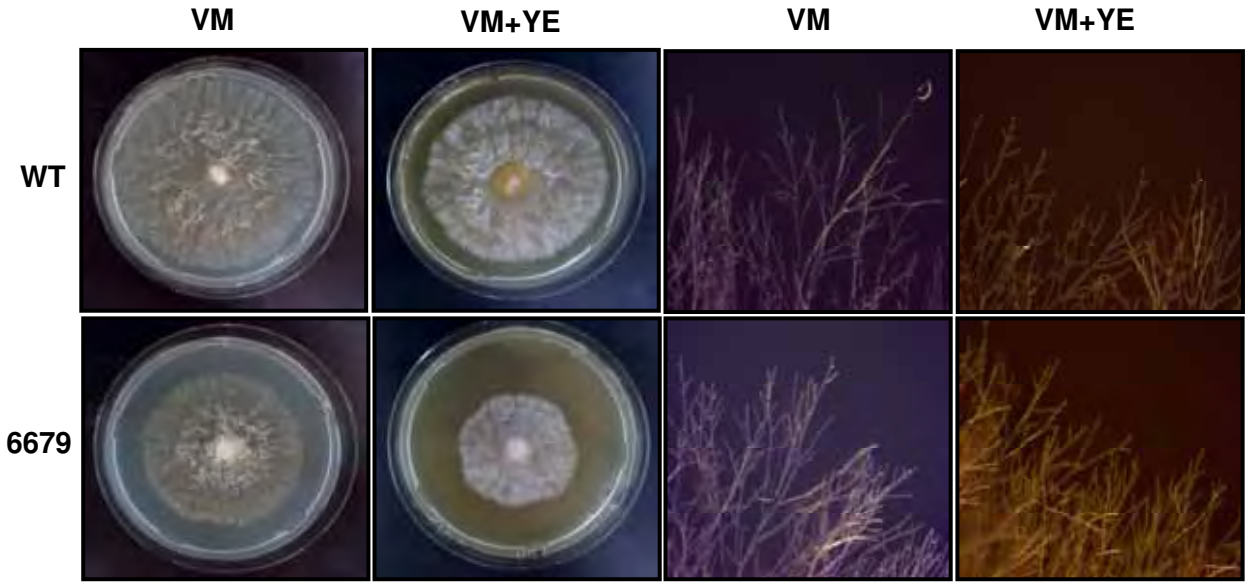


Figura 16 – Análise morfológica das colônias e crescimento radial e da extremidade das hifas nas linhagens selvagem e mutante. Os conídios foram inoculados no centro das placas de Petri nos meios VM e VM+YE e as placas foram incubadas por 24h a 30°C. **Esquerda,** crescimento radial de cada linhagem. **Direita**, extremidades das hifas analisadas em estereomicroscópio SteREO Discovery. V8, Zeiss acoplado à câmera fotográfica. Escala de aumento 100 µm (aumento 8x).

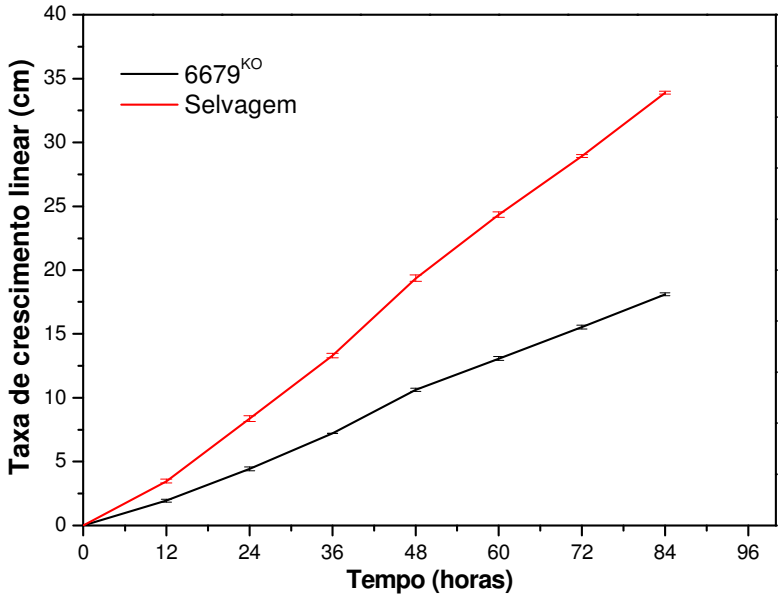


Figura 17 – Análise do crescimento linear das linhagens selvagem e mutante na ORF NCU06679 em *race tubes.* O crescimento foi medido através da marcação da frente micelial a cada 12 h até que uma das linhagens atingisse a outra extremidade do tubo. Resultados de três experimentos independentes.

glicogênio na linhagem mutante e o resultado comparado com a linhagem selvagem FGSC#2489 na situação de estresse térmico. As linhagens foram analisadas durante o crescimento vegetativo, na temperatura normal e após submissão ao choque térmico. Os micélios obtidos de cada linhagem, nas diferentes situações, foram utilizados para a quantificação do conteúdo de glicogênio.

A Figura 18 mostra o acúmulo de glicogênio nas duas condições para ambas as linhagens. Na linhagem selvagem observou-se uma redução do conteúdo de glicogênio quando submetida ao estresse térmico, quando se compara com a situação normal de crescimento, um resultado já conhecido de experimentos anteriores realizados no laboratório. A linhagem mutante apresentou um menor conteúdo de glicogênio quando comparado com a linhagem selvagem nas duas situações (antes e depois do choque térmico). Entretanto, a redução no conteúdo de glicogênio na linhagem mutante na temperatura normal de crescimento foi muito acentuada em relação à linhagem selvagem.

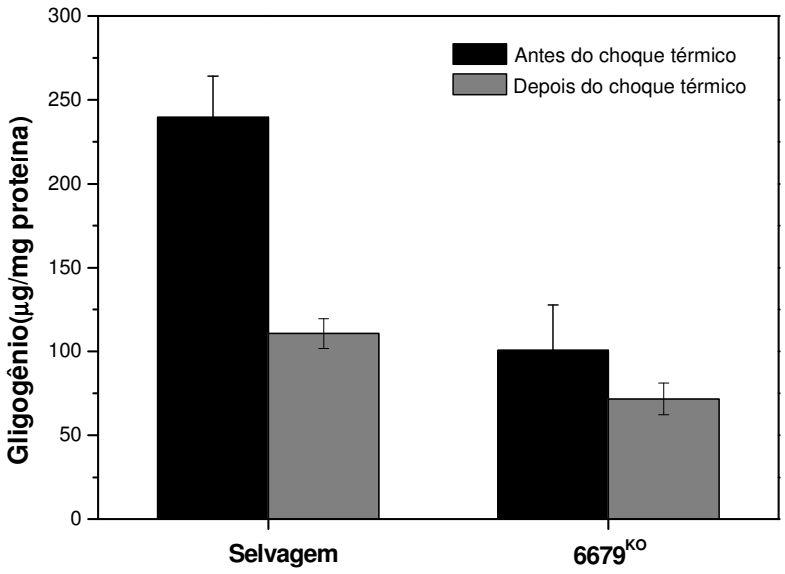


Figura 18- Acúmulo de glicogênio nas linhagens selvagem e mutante. Análise do acúmulo de glicogênio nas linhagens selvagem (FGSC#2489) e mutante na ORF NCU06679 durante o crescimento vegetativo (30℃) e após submissão a estresse térmico (45℃).

2.3.5 - Análise da expressão dos genes *gsn* e *gpn* nas linhagens selvagem e mutante

Como a linhagem mutante apresentou reduzido conteúdo de glicogênio, realizamos a análise da expressão dos genes que codificam para as enzimas glicogênio sintase (*gsn*) e glicogênio fosforilase (*gpn*), regulatórias nos processos de síntese e degradação,

respectivamente. Resultados anteriores obtidos pelo nosso grupo mostraram que a expressão do gene *gsn* por *Northern blot,* em uma linhagem selvagem, variou ao longo do crescimento do fungo, apresentando máxima expressão ao redor de 24 h de crescimento. Neste trabalho a expressão dos genes foi realizada através da técnica de PCR em tempo real, também chamado de PCR quantitativo. Essa análise foi realizada em amostras de RNA extraídas de micélios coletados em diferentes tempos do crescimento do fungo, tanto com a linhagem selvagem quanto com a linhagem mutante. Além disso, micélios foram também coletados em experimentos de choque térmico. Os micélios foram utilizados na extração de RNA total, sendo posteriormente obtido o cDNA a partir das amostras. Com os cDNAs preparados e oligonucleotídeos específicos para cada gene a ser analisado, procedeu-se a análise da expressão dos genes *gsn* e *gpn* por meio de reações de PCR em tempo real. Os resultados obtidos na análise de expressão desses genes estão apresentados nas Figuras 19A e 19B e foram expressos em relação à expressão do gene da β tubulina.

Pode-se observar um máximo na expressão dos genes *gsn* (Figura 19A) e *gpn* (Figura 19B) em 24 h para ambas as linhagens. Entretanto, para o gene *gpn* a expressão em 24 h na linhagem mutante foi ligeiramente maior do que na linhagem selvagem, o que confirma resultados anteriores obtidos por *Northern blot*. Além disso, é possível verificar que em ambas as linhagens a expressão do gene *gsn* foi menor do que o gene *gpn* em todos os tempos analisados. Foram realizadas também análises de expressão dos genes na situação de estresse térmico (Figuras 20A e 20B). É possível observar que a expressão dos dois genes foi diminuída quando as duas linhagens foram submetidas ao choque térmico (de 30°C para 45°C). Pode-se observar também uma maior expressão dos dois genes analisados na linhagem mutante no crescimento a 30°C.

Baseado em nossos resultados é possível concluir que a proteína codificada pela ORF NCU06679 seja uma histona acetiltransferase. É descrito na literatura que estas proteínas participam de grandes complexos proteicos envolvidos em diversos processos celulares, entre eles remodelagem de cromatina e regulação da transcrição. Os resultados obtidos, neste trabalho, mostraram que a linhagem mutante nesta proteína apresenta níveis de expressão dos genes *gsn* e *gpn* alterados, indicando que a proteína muito provavelmente está envolvida na regulação da expressão destes genes, mesmo não sendo uma proteína que apresenta domínio de ligação a DNA.

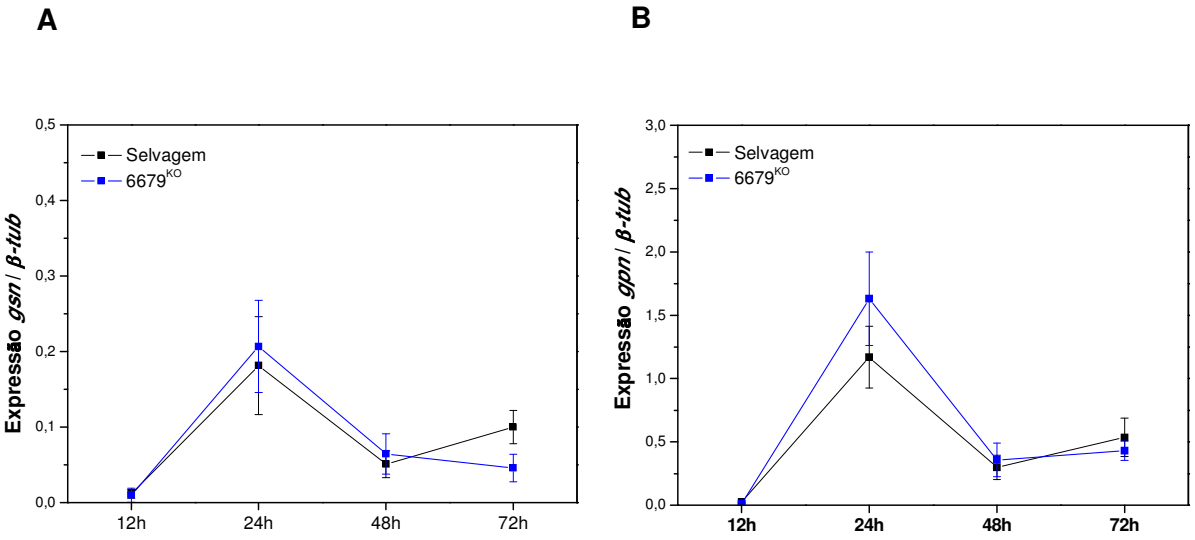


Figura 19 – Análise da expressão dos genes *gsn* e *gpn* nas linhagens selvagem e mutante ao longo do crescimento. Análise da expressão dos genes *gsn* e *gpn* nas linhagens selvagem e mutante através da técnica de PRC em tempo real. **A-** Expressão do gene *gsn.* **B-** Expressão do gene *gpn.*

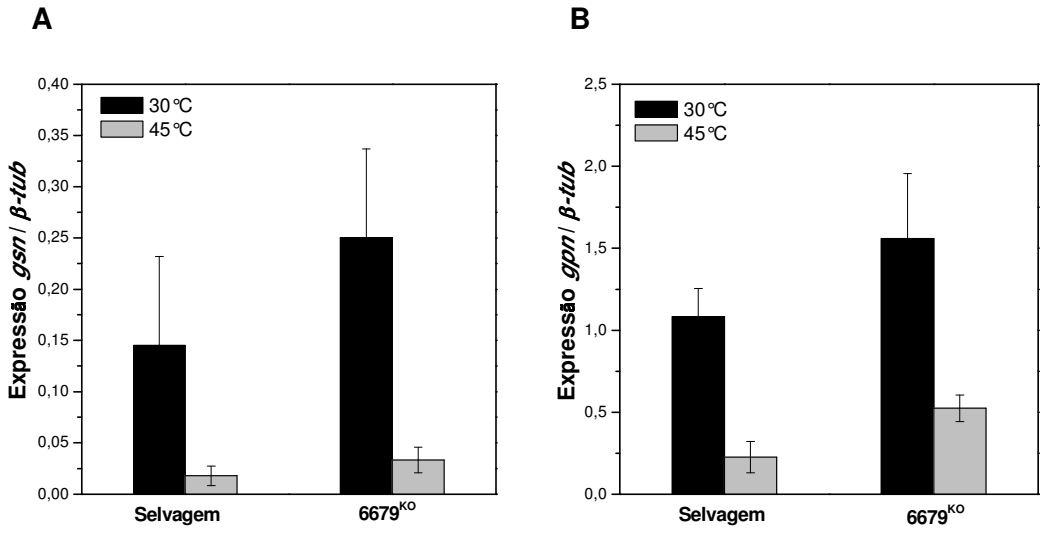


Figura 20 - Análise da expressão dos genes *gsn* e *gpn* nas linhagens selvagem e mutante antes e após choque térmico. Análise da expressão dos genes *gsn* e *gpn* nas linhagens selvagem e mutante através da técnica de PRC em tempo real. **A-** Expressão do gene *gsn.***B-** Expressão do gene *gpn.* As linhagens foram crescidas a 30ºC durante 24 h, uma parte do micélio foi coletado e, em seguida, o restante da massa micelial foi transferida para meio a 45ºC e coletada após 30 min nesta temperatura.

3 – Clonagem, produção e purificação das proteínas recombinantes

3.1 - Clonagem da ORF NCU06679 e subclonagem em vetor de expressão

Para a análise funcional de uma proteína é importante a produção da mesma na forma recombinante. A clonagem da ORF NCU03482 havia sido realizada em um trabalho anterior no laboratório e a clonagem da ORF NCU06679 foi realizada neste trabalho. Para isto, oligonucleotídeos foram desenhados para a amplificação da ORF, a qual foi realizada por RT-PCR a partir de RNA total. Inicialmente, a melhor temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos foi definida em uma reação de PCR com gradiente de temperatura, utilizando DNA genômico e o par de oligonucleotídeos NCU06679-F e NCU06679-R. Com a temperatura de anelamento já definida, a ORF foi amplificada, obtendo-se um fragmento do tamanho de 1.341 bp.

O fragmento foi clonado no vetor de clonagem pMOS-Blue, originando o plasmídeo pMOS-6679. O cassete de DNA correspondente ao inserto (1.341 pb) foi transferido da construção pMOS-6679 para o vetor de expressão pET28a, para a produção da proteína recombinante fusionada a uma cauda de poli-His, através da digestão com as enzimas *Nde*I e *Eco*RI gerando a construção pET-6679. Uma amostra da construção plasmidial de um clone considerado positivo foi confirmada através de sequenciamento de DNA e o plasmídeo foi armazenado a -80ºC.

3.1.2 - Ensaios de produção em *E. coli* e análise da solubilidade da proteína recombinante

Para a produção da proteína recombinante, o plasmídeo pET28a-6679 foi utilizado para transformar a linhagem de *E. coli*, cepa Rosetta. Inicialmente, o ensaio de indução da proteína recombinante foi realizado juntamente com um controle positivo (pET-CopB), o qual produz a proteína CopB de *X. citri* com tamanho de 55 kDa e um controle negativo (pET28a vazio). A temperatura de indução foi de 30ºC, 0,4 mM de IPTG e como tampão para lise das células o Tris-HCl. As amostras foram quantificadas e 20 ug/uL foram fracionadas por SDS-PAGE. Na Figura 21, as bandas apontadas pelas setas correspondem à proteína recombinante His::6679 contendo aproximadamente 50 kDa e ao controle positivo CopB (55 kDa).

Como a proteína foi produzida quase que exclusivamente na forma insolúvel, diferentes tampões foram utilizados na lise das células, como tentativas para melhorar a

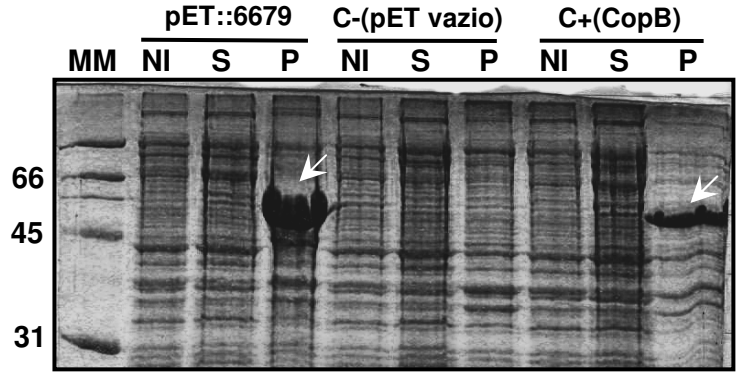


Figura 21- Análise da expressão em *E. coli* Rosetta da proteína His::6679. Extratos de células transformadas com o plasmídeo pET-6679, pET vazio (controle negativo) e pET-*copB* (controle positivo). A primeira seta indica a banda correspondente à proteína recombinante e a segunda à proteína CopB (controle positivo). Eletroforese em gel SDS-PAGE 12%, corado com Comassie Brilliant Blue R-250. MM, Massa Molecular (kDa), NI, amostra não-induzida; S, sobrenadante; P, precipitado.

solubilidade da proteína recombinante. Além disso, diferentes temperaturas de indução (12ºC, 30ºC e 37ºC) foram também avaliadas. Os resultados estão mostrados nas Figuras 22, 23 e 24.

Analisando os resultados apresentados, pode-se dizer que nas temperaturas 30°C (Figura 23) e 37°C (Figura 24), a proteína se concentrou no precipitado nos diferentes tampões testados. Na temperatura 12°C (Figura 22A) é possível observar que houve uma menor concentração da proteína no precipitado, entretanto a proteína também foi detectada no sobrenadante quando as células foram lisadas com o tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 500 mM, NP400 ,5%, imidazol 150 mM, glicerol 5%. Este resultado foi observado através do ensaio de *Western blot* e está mostrado na Figura 22B. Como resultado desta avaliação foi definido a melhor condição de produção para a proteína His::6679 como sendo 12°C, 22 h após indução e 0,4 mM de IPTG para indução da proteína recombinante e para a lise das células o tampão Tris-HCl, pH 8,0 contendo imidazol 150 mM.

3.1.3 - Purificação da proteína recombinante

A purificação da proteína His::6679 foi primeiramente realizada por cromatografia de afinidade utilizando resinas de Ni^{2+} e de Co^{+2}, as quais permitem purificar uma proteína rapidamente e de maneira simplificada utilizando centrífuga de bancada. Para isso, as proteínas foram produzidas em pequena escala (200 mL de cultura) e purificadas como descrito em Materiais e Métodos. A Figura 24 mostra um gel de SDS-PAGE 12% da

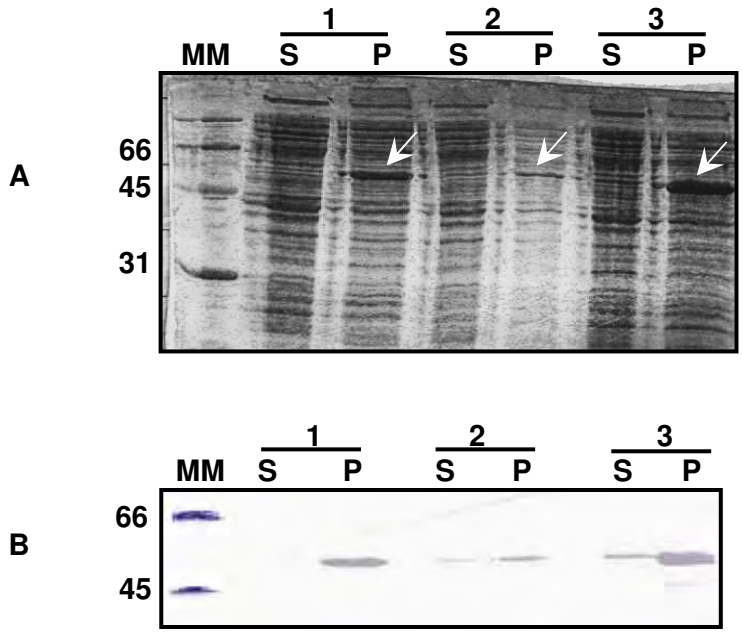


Figura 22- Análise da expressão em *E. coli* Rosetta da proteína His::6679 na condição de 12°C. A. As células foram lisadas nos tampões Hepes contendo imidazol 80 mM (**1**), Hepes contendo imidazol 150 mM (**2**) e Tris-HCl contendo imidazol 150 mM (**3**). As setas indicam as bandas correspondentes à proteína recombinante (aproximadamente 50 kDa). **B.** Ensaio de *Western blot* revelado com anticorpo anti-His conjugado à fosfatase alcalina. Eletroforese em gel SDS-PAGE 12% corado com Comassie Brilliant Blue R-250. MM, Massa Molecular (kDa), S, sobrenadante, P, precipitado.

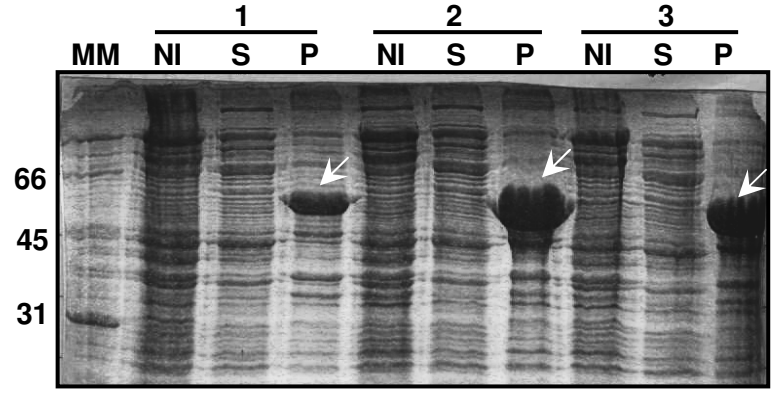


Figura 23- Análise da expressão em *E. coli* Rosetta da proteína His::6679 na condição de 30°C. As células foram lisadas nos tampões Hepes contendo imidazol 80 mM (**1**), Hepes contendo imidazol 150 mM (**2**) e Tris-HCl contendo imidazol 150 mM (**3**). As setas indicam as bandas correspondentes à proteína recombinante (aproximadamente 50 kDa). Eletroforese em gel SDS-PAGE 12%, corado com Comassie Brilliant Blue R-250. MM, Massa Molecular (kDa), NI, amostra não-induzida, S, sobrenadante, P, precipitado.

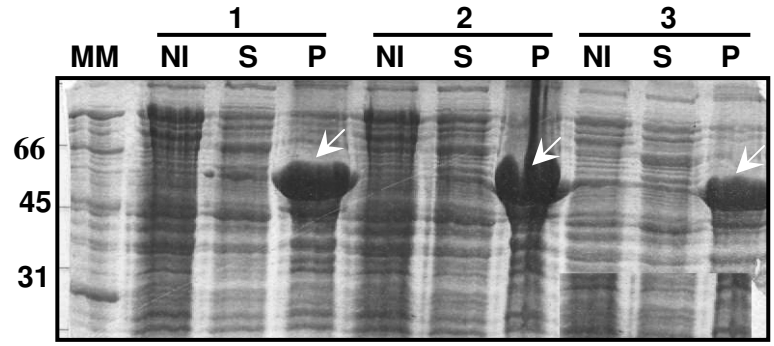


Figura 24- Análise da expressão em *E. coli* Rosetta da proteína His::6679 na condição de 37°C. As células foram lisadas nos tampões Hepes contendo imidazol 80 mM (**1**), Hepes contendo imidazol 150 mM (**2**) e Tris-HCl contendo imidazol 150 mM (**3**). As setas indicam as bandas correspondentes à proteína recombinante (aproximadamente 50 kDa). Eletroforese em gel SDS-PAGE 12%, corado com Comassie Brilliant Blue R-250. MM, Massa Molecular (kDa), NI, amostra não-induzida, S, sobrenadante, P, precipitado.

proteína nas diferentes etapas da purificação. A Figura 25A mostra a purificação da proteína recombinante utilizando resina de níquel e a Figura 25B mostra a purificação da proteína recombinante utilizando resina de cobalto.

Podemos observar em ambas as figuras que a fração E3 eluída com 300 mM de imidazol apresentou maior pureza em relação à fração E1, a qual foi eluída com 100 mM de imidazol. Observou-se também que a purificação realizada com a resina de Co^{2+} parece apresentar um menor rendimento da proteína purificada em relação à purificação realizada com a resina Ni^{2+}. Pode-se afirmar que por ser um método simples de purificação, o resultado é satisfatório, mas mostrou contaminação com outras proteínas. Para tentar aumentar o grau de pureza realizamos a purificação por cromatografia de afinidade utilizando o sistema de purificação AKTA Prime. Para isso, a proteína foi produzida em maior escala (1L de cultura) e purificada como descrito em Materiais e Métodos. A Figura 26A mostra o perfil cromatográfico e a Figura 26B mostra a análise de algumas frações coletadas após eluição com gradiente de concentração de imidazol.

É possível observar que a purificação da proteína realizada com o auxílio do cromatógrafo foi eficiente, pois houve uma maior recuperação da proteína purificada quando comparada com as purificações realizadas na bancada. No entanto, essa purificação não foi tão efetiva em termos de pureza da proteína uma vez que há a presença de bandas contaminantes nas frações eluídas, como mostrado Figura 26B. Outros procedimentos cromatográficos deverão ser utilizados para aumentar a pureza desta proteína, importante para futuros ensaios funcionais.

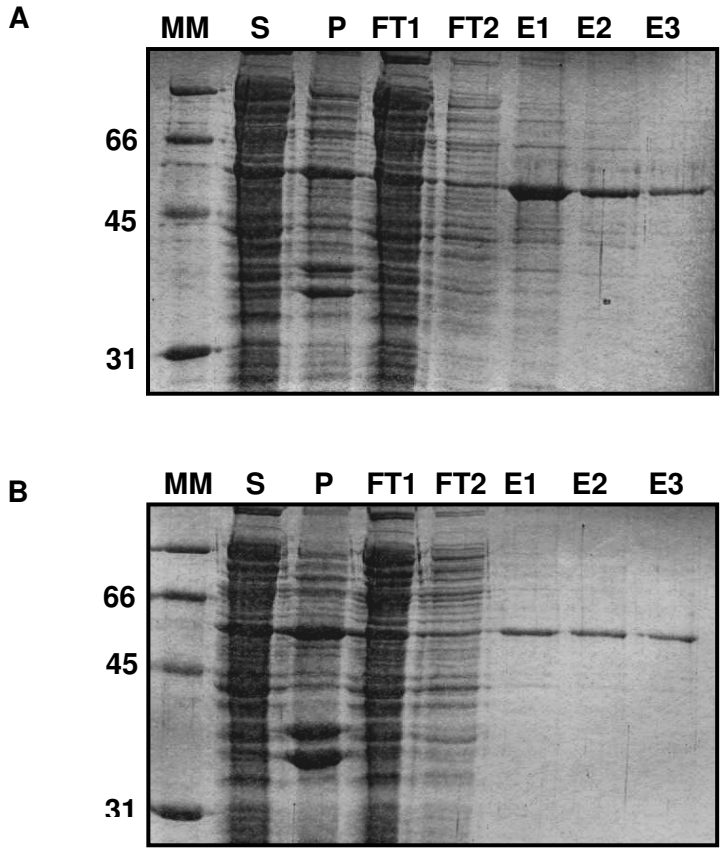


Figura 25- Purificação da proteína His::6679 produzida em *E. coli.* A. Purificação realizada com resina Ni^{2+}. **B.** Purificação realizada com resina Co^{2+}. MM, Massa Molecular, S, sobrenadante, P, precipitado, FT1 e FT2, *flow through*, E1, eluição com 100 mM de imidazol, E2, eluição com 200 mM de imidazol, E3, eluição com 300 mM de imidazol. SDS-PAGE 12%.

3.2 - Produção e purificação da proteína recombinante codificada pela ORF NCU03482 fusionada à proteína SUMO

A proteína recombinante codificada pela ORF NCU03482 já havia sido produzida e purificada em outro trabalho no laboratório utilizando o vetor de expressão pET28a. Entretanto, os resultados não foram satisfatórios. Na tentativa de melhorar sua purificação, a ORF foi subclonada no vetor de expressão pETSUMO, o qual permite a produção da proteína recombinante fusionada à proteína SUMO. Proteínas recombinantes fusionadas à proteína SUMO são descritas apresentar uma maior solubilidade. Após produção, a proteína SUMO pode ser clivada pela enzima SUMO protease, resultando na produção da proteína nativa livre de *tag*.

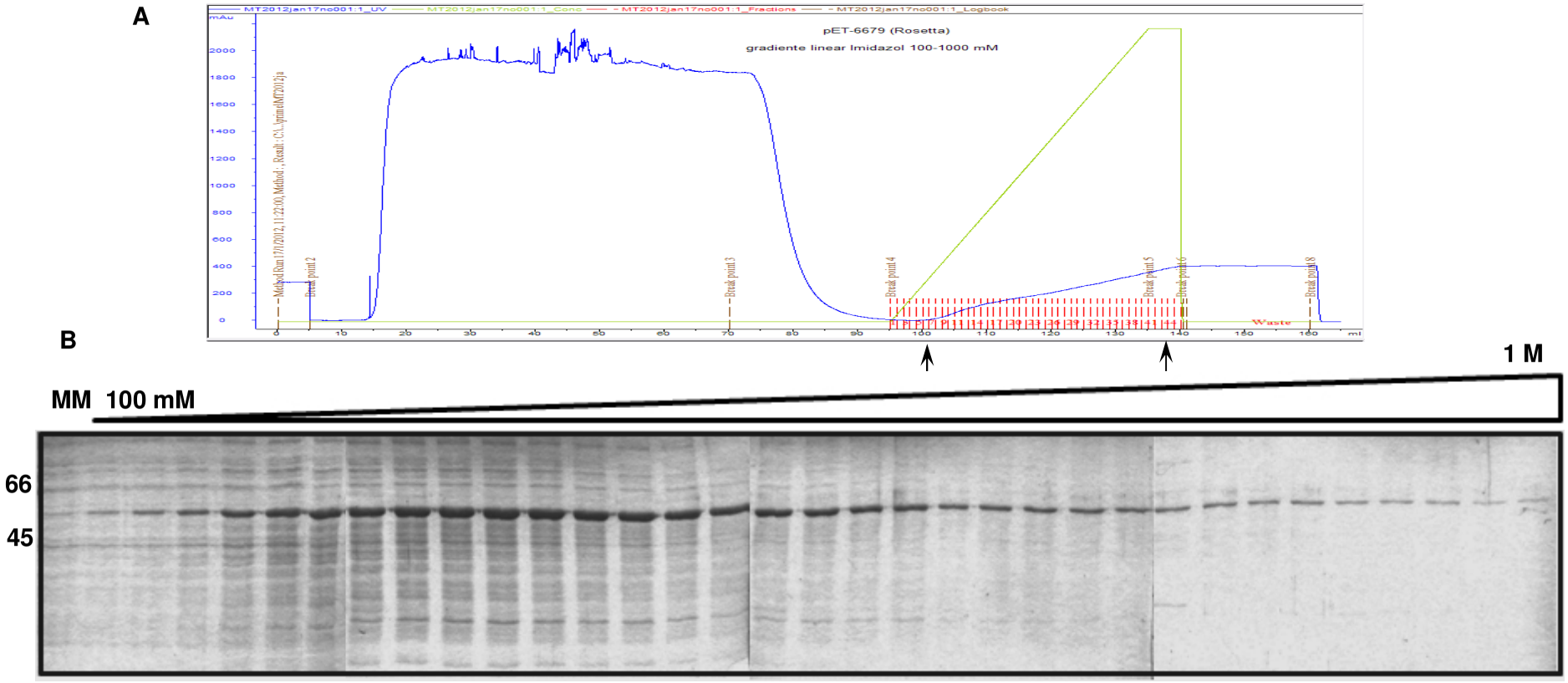


Figura 26- Purificação e análise da proteína His::6679 produzida em *E.* coli em maior escala. A. Cromatograma das etapas de purificação da proteína em coluna His-Trap utilizando um gradiente linear de 100 mM a 1 M de imidazol. As setas indicam o intervalo correspondente às frações coletadas. **B.** Análise por eletroforese das frações eluídas. SDS-PAGE 12%, MM, Massa Molecular.

A etapa de clonagem da ORF no vetor foi realizada por outra integrante do nosso grupo de pesquisa. Neste trabalho estão descritas as etapas de produção e purificação da proteína recombinante SUMO::3482. Para a produção da proteína, o plasmídeo pETSUMO-3482 foi utilizado para transformar a linhagem de *E. coli*, cepa Rosetta. Diferentes condições de indução foram testadas, utilizando-se 0,1 e 0,4 mM de IPTG nas temperaturas de 12, 30 e 37°C. Utilizou-se como tampão de lise o tampão Hepes 50 mM, pH 7,0, NaCl 500 mM, imidazol 150 mM, glicerol 5%. As setas apontam para a banda correspondente à proteína SUMO::3482 com aproximadamente 65 kDa. As amostras analisadas estão apresentadas nas Figuras 27 e 28. Utilizando a condição de indução de 0,4 mM de IPTG foi possível visualizar bandas de maior intensidade correspondente à massa molecular da proteína (Figura 28). Analisando as diferentes temperaturas de indução foi possível observar que as três temperaturas utilizadas foram adequadas para a produção da proteína recombinante.

Após estabelecer a melhor condição de indução da proteína, realizou-se a purificação por cromatografia de afinidade utilizando o sistema de purificação AktaPrime. Foi possível observar uma boa recuperação da proteína em várias frações ao longo do gradiente de eluição, porém a proteína não apresentou um alto grau de pureza, como mostrado na Figura 29A. Algumas das frações coletadas (frações 5, 7 e 9) foram analisadas por *Western blot* com anticorpo anti-His para confirmar a produção da proteína recombinante (Figura 29B). As frações contendo uma maior concentração de proteína foram reunidas, dialisadas e armazenadas a -80°C.

A SUMO protease também foi produzida e purificada neste trabalho, como mostrado na Figura 30. É possível observar que houve uma alta concentração da SUMO protease nas frações iniciais do gradiente de concentração de imidazol. As frações contendo uma maior concentração da proteína foram reunidas, dialisadas e armazenadas a -80°C.

Com as proteínas purificadas realizou-se então a digestão da proteína SUMO::3482 com a protease SUMO na proporção 1:50 de enzima:proteína recombinante. Na Figura 31A está apresentado o resultado obtido. Na canaleta 1 é possível observar a presença de uma banda apresentando a mesma massa molecular da proteína após digestão com a protease, na preparação da proteína recombinante. Esta banda, através de análise por espectrometria de massas, revelou ser a proteína RuvBL1-*like* de *N. crassa.* Na canaleta 3 a proteína recombinante não fusionada de aproximadamente 50 kDa, pode ser visualizada como produto da digestão realizada. É possível observar que há ainda alguns contaminantes que podem provavelmente ser removidos através de uma nova purificação. Foi realizada também uma análise por *Western blot* com anticorpo anti-His para observar o resultado desta reação (Figura 31B). Na canaleta 1 é possível observar a presença da proteína

recombinante SUMO::3482 (aproximadamente 65 kDa), na 2 está presente a SUMO protease e na 3 não há banda na região da proteína recombinante, uma vez que após a digestão a proteína está isenta de *tag* e não foi detectada com o anticorpo utilizado. Esse resultado mostrou que a clivagem da proteína SUMO, fusionada à proteína recombinante foi efetivamente realizada pela SUMO protease.

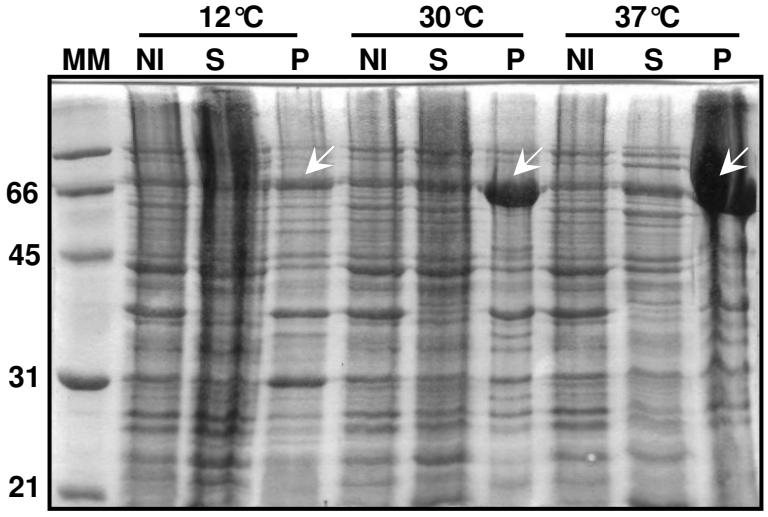


Figura 27- Análise da expressão em *E. coli* Rosetta da proteína SUMO::3482 induzida em diferentes temperaturas. A indução da proteína foi realizada com 0,1 mM de IPTG. As setas indicam as bandas correspondentes à proteína recombinante (aproximadamente 65 kDa). Eletroforese em gel SDS-PAGE 10%, corado com Comassie Brilliant Blue R-250. MM, Massa Molecular (kDa), NI, amostra não-induzida, S, sobrenadante, P, precipitado.

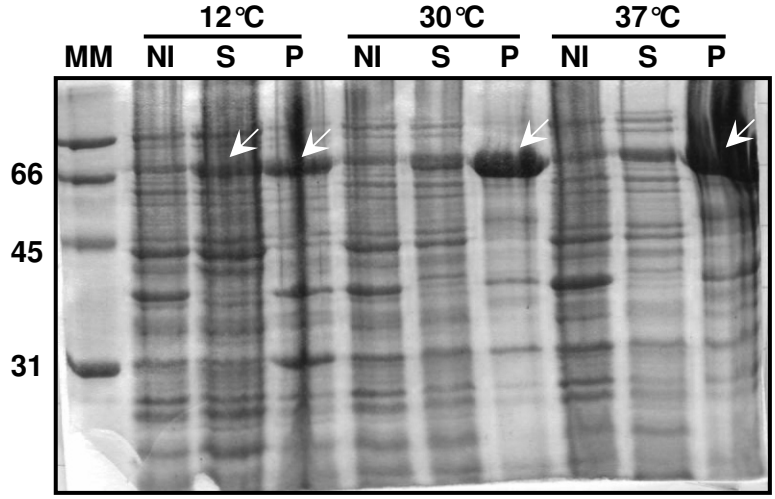


Figura 28- Análise da expressão em *E. coli* Rosetta da proteína SUMO::3482 induzida em diferentes temperaturas. A indução da proteína foi realizada com 0,4 mM de IPTG. As setas indicam as bandas correspondentes à proteína recombinante (aproximadamente 65 kDa). Eletroforese em gel SDS-PAGE 10%, corado com Comassie Brilliant Blue R-250. MM, Massa Molecular (kDa), NI, amostra não-induzida, S, sobrenadante, P, precipitado.

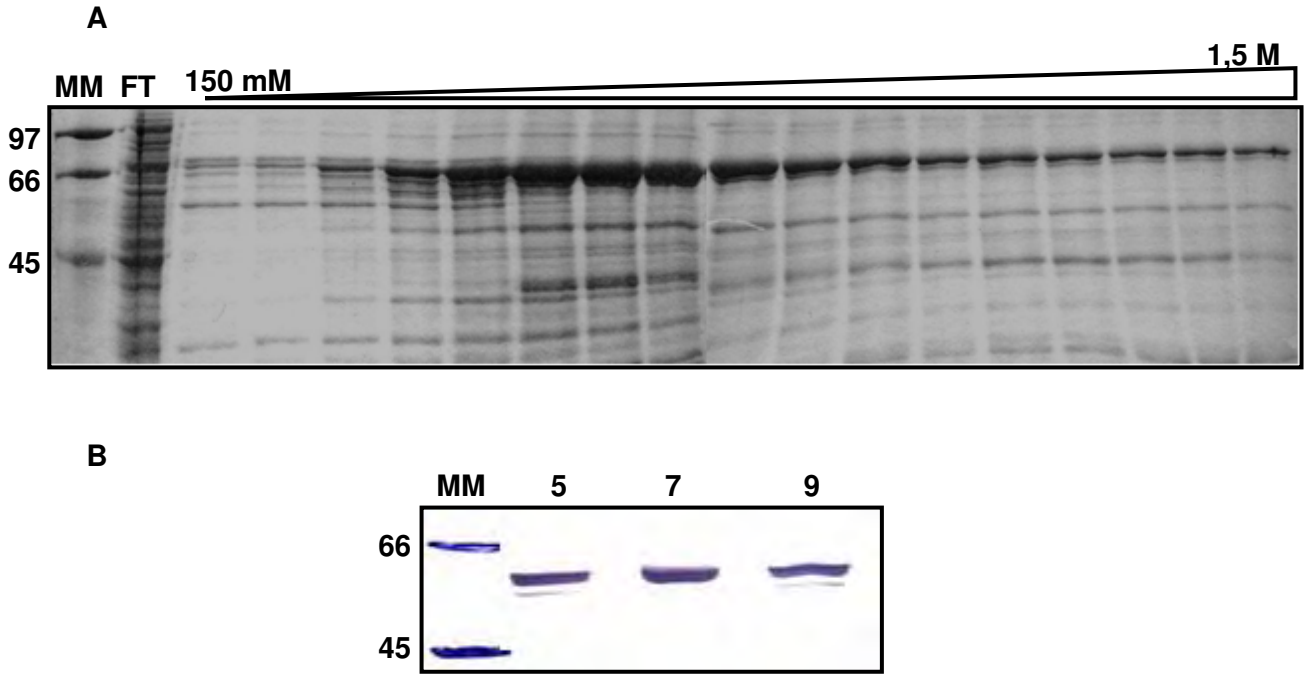


Figura 29 – Purificação da proteína SUMO::3482 produzida em *E. coli*. A. Análise por eletroforese das frações eluídas durante a purificação da proteína em coluna His-Trap utilizando um gradiente linear de 150 mM a 1,5 M de imidazol. **B.** Ensaio de *Western blot* revelado com anticorpo anti-His conjugado à fosfatase alcalina, os números 5, 7 e 9, representam as frações analisadas. SDS-PAGE 12%, MM, Massa Molecular, FT, *flow through*.

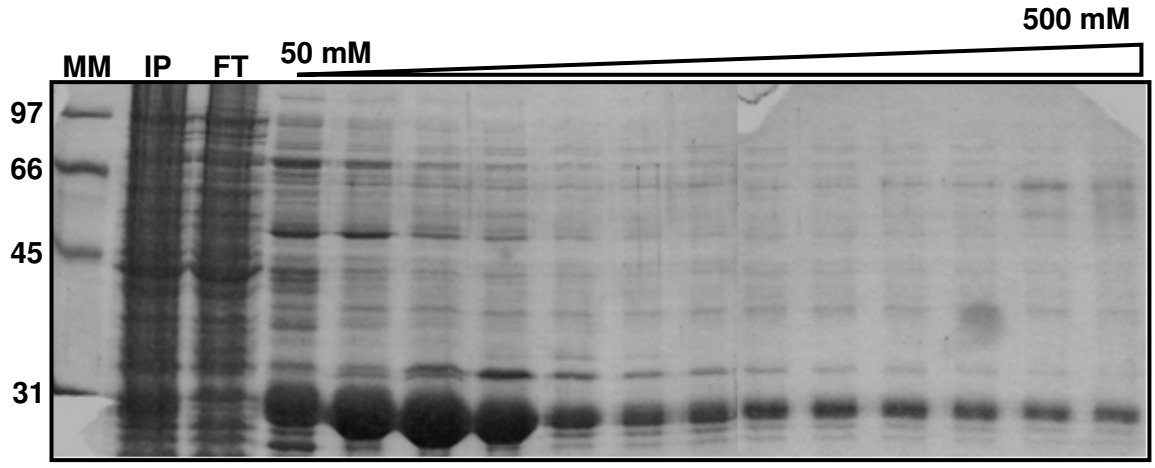


Figura 30 - Purificação da SUMO protease produzida em *E.* coli. Análise por eletroforese das frações eluídas durante a purificação da proteína em coluna His-Trap utilizando um gradiente linear de 50 mM a 500 mM de imidazol. SDS-PAGE 12%, MM, Massa Molecular, FT, *flow through*.

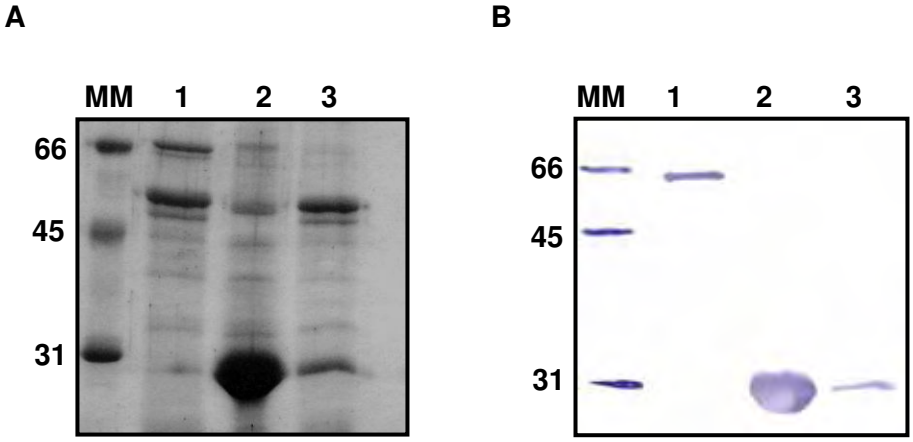


Figura 31 – Digestão da proteína SUMO::3482 com a SUMO protease. A. Análise por eletroforese da digestão da proteína SUMO::3482 com a SUMO protease purificada. **B.** Ensaio de *Western blot* revelado com anticorpo anti-His conjugado à fosfatase alcalina.**1-** Proteína SUMO::3482. **2-** SUMO protease. **3-** Produto da digestão. SDS-PAGE 10%, MM, Massa Molecular.

4 - Localização celular dos produtos das ORFs NCU03482 e NCU06679. Experimentos preliminares para a produção das proteínas fusionadas a GFP

A GFP (*Green Fluorescent Protein*) é uma proteína muito utilizada para a identificação da localização celular de proteínas. Para viabilizar uma futura análise funcional das proteínas codificadas pela ORF NCU06679 e NCU03482, experimentos foram iniciados com o objetivo de introduzir em ambas as sequências genômicas a sequência codificadora da proteína GFP na região C-terminal. Um esquema detalhado da estratégia utilizada neste trabalho está descrita na Figura 8 em Materiais e Métodos.

Primeiramente, foi realizada a amplificação da sequência codificadora da GFP por PCR utilizando como DNA molde o vetor pZErO-GFP-*hph*. O fragmento amplificado possui 2.281 pb e está apresentado na Figura 32A. Este fragmento contém na extremidade 3' a sequência para o *stop codon* da GFP, seguida da sequência codificadora do gene *hph*. Foram realizadas também amplificações das regiões *upstream* e *downstream* a cada ORF a partir do *stop codon*, contendo aproximadamente 1 kb cada uma delas (Figuras 32B, 32C e 32D). Com os produtos dessas amplificações, foram realizadas as sínteses dos *splitmarkers* 5' e 3'. Para a síntese do *splitmarker* 5' foram utilizados o produto da amplificação da sequência codificadora de GFP e o produto da amplificação da região *upstream* ao stop codon de cada ORF. O fragmento obtido após essa amplificação do *splitmarker* 5' para a ORF NCU06679 apresentou 3.003 pb e o *splitmarker* 5' para a ORF NCU03482 apresentou 2.915 pb (Figura 32E). Para a síntese do *splitmarker* 3' foi utilizado o produto da

amplificação *downstream* ao *stop codon* e novamente o produto da amplificação da sequência codificadora de GFP e *hph*. O fragmento obtido desta amplificação para a ORF NCU06679 apresentou 2.161 pb e para a ORF NCU03482 apresentou 2.074 pb (Figuras 32E e 32F).

Após a obtenção dos *splimarkers,* a linhagem FGSC#9718 (*background mus*) foi transformada por eletroporação. Essa transformação foi realizada para que o fungo, através de eventos de recombinação homóloga possa incorporar essa região em seu genoma. Os conídios transformados foram inoculados em meio contendo higromicina, que é a marca de seleção inserida juntamente com a proteína GFP. Os transformantes que cresceram foram posteriormente transferidos para tubos com meio VM contendo higromicina e, após o crescimento, foram inoculados em culturas liquidas. Os micélios foram coletados, o DNA genômico extraído e utilizado em ensaios de *Southern blot* utilizando a sequência nucleotídica da GFP como sonda. Infelizmente, não foi possível observar bandas de hibridização nos diferentes ensaios realizados em diferentes condições experimentais. Novos experimentos de amplificação dos fragmentos e transformação do fungo estão sendo realizados.

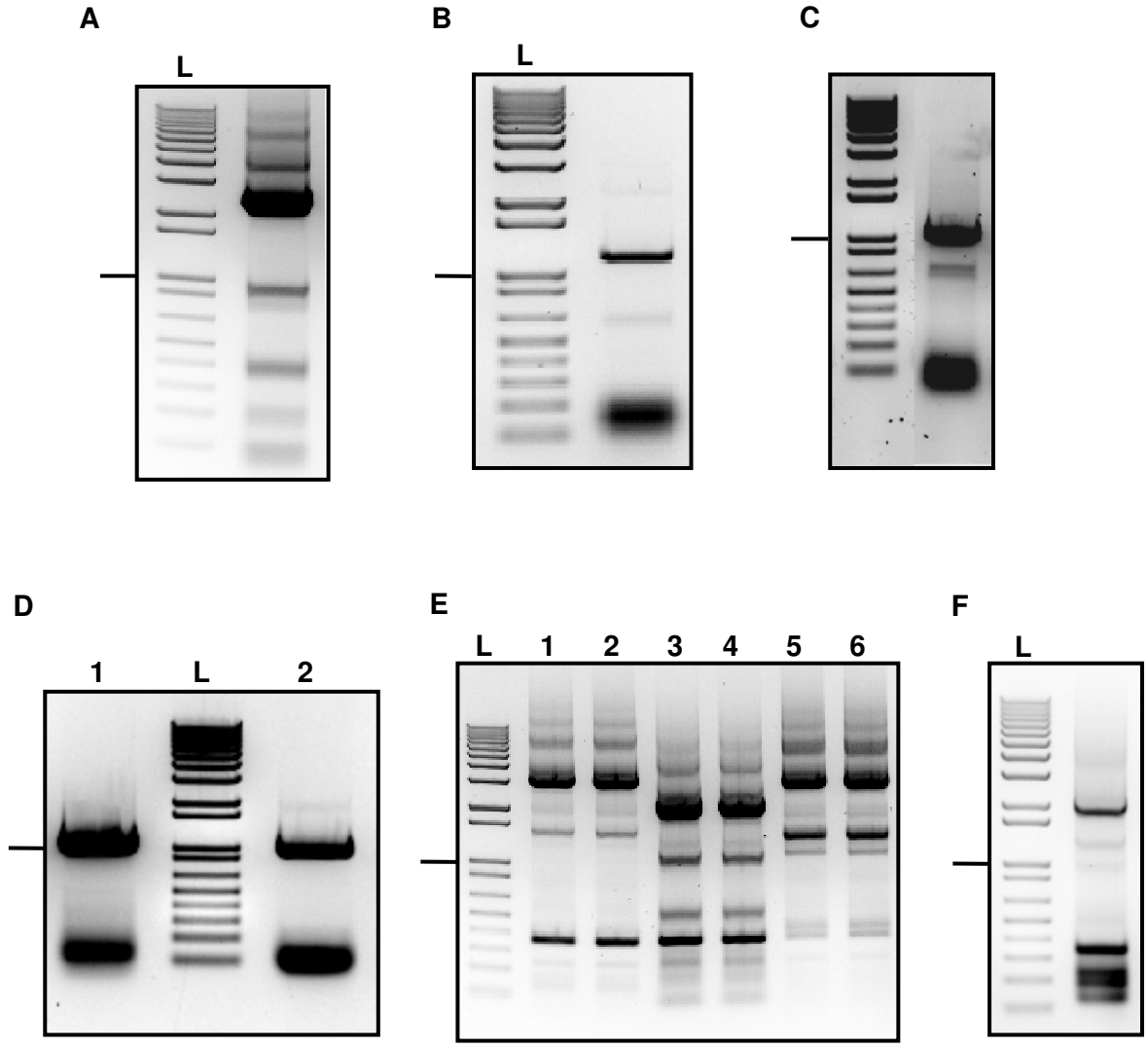


Figura 32 - Amplificações para a obtenção dos *split markers* 5' e 3' para as proteínas codificadas pelas ORFs NCU06679 e NCU03482. A- Amplificação da sequência codificadora da GFP, fragmento de aproximadamente 2.281 pb. **B-** Amplificação da região *upstream* ao *stop codon* da ORF NCU06679, fragmento de 1.151 pb. **C-** Amplificação da região *downstream* ao *stop codon* da ORF NCU06679, fragmento de 1.074 pb. **D-** Amplificação das regiões *upstream* (**1**) *e downstream* (**2**) ao *stop codon* da ORF NCU03482, com tamanhos de 1.063 pb e 987 pb, respectivamente. **E-** Amplificação dos *splitmarkers* 5' e 3' de cada ORF, (**1** e **2**) *splitmarker* 5' referente a ORF NCU06679, fragmento de 3.003 pb. (**3** e **4**) *splitmarker* 3' referente a ORF NCU06679, fragmento de 2.161. (**5** e **6**) *splitmarker* 5' referente a ORF NCU03482, fragmento 2.915 pb. **F –** Amplificação do *splitmarker* 3' referente a ORF NCU03482, fragmento de 2,074 pb. Eletroforese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo 0,5 µg/mL. O traço representa o fragmento do DNA *ladder* de 1 kb.

Principais Conclusões

Este trabalho teve como objetivo principal a caracterização funcional de duas proteínas, identificadas previamente em complexos DNA-proteínas, as quais ainda não haviam sido caracterizadas no fungo *N. crassa.* Resultados anteriormente obtidos mostraram que ambas as proteínas pertencem a grandes complexos proteicos participantes de processos de remodelagem de cromatina, portanto, muito provavelmente envolvidas em regulação da expressão gênica. As principais conclusões deste trabalho foram:

- Inicialmente, as linhagens mutantes nas proteínas foram analisadas. A linhagem mutante na proteína RuvB-*like* 1 foi disponibilizada pelo FGSC como uma linhagem heterocária. Realizou-se então a tentativa de obtenção de uma linhagem homocária, entretanto o resultado foi negativo, o que significa que a proteína é essencial em *N. crassa*. Trabalhos na literatura também mostraram que a proteína é essencial em *S. cerevisiae, Drosophila melanogaster* e *C. elegans*. Experimentos de caracterização morfológica e bioquímica foram realizados apenas com a linhagem mutante na proteína homóloga à histona acetiltransferase.

- As análises morfológicas realizadas foram: crescimento radial, crescimento linear e análise das extremidades das hifas. Os resultados mostraram que a proteína histona acetiltransferase pode estar envolvida no crescimento e desenvolvimento do fungo, uma vez que a linhagem mutante apresentou diminuição nas taxas de crescimento linear e radial quando comparada com a linhagem selvagem, além de apresentar uma menor conidiação. A análise de acúmulo de glicogênio mostrou que a linhagem mutante apresentou, assim como a linhagem selvagem, uma diminuição no acúmulo do carboidrato quando o fungo foi submetido a estresse térmico. Entretanto, foi possível observar que a linhagem mutante acumula menos glicogênio na temperatura de crescimento vegetativo e que a diminuição quando submetida ao estresse também é menos acentuada. As análises da expressão dos genes *gsn* e *gpn* ao longo do crescimento mostraram que ambas as linhagens apresentaram um máximo de expressão em 24 h de crescimento. Foi possível observar também que a linhagem mutante apresentou um leve aumento do nível de expressão do gene *gpn* nesse mesmo tempo de crescimento. Nas duas linhagens a expressão do gene *gpn* foi maior do que a do gene *gsn.* A expressão desses genes também foi avaliada no ensaio de choque térmico, mostrando que a expressão dos genes foi diminuída quando as linhagens foram expostas ao choque térmico. Os resultados obtidos, neste trabalho, mostraram que a linhagem mutante nesta proteína apresentou níveis de expressão dos genes *gsn* e *gpn* alterados, indicando que a proteína muito provavelmente está envolvida na

regulação da expressão destes genes, mesmo não sendo uma proteína que apresenta domínio de ligação a DNA.

- Neste trabalho foram realizadas também a produção e purificação das duas proteínas estudadas nas formas recombinantes em *E. coli*. A produção dessas proteínas é importante para futuros ensaios funcionais das mesmas. A proteína histona acetiltransferase foi produzida e suas condições de purificação foram padronizadas. A proteína RuvB-*like* 1 foi produzida em fusão à proteína SUMO. Essa construção permite que após a purificação da proteína, ela seja submetida à digestão com a SUMO protease, obtendo assim a proteína recombinante em sua forma nativa, não fusionada. Novos ensaios de purificação serão realizados para melhorar a pureza de ambas as proteínas.

- Neste trabalho foram realizados também experimentos iniciais para a inserção da proteína GFP fusionada às proteínas estudadas. Após inserção de GFP será possível realizar ensaios de localização celular destas proteínas. Como estas proteínas foram identificadas em um extrato celular que mostrou ligação a um fragmento de DNA contendo o elemento STRE, a determinação da localização celular destas proteínas na condição de estresse térmico poderia fornecer informações relacionadas à capacidade destas proteínas em ligar ao elemento de DNA STRE.

- Análises bioquímicas adicionais serão necessárias para atribuir uma função biológica a estas proteínas na condição de estresse témico.

Referências

REFERÊNCIAS

ALONSO, M. D. et al. A new look at the biogenesis of glycogen. **FASEB J.**, v. 9, n. 12, p. 1126-1137, Sept. 1995

BAUER, A. et al. Pontin52 and Reptin52 function as antagonistic regulators of β-catenin signalling activity. **EMBO J.**, v.19, n. 22, p. 6121-6130, Nov. 2000.

BEADLE, G. W.; TATUM, E. L. Genetic control of biochemical reactions I *Neurospora.* **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 27, n. 11, p. 513-521, Feb. 1996.

BERTOLINI, M. C. et al. Glycogen metabolism regulation in *Neurospora crassa*. In: WITZANY, G. **Biocommunication of fungi**. Dordrecht: Springer Science, 2012. Cap. 2, p. 39-56.

BIENZ, M.; PELHAM, H. B. R. Heat shock regulatory elements function as inducible enhancer in the Xenopus *hsp70* gene and when linked to a heterologous promoter. **Cell,** v. 45, n. 5, p. 753-760, June 1986.

BIENZ, M.; PELHAM, H. R. B. Mechanisms of the heat shock gene activation in higher eukaryotes. **Adv. Genet.**, v. 24, p. 31-72, 1987.

BORKOVICH, K. A. et al. Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 1, n. 68, p. 1-108, Mar. 2004

BRUNT, J. V. Fungi: the perfect hosts? **Nature Biot.**, v. 4, p. 1057-1062, 1986.

CHERRY, J. R.; FIDANTSEF, A. L. Directed evolution of industrial enzymes: as update. **Current Opinion in Biot.**, v. 14, p. 438-443, 2003.

DAVIS, R. H.; PERKINS, D. D. *Neurospora*: a model of model microbes. **Nature Rev. Genet.**, v. 3, n. 5, p. 397-403, May 2002.

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

DUNLAP, J. C. et al. Enabling a community to dissect an organism: overview of the *Neurospora* functional genomics project. **Adv. Genet.**, v. 57, n. 1, p. 49-96, Mar 2007.

FINCHAM, J. R. S.; DAY, P. R.; RADFORD, A. **Fungal genetics**. 4th ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1979. 639 p.

FRANÇOIS, J.; VILLANUEVA, M. E.; HERS, H. G. The control of glycogen metabolismo in yeast. 1- Interconversion *in vivo* of glycogen synthase and glycogen phosphorylase induced by glucose, a nitrogen source or unconplers. **Eur. J. Biochem.**, v. 174, n. 3, p. 551-559, June 1988.

FREITAS, F. Z. **Caracterização functional dos elementos de transcrição do gene da glicogênio sintase (*gsn*) de *Neurospora crassa***. 2007. 180 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

FREITAS, F. Z.; BERTOLINI, M. C. Genomic organization of the *Neurospora crassa gsn* gene: possible involvement of the STRE and HSE elements in the modulation of transcription during heat shock. **Mol. Gen. Genomics**, v. 272, n. 5, p. 550-561, Dec. 2004.

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, p. 2052-2061, 2008.

GALAGAN, J. E. et al. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa.* **Nature**, v. 422, n. 6934, p. 859-868, Apr. 2003.

GARTNER, W. et al. The ATP-dependent helicase RUVBL1/TIP49a associates with tubulin during mitosis. **Cell Motil. Cytoskeleton**, v. 56, n. 2, p. 79-93, 2003.

GONÇALVES, R. D. **Fatores de transcrição reguladores do metabolismo do glicogênio em *Neurospora crassa*. Caracterização parcial e identificação de alvos de ligação por ChIP**. 2012. 175 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

HARRIS, R. A. Carbohydrate metabolism I: major metabolic pathways and their control. In: DEVLIN, T. M. **Textbook of biochemistry with clinical correlations**. 4th ed. New York: Wiley-Liss, 1997. p. 267-333.

HARKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycol. Res.**, v. 105, p. 1422-1432, Dec. 2001.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal. Biochem.**, v. 48, n. 2, p. 422-427, Aug. 1972.

HONDA, S. H.; SELKER, E. U. Direct interaction between DNA methylatransferase DIM-2 and HP1 is required for DNA methylation in *Neurospora crassa*. **Mol. Cell. Biol.**, v. 28, p. 6044-6055, 2008.

HUANG, K. P.; CABIB, E. Yeast glycogen synthetase is the glucose-6-phosphate dependent form. I. Purification and properties. **J. Biol. Chem.**, v. 249, n. 12, p. 3851-3857, June 1974.

IZUMI, N. et al. Integrated regulation of PIKK-mediated stress responses by AAA+ proteins RUVBL1 and RUVBL2. **Nucleus,** v. 3, n.1, p. 29-43, Jan./Feb. 2012.

JACOBSON, D. J. et al. *Neurospora* in temperate forests of western North America. **Mycologia**, v. 96, n.1, p. 66-74, 2004.

JOHNSON, L. N. Glycogen phosphorylase: control by phosphorylation and allosteric effectors. **FASEB J.**, v. 6, n. 6, p. 2274-2282, Mar. 1992.

KARATA, K. et al. Dissecting the role of a conserved motif (the second region of homology) in the AAA family of ATPases. Site-directed mutagenesis of the ATP-dependent protease FtsH. **J. Boil. Chem.**, v. 37, p. 26225-26232, Sept. 1999.

MADSEN, N. B. Glycogen phosphorylase: control by phosphorylation. In: BOYER, P. D.; KREBS, E. G. **The Enzymes**. 3rd ed. New York: Academic Press, 1986. v. 17, p. 366-394.

MARTINEZ-PASTOR, M. et al. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). **EMBO J**., v.15, p. 2227-2235, 1996.

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

METEZEMBERG, R. L. Implications of some genetic control mechanisms in *Neurospora.* **Microbiol. Rev.**, v. 43, n. 3, p. 361-383, Sept. 1979.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Principles of metabolic regulation. In:_____ . **Lehninger principles of biochemistry**. 5th ed. New York: W H Freeman, 2008. p. 3373-3377.

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

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

NOVENTA-JORDÃO, M. A. et al. Effects of temperature shifts on the acticities of *Neurospora crassa* glycogen synthase, glycogen phosphorylase and trehalosse-6-phosphate synthase. **FEBS Lett.**, v. 378, n. 1, p. 32-36, Jan. 1996.

NOWAK, A. J. et al. Chromatin-modifying complex component Nurf55/p55 associates with histones H3 and H4 and polycomb repressive complex 2 subunit Su(z)12 through partially overlapping binding sites. **J. Biol. Chem.**, v. 286, n. 26, p. 23388-23396, July 2011.

PARTHUN, R. M. R.; WIDOM, J.; GOTTSCHLING, D. E. The major cytoplasmic histone acetyltransferase in Yeast: links to chromatin replication and histone metabolism. **Cell**, v. 87, p. 85-94, Oct. 1996.

PERKINS, D. D. *Neurospora*: the organism behind the molecular revolution. **Genetics**, v. 130, n. 4, p. 687-701, Apr. 1992.

PERKINS, D. D.; TURNER, B. C.; BARRY, E. G. Strains of *Neurospora crassa* collected from nature. **Evolution**, v. 30, n. 2, p. 281-313, June 1976.

PIRAS, R.; ROTHMAN, L. R.; CABIB, E. Regulation of muscle glycogen synthetase by metabolites. Differential effects on the I and D forms. **Biochemistry**, v. 7, n. 1, p. 56-66, Jan. 1968.

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

RAPPAS, M. S. J. et al. Structural basis of the nucleotide driven conformational changes in the AAA+ domain of transcription activator PspF. **J. Mol. Biol.**, v. 357, p. 481-492, 2006.

ROACH, P. J. Glycogen and its metabolism. **Curr. Mol. Med.**, v. 2, n. 2, p. 101-120, Mar. 2002.

SANTOS, M. A. **Estudos preliminares com proteínas de *Neurospora crassa* identificadas em complexos DNA-proteína**. 2010. 89 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

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

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

SONG, J. et al. Structural basis of histone H4 recognition by p55. **Genes Dev.**, v. 22, n. 10, p. 1313-1318, May 2008.

TAUNTON, J.; HASSIG, C. A.; SCHREIBER, S. L. A mammalian histone deacetylase related to the Yeast transcriptional regulator Rpd3p. **Science**, v. 272, p. 408-411, Apr. 1996.

TÉLLEZ-IÑÓN, M. T.; TORRES, H. N. Interconvertible forms of glycogen phosphorylase in *Neurospora crassa.* **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 66, n. 2, p. 459-463, June 1970.

TURIAN, G.; OULEVEY, N.; TISSOT, F. Preliminary studies on pigmentation and ultrastructure of microconidia of *Neurospora crassa*. **Neurospora Newslett.**, v. 11, p. 17, 1967.

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

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

WEILAND, J. J. Rapid procedure for the extraction of DNA from fungal spores and mycelia. **Fungal Genet. Newsl.**, v. 44, p. 60-63, 1997.

XU, C.; MIN, J. Structure and function of WD40 domain proteins. **Protein Cell**, v. 2, n. 3, p. 202-214, 2011.

ZALOKAR, M. Variations in the production of carotenoids in *Neurospora*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 70, n. 2, p. 561-567, Aug. 1957a.

ZALOKAR, M. Isolation of an acidic pigment in *Neurospora*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 70, n. 2, p. 568-571, Aug. 1957b.