UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Caracterização funcional de diferentes componentes das vias
metabólicas de resposta ao dano ao DNA no fungo filamentoso**
Aspergillus nidulans

Iran Malavazi

Ribeirão Preto
2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Caracterização funcional de diferentes componentes das vias
metabólicas de resposta ao dano ao DNA no fungo filamentoso**
Aspergillus nidulans

**Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biociências Aplicadas à Farmácia para
obtenção do Título de Doutor em
Biociências Aplicadas à Farmácia**

**Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia.**

Orientado: Iran Malavazi

Orientador: Gustavo Henrique Goldman

Ribeirão Preto
2007

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Malavazi, Iran

Caracterização funcional de diferentes componentes das vias metabólicas de resposta ao dano ao DNA no fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*. Ribeirão Preto, 2007.

379 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP - Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientador: Goldman, Gustavo Henrique.

1. *Aspergillus nidulans*. 2. dano ao DNA. 3. microarray. 4. complexo Mre11. 5. ATM. 6. crescimento polar.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Iran Malavazi

Caracterização funcional de diferentes componentes das vias metabólicas de resposta ao dano ao DNA no fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutor em Biociências Aplicadas à Farmácia

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Gustavo Henrique Goldman

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico

A Bruna, minha esposa por continuar
fazendo da minha existência
extensão da sua

Aos meus queridos pais Polônia e
Floriano (*in memoriam*) pela beleza
da crença antes mesmo da
compreensão

Ao meu irmão, Ivan, minha cunhada
Márcia e meu sobrinho Ian, eterna
gratidão e carinho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman. Obrigado por compartilhar seu conhecimento incondicionalmente, depositando grande confiança e entusiasmo no meu trabalho. Meus sinceros agradecimentos pela oportunidade e pelo valioso amadurecimento profissional ao longo desses anos.

A FAPESP, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro ao longo desse trabalho e pela bolsa de doutoramento concedida.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Helena de Souza Goldman, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras USP, Ribeirão Preto pelo apoio, incentivo e por viabilizar as reações de sequenciamento do DNA em seu laboratório e por todo suporte técnico.

À Andréa Carla Quiapim, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras USP, Ribeirão Preto pelo valioso auxílio no sequenciamento da biblioteca de cDNA.

À Profa. Dra. Maria Cristina Roque Barreira, Faculdade de Medicina Ribeirão Preto, USP por permitir o uso do aparelho FLA3000 para aquisição das imagens de macroarray

Ao Prof. Dr. José Antunes Rodrigues, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP por permitir o uso do aparelho cintilador.

Ao Prof. Dr. Prof. Dr. Marcelo Menossi bem como seus alunos Juliana Maria Felix, Rodrigo Duarte Drummond e Renato Vicentini, CEBMEG - UNICAMP pelo valioso auxílio na análise das imagens de macroarray e no suporte para a utilização do “pipeline” por eles desenvolvido.

À Profa. Dra. Sônia Marli Zingatetti Di Mauro e funcionários do Centro Brasileiro de Cultura e Estocagem de Clones (BCC Center), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, UNESP pelo auxílio na produção das membranas de macroarray.

À Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, Prof. Dra. Lucia Maria Carareto Alves e Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, UNESP, pelo auxílio na padronização das hibridizações de microarray e por permitir o uso dos equipamentos necessários nestes experimentos.

Ao Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck, Instituto de Ciências Biológicas, USP pelo auxílio no sequenciamento da biblioteca de cDNA e pelas críticas no manuscrito.

À Profa. Dra. Pierina Sueli Bonato, aos técnicos e alunos de seu laboratório no auxílio na determinação de NADPH e NADH⁺ por HPLC neste trabalho.

Ao Laboratório de Microscopia Confocal, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP nas pessoas do Prof. Dr. Roy Eduard Larson pela viabilização do uso do microscópio confocal e da técnica Márcia Graeff e pelo cuidadoso treinamento técnico.

À TIGR (“The Institute for Genomic Reserch”) pelo envio das lâminas de microarray de *A. nidulans*.

Ao Dr. Steven D. Harris, Universidade de Nebraska, Lincoln, EUA pelo envio das linhagens AAV1, AAV2, AKS70, AML37, ACP115 e pelo grande suporte, críticas e sugestões no trabalho com o gene *atmA*^{ATM}.

À Camile Pizzeta Semighini, Universidade de Nebraska, Lincoln, EUA pela amizade incentivo e suporte no trabalho com o gene *atmA*^{ATM}.

Ao Dr. Reinhard Fisher, Universidade de Karlsruhe, Alemanha, pelo envio das linhagens SSK13, SSK99, SJW100.

Ao Dr. Vladimir Efimov pelo envio da linhagen 1444D.

Ao Dr. Y. Itoh, Universidade de Shinshu, Japão pelo envio das linhagens ATr60cd1 e DC1.

Aos Amigos do Laboratório, deste e de outros tempos, Dra. Márcia Ferreira da Silva Balieiro, Dra. Marcia Regina Von Zeska Kress, Dr. Frederico Marianetti Soriani, Dr. Everaldo dos Reis Marques, André Mota Jr., Luciano Ângelo Bernardes, Érika do Nascimento, Joel Fernandes Lima, Paula Fagundes de Gouvêa, Ana Cristina Colabardini, Patrícia Alves de Castro, Alan Oliveira e Silva, André Lopes, Álvaro Denis Vale, Davidson Duarte Custódio. Obrigado a cada um de vocês pela grande disposição em ajudar e por proporcionarem um convívio sempre agradável.

Aos Técnicos que passaram pelo laboratório Lílían Aparecida de Souza e Washington Luís de Lima que igualmente contribuíram para a realização desse trabalho.

Aos Técnicos do laboratório e amigos Dra. Marcela Savoldi e José Luís Capellaro, meus mais sinceros agradecimentos pelo prestimoso apoio em inúmeras etapas desse trabalho.

À Pró-Reitoria de pós-graduação da USP pelo auxílio financeiro concedido e em especial à Profa. Dra. Ana Lúcia da Costa Darini pela grande ajuda e empenho nessa solicitação.

Aos Funcionários da seção de Pós-Graduação: Ana, Carlos, Eleni e Rosana por todo o auxílio dispensado.

A minha segunda família S. Elias, D. Nílvia, Carin e Vivian. Obrigado por todo apoio, dedicação e entusiasmo.

À todas as pessoas e instituições que de alguma forma foram envolvidas nesse projeto.

Tudo no mundo começou com um sim. Uma
molécula disse sim a outra molécula e
nasceu a vida. Mas antes da pré-história
havia a pré-história da pré-história e havia
o nunca e havia o sim. Sempre houve. Não
sei o quê, mas sei que o universo jamais
começou.

Clarice Lispector, *A hora da estrela*

RESUMO

MALAVAZI, I. **Caracterização funcional de diferentes componentes das vias metabólicas de resposta ao dano ao DNA no fungo filamentosso *Aspergillus nidulans***. 2007. 379 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

O complexo Mre11 (Mre11/Rad50/Nbs1) é uma componente chave da resposta celular ao dano ao DNA em humanos e recentes observações sugerem que estas proteínas são em parte responsáveis pela interface entre o sensoramento do dano ao DNA, seu reparo e as funções das proteínas envolvidas nos pontos de checagem do ciclo celular. Em *Aspergillus nidulans*, a partir de um “screening” para o isolamento de letais sintéticos na ausência de dineína, o gene *sld1*^{RAD50} foi clonado como um desses letais sintéticos através da complementação do fenótipo de deficiência de conidiação do mutante. Foi identificada uma transversão G-C na posição 2509 (Ala-692-Pro) no mutante *sld1444* a qual está presente na região de dobradiça da proteína. Essa mutação causa sensibilidade a vários agentes mutagênicos. Uma linhagem mutante *sld1*^{RAD50}::*pyrG* foi construída a qual apresentou também vários defeitos na resposta celular ao dano ao DNA incluindo sensibilidade a várias drogas mutagênicas, defeito no ponto de checagem de replicação do DNA e na viabilidade dos ascósporos. Além disso, o gene *sld1*^{RAD50} interage geneticamente com *bimE*^{APC1} para o controle do “spindle pole checkpoint” durante a segregação cromossômica sugerindo um novo papel para o complexo Mre11. Em atuação paralela com o complexo Mre11, duas proteínas quinases ditas apicais, ATM e ATR coordenam a transdução do sinal do dano ao DNA para proteínas efetoras do reparo. A proteína ATM está mutada na síndrome de instabilidade cromossômica herdada Ataxia Telangiectasia. Para a caracterização do homólogo de ATM em *A. nidulans* AtmA, uma linhagem mutante Δ *atmA*^{ATM} foi isolada. Esse mutante apresentou falha na resposta ao dano ao DNA, como seus homólogos em vários outros organismos mostrando defeitos no ponto de checagem intrafase S e G2/M, além de sensibilidade a camptothecin e bleomicina. Ainda, o extrato protéico bruto desse mutante não foi capaz de fosforilar o homólogo de NBS1 em *A. nidulans*, ScaA. Além das conhecidas funções de ATM na resposta ao dano ao DNA, foi verificado que o mutante Δ *atmA*^{ATM} apresentou uma acelerada cinética de divisão nuclear e severos defeitos no estabelecimento e manutenção do eixo de crescimento polarizado, evidenciando uma função ainda não descrita para ATM no crescimento polar. Provavelmente, AtmA regula a função e/ou localização de proteínas chaves para a formação do eixo de polarização. Diante disso, para investigar as vias metabólicas que são controladas por esse gene, o perfil transcricional do mutante Δ *atmA*^{ATM}, em comparação com a linhagem selvagem foi verificado em diferentes condições de crescimento. Os resultados indicaram um importante papel da via das pentoses fosfato na proliferação celular monitorada pela AtmA. Além disso, foram identificados vários genes com a expressão do mRNA diminuída envolvidos no crescimento polarizado, na síntese de ácido fosfatídico e de ergosterol e no tráfico intracelular, secreção e transporte vesicular. Buscando identificar genes que participam da resposta celular ao dano ao DNA causado pela droga anti topoisomerase I, camptothecin, foram utilizados filtros de macroarray de *A. nidulans* contendo 2787 genes deste organismo para monitorar a expressão gênica da linhagem selvagem e do mutante *uvsB*^{ATR}, num experimento de indução com CPT

por 30, 60 e 120 minutos. Os resultados revelaram um total de 1512 e 1700 genes modulados na linhagem selvagem e *uvrB*^{ATR} respectivamente, em pelo menos um ponto experimental. Seis desses genes que apresentaram aumento da expressão de mRNA na linhagem selvagem e diminuição da linhagem Δ *uvrB*^{ATR} foram caracterizados: *fhdA* (que codifica para uma proteína com domínio “fork-head associated”), *tprA* (uma proteína hipotética que apresenta o domínio “tetratricopeptide repeat”), *mshA* (um homólogo MutS6 envolvido em “mismatch repair”), *phbA* (um homólogo da proibitina), *uvrC*^{RAD51} e *csbA* (homólogo da proteína CSB envolvida no reparo por excisão de nucleotídeos e ligada a Síndrome de Cockayne). A indução transcricional desses genes na presença de CPT requer a função de Δ *uvrB*^{ATR}. Estes genes foram deletados e surpreendentemente apenas *uvrC*^{RAD51} apresentou sensibilidade a CPT, enquanto os outros mostraram sensibilidade a outros agentes que causam dano ao DNA e estresse oxidativo. Além disso, com exceção de *uvrC*^{RAD51}, a deleção desses genes leva a supressão parcial da sensibilidade a menadiona e paraquat do mutante Δ *uvrB*^{ATR}. Esses resultados indicaram um comportamento heterogêneo de sensibilidade durante o crescimento na presença de agentes que causam dano direto ou indireto ao DNA, evidenciando que o perfil transcricional não é determinante para prever a função de um gene na proteção da célula a determinada droga que causa dano ao DNA.

Palavras-chave: 1. *Aspergillus nidulans*. 2. dano ao DNA. 3. microarray. 4. complexo Mre11. 5. ATM. 6. crescimento polar.

ABSTRACT

MALAVAZI, I. **Functional characterization of different components of the metabolic pathways involved in the filamentous fungi *Aspergillus nidulans* DNA damage response.** 2007. 379 f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

The Mre11 protein complex (Mre11/Rad50/Nbs1) has emerged as a central component in the human cellular DNA damage response, and recent observations suggest that these proteins are at least partially responsible for the linking of DNA damage detection to DNA repair and cell cycle checkpoint functions. In *Aspergillus nidulans*, the *sldI1444D* mutant was isolated in a screen for dynein synthetic lethals. The *sldI*^{RAD50} gene was cloned by complementation of the sporulation deficiency phenotype of this mutant. A transversion G-C at the position 2509 (Ala-692-Pro amino acid change) in the *sldI1444D* mutant causes sensitivity to several DNA-damaging agents. The mutation *sldI1* occurs at the CXXC hinge domain of Rad50. An inactivation strain *sldI*^{RAD50}::*pyrG* was constructed. Besides sensitivity to a number of DNA-damaging agents, this deletion strain was also impaired in the DNA replication checkpoint response and in ascospore viability. Also, *sldI*^{RAD50}::*pyrG* genetically interacted with *bimE*^{APC1}, acting in the spindle pole checkpoint control during segregation, suggesting a new possible role of Mre11 complex. In parallel to the Mre11 complex, two apical kinases ATM and ATR respond to DNA damage and transduce the signal to effector proteins. In humans, mutations in ATM cause the devastating neurodegenerative disease Ataxia Telangiectasia. Here we characterized the homolog of ATM (AtmA) in the filamentous fungus *A. nidulans*. The deletion strain $\Delta atmA$ presented defects in the DNA damage response as previously shown in other model organisms including intra S-phase and G2/M checkpoint defects, sensitivity to camptothecin and bleomycin. Also, the crude extract from the mutant strain did not phosphorylate the *NBS1* homologue ScaA. In addition to its expected role in the DNA damage response, the $\Delta atmA$ mutant showed increased nuclear division kinetics and severe defects in polarized hyphal growth, indicating a novel feature for the ATM gene. Probably, AtmA regulates the function and/or localization of landmark proteins required for the formation of a polarity axis. We extended these studies by investigating which pathways are controlled by AtmA during proliferation and polar growth by comparatively determining the transcriptional profile of *A. nidulans* wild type and $\Delta atmA$ mutant strains in different growth conditions. Our results indicated an important role of the pentose phosphate pathway in the fungal proliferation during endogenous DNA damage and polar growth monitored by the AtmA kinase. Furthermore, we identified several genes that have decreased mRNA expression in the $\Delta atmA$ mutant that are involved in the formation of polarized hyphae and control of polar growth; in the biosynthesis of phosphatidic acid and ergosterol; and intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport. In order to identify genes that responded to the DNA damage mediated by the anti-topoisomerase I drug, camptothecin, we used an *A. nidulans* macroarray carrying sequences of 2,787 genes from this fungus to monitor gene expression of both wild-type and *uvsB*^{ATR} in a time-point experiment where mycelium was exposed to 60, 90 and 120 minutes to the drug. The results revealed a total of 1,512 and 1,700 genes in the wild-type and *uvsB*^{ATR} deletion mutant strain that displayed statistically significant difference in at

least one experimental time-point. We characterized six genes that have increased mRNA expression in the presence of CPT in the wild-type strain relative to the *uvsB*^{ATR} mutant strain: *fhdA* (encoding a fork head associated domain protein), *tprA* (encoding a hypothetical protein that contains a tetratrico peptide repeat), *mshA* (encoding a MutS homologue involved in mismatch repair), *phbA* (encoding a prohibitin homologue), *uvsC*^{RAD51} (the homologue of the RAD51 gene), and *cshA* (encoding a homologue of the excision repair protein ERCC-6 [Cockayne's syndrome protein]). The induced transcript levels of these genes in the presence of CPT required *uvsB*^{ATR}. These genes were deleted, and surprisingly, only the $\Delta uvsC$ ^{RAD51} mutant strain was sensitive to CPT; however, the others displayed sensitivity to a range of DNA-damaging and oxidative stress agents. Moreover, with the exception of UvsC, deletion of each of these genes partially suppressed the sensitivity of the $\Delta uvsB$ strain to menadione and paraquat. These results indicated a very complex and heterogeneous sensitivity behavior during growth in the presence of agents that directly or indirectly cause DNA damage and the transcriptional response to DNA-damaging agents does not necessarily identify the genes that protect against these agents.

Keywords: 1. *Aspergillus nidulans*. 2. DNA damage. 3. microarray. 4. Mre11 complex. 5. ATM. 6. polar growth.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Modelo estrutural proposto do complexo Mre11/Rad502/Nbs1	17
Figura 2: Ciclo de vida do fungo filamentoso <i>Aspergillus nidulans</i>	25
Figura 3: Análise de complementação dos subclones de pi1-1 na linhagem <i>sld11444</i> (1444D)	92
Figura 4: Alinhamento da proteína Sld1 ^{Rad50}	94
Figura 5: Esquema estrutural da proteína <i>sld1</i> ^{Rad50} e localização da mutação C2074G na linhagem 1444D	95
Figura 6: Construção da linhagem <i>sld1</i> ^{RAD50} :: <i>pyrG</i>	97
Figura 7: Fenótipo do crescimento radial das linhagens <i>sld1</i> ^{RAD50} :: <i>pyrG</i> , <i>sld11444</i> e wt	98
Figura 8: Viabilidade dos conídios da linhagem <i>sld1</i> ^{RAD50} :: <i>pyrG</i> e duplo mutantes após exposição a luz UV	99
Figura 9: Fenótipos da síntese de DNA radioresistente das linhagens <i>sld1</i> ^{RAD50} , <i>sld1</i> ^{RAD50} :: <i>pyrG</i> , <i>mreA</i> ^{MRE11} :: <i>pyr4</i> e wt	103
Figura 10: Inibição do crescimento radial das linhagens <i>sld1</i> ^{RAD50} :: <i>pyrG</i> , <i>bimE7</i> e <i>sld1</i> ^{RAD50} :: <i>pyrG bimE7</i> na presença de HU	104
Figura 11: Identificação da mutação <i>sld11444</i> na linhagem 1444D.....	107
Figura 12: Domínios comuns e tamanhos dos membros da família PI 3K (“phosphoinositide 3-kinase”) no fungo filamentoso <i>A. nidulans</i>	121
Figura 13: Construção da linhagem $\Delta atmA^{ATM}$	123
Figura 14: Experimento de RT-PCR para o gene <i>atmA</i> ^{ATM} na linhagem IM69.....	124
Figura 15: Sensibilidade do mutante $\Delta atmA^{ATM}$ a drogas que causam dano ao DNA	125
Figura 16: O gene <i>atmA</i> ^{ATM} é necessário para a funcionalidade do ponto de checagem G2/M	126
Figura 17: Fenótipo da síntese de DNA radioresistente (RDS) da linhagem $\Delta atmA^{ATM}$	127
Figura 18: Ensaio de fosforilação <i>in vitro</i> da proteína ScaA ^{NBS1}	128
Figura 19: Fenótipo do crescimento radial dos mutantes $\Delta atmA$ e <i>alcA::gfp::atmA129</i>	129
Figura 20: Localização subcelular da proteína AtmA	130

Figura 21: Análise da septação dos germinantes na linhagem selvagem e $\Delta atmA^{ATM}$	131
Figura 22: Morfologia dos conidióforos do mutante $\Delta atmA^{ATM}$	134
Figura 23: Defeitos morfológicos relacionados ao crescimento polarizado no mutante $\Delta atmA^{ATM}$	137
Figura 24: Percentual de células com crescimento polarizado em germinantes do mutante $\Delta atmA^{ATM}$ após liberação do bloqueio com HU	138
Figura 25: Perfil de divisão nuclear no mutante $\Delta atmA^{ATM}$	138
Figura 26: Presença de fragmentação do DNA constitutiva em germinantes da linhagem $\Delta atmA^{ATM}$	139
Figura 27: Falha no restabelecimento do eixo polarizado de crescimento no mutante $\Delta atmA^{ATM}$ no ensaio com citocalasina A.....	141
Figura 28: O crescimento dos germinantes não está restrito às extremidades das hifas no mutante $\Delta atmA^{ATM}$	142
Figura 29: Microtúbulos não convergem na extremidade das hifas no mutante $\Delta atmA^{ATM}$	143
Figura 30: Fenótipo do crescimento radial da linhagem $\Delta atmA^{ATM}$ e duplo mutantes na presença de dano ao DNA	145
Figura 31: Percentual de inibição do crescimento radial da linhagem $atmA^{ATM}$ e duplo mutantes na presença de dano ao DNA.....	146
Figura 32: Viabilidade dos conídios da linhagem $\Delta atmA^{ATM}$ e duplo mutantes após exposição à luz UV.....	150
Figura 33: A superexpressão de $atmA^{ATM}$ suprime parcialmente a sensibilidade a MMS do mutante $\Delta atmA$	152
Figura 34: Ensaio de viabilidade com peróxido de hidrogênio no duplo mutante $uvsB101 alcA::atmA$	153
Figura 35: Distribuição de radicais livres no mutante $uvsB101 alcA::atmA$ pela coloração com NBT	154
Figura 36: Fenótipo dos germinantes do mutante $uvsB101 alcA::atmA$	155
Figura 37: Fenótipo dos germinantes no ensaio de polarização após liberação do bloqueio com HU do mutante $uvsB101 alcA::atmA$	156
Figura 38: Desenho experimental das hibridizações de microarray a partir de conídios crescidos por 60, 90 e 120 minutos	165

Figura 39: Distribuição gráfica dos genes modulados durante o experimento de crescimento dos conídios.	166
Figura 40: Clusters de expressão gênica gerados pelo algoritmo aglomerativo “K-means” nas hibridizações de microarray (germinação dos conídios por 60, 90 e 120 minutos).....	167
Figura 41: Complementação da mutação <i>pppA1</i> com o gene da transaldolase na linhagem <i>pppA1</i>	174
Figura 42: Fenótipos observados na linhagem duplo mutante $\Delta atmA^{ATM}$ <i>pppA1</i> ...	176
Figura 43: Ensaio de viabilidade do conídios na presença de peróxido de hidrogênio das linhagens $\Delta atmA$ e <i>pppA1</i> e duplo mutante	179
Figura 44: Distribuição de radicais livres no mutante $\Delta atmA$ <i>pppA1</i> após coloração com NBT	180
Figura 45: Distribuição de radicais livres no mutante $\Delta atmA$ <i>pppA1</i> após tratamento com H ₂ DCFDA	181
Figura 46: Desenho experimental das hibridizações de microarray a partir de conídios crescidos por 60, 90 e 120 minutos após liberação do bloqueio com HU	183
Figura 47: Distribuição gráfica dos genes modulados durante o experimento de microarray com conídios crescidos após liberação do bloqueio com HU	184
Figura 48: Clusterização hierárquica comparando o padrão de expressão da linhagem selvagem e $\Delta atmA$ após a liberação do bloqueio com HU.....	191
Figura 49: Repressão dos valores mRNA no mutante $\Delta atmA^{ATM}$ de genes identificados pela técnica de microarray após liberação do bloqueio com HU	192
Figura 50: Localização subcelular da proteína KipA no mutante $\Delta atmA$	194
Figura 51: Ácido fosfatídico está envolvido no defeito de polarização no mutante $\Delta atmA$	198
Figura 52: A diminuição do “pool” de ácido fosfatídico e a ausência de <i>ca/C2</i> na célula exacerbam o defeito de crescimento polarizado após liberação do bloqueio com HU	199
Figura 53: Efeito da inibição da síntese de esfingolípídeos na linhagem $\Delta atmA$	200

Figura 54: Polarização do ergosterol de membrana e influência da lovastatina durante o crescimento polarizado em <i>A. nidulans</i>	202
Figura 55: Marcação com FM4-64 dos germinantes da linhagem $\Delta atmA$	204
Figura 56: Os genes <i>mreA</i> ^{MRE11} e <i>uvsC</i> ^{RAD51} de <i>A. nidulans</i> são induzidos transcricionalmente pela presença de CPT.....	216
Figura 57: Esquema da matriz dos “spots” depositados nas membranas de nylon do macroarray	219
Figura 58: Desenho experimental dos experimentos de macroarray	220
Figura 59: Gráfico de dispersão das hibridizações de macroarray (duplicatas) para a linhagem selvagem GR5	221
Figura 60: Perfil de expressão global dos genes com modulação estatisticamente significativa em pelo menos um ponto experimental nos experimentos de macroarray com a linhagem selvagem GR5	222
Figura 61: Clusters de expressão gênica gerados pelo algoritmo “K-means” nas hibridizações de macroarray (linhagem selvagem)	224
Figura 62: Padrão de expressão dos clusters 35 e 49 em resposta a CPT na linhagem selvagem GR5	225
Figura 63: Comparação dos padrões de variação de expressão gênica pelas técnicas de macroarray e RT-PCR em tempo real de alguns genes estudados.....	235
Figura 64: Variação da expressão de genes induzidos identificados no macroarray por RT-PCR em tempo real.....	237
Figura 65: Diagrama de Venn da representação dos transcritos identificados nos experimentos de macroarray durante a exposição a CPT.....	241
Figura 66: Clusterização hierárquica mostrando o perfil de expressão de 84 genes selecionados nos experimentos de macroarray para a linhagem selvagem e $\Delta uvsB^{ATR}$ expostas a CPT	243
Figura 67: A expressão dos genes e <i>tprA</i> , <i>uvsC</i> , <i>cshA</i> , <i>mshA</i> , <i>fhdA</i> e <i>phbA</i> , é dependente de <i>uvsB</i> ^{ATR}	244
Figura 68: Construção das linhagens inativadas dos genes <i>mshA</i> , <i>phbA</i> , <i>cshA</i> , <i>fhdA</i> e <i>tprA</i> identificados pela técnica de macroarray.....	246
Figura 69: Fenótipo de crescimento radial das linhagens $\Delta phbA$, $\Delta mshA$, $\Delta cshA$, $\Delta fhdA$, $\Delta tprA$ e $\Delta uvsC$ na presença de drogas	248

Figura 70: Perfil de expressão dos genes <i>phbA</i> , <i>mshA</i> , <i>csbA</i> , <i>fhbA</i> , <i>tprA</i> e <i>uvrC</i> na presença de MMS, 4NQO e BLEO avaliado por RT PCR em tempo real	250
Figura 71: Perfil de expressão dos genes <i>phbA</i> , <i>mshA</i> , <i>csbA</i> , <i>fhbA</i> , <i>tprA</i> e <i>uvrC</i> na presença de PARAQ e MENA avaliado por RT PCR em tempo real	251
Figura 72: Instabilidade genética na linhagem $\Delta mshA$ verificada pela presença de setores durante o crescimento	252
Figura 73: As linhagens duplo mutantes com <i>uvrB</i> ^{ATR} suprimem o fenótipo de sensibilidade a drogas que causam estresse oxidativo	253

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Genótipos das linhagens de <i>A. nidulans</i> utilizadas neste trabalho	33
Tabela 2: Soluções estoque de requisitos nutricionais recomendados para complementação das auxotrofias em <i>A. nidulans</i>	43
Tabela 3: Soluções estoque das drogas mutagênicas	43
Tabela 4: Seqüência dos primers utilizados para a produção dos cassetes de deleção pela técnica “PCR-mediated”	69
Tabela 5: Descrição dos primers e sondas fluorescentes utilizados nas reações de RT-PCR em Tempo Real	77
Tabela 6: Ensaio de mitose da linhagem <i>sldI</i> ^{RAD50} :: <i>pyrG</i> e duplo mutantes.....	101
Tabela 7: Ensaio de viabilidade da linhagem <i>sldI</i> ^{RAD50} e duplo mutantes.....	101
Tabela 8: Papel do gene <i>sldI</i> ^{RAD50} no processo de gametogênese em <i>A. nidulans</i>	109
Tabela 9: Papel do gene <i>atmA</i> ^{ATM} no processo de gametogênese em <i>A. nidulans</i>	133
Tabela 10: Ensaio de mitose da linhagem <i>atmA</i> ^{ATM} e duplo mutantes	148
Tabela 11: Determinação do percentual de divisão nuclear para a linhagem Δ <i>atmA</i> ^{ATM}	165
Tabela 12: Genes reprimidos transcricionalmente no mutante Δ <i>atmA</i> de <i>A. nidulans</i> durante a germinação dos conídios por 60, 90 e 120 minutos	168
Tabela 13: Genes induzidos transcricionalmente no mutante Δ <i>atmA</i> de <i>A. nidulans</i> durante a germinação dos conídios por 60, 90 e 120 minutos	169
Tabela 14: Determinação da concentração de NADPH e NADP ⁺ nos germinantes das linhagens selvagem e mutante Δ <i>atmA</i>	178
Tabela 15: Determinação do percentual de crescimento polarizado para a linhagem Δ <i>atmA</i> ^{ATM}	183
Tabela 16: Genes induzidos transcricionalmente no mutante Δ <i>atmA</i> de <i>A. nidulans</i> durante a germinação dos conídios por 60, 90 e 120 minutos após bloqueio com HU	186

Tabela 17: Genes reprimidos transcricionalmente no mutante $\Delta atmA$ de <i>A. nidulans</i> durante a germinação dos conídios por 60, 90 e 120 minutos após bloqueio com HU	187
Tabela 18: Interações genéticas observadas no mutante $\Delta atmA$	196
Tabela 19: Genes induzidos em presença de CPT identificados pela análise do macroarray na linhagem selvagem GR5 durante tratamento com CPT por 30, 60 e 120 minutos.	227

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

4NQO	óxido de 4-nitroquinolina
<i>amp^R</i>	resistência a ampicilina
APC	complexo promotor da anáfase (“anaphase promoting complex”)
ATM	“ataxia telangiectasia “mutated”
ATR	“ATM and Rad3 related”
BER	reparo por excisão de bases (“base excision repair”)
<i>bimE</i>	gene “blocked in mitosis” E de <i>A. nidulans</i>
BLEO	bleomicina
BSA	albumina de soro bovino
CA	citocalasina A
cDNA	DNA complementar
CPT	camptothecin
CS	Síndrome de Cockayne (Cockayne’s Syndrome”)
<i>cshA</i>	gene “Cockayne’s syndrome homolog” A de <i>A. nidulans</i>
DAG	diacilglicerol
DAPI	4, 6-diamino-2-fenilindol
DMSO	dimetilsulfóxido
dNTP	desoxiribonucleotídeos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DPI	difenilenoiodônio
DSB	quebra de dupla fita (“double strans break”)
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiamina tetraacético
EGTA	ácido etileno glicol-bis(2-aminoetil éter)-N,N,N’,N’ tetraacético
<i>fhdA</i>	gene “forkhead domain” A de <i>A. nidulans</i>
FM4-64	(N-(3-thiethylammoniumpropyl)-4-(p-diethylaminophenyl)hexatrienyl) pyridinium dibromide
g	gravidade
<i>gfp</i>	gene da proteína fluorescente verde (“green fluorescent protein”)
H ₂ DCFDA	5-(e -6)-clorometil-2’,7’-diclorofluoresceína diacetato, acetil ester
HEPES	ácido N-(2 hidróximetil) piperazina-N’-(4-[2-etanosulfônico])
HR	recombinação homóloga (“homologous recombination)
HU	hidroxiuréia
J	joules

Kb	kilo bases
KDa	kilo Daltons
<i>kipA</i>	gene kinesina A de <i>A. nidulans</i>
M	molar
MENA	menadiona
MES	ácido 2 (N-morfolino etanosulfônico)
MMR	reparo por emparelhamento errado de bases (“mismatch repair”)
MMS	metil metano sulfonato
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino propanosulfônico)
mRNA	RNA mensageiro
<i>mshA</i>	gene “MUTS homolog” A de <i>A. nidulans</i>
NBS	Síndrome de Nijmegen (“Nijmegen Breakage Syndrome”)
NBT	“nitro blue tetrazolium”
NER	reparo pro excisão de nucleotídeos (“nucleotide excision repair”)
NHEJ	união das extremidades não homólogas (“non homologous end joining”)
<i>nimA</i>	gene “never in mitosis” A de <i>A. nidulans</i>
nm	nanômetros
ORF	fase aberta de leitura (“open reading frame”)
p/p	peso/peso
p/v	peso/volume
PARAQ	paraquat
<i>phbA</i>	gene “prohibitin homolog” A de <i>A. nidulans</i>
PHLEO	fleomicina
PI3Kc	“phosphoinositide -3-kinase catalytic domain”
PIKK	“phosphoinositide 3-kinase related kinase”
PLC	fosfolipase C
PLD	fosfolipase D
ppp	via das pentoses fosfato (“pentose phosphate pathway”)
<i>pyrG</i>	gene orotidina-5'-fosfato descarboxilase de <i>A. fumigatus</i>
r^2	coeficiente de correlação
RDS	síntese de DNA radioresistente (“radioresistant DNA synthesis”)
RI	radiação ionizante
ROS	espécies reativas do oxigênio (“reactive oxygen species”)
rpm	rotação por minuto

RT-PCR	transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
SDS	dodecil sulfato de sódio
<i>sldI</i>	gene “synthetic lethality without dynein” I de <i>A. nidulans</i>
ssDNA	DNA fita simples (“single strand DNA”)
TEMED	N, N, N', N' tetrametilenodiamina
TIGR	“The Institute for Genomic Research”
<i>tpmA</i>	gene tropomiosina de <i>A. nidulans</i>
<i>tprA</i>	gene “tetratricopetide repeats” A de <i>A. nidulans</i>
TRIS	Tris-(hidroximetil)-aminometano
UV	luz ultravioleta
<i>uvsB</i>	gene “ultraviolet sensitive” B de <i>A. nidulans</i>
v/v	volume/volume
WGA	aglutinina de gérmen de trigo (“wheat germ agglutinin”)
wt	linhagem selvagem (“wild type”)
XP	Xeroderma Pigmentosum

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	iii
Lista de figuras	v
Lista de tabelas	x
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	xii
1.0. INTRODUÇÃO	1
1.1. A resposta celular ao dano do DNA	2
1.2. O complexo Mre11 de reparo ao dano ao DNA	10
1.3. O fungo <i>Aspergillus nidulans</i> como modelo experimental	21
1.4. A resposta ao dano ao DNA no modelo experimental <i>Aspergillus nidulans</i>	26
2.0. OBJETIVOS	29
3.0. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1. Linhagens de <i>A. nidulans</i> utilizadas neste trabalho	33
3.2. Meios de Cultura	35
3.2.1. Meios de cultura para <i>A. nidulans</i>	35
3.2.1.1. Meio mínimo (MM)	35
3.2.1.2. Meio completo (YAG, YUU, YG e YG+UU)	35
3.2.1.3. Meio mínimo de Cove (Cove, 1966)	35
3.2.2. Meio de cultura para <i>E. coli</i>	36
3.2.2.1. Meio Luria Bertani (LB)	36
3.2.2.2. Terrific Broth	36
3.3. Soluções e Tampões	37
3.3.1. Solução de elementos traços	37
3.3.2. Solução de sais 20X concentrada para MM (Kaffer, 1977)	37
3.3.3. Solução de sais 50X concentrada para MM Cove (Cove, 1966)	37
3.3.4. Soluções de protoplastização para transformação em <i>A. nidulans</i>	38
3.3.4.1. Solução 1 de protoplastização	38
3.3.4.2. Solução 2 de protoplastização	38
3.3.4.3. Solução 3 de protoplastização	38
3.3.4.4. Solução 4 de protoplastização	38
3.3.4.5. Solução 5 de protoplastização	39
3.3.5. Solução de lise para mini prep	39
3.3.6. Solução de neutralização para mini prep	39
3.3.7. Solução de Denhardt (100X concentrada)	39

3.3.8. Solução depurinizante.....	39
3.3.9. Solução salina citrato (SSC) 20X concentrada.....	40
3.3.10. Solução OLB para produção de sonda “overgo”	40
3.3.11. Solução SDS 10%	40
3.3.12. Solução de fixação para microscopia I	41
3.3.13. Solução de fixação para microscopia II	41
3.3.14. Solução estoque de DAPI (4,6-diamino-2-phenilindol)	41
3.3.15. Solução estoque de calcoflúor	41
3.3.16. Solução estoque de xilose.....	41
3.3.17. Solução estoque de lovastatina.....	41
3.3.18. Solução estoque de miriocina	42
3.3.19. Solução estoque de filipina.....	42
3.3.20. Solução estoque de “nitro blue tetrazolium” (NBT).....	42
3.3.21. Solução estoque de FM4-64	42
3.3.22. Solução estoque de difenileniodônio	42
3.3.23. Solução estoque de H ₂ DCFDA.....	42
3.3.24. Soluções estoque de requisitos nutricionais.....	43
3.3.25. Soluções estoque de drogas mutagênicas utilizadas	43
3.3.26. Tampão PBS (“Phosphate buffered saline”) 10X concentrado.....	44
3.3.27. Tampão MOPS 10X concentrado.....	44
3.3.28. Tampão de amostra para eletroforese de RNA	44
3.3.29. Tampão de amostra para eletroforese de DNA.....	44
3.3.30. Tampão de amostra para eletroforese de proteínas	44
3.3.31. Tampão TRIS-Acetato-EDTA (TAE) 50X concentrado.....	45
3.3.32. Tampão GET para “mini prep”.....	45
3.3.33. Tampão de eletroforese de proteína	45
3.3.34. Tampão de extração de DNA	45
3.3.35. Tampão de extração de proteína	46
3.3.36. Inibidores de protease (concentrações finais para uso)	46
3.3.37. Corante comassie	46
3.3.38. Descorante de comassie	46
3.3.39. SDS PAGE 10%	46
3.3.39.1. Gel de poliacrilamida - empilhamento	46
3.3.39.2. Gel de poliacrilamida - corrida	47
3.4. Protocolos adotados.....	47
3.4.1. Construção da biblioteca de cDNA induzida por camptothecin	47
3.4.2. Produção das membranas de macroarray	48
3.4.3. Mini preparação do DNA plasmidial	49
3.4.4. Maxi preparação do DNA cosmidial	51
3.4.5. Reação de sequenciamento do DNA	52
3.4.6. Extração de DNA genômico	53
3.4.7. Extração e manipulação de RNA	53
3.4.8. Extração de proteínas	54
3.4.9. Ensaio de fosforilação <i>in vitro</i> da proteína ScaA	55
3.4.10. Marcação de sonda radioativa	56
3.4.11. Hibridização de ácidos nucleicos	56
3.4.11.1. Hibridização das membranas de Southern blot e hibridização de colônia	56
3.4.11.2. Hibridização das membranas de macroarray com sonda “overgo”	57
3.4.11.3. Hibridização das membranas de macroarray com sonda de cDNA	57
3.4.11.4. Retirada das sondas das membranas de macroarray (“probe stripping”)	58

3.4.11.5. Captura e análise estatística das imagens de macroarray	59
3.4.11.6. Hibridização das lâminas de microarray de <i>A. nidulans</i>	61
3.4.11.7. Captura e análise estatística das imagens de microarray	62
3.4.12. Identificação da mutação na linhagem 1444D e inativação do gene <i>sldl</i> ^{RAD50}	64
3.4.13. Identificação da mutação no gene <i>bimE</i> ^{APC1} na linhagem A776	66
3.4.14. Identificação da mutação no gene <i>pppA1</i> na linhagem G840	67
3.4.15. Inativação gênica em <i>A. nidulans</i> pela técnica “PCR-mediated”	67
3.4.15.1. Inativação do gene <i>atmA</i> ^{ATM}	71
3.4.16. Construção de uma linhagem condicional <i>alcA::gfp::atmA</i>	71
3.4.17. Transformação em <i>A. nidulans</i>	73
3.4.18. Preparo de células eletrocompetentes de <i>E. coli</i>	74
3.4.19. Eletrotransformação de <i>E. coli</i>	75
3.4.20. Southern blot alcalino	75
3.4.21. Reação de PCR quantitativo em tempo real (“Real time RT- PCR”)	76
3.4.22. Ensaio de viabilidade após bloqueio na fase S	78
3.4.23. Ensaio de viabilidade após tratamento com peróxido de hidrogênio	79
3.4.24. Experimentos de microscopia de fluorescência	79
3.4.24.1. Coloração dos germinantes com as sondas fluorescentes utilizadas (DAPI, calcofluor, filipina, FM4-64 e H ₂ DCFDA)	79
3.4.24.2. Análise das linhagens que apresentavam fusão com GFP	81
3.4.24.3. Determinação da funcionalidade do ponto de checagem intrafase S (Ensaio de Mitose)	82
3.4.24.4. Determinação da funcionalidade do ponto de checagem G2/M	82
3.4.24.5. Ensaio de TUNEL	83
3.4.24.6. Determinação da polarização do crescimento em conídios após liberação do bloqueio com HU	84
3.4.24.7. Determinação do percentual de septação	85
3.4.24.8. Estudo da inibição da divisão nuclear na presença de bleomicina	85
3.4.25. Coloração dos germinantes com NBT	86
3.4.26. Determinação de NADPH/NADP ⁺	86
3.4.27. Cruzamentos entre linhagens de <i>A. nidulans</i>	87
3.4.28. Determinação da sensibilidade a agentes mutagênicos	88
3.4.29. Estoque de linhagens	88
3.4.30. Análise estatística	88

4.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO89

Módulo 4.1: Isolamento e caracterização fenotípica do mutante $\Delta sldl^{RAD50}$ em *A. nidulans*.90

4.1.1. Identificação do gene <i>sldl</i> ^{RAD50} através do “screening” de letais sintéticos na ausência de dineína	91
4.1.2. Inativação da função do gene <i>sldl</i> ^{RAD50}	96
4.1.3. Caracterização fenotípica da linhagem <i>sldl</i> ^{RAD50} :: <i>pyrG</i>	97
4.1.3.1. Papel do gene <i>sldl</i> ^{RAD50} na resposta celular ao dano ao DNA	97
4.1.3.2. Participação do gene <i>sldl</i> ^{RAD50} no ponto de checagem intrafase S	100
4.1.3.3. Interações genéticas entre os genes <i>sldl</i> ^{RAD50} , <i>scaA</i> ^{NBS1} , <i>uvsB</i> ^{ATR} e <i>bimE</i> ^{APC1}	103
4.1.3.4. Participação do gene <i>sldl</i> ^{RAD50} no programa meiótico em <i>A. nidulans</i>	107
4.1.4. Discussão - O gene <i>sldl</i> ^{RAD50} , o complexo Mre11 e a resposta ao dano ao DNA	109

Módulo 4.2: Isolamento e caracterização fenotípica do mutante $\Delta atmA^{ATM}$ em *A. nidulans* 119

4.2.1. A clonagem e a inativação do gene $atmA^{ATM}$ de <i>A. nidulans</i>	120
4.2.2. Caracterização fenotípica da linhagem IM69 ($\Delta atmA^{ATM}$)	124
4.2.2.1. Papel do gene $atmA^{ATM}$ na resposta celular ao dano ao DNA	124
4.2.2.2. Participação do gene $atmA^{ATM}$ no ponto de checagem intrafase S e G2/M	125
4.2.2.3. A inativação do gene $atmA^{ATM}$ leva ao fenótipo RDS e a ausência de fosforilação de $scaA^{NBS1}$	126
4.2.2.4. A localização subcelular da proteína AtmA	128
4.2.2.5. O papel do gene $atmA^{ATM}$ no ponto de checagem de septação	130
4.2.2.6. Participação do gene $atmA^{ATM}$ no programa meiótico em <i>A. nidulans</i>	132
4.2.2.7. O papel do gene $atmA^{ATM}$ na formação do eixo polarizado de crescimento	133
4.2.2.8. Papel do gene $atmA^{ATM}$ na organização dos microtúbulos nas extremidades das hifas	141
4.2.2.9. Possíveis interações genéticas do gene $atmA^{ATM}$, e outros componentes do sistema de reparo	144
4.2.2.10. Possíveis interações genéticas entre as quinases $atmA^{ATM}$ e $uvsB^{ATR}$	151
4.2.3. Discussão - O gene $atmA^{ATM}$, seu papel no reparo ao dano ao DNA e na formação do eixo estável de crescimento polarizado	157

Módulo 4.3: Identificação de genes diferencialmente expressos na linhagem $\Delta atmA^{ATM}$ envolvidos na cinética de divisão nuclear acelerada e com o defeito de polarização no mutante..... 163

4.3.1. Uso da técnica de microarray para identificação de genes diferencialmente expressos no mutante $\Delta atmA^{ATM}$	164
4.3.2. Identificação de genes diferencialmente expressos no mutante $\Delta atmA^{ATM}$ durante o crescimento dos conídios	164
4.3.2.1. A via das pentoses fosfato e sua relação com a cinética de divisão nuclear acelerada e com a diminuição do crescimento polarizado no mutante $\Delta atmA^{ATM}$	171
4.3.3. Identificação de genes diferencialmente expressos no mutante $\Delta atmA^{ATM}$ durante o crescimento dos conídios após liberação do bloqueio com HU ...	182
4.3.3.1. Genes envolvidos na formação do eixo de crescimento polarizado e no controle do crescimento polar	193
4.3.3.2. Genes envolvidos na síntese de ácido fosfatídico	196
4.3.3.3. Genes envolvidos na biossíntese de ergosterol, tráfico intracelular, secreção e transporte vesicular	201
4.3.4. Discussão - Análise do perfil transcricional do mutante $\Delta atmA$ em <i>A. nidulans</i>	204

Módulo 4.4: Análise do transcriptoma de *Aspergillus nidulans* exposto ao dano ao DNA causado por camptothecin através de macroarrays de cDNA 215

4.4.1 Construção e sequenciamento da biblioteca de cDNA induzida por CPT do fungo <i>A. nidulans</i>	216
4.4.2. Uso da técnica de macroarray para identificação de genes diferencialmente expressos em presença de CPT	218
4.4.2.1. Análise global do perfil transcricional de <i>A. nidulans</i> em presença de CPT na linhagem selvagem GR5	222
4.4.2.2. Confirmação da expressão diferencial dos genes identificados pela técnica de macroarray utilizando a metodologia de RT-PCR em tempo real	234

4.4.2.3. Análise global do perfil transcricional de <i>A. nidulans</i> em presença de CPT no mutante $\Delta uvrsB^{ATR}$	240
4.4.2.4. Caracterização molecular dos genes identificados pela técnica de macroarray	245
4.4.3. Discussão - Perfil transcricional em <i>A. nidulans</i> após exposição ao dano ao DNA causado por CPT	254
5.0. CONCLUSÕES	261
6.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	264

1.0. INTRODUÇÃO

1.1. A resposta celular ao dano do DNA

Todas as células vivas apresentam o DNA como material responsável pela transmissão da informação genética, com exceção de alguns vírus que podem apresentar RNA (OLIVEIRA; MENCK, 2001). O sucesso da molécula de DNA dupla fita, na forma ordenada de um polímero de nucleotídeos como transmissor da informação genética tornou-se possível graças a estabilidade, a resistência do polímero e a grande eficiência e fidelidade do processo catalítico replicativo. A informação duplicada contida no modelo estrutural do DNA facilita o reparo caso o dano aconteça em apenas uma das fitas. Por essa razão, a molécula de DNA constituiu-se num modelo extremamente apropriado do ponto de vista evolutivo para armazenar a informação genética da forma mais fiel possível.

O processo de mitose é um dos mais elementares da célula. Nele, uma cópia íntegra do genoma precisa ser transmitida para cada uma das células filhas. Por esse motivo, os organismos desenvolveram um sistema vital de reparo do dano sofrido pela molécula de DNA para prevenir a transmissão errônea da informação genética. Em eucariotos, o mecanismo de reparo envolve múltiplas vias metabólicas, as quais são altamente dispendiosas do ponto de vista energético e requerem inúmeros genes envolvidos nos sistemas pertinentes. Um grupo de proteínas relativamente conservadas entre as espécies, a pluralidade de genes identificados em bactérias, leveduras, fungos filamentosos e mamíferos demonstram que o reparo do dano ao DNA é altamente necessário à célula em termos de sua sobrevivência (GOLDMAN; MACGUIRE; HARRIS et al., 2002). Entretanto, o genoma das células vivas está constantemente exposto à ação deletéria de agentes causadores de danos os quais podem levar a alterações do esqueleto carbônico da molécula e o aparecimento de estruturas não canônicas do DNA as quais desencadeiam a resposta celular ao dano ao DNA (DDR). A presença de estruturas não convencionais na molécula de DNA deve-se a ocorrência de fatores como, por exemplo: (i) o colapso da forquilha de replicação; (ii) a presença de bases danificadas ou modificadas, inclusive espontaneamente; (iii) a presença de reações cruzadas entre bases nitrogenadas adjacentes como os dímeros de pirimidinas (dímero cilobutano e fotoproducto 6-4 pirimidina-pirimidona), fotoproductos induzidos por radiação UV e outros aductos químicos causados por mutagênicos como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, nitrosaminas, agentes alquilantes e a

grande maioria dos quimioterápicos antitumorais; (iii) as quebras de fita simples; (iv) as quebras de fita dupla (DSB); (vi) as ligações cruzadas entre as cadeias de DNA e entre DNA e proteínas entre outros (NOBURY; HICKSON, 2001; SANCAR et al., 2004).

Conceitualmente, a natureza do dano ao DNA pode ser dividida em duas classes abrangentes: endógeno e ambiental. A categoria do dano endógeno abrange principalmente as reações hidrolíticas e oxidativas que são uma consequência da “vida circundada por água”. A classe ambiental inclui os agentes físicos e químicos que agredem a molécula do DNA, geralmente gerados fora da célula (FRIEBERG et al., 2005). Tem sido estimado que o genoma de células humanas sofra 2×10^4 lesões por dia (BARZILAI; ROTMAN; SHILOH, 2002). Uma porção significativa desses danos deve-se apenas às espécies reativas do oxigênio (ROS). O efeito da produção excessiva de ROS e/ou a incapacidade do sistema celular antioxidante em neutralizar esses elementos é conhecido como estresse oxidativo (BARZILAI; ROTMAN; SHILOH, 2002). O estresse oxidativo é uma consequência inevitável da vida em uma atmosfera rica em oxigênio. ROS são geradas constantemente como subprodutos do metabolismo aeróbico. O “paradoxo do oxigênio” expõe a célula a esse elemento, o qual embora seja um componente essencial para a produção de energia, é extremamente perigoso aos organismos dada a alta suscetibilidade do DNA em ser atacado pelas ROS (FRIEDBERG et al., 2005).

Independentemente da origem dos danos genéticos, endógenos ou ambientais, eles são uma ameaça à sobrevivência celular. De maneira geral, o dano ao DNA perturba o “steady-state” da célula e ativa e/ou amplifica vias bioquímicas que regulam o crescimento e a divisão celular, as quais ajudam a coordenar a replicação do DNA com a remoção do dano. Em células de mamíferos quatro tipos de respostas metabólicas são ativadas para depurar a célula do dano sofrido em seu material genético sendo: (i) as vias de reparo do dano, (ii) a regulação dos pontos de checagem do ciclo celular, (iii) a resposta transcricional e (iv) apoptose (SANCAR et al., 2004). Este trabalho esteve focado nos elementos participantes das duas primeiras vias da DDR apenas, ou seja, reparo e regulação dos pontos de checagem do ciclo celular. Devido ao gigantesco espectro de dano que o genoma pode sofrer, não é surpreendente que as células tenham desenvolvido múltiplos mecanismos

pelo qual o material genético danificado é removido ou efeitos potencialmente letais que causam interferência com o metabolismo do DNA (replicação e transcrição principalmente) sejam também reparados (FRIEDBERG et al., 2005).

O defeito em alguma dessas vias estabelecidas leva a instabilidade genética, herança de moléculas com mutações e fixação da mutação. Em eucariotos superiores, as falhas no sistema de reparo podem causar efeitos fenotípicos como a síntese de DNA radioresistente (RDS), encurtamento dos telômeros e patologias como falência de órgãos, imunodeficiência e alta predisposição ao câncer (CARNEY et al., 1998; CARNEY, 1999; GATTI, 2001; D'AMOURS; JACKSON, 2002). Essas características são de certa forma compartilhadas nas síndromes de instabilidade cromossômica herdadas em humanos como, por exemplo, a Síndrome de Bloom, Anemia de Fanconi, Síndrome de Li-Fraumeni, Xeroderma Pigmentosum (XP), Ataxia Telangiectasia (AT), Ataxia Telangiectasia Like Disease (ATLD), a Síndrome de Nijmegen (NBS) e a Síndrome de Seckel as quais perfeitamente exemplificam deficiências no sistema de reparo causadas por mutações em proteínas alvos dos mesmos.

Os genes responsáveis pela correção do dano ao DNA podem ser agrupados genericamente de acordo com seu mecanismo global em: reparo por emparelhamento errado de bases ("mismatch repair" - MMR); reparo por excisão de bases ("base excision repair" - BER); reparo por excisão de nucleotídeos ("nucleotide excision repair" - NER); e reparo da quebra de dupla fita ["DNA double strand break (DSB) repair"]. A via essencial em humanos para o reparo do dano ao DNA causado por agentes alquilantes e oxidantes é a BER (FORTINI et al., 2003) e certamente esta é a via mais frequentemente usada na natureza para o reparo do DNA (FREIBERG et al., 2005). Nela, o reparo é iniciado por uma DNA glicosilase que cliva a base nitrogenada alvo da sequência de DNA danificada criando um sítio abásico. Para tanto, existem DNA glicosilases específicas que reconhecem bases oxidadas/reduzidas, alquiladas (usualmente metiladas), e deaminadas (como uracila, xantina) (SANCAR et al., 2004) primariamente ao reparo. O reparo é concluído quando o nucleotídeo é substituído e covalentemente ligado no esqueleto carbônico do DNA.

O sistema de MMR é altamente conservado em procariotos e eucariotos e desempenha um papel importante na manutenção da estabilidade

genômica. A perda de função de MMR leva a uma variedade de efeitos biológicos significantes, incluindo o aumento da susceptibilidade ao câncer em mamíferos (FRIEDBERG et al., 2005). Após cada ciclo replicativo, existe um período de tempo em que cada nucleotídeo incorporado erradamente pode ser removido e substituído pelo sistema de MMR. Esse sistema de reparo pode atuar graças a ação de DNA metilases que permitem a célula distinguir a fita recém sintetizada, onde a remoção do nucleotídeo desemparelhado deve ocorrer, da fita mãe (metilada) preservando assim a sua integridade estrutural (NETTO; MENCK, 2001). Esse sistema em eucariotos superiores funciona no genoma na fase pós-replicacional detectando e reparando mutações causadas por substituições de bases, pequenas inserções ou deleções de nucleotídeos e suprimindo a recombinação homóloga entre seqüências que não são completamente homólogas (EDELMANN; EDELMANN, 2004). A principal via para o reparo por MMR ocorre durante a replicação e envolve as proteínas MutH -L -S de *Escherichia coli* e suas proteínas homólogas em outros organismos. Em *E. coli*, MutS inicia o processo de reparo sendo capaz de reconhecer vários tipos de alterações estruturais na dupla fita do DNA que podem ser bastante diferentes entre si como mencionado anteriormente. A partir da ligação de MutS ao sítio de reparo, são ativadas as endonucleases MutL e MutH (homólogos de MutH não foram encontrados em eucariotos). Em *Saccharomyces cerevisiae* foram identificados seis homólogos MutS (MutS1-6) e quatro homólogos MutL (MutL1-3 e PMS1). Neste organismo, o reparo se inicia pelo complexo heterodimérico MSH2-MSH6 na região de reconhecimento do dano (MARTI; KUNZ; FLECK et al., 2002; SIA; KIRKPATRICK, 2005). Para o exercício da função do complexo MSH2-MSH6 foi identificado o papel de PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) o qual através de sua interação com o complexo, capacita a célula a discriminar entre as fitas de DNA onde está presente o emparelhamento errado de bases, estimulando assim a ligação preferencial do complexo nesta fita (FLORES-ROZAS et al., 2000). Para tal função, foi identificado um motivo de ligação de PCNA nas proteínas MSH6 e MSH3 de *S. cerevisiae* (FLORES-ROZAS et al., 2000). Os indivíduos que carregam mutações em genes envolvidos no reparo do DNA por MMR são acometidos pela síndrome mais comum de predisposição ao câncer conhecida em humanos, que é um tipo de neoplasia colorretal [(“hereditary nonpolyposis colorrectal cancer” (HNPCC)] (EDELMANN; EDELMANN, 2004).

O reparo por NER é responsável pela remoção de lesões que distorcem a hélice do DNA, dentre elas as ligações cruzadas entre pirimidinas adjacentes na cadeia de DNA (dímeros de ciclobutano e fotoproducto 6-4 pirimidina-pirimidona) e ligações intracadeias de DNA ocasionados por agentes químicos (FRIEBERG et al., 2005). Estes dímeros de timidina são introduzidos no material genético principalmente através da luz ultravioleta (UV). O reparo pela via de NER ocorre pela remoção de um trecho de DNA onde está localizada a lesão através de uma quebra de fita simples que flanqueia a região onde ocorreu a lesão. Defeitos hereditários no sistema de NER causam em humanos Xeroderma Pigmentosum (XP) e Síndrome de Cockayne (CS), esta última frequentemente associada ao XP. Sete diferentes grupos genéticos de complementação (XPA-G) foram identificados e seus genes clonados. Pacientes portadores de XP/CP apresentam alta predisposição ao câncer nas áreas do corpo expostas ao sol. Além disso, deficiências no processo de NER levam também a Tricotiodistrofia em humanos, sendo esta não associada ao aparecimento de câncer (COSTA et al., 2005). Todas as doenças hereditárias causadas pelo sistema de NER defectivo são caracterizadas pela acentuada fotosensibilidade da pele e dos olhos (MAGNALDO; SARASIN, 2004; COSTA et al., 2005). Em mamíferos existem duas subvias de reparo: GG-NER ("global genomic" - NER) que age no reparo de todo o genoma da célula e TC-NER ("transcription coupled" - NER) a qual é especializada no reparo de lesões durante a transcrição de genes ativos. Essa subvia repara os mesmos tipos de lesões que a GG-NER (FRIEDBERG et al., 2005).

Dentre os tipos de dano ao DNA que as células estão constantemente expostas, a DSB é o mais deletério deles. Nesse tipo de lesão, o esqueleto carbônico da dupla hélice é afetado. Na ausência de correção adequada do dano, podem ocorrer defeitos cromossômicos, instabilidade genética causada por fragmentação cromossomal e rearranjo genômico com a união de seqüências de DNA em locais do genoma originalmente distantes. Estes eventos causam translocações, deleções, e conseqüentemente, expressão gênica e viabilidade celular alterada podendo resultar em proliferação celular anormal que em organismos multicelulares conduz ao câncer (BARTEK; LUKAS, 2001; CONELLI; LEACH, 2002; NYBERG et al., 2002). Por outro lado, as DSBs são também intermediários necessários em inúmeros processos normais do metabolismo de

DNA, como por exemplo, a recombinação das cadeias variáveis, diversas e de junção das imunoglobulinas V(D)J, e a meiose. Durante a meiose ocorrem quebras controladas de dupla fita em “hot spots” do genoma habilitando a ocorrência de “crossing over” após a interação física das cromátides irmãs pela invasão da fita de DNA adjacente no molde que culmina na formação e resolução dos intermediários de Holliday durante a recombinação homóloga (D’AMOURS; JACKSON, 2002; LISBY; ROTHSTEIN, 2004).

Em eucariotos, a quebra de dupla fita é reparada por dois mecanismos distintos, cujas vias de ação são interconectadas, a recombinação homóloga (HR) e a união das extremidades não homólogas (“non homologous end joining” - NHEJ), esta última também conhecida como recombinação ilegítima. Durante a NHEJ, as duas extremidades do DNA são unidas por ligações que requerem pouco ou nenhum processamento das extremidades. Esse processo é sujeito a erro e tem um papel secundário no reparo de DSB em *S. cerevisiae* (LISBY; ROTHSTEIN, 2004). Múltiplas proteínas estão envolvidas no reconhecimento e na resposta às quebras cromossômicas no reparo por NHEJ. Em mamíferos, o centro da maquinaria consiste da proteína quinase dependente de DNA (DNA-PK) e da ligase IV/XRCC4/XLF. O heterodímero KU70/80 é o componente de ligação a DNA-PK, o qual forma um anel que especificamente liga-se às extremidades do DNA lesionado. O complexo DNA-KU70/80 então ativa e atrai a subunidade catalítica da DNA-PK (DNA-PK_{CS}), uma serina/treonina proteína quinase. Após sua justaposição nas duas extremidades do DNA, DNA-PK_{CS} sofre autofosforilação e as extremidades deste tornam-se disponíveis para a junção via o complexo ligase IV que é composto também dos cofatores XRCC4 e XLF que são provavelmente necessários para a ligação precisa deste nas extremidades do DNA. O complexo Mre11, que será discutido mais adiante, também auxilia na manutenção da proximidade física das extremidades rompidas do DNA (BASSING; ALT, 2004; SANCAR et al., 2004; HELLEDAY et al., 2007).

Ao contrário da NHEJ, a HR requer um amplo processamento das extremidades 5’ (sentido 5’→3’) para gerar regiões de simples fita no local de quebra, o que é facilitado pelo complexo Mre11. As simples fitas geradas invadem o duplex de DNA homólogo, o qual servirá de molde para a restauração da DSB. Como na HR a informação genética é copiada a partir da cromátide irmã, esse processo é

altamente preciso e eficiente (LISBY et al., 2004; HELLEDAY et al., 2007). Embora os mecanismos de HR e NHEJ sejam mutuamente independentes, o complexo Mre11 (Mre11-Rad50-Nbs1), cujo papel na resposta celular ao dano ao DNA será abordado adiante, está possivelmente envolvido na levedura *S. cerevisiae*, em células de mamíferos (LISBY; ROTHSTEIN, 2004; LISBY et al., 2004) e também em fungos filamentosos.

O complexo Mre11 em *S. cerevisiae* (MRE11-RAD50-XRS2^{NBS1}) é necessário para o recrutamento da ATM quinase (Tel1) e estas proteínas em conjunto participam da decisão precoce da célula entre as vias de HR ou NHEJ (LISBY et al., 2004). Embora este processo de decisão da célula e o balanço entre HR e NHEJ não seja muito bem conhecido, sabe-se que as vias de NHEJ e HR são respectivamente favorecidas nas fases G1 e G2/S, uma vez que neste ponto, as proteínas de recombinação homóloga do grupo espistático Rad52 de *S. cerevisiae* (RAD50-57, 59, MRE11 e XRS2^{NBS1}) são recrutadas nos sítios de dano ao DNA (PETRINI et al., 1997; LISBY; ROTHSTEIN, 2004). Evidências precisas sobre essa interconexão em fungos filamentosos podem ser verificadas nas linhagens mutantes “Ku”. Nestas um dos homólogos de Ku70 e/ou Ku80 foram deletados em *N. crassa*, *A. fumigatus* e *A. nidulans*. Nestes mutantes, onde o sistema de NHEJ foi afetado, ocorre um direcionamento na célula para a via de HR (NINOMIYA et al., 2004; FERREIRA et al., 2006a; NAYAK et al., 2006). Essa característica fenotípica tem sido usada na otimização dos processos de deleção e substituição gênica nesses organismos. A atividade exonucleásica de Mre11 (ver seção 1.2 para detalhes) executa o processamento das extremidades do DNA eliminando “hairpins” e ligações covalentes DNA-proteínas (LISBY; ROTHSTEIN, 2004). Após essa etapa de ativação da via de HR, as proteínas efetoras desse sistema reparam o dano. Dentre elas está Rad51 (*uvsC* em *A. nidulans*), que proporciona a invasão da região de simples fita no “template” homólogo para iniciar a cópia da região onde a informação genética foi comprometida, e também Rad52. Ambas proteínas são recrutadas para o sítio de reparo após a ativação e o desacoplamento de Mre11 e TEL1^{ATM} do foco nuclear indicando uma relação hierárquica bastante intrincada entre as proteínas que participam do reparo ao dano. Essa rica relação hierárquica foi amplamente caracterizada em *S. cerevisiae* por LISBY et al. (2004).

Além da maquinaria recombinacional para o reparo (HR ou NHEJ), na presença de dano ao DNA, os pontos de checagem do ciclo celular são ativados e este é interrompido ou atrasado para que as células tenham tempo de reparar o dano ao DNA antes de eventos críticos como a replicação e a segregação (HOFFMAN; HARRIS, 2000). O termo “ponto de checagem” é definido baseado no estado de transição do ciclo celular o qual é inibido pelo dano ao DNA sendo eles: G1/S, intrafase S e G2/M (KASTAN; BARTEK, 2004). Embora os três pontos de checagem sejam distintos, as proteínas que atuam como sensores do dano e que os ativam parecem ser compartilhadas pelos três, sendo que as suas funções podem ser primárias ou coadjuvantes, dependendo do ponto de checagem em que operam (SANCAR et al., 2004) (ver seção 1.2 para detalhes). Além dos pontos de checagem do ciclo celular, a divisão celular também é controlada em outro âmbito. No processo de divisão celular, os cromossomos eucarióticos sofrem mudanças estruturais dramáticas e movimentos durante a mitose ou meiose, que incluem a individualização e a compactação das duas cópias dos cromossomos replicados. Para garantir que a segregação cromossômica seja efetuada com alta fidelidade a cada ciclo de replicação, o “spindle pole checkpoint” atua coordenando este processo. As cromátides irmãs movem-se para os pólos opostos da célula através de forças mediadas pelos microtúbulos, os quais se ligam às estruturas especializadas na região centromérica dos cromossomos, o cinetocoro. O cinetocoro regula a ação das proteínas motoras e a despolimerização dos microtúbulos para promover os movimentos dos cromossomos em direção aos pólos opostos da célula e assim garantir quantidade equivalente de material genético para cada célula filha (HAERING, NASMITH, 2003). Dessa forma, o ciclo de divisão celular é controlado de forma temporal e espacial. Temporalmente, através da síntese e da destruição controlada de proteínas do ciclo celular nos pontos de checagem, que assegura que o DNA esteja completamente replicado e que qualquer eventual dano reparado. Espacialmente, através da coordenação celular da dramática reorganização da arquitetura subcelular na entrada e na saída na mitose (PINES, 1999). Nesse sentido, o “spindle pole checkpoint” atua primariamente bloqueando a atividade do complexo promotor de anáfase (APC), ou ciclossomo. O APC é uma grande proteína ubiquitina ligase necessária para a segregação cromossômica. Em situações onde o “spindle pole checkpoint” é requerido, um complexo de proteínas incluindo Mad2,

Mad3, Bub3 e Sdc20 de *S. cerevisiae* se liga diretamente ao APC inibindo sua atividade de ubiquitina ligase (YU, 2002).

1.2. O complexo Mre11 de reparo ao dano ao DNA

Os componentes do sistema de reparo podem ser classificados teoricamente em três tipos, segundo suas posições e funções nas cascatas de ativação dos pontos de checagem (ZHOU; ELLEDGE, 2000; PETRINI; STRACKER, 2003): (i) sensores do dano ao DNA; (ii) transdutores de sinal; (iii) efetores. Entretanto, não há uma demarcação absoluta entre os vários componentes dos pontos de checagem sendo inclusive sugerido a presença de proteínas mediadoras que atuam após os sensores e antes dos transdutores (SANCAR et al., 2004). Embora o mecanismo preciso dos transdutores não seja bem conhecido, eles aparentemente modulam a atividade de ATM/ATR e seus substratos e, num senso mais amplo, proporcionam a união espaço-temporal dos complexos multiprotéicos nas regiões de cromatina circundantes da área com o DNA danificado (KASTAN; BARTEK, 2004). São conhecidos pelo menos três mediadores ligados a ATM: MDC1 (“mediator of DNA damage checkpoint 1”), 53BP1 (“p53 binding protein 1”) e BRCA1, uma grande proteína com multi domínios que contem dois domínios BRCT (“Brca1 carboxy-terminal”) em tandem.

O sensoreamento do dano é o passo mais precoce da DDR e também o menos compreendido (SEMIGHINI; GOLDMAN; HARRIS, 2005). Proteínas que se ligam a seqüências ou estruturas específicas do DNA devem reconhecer o seu alvo num vasto excesso de estruturas relacionadas. Os sensores do dano não só se ligam ao DNA não danificado durante a busca pela região específica de ligação, como também estão em contato com DNA não danificado quando encontram o alvo do reparo. Uma vez que o montante de DNA não danificado excede vastamente aquele do DNA lesado, as proteínas que o reconhecem dispendem mais tempo em associação com DNA não danificado e ainda assim desempenham sua função na presença desse DNA não específico (SANCAR et al, 2004). Primariamente os sensores foram tidos como proteínas que reconheciam danos específicos ao DNA, provavelmente pela ligação direta com as bases danificadas ou a cromossomos rompidos, dessa forma gerando um sinal que ativaria uma via comum de transdução do sinal para os efetores apropriados. Entretanto, estudos recentes sugerem que

diferentes tipos de dano ao DNA são processados por um intermediário comum que ativa a DDR. O candidato proposto para ser esse intermediário seria as regiões de fita simples do DNA (ssDNA “single strand DNA”), a qual é muito frágil, existindo *in vivo*, somente em associação com a proteína de replicação A (RPA) (ZHOU; ELLEDGE, 2003; SANCAR et al., 2004; SEMIGHINI; GOLDMAN; HARRIS, 2005).

Estudos genéticos em leveduras e animais têm demonstrado que dois complexos protéicos, RAD17-RFC2-5 e RAD1-RAD9-HUS1 (complexo 9-1-1) em humanos funcionam como sensores (NYBERG et al., 2002). RAD17 interage com as subunidades 2, 3, 4 e 5 do fator de replicação C (RFC) para formar uma estrutura pentamérica enquanto as proteínas RAD9, um homólogo do antígeno celular de proliferação nuclear (PCNA), HUS1 (hydroxyurea sensitive 1) e RAD1 formam um anel heterotrimérico em torno do DNA (SANCAR et al. 2004). Zou, Cortez e Elledge (2002) mostraram que RAD9 é recrutado para a cromatina de forma dependente de RAD17 em resposta ao dano ao DNA. Além disso, esses autores sugerem que o fator de replicação A (RPA), uma proteína de ligação a ssDNA, estimula a ligação do complexo RAD17-RFC2-5 aos sítios de ssDNA e que esses trechos de ssDNA recobertos pela proteína RPA são os intermediários reconhecidos por esse complexo para iniciar a sinalização do dano (ZHOU; ELLEDGE, 2003; SEMIGHINI; GOLDMAN; HARRIS, 2005). Nessa categoria de sensores do dano, podem também ser incluídas as quinases ATM e ATR, e o complexo Mre11 (ZHOU; ELLEDGE, 2000; BARTEK; LUKAS, 2001, LISBY; ROTHSTEIN, 2004; BARTEK; LUKAS, 2007). Bartek e Lukas (2007) propõem várias linhas de evidências no sentido de colocar o complexo Mre11 como um elemento sensor da DDR. A rápida resposta de ATM por todo o núcleo que se segue após a introdução de uma pequena quantidade de DSB, mesmo pela presença de agentes que necessariamente não causam DSB como, por exemplo, cloroquina, inibidores de histona deacetilase, NaCl, indicam que a ativação de ATM não obrigatoriamente depende de sua interação com as extremidades do DNA, mas pode ser disparada apenas por mudanças na estrutura da cromatina (PAULL; LEE, 2005).

O complexo Mre11 atua também diretamente no reparo da DSB, ou seja, num momento em que as vias de sinalização do dano já foram ativadas sendo possivelmente também um efetor do reparo. Imediatamente após a formação da DSB, o complexo Mre11 se associa às extremidades rompidas dos cromossomos

para mantê-las em união até que o reparo esteja completo (Figura 1C). Interessantemente, um passo essencial antes do reparo DSB é a conversão desta para uma região simples fita. Em leveduras, alelos nulos de qualquer gene que codifica para alguma das proteínas do complexo Mre11 apresentam níveis diminuídos de processamento das quebras de dupla fita, indicando que o complexo Mre11 é responsável pelas etapas iniciais de processamento das extremidades do DNA rompido (D'AMOURS; JACKSON, 2002). Em experimentos bioquímicos foi demonstrado um domínio fosfoesterase da proteína *MRE11* humana, atuando como endonuclease de fita simples e dupla, e exonuclease de fita dupla de DNA 3'-5' (D'AMOURS; JACKSON, 2002). As proteínas *RAD50* e *NBS1* estimulam a atividade enzimática do *MRE11*, a qual também é regulada por ATP (PAULL; LEE, 2005).

Com relação aos transdutores do sinal durante a resposta ao dano ao DNA, mais informações são conhecidas (SEMIGHINI; GOLDMAN; HARRIS, 2005). Os transdutores do sinal pertencem a duas classes principais que apresentam “motifs” conservados. A primeira classe consiste das proteínas PIKKs (phosphoinositide 3-kinase related kinase), representadas pela ATM (“Ataxia telangiectasia mutated”) e ATR (“ATM and RAD3 related kinase”) (ABRAHAN, 2001). A segunda classe consiste de duas famílias de serina/treonina proteína quinase conhecidas como CHK1 e CHK2 (“checkpoint kinase” 1 e 2). ATM e ATR funcionam no ápice da DDR e são responsáveis pela fosforilação de diversos alvos incluindo as quinases CHK1 e CHK2, as quais por sua vez potencializam a fosforilação de outros alvos “downstream” (ABRAHAN, 2001; NYBERG et al., 2002; SEMIGHINI; GOLDMAN; HARRIS, 2005). Recentemente, uma abordagem utilizando proteômica identificou mais de 900 sítios de fosforilação em mais de 700 proteínas diferentes que sofrem fosforilação mediada por ATM e ATR (MATSUOKA et al., 2007). Estudos em leveduras, mamíferos e fungos filamentosos também identificaram a proteína ATRIP que parece funcionar como uma subunidade reguladora de ATR que recruta essas proteínas nos pontos de dano ao DNA e facilita a associação destas com os efetores apropriados (CORTEZ, et al., 2001; FAGUNDES et al., 2004). Além disso, a proteína RPA foi verificada estimulando “in vitro” a ligação de ATRIP em ssDNA levando a um modelo no qual ATR localiza-se nos pontos de parada da forquilha de replicação por meio da ligação de ATRIP a RPA. Neste modelo, qualquer estímulo que leve ao aparecimento de trechos de ssDNA no genoma, como

a parada de uma forquilha de replicação, levaria a ligação de RPA, a ligação subsequente de ATRIP e de seu parceiro ATR. Uma vez ativa no sítio de ssDNA, a ATR quinase poderia fosforilar substratos críticos como RAD17 e CHK1 (KASTAN; BARTEK, 2004).

Os substratos de ATM, ATR e CHKs são geralmente responsáveis diretos pelo reparo do DNA, pela regulação transcricional, pelo controle do ciclo celular, e pela indução de morte celular. É importante enfatizar que embora o papel de muitos destes efetores seja razoavelmente conhecido, particularmente em mamíferos e leveduras, os mecanismos pelo qual o sinal do dano ao DNA modifica suas atividades não é bem conhecido. Em linhas gerais, a escolha dos transdutores do sinal (quinases ATM/ATR e CHK2/CHK1) refletem o tipo de dano ao DNA presente na célula, embora alguma sobreposição de funções entre os segmentos ATR/CHK1 e ATM/CHK2 possa existir (BARTEK; LUKAS, 2001). Entretanto, os efetores “downstream” a essas quinases e seus alvos finais podem diferir dependendo do ponto de checagem que estão controlando G1/S, intrafase S ou G2/M. Devido ao fato de que os módulos de transdução ATM-CHK2 e ATR-CHK1 compartilham alguns substratos, um fato bastante interessante é que em mamíferos ATM-CHK2 são dispensáveis para o desenvolvimento pré-natal, no entanto a completa ausência de ATR-CHK1 leva a letalidade embriônica (SHILOH, 2003; KASTAN; BARTEK, 2004).

O ponto de checagem G1/S previne a célula de entrar em na fase S na presença de dano ao DNA pela inibição da replicação do material genético (CLARK; GIMÉNEZ-ABIÁN, 2000). A fase G1 é um período onde a célula toma decisões críticas sobre seu estado, incluindo a opção pela replicação do DNA e finalização do ciclo celular. Sob condições favoráveis, ou seja, na presença de mitógenos e de um ambiente celular favorável para a proliferação, as células na fase G1 são comprometidas a entrarem na fase S pela passagem no ponto de restrição (em células de mamíferos) ou do “START point” (em células de *S. cerevisiae*) o que ocorre tardiamente na fase G1. Em células sob condições normais, esse comprometimento parece ser irreversível até a próxima fase G1. Entretanto, na presença de dano ao DNA o bloqueio da entrada na fase S ocorre independentemente da célula ter passado pelo ponto de restrição. Classicamente, o bloqueio na fase G1 ocasionado pela reposta deste ponto de checagem envolve o

papel do fator de transcrição e gene supressor de tumor p53 (em fungos filamentosos não foi até o momento encontrado um homólogo de p53). Na presença de dano ao DNA p53, que normalmente é uma molécula instável e com limitada capacidade de ligação ao DNA, sofre várias modificações pós traducionais o que estabiliza a molécula. A partir disso p53 pode estimular a transcrição de inibidores do ciclo celular, dentre eles p21 o qual se acumula intracelularmente a níveis capazes de reprimir o complexo CDK2/ciclina E. Adicionalmente p21 inibe a replicação do DNA por sua interação com PCNA (uma subunidade da DNA polimerase δ) (BARTEK; LUKAS, 2001). Entretanto, tem sido postulado que o ponto de checagem em G1 dependente de p53, e, por conseguinte de suas modificações pós traducionais e da síntese de p21, é demasiado lento para explicar a rápida inibição de CDK2 (CDK2/ciclina E) na presença de dano ao DNA nessa fase do ciclo celular. Além disso, o silenciamento de CDK2 ocorre mesmo em células onde p53 está inativo. Essas evidências sugerem que o ponto de checagem G1/S acontece por duas “ondas” de atividade, uma rápida que atua independente de transcrição e síntese protéica e outra, mediada por p53 mais lenta a qual é totalmente operacional várias horas após a detecção do dano (BARTEK; LUKAS, 2001; SANCAR et al., 2004). Dessa forma, o sistema que permite a rápida parada do ciclo celular na fase G1/S explora um mecanismo que atua inativando a proteína Cdc25 fosfatase (*nimT* em *A. nidulans*). A inativação de Cdc25 impede a defosforilação de CDK2 que é essencial para a transição G1/S (BARTEK; LUKAS, 2001; LUKAS; LUKAS; BARTEK, 2004). A inativação de Cdc25 ocorre através de fosforilação inibitória em vários resíduos de serina nessa proteína mediada por CHK1 e CHK2 as quais foram previamente ativadas por ATR/ATM respectivamente. Nessas circunstâncias, em células de mamíferos ocorre um rápido “turnover” de Cdc25 a qual é rapidamente endereçada para degradação (mediada por ubiquitinação) no proteassoma 26S (BARTEK; LUKAS, 2001). Entretanto deve-se manter em mente que o papel dos reguladores “upstream” ATM/ATR e CHK2/CHK1 são essenciais para a função das duas “ondas” de bloqueio da transição G1/S.

O ponto de checagem intrafase S é por definição um fenômeno transitório que ocorre a partir da diminuição da taxa de síntese de DNA. Ao contrario dos pontos de checagem G1/S e G2/M, este pode ser benéfico para a célula por promover apenas algum atraso não permanente no ciclo celular na presença do

genoma porventura incompletamente replicado. Um bloqueio sustentado da fase S poderia limitar o montante de cromátides irmãs e dessa forma reduzir a quantidade de molde necessário para o reparo por HR (BARTEK; LUKAS, 2001). O ponto de checagem intrafase S é independente de p53 e também está baseado no eixo ATM/ATR-CHK2/CHK1-Cdc25-CDK2 (CLARK; GIMÉNEZ-ABIAN, 2000; BARTEK; LUKAS, 2001; LUKAS; LUKAS; BARTEK, 2004). Em *A. nidulans*, os mecanismos de bloqueio em G1/S e intrafase S apresentam as mesmas características funcionais que em células de mamíferos, entretanto o eixo final envolve a inativação de CDK1 (NimX^{CDC2}/ciclina B) pela fosforilação inibitória de NimX^{CDC2} pela quinase Anka^{WEE1} e inativação de NimT^{CDC25} (OSMANI; YE, 1996; OSMANI; YE, 1997).

O ponto de checagem G2/M assegura que o dano do DNA não seja transmitido às células filhas, impedindo que a mutação se torne fixa, além de prevenir a instabilidade e perdas genéticas (HARTWELL; WEINERT, 1989; CLARK; GIMÉNEZ-ABIÁN, 2000). Semelhantemente ao ponto de checagem G1/S, o ponto de checagem G2/M é o resultado de uma combinação de mecanismos que operam por modificações pós-traducionais de diversas proteínas efetoras, e mecanismos de atraso e sustentação que envolvem também alterações do programa transcricional da célula (ABRAHAM, 2001; NYBERG et al., 2002; LUKAS; LUKAS; BARTEK, 2004). Dependendo do tipo de dano ao DNA as cascatas de transdução do sinal dependentes de ATM-CHK2-Cdc25 e/ou ATR-CHK1-Cdc25 são ativadas para promover o bloqueio em G2. Como em qualquer outro evento, quinases bloqueiam a entrada em mitose inibindo Cdc25 fosfatase ou ativando Wee1 proteína quinase as quais conjuntamente controlam a atividade de CDK1 (complexo Cdc2 ciclinaB, MPF “maturation promoting factor”) que é o principal alvo do ponto de checagem G2/M em mamíferos e também em *A. nidulans*, porém não em *S. cerevisiae* (YE; OSMANI, 1997). Em *A. nidulans* *bimE*^{APC1} é um outro elemento necessário para prevenir a entrada prematura em mitose quando a síntese de DNA é totalmente bloqueada por agentes que causam estresse replicacional (OSMANI; YE, 1997). BimE é um homólogo do complexo promotor da anáfase (APC). Ainda, uma outra proteína de *A. nidulans*, NimA, uma serina treonina quinase, é essencial na progressão G2/M. A expressão de NimA é regulada durante o ciclo celular sendo que sua expressão aumenta à medida que a célula se aproxima da mitose. Nesse ponto *nimA* é fosforilado, tanto por autofosforilação ou por uma quinase não identificada. Com a

transição G2/M e ativação de NimX^{CDC2}/ciclina B, NimA torna-se hiperfosforilado e então proteoliticamente degradado na saída da mitose sendo também importante na finalização do ciclo celular (OSMANI; MAY; MORRIS, 1987; OSMANI; YE, 1996; OSMANI; YE, 1997).

Recentemente, a organização espaço temporal do recrutamento das proteínas e vias associadas ao reparo ao dano ao DNA tem mostrado que a proteína Mre11 é a primeira a ser detectada no sítio de DSB e que o complexo Mre11 é essencial para a ativação de ATM na levedura *S. cerevisiae*, indicando que essas proteínas pioneiras no ponto de reparo tem um papel decisivo na definição pela célula da via de HR ou NHEJ (LISBY et al., 2004; PAULL; LEE, 2005).

Em leveduras, quando componentes do complexo Mre11/Rad50/Xrs2^{NBS1} (MRX) são inativados, alguns processos metabólicos do DNA como a HR, NHEJ, manutenção do telômero, formação das DSBs meióticas, processamento das DSBs e regulação dos pontos de checagem são afetados, (VAN DEN BOSCH, LOHMAN; PASTINK, 2002; ASSENMACHER; HOPFNER, 2004). Estes dados sugerem que possivelmente este complexo está envolvido em todos os processos metabólicos de resposta a DSBs. Além disso, a inativação dos genes Mre11, Rad50 e Nbs1 de camundongo resultam em letalidade embrionária (ZHU et al., 2001), embora alelos hipomórficos viáveis tenham sido recentemente descritos (WILLIAMS et al., 2002). A idéia de que o complexo MRN possui uma função central na resposta à DSBs foi reforçada pela observação de que mutações hipomórficas de Mre11 e Nbs1 causam, respectivamente, a ataxia telangiectasia “like disease” (ATLD) e a síndrome de Nijmegen (NBS) (DE LA TORRE; PINCHEIRA; LÓPEZ-SÁEZ, 2003). As duas desordens são fenotipicamente relacionadas com a ataxia telangiectasia (AT), que é causada pela mutação no gene ATM (SAVITSKY et al., 1995). Essa doença autossômica recessiva é caracterizada pela ataxia cerebelar progressiva, imunodeficiência, envelhecimento precoce, disgenesia gonadal, acentuada radiosensibilidade e susceptibilidade a infecções e tumores (MACKINNON, 2004).

O complexo Mre11 é formado por duas proteínas altamente conservadas em eucariotos: *MRE11* e *RAD50*; e por uma terceira proteína *NBS1* (Figura 1) que se junta ao complexo no núcleo após sua fosforilação (CARNEY et

al., 1998). Quando *NBS1* está presente, um único peptídeo de *NBS1* interage com Mre11 de forma independente de *RAD50* (D'AMOURS; JACKSON, 2002).

Figura 1: Modelo estrutural proposto do complexo Mre11/Rad502/Nbs1. **(A)** A estrutura “coiled coil” antiparalela de Rad50 emerge a partir dos domínios ATPásicos dessa proteína (ABC - ATP “binding cassette”). Na extremidade do segmento “coiled coil” estão os domínios “zinc hook” envolvido na modificação molecular da proteína que permite a ligação à cromátide irmã durante a recombinação homóloga via ligação de coordenação com íons zinco. A região de ligação de Nbs1 ao complexo não é bem estabelecida **(B)** Modelo hipotético para a interação de Mre11 com um dímero de ATM quinase e DNA. M: Mre11; N: Nbs1 esquematizado no mesmo esquema de cores de (A). Extraído e modificado de Assenmacher e Hopfner, (2004). **(C)** Representação esquemática das funções do complexo Mre11 durante o reparo ao dano ao DNA. O complexo se associa aos fragmentos de DNA para mantê-los em proximidade física ligando-se tanto inter cromátide quanto numa mesma cromátide. Essa interação pode acontecer através de múltiplas interações das estruturas “zinc hooks” de Rad50 através da coordenação intermolecular com íons Zn^{+} entre os motivos CXXC dessa proteína. Extraído e modificado de Jager e Kanaar (2002).

Dentre as proteínas do complexo Mre11, Rad50 faz parte da família de proteínas SMC (“Structural Maintenance of Chromosome”) tipicamente relacionada com a condensação cromossômica e a coesão das cromátides irmãs em eucariotos (HOPFNER; TAINERY, 2003). Esta proteína apresenta os motivos Walker A e Walker B nas regiões 5’ e 3’, respectivamente. Esses motivos são seqüências de aminoácidos curtas e conservadas evolutivamente que apresentam capacidade de ligação a nucleotídeos (D'AMOURS; JACKSON, 2002). Separando os motivos

Walker A e Walker B, a proteína apresenta duas regiões “coiled-coil” de cerca de 400 a 900 aminoácidos que são interrompidas por um domínio globular, onde ocorre a interação com a proteína Mre11 e possivelmente com a proteína Nbs1 (JAGER; KANAAR, 2002, D’AMOURS; JACKSON, 2002). Como outras proteínas da família SMC, Rad50 forma um homodímero antiparalelo com uma região de dobradiça no centro da proteína, que aproxima as regiões N terminal e C terminal (e conseqüentemente os motivos Walker A e B) para criar um domínio funcional de ligação ao ATP. Nesse domínio central da proteína, está uma seqüência conservada Cys-XX-Cys (CXXC) que forma um motivo de interação protéica que é um domínio de dimerização da região “coiled-coil” mediado por íons zinco (“zinc hook”) (HOPFNER et al., 2001; HOPFNER, PUTNAN; TAINER, 2002; HOPFNER, et al., 2002; ASSENMACHER; HOPFNER, 2004). O domínio de ligação ao ATP é crucial para a funcionalidade de Rad50, uma vez que sua mutagênese resulta em perda parcial da atividade nucleásica *in vitro* do complexo MRN em humanos (D’AMOURS; JACKSON, 2002) e letalidade embriônica em camundongos (ZHU et al., 2001).

A estrutura e função da proteína humana *NBS1* (nibrina ou p95), Xrs2 (em *S. cerevisiae*) e ScaA (em *A.nidulans*) é a menos conhecida do complexo. *NBS1* modula a atividade nucleásica estimulada pela molécula de ATP de Mre11/Rad50 e é requerida para o processamento de “hairpins” pelo complexo. Nbs1 tem o domínio FHA (“forkhead-associated”) e BRCT (“breast cancer C-terminus”). Ambos esses domínios ligam-se a fosfopeptídeos (ASSENMACHER; HOPFNER, 2004) e permitem interação proteína-proteína. Mediante DSB, a proteína Nbs1 é fosforilada pela ATM quinase e esta passa unir-se ao complexo Mre11/Rad50 no núcleo (LIM et al., 2000; WU et al., 2000; D’AMOURS & JACKSON 2002).

De modo importante, a resposta celular ao dano ao DNA é altamente dependente da atividade catalítica das quinases ATM e ATR/ATRIP, sendo que homólogos dessas proteínas são encontradas em todas as células eucarióticas seqüenciadas (ABRAHAM, 2001). ATM e ATR pertencem a família de quinases fosfatidilinositol 3-kinase (PI3K), cujo domínio está localizado na porção C terminal da proteína. ATM e ATR não apresentam atividade catalítica em lipídeos e guardam consigo organização estrutural semelhante. A sua atividade catalítica é específica para resíduos de serina ou treonina seguidos por um resíduo de glutamina (“S/TQ”) (ABRAHAM, 2001; SCHECHTER, 2004; PAULL; LEE, 2005). O domínio catalítico

PI3Kc é flanqueado por duas regiões moderadamente conservadas denominadas FAT (ERAP/ATM/TRRAP) e FATC, onde “C” indica carboxi terminal. Embora esses domínios não apresentem atividade catalítica documentada, eles sempre aparecem em conjunto, o que indica que podem interagir intramolecularmente para regular a conformação do domínio catalítico (ABRAHAM, 2001). As duas proteínas ATM e ATR apresentam funções distintas e por vezes redundantes na fosforilação de certos substratos. ATM primariamente responde a DSBs que foram induzidas no genoma por fontes extrínsecas como radiação ionizante e agentes radiomiméticos como bleomicina; ou por fontes intrínsecas como a recombinação V(D)J no sistema imune de metazoários. ATR por sua vez, também responde a DSBs, porém mais lentamente que ATM. Por outro lado, sua resposta é mais ampla envolvendo agentes alquilantes como metil metano sulfonato (MMS) e agentes que interferem na forquilha de replicação como hidroxauréia (HU) e luz ultravioleta (OSBORN; ELLEDGE; ZOU, 2002; NYBERG et al., 2002) e na própria manutenção da resposta pela ATM (SHECHETER; CONSTANZO; GAUTIER, 2004). Especificamente em *A. nidulans* foi demonstrado recentemente que UvsB^{ATR} modula a expressão de ScaA^{NBS1} durante a recuperação do estresse replicacional causado por hidroxauréia e que o foco nuclear de UvsC^{RAD51}, é também dependente de UvsB^{ATR} (FAGUNDES et al., 2005). Em última instância ATM e ATR fosforilam e ativam as vias de transdução de sinal que interagem com a maquinaria ciclina e ciclina dependente de quinase (ABRAHAM, 2001).

Em células humanas, ATM apresenta-se inativa na forma dimérica. A ativação de ATM por dano ao DNA ou por outras formas de estresse celular leva a autofosforilação da molécula no resíduo serina 1981 e a sua monomerização, habilitando dessa forma a fosforilação de seus substratos. A autofosforilação de ATM mostrou-se essencial para sua atividade *in vivo* em células humanas, embora não tenha se mostrado necessário em ensaios *in vitro* onde se utilizou ATM imunoprecipitada (PAULL; LEE, 2005). Alvos principais da fosforilação mediada por ATM incluem: proteínas que atuam na modificação da cromatina (histona H2AX), que promovem o reparo do DNA (NBS1, BRCA1, BLM, RAD51), que ativam os pontos de checagem (CHK1, CHK2, FANCD2, MDM2 E2F1, Cdc25) e que desencadeiam apoptose (p53) (LAVIN; SHILOH, 1997; BASKARAN et al., 1997; SHAFMAN et al., 1997; BANIN et al., 1998; CANMAN et al., 1998; MCKINNON,

2004; BAKKENIST; KASTAN, 2003; SEMIGHINI; GOLDMAN; HARRIS, 2005; PAULL; LEE 2005).

A verificação de que *NBS1* é um substrato da *ATM* foi confirmada independentemente por três grupos e possibilitou a confirmação de que essas duas proteínas atuavam em vias comuns (GATEI et al., 2000; LIM et al., 2000; WU et al., 2000). Da mesma forma, o homólogo de *NBS1* em *A. nidulans* ScaA também é fosforilado por *atmA*^{ATM}, como será mostrado adiante neste trabalho. Após autofosforilação, ATM ativada se associa diretamente ao complexo Mre11 (para uma revisão ver VAN DEN BOSCH; BREE; LOWNDES, 2003). O papel do complexo Mre11 na ativação e na funcionalidade da ATM tem sido verificado de várias formas. Recentemente, verificou-se que a ativação da ATM em células humanas em cultura foi dependente do complexo Mre11 e Rad50, porém não de Nbs1, nos tempos iniciais de tratamento com baixas doses de radiação ionizante. Entretanto, em tempos de exposição a radiação mais tardios, ou em altas doses, a ativação de ATM foi independente de Mre11-Rad50 ou nibrina (CEROSALETTI; CONCANNON, 2004). Esses resultados indicam que o complexo Mre11 pode também atuar como um “cofator” para ATM, facilitando a ativação da própria ATM, ou mesmo sua atividade em outros substratos. Dessa forma, os componentes do complexo Mre11 apresentam funções “downstream” e “upstream” a ATM na resposta ao dano ao DNA, o que pode explicar as semelhanças clínicas observadas nas síndromes AT e ATLD. (UZIEL et al., 2003; CEROSALETTI; CONCANNON, 2004; PAULL; LEE, 2005).

Estudos têm demonstrado que a ATM está presente predominantemente no núcleo de células humanas em cultura, com uma pequena fração localizada no citoplasma (BROWN et al., 1997; LAKIN et al., 1996; WATTERS et al., 1997). Além do seu papel nuclear no monitoramento do dano ao DNA, foi verificado através de experimentos de duplo híbrido que a porção amino terminal da ATM interage com fragmentos de β -adaptina. Além disso, no citoplasma ATM co-localiza-se em vesículas evidenciando sua associação com β -adaptina. β -adaptina é um dos componentes do complexo AP-2, o qual está envolvido no processo de endocitose mediado por moléculas de clatrina, indicando que a ATM apresenta funções relacionadas aos mecanismos de transporte de vesículas e/ou de proteínas dentro da célula (LIM et al., 1998). Essas importantes observações das funções

citoplasmáticas da proteína ATM, até então exclusivas de células de mamíferos serão abordadas adiante nesse trabalho.

1.3. O fungo *Aspergillus nidulans* como modelo experimental

O gênero *Aspergillus* consiste de muitas espécies bem caracterizadas, pertencentes ao grupo dos ascomicetos. *A. nidulans* é um saprófita que pode ser isolado do solo, podendo ocorrer como bolor em alimentos. O fato de ser saprófita permite que este fungo filamentoso utilize uma grande variedade de nutrientes, além de ser capaz de crescer em uma ampla faixa de temperatura. Isto se reflete em seu cultivo laboratorial, realizado em um meio de cultura simples contendo diferentes fontes de carbono e nitrogênio. A assimilação dos nutrientes requer diversas vias bioquímicas e a produção das enzimas participantes de tais vias sofrem regulação gênica, um dos motivos que incentivou os geneticistas e bioquímicos a estudarem este organismo desde a década de 50 (WARD, 1991). A introdução do fungo filamentoso *A. nidulans* como organismo modelo deu-se a partir dos estudos pioneiros de Guido Pontecorvo e Etta Kaffer que tornaram possível a utilização desse fungo como um modelo, principalmente no campo da genética (PONTECORVO, 1953; KAFFER, 1977). Posteriormente, os estudos igualmente importantes de Ron Morris na caracterização do processo de mitose em *A. nidulans* e do isolamento de mutantes condicionais (*nim*, *bim*, *nud*, e *sep*), permitiram um aprimorado estudo do ciclo celular e da maquinaria morfogenética neste organismo (GOLDMAN; KAFFER, 2004; OSMANI; MIRABITO, 2004).

O sequenciamento completo do genoma do fungo *A. nidulans* foi recentemente finalizado (GALAGAN et al., 2005) e os dados disponíveis tem sido utilizados pela comunidade de pesquisadores. Isso tem facilitado, por exemplo, a deleção completa de genes bem como a recente produção de lâminas de microarray com oligonucleotídeos de *A. nidulans* as quais estão em fase de distribuição para os pesquisadores. *A. nidulans* possui um pequeno genoma de 30.068.514 pb, contendo 9.541 genes, organizados em 8 cromossomos geneticamente bem caracterizados e correspondentes a 8 grupos de ligação. (TIMBERLAKE, 1990; GALAGAN et al., 2005). *A. nidulans* apresenta em torno de um gene a cada 3.151 pb com uma média de 3,6 íntrons por gene (GALAGAN et al., 2005). Este fungo possui uma boa frequência de transformação genética e apresenta recombinação sítio-específica.

Vetores binários e bibliotecas genômicas, de cDNA e cosmidiais cromossomo-específicas estão disponíveis. Assim, a clonagem, a duplicação, a substituição e a deleção de genes podem ser feitas com relativa facilidade. Promotores induzíveis e reprimíveis podem ser usados para regular a expressão de genes clonados. Dentre estes, o mais utilizado é o promotor do gene que codifica da enzima álcool desidrogenase I (*alcA*), o qual é induzido por álcool e treonina e reprimido por glicose (WARING et al., 1989). Adicionalmente, *A. nidulans* é uma boa fonte de biomassa para experimentos bioquímicos, produzindo acima de 10 g/L após 16 horas de crescimento.

O ciclo vegetativo do *A. nidulans* consiste na proliferação das hifas, células tubulares, multinucleadas, formadoras de um tecido vegetativo denominado micélio. Este organismo é classificado como um fungo perfeito, pois apresenta um ciclo sexual definido (Figura 2). Por ocasião da identificação do ciclo sexual em *A. nidulans*, ele foi renomeado como *Emericella nidulans*, muito embora a designação do estado de fungo imperfeito ainda permaneça (WARD, 1991). Os conídios, estruturas de reprodução assexuada, apresentam um único núcleo estacionado em G1, (BERGEN, MORRIS, 1983) sendo capazes de se manterem dormentes, porém viáveis, por longos períodos de tempo. O conídio germinante passa por uma etapa inicial de incorporação de água, na qual ele cresce isotropicamente pela deposição de novas camadas de parede celular em todas as direções (MOMANY; TAYLOR, 2000; HARRIS MOMANY, 2004; OSMANI; MIRABITO, 2004). A primeira divisão nuclear ocorre depois de aproximadamente 4 horas do início da incorporação de água. Após 8 horas, o conteúdo citoplasmático sofre um aumento de 10 vezes, e o DNA de 8 vezes, ou seja, 3 divisões nucleares se completam (DOONAN, 1992). Surge então o tubo germinativo, gerando um eixo de crescimento polarizado. A deposição de parede celular exclusivamente na ponta do tubo germinativo é chamada de extensão apical, e confere à hifa o aspecto de um filamento alongado (HARRIS, 1999; MOMANY; TAYLOR, 2000). A remoção enzimática da parede celular leva à formação de protoplastos esféricos e à perda do crescimento polarizado. No entanto, se houver nova deposição de parede celular o eixo polarizado se restabelece (DOONAN, 1992). A indução do estado de protoplastos nestes germinantes é um evento necessário e utilizado para as transformações em *A. nidulans*.

A citocinese em fungos filamentosos é estabelecida pela formação de septos que dividem as hifas, tornando-as uma estrutura modular composta por células individuais. Assim, como nos demais eucariotos, a citocinese em *A. nidulans* é coordenada com o ciclo celular, ocorrendo a formação do primeiro septo após a terceira mitose (HARRIS, 1997). Subseqüentemente, cada ciclo de divisão celular resulta na formação de um septo adicional (HARRIS; MORRELL; HAMER, 1994). As sucessivas divisões celulares e a formação do septo produzem uma hifa multicelular alongada na qual dois subcompartimentos podem ser identificados: (i) um compartimento apical que continuamente cresce ao passo que o ciclo celular continua e, (ii) um compartimento sub apical que entra num período de quiescência mitótica e parada do crescimento (HARRIS, 1997). As ramificações do compartimento subapical geram uma nova extremidade hifal que repete o ciclo morfogenético. Esse padrão de crescimento observado nos fungos filamentosos permite a eles rapidamente colonizarem novos substratos (SEMIGHINI; GOLDMAN; HARRIS, 2005).

Para induzir o ciclo sexual é necessário reduzir a tensão de oxigênio, através da vedação da placa de cultivo, observando-se a formação de cleistotécios após cerca de 10 dias (DOONAN, 1992). *A. nidulans* é homotático, isto é, uma colônia originada de um único conídio é capaz de se autofecundar, realizando o ciclo sexual. O corpo de frutificação deste fungo, o cleistotécio é uma estrutura esférica com coloração avermelhada. Em seu interior há cerca de 10 mil asci, cada um contendo 8 ascosporos (esporos sexuais) binucleados (Figura 2). As células Hülle, cuja função é desconhecida, são estruturas globulares que recobrem os cleistotécios. O desenvolvimento do cleistotécio se inicia a partir de dois núcleos, os quais entram em divisão sincronizada para produzir uma hifa dicariótica precursora do cleistotécio, local aonde se acredita ocorrer a fusão nuclear que origina o zigoto diplóide. Os seus núcleos sofrem uma divisão meiótica, originando 4 núcleos haplóides, e cada um deles se divide mitoticamente, originando oito núcleos. A parede do ascosporo, denominada cápsula perisporal, se forma ao redor de cada um destes núcleos. Após a individualização dos oito produtos, os seus núcleos sofrem uma divisão mitótica, originando os esporos sexuais binucleados. Quando a fusão nuclear ocorre entre núcleos genotipicamente diferentes, o cleistotécio formado será híbrido. Os ascosporos presentes nestes cleistotécios poderão ser utilizados em

análises genéticas. A cor dos esporos é em particular um marcador visual muito útil na análise genética (WARD, 1991).

Além dos ciclos assexual e sexual, *A. nidulans* apresenta ainda um ciclo parassexual, no qual as hifas de duas linhagens crescidas lado a lado se fusionam, formando o heterocário, um micélio que apresenta os núcleos das duas linhagens (Figura 2). Isto permite o cruzamento experimental de duas linhagens para a obtenção de uma progênie recombinante. A esporulação do heterocário forma diplóides estáveis, os quais podem ser usados na determinação de recessividade ou dominância de uma mutação, quando o alelo selvagem e o mutado estão presentes no mesmo núcleo. Um diplóide pode perder cromossomos gradativamente como resultado de falhas na separação das cromátides irmãs durante a mitose (“nondisjunction”), voltando à condição haplóide. Este processo pode ser acelerado pelo uso de concentrações subletais do fungicida benomil, um inibidor do rearranjo dos microtúbulos. O haplóide resultante contém alguns cromossomos de uma linhagem parental, e alguns da outra. Assim, é possível mapear uma mutação num determinado cromossomo ou grupo de ligação através do uso de linhagens com marcadores específicos para cada cromossomo possa ser reconhecida fenotipicamente em cada um dos grupos de ligação. A análise dos segregantes haplóides derivados do cruzamento indica que o gene a ser mapeado reside no mesmo grupo de ligação do marcador ao qual ele não pode estar associado (WARD, 1991; KAFER; MAY, 1998).

Ao contrário do que ocorre em leveduras, em humanos e outros organismos modelos, a resposta ao dano ao DNA em fungos filamentos ainda não é bem caracterizada. Embora alguns aspectos dessa resposta em fungos filamentos devam ser semelhantes com o que se observa em leveduras e em humanos, alguns aspectos podem ser exclusivos devido a própria organização desses organismos em hifas, o que pode inclusive influenciar o modo de reparo ao dano e/ou sua tolerância pela célula fúngica (GOLDMAN; MACGUIRE; HARRIS, 2002; GOLDMAN, KAFER, 2004).

Figura 2: Ciclo de vida do fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*. Extraído e modificado de Casselton e Zolan (2002).

1.4. A resposta ao dano ao DNA no modelo experimental *Aspergillus nidulans*

Evidências para o reparo da molécula de DNA foram inicialmente obtidas quando mutantes sensíveis à radiação UV foram isoladas em *E. coli*. Os resultados de investigações genética e bioquímica identificaram três principais processos do dano causado pela luz UV denominados: (i) de reparo por excisão em células que não estavam em processo de divisão; (ii) um reparo recombinacional fiel; e (iii) reparo recombinacional passível de erro (mutagênico) (KAHER; MAY 1998). A caracterização do sistema SOS de *E. coli* foi, portanto o ponto de partida para os estudos da resposta ao dano ao DNA. Mecanismos similares, porém envolvendo inúmeros outros genes e complexos protéicos, foram identificados posteriormente em eucariotos (KAHER; MAY, 1998). O estudo do sistema de reparo ao DNA em fungos filamentosos tem sido baseado na caracterização de linhagens mutantes defectivas na resposta ao dano ao DNA em *A. nidulans* e *N. crassa* (GOLDMAN; MACGUIRE; HARRIS, 2002). Recentemente, o genoma dessas duas espécies tornou-se disponível, o que tem permitido a identificação de ortólogos de componentes chaves da resposta ao dano ao DNA nesses organismos que são conservados desde leveduras até mamíferos (GOLDMAN; KAHER, 2004).

Ao contrario de leveduras e mamíferos, a DDR em fungos filamentosos é pouco caracterizada (GOLDMAN; MACGUIRE; HARRIS, 2002). Apesar disso, um grande número de mutantes sensíveis a agentes genotóxicos tem sido isolados em *A. nidulans* e *N. crassa* (KAHER; MAY, 1998; INOUE, 1999). Contrariamente às leveduras, os fungos filamentosos são multicelulares, formando hifas que interagem para formar o micélio altamente ramificado e denso. O micélio também produz estruturas multicelulares que facilitam a dispersão dos esporos. Essas características, combinadas com a facilidade de manipulação genética desses organismos permitem utilizá-los no estudo da resposta ao dano ao DNA. Embora algumas características dessa resposta possam ser compartilhadas com o que ocorre em mamíferos e leveduras, alguns aspectos podem refletir exclusivamente a natureza da organização em hifas nesses organismos (GOLDMAN; MACGUIRE; HARRIS, 2002). Por exemplo, como as hifas são estruturas multinucleadas, a apoptose induzida por dano ao DNA pode ser um componente mais significativo da DDR em fungos filamentosos do que em leveduras. Além disso, as formas de reparo do dano e a tolerância deste também podem ser influenciadas pela natureza das

hifas (GOLDMAN; MACGUIRE; HARRIS, 2002).

De maneira geral, os genes cujos produtos participam do sistema de reparo ao dano ao DNA foram identificados através de mutações recessivas que causam sensibilidade a agentes genotóxicos. Em *A. nidulans*, cinco coleções de mutantes sensíveis a agentes genotóxicos foram descritas, a saber: (i) *uvs*, (ii) *mus*, (iii) *sag*, (iv) *nuv* e (v) *sca*, (para uma revisão ver KAFER; MAY, 1998; GOLDMAN; MACGUIRE; HARRIS, 2002; GOLDMAN; KAFER, 2004) sendo a última classe isolada em trabalhos anteriores em nosso laboratório. Além disso, há também os mutantes *rec* que apresentam defeitos no processo de recombinação homóloga e também podem definir funções relacionadas ao dano ao DNA (PARAG; PARAG, 1975).

Os mutantes *uvs* (“ultraviolet sensitive”) e *mus* (“MMS sensitive mutants”) são hipersensíveis a luz ultravioleta e ao agente alquilante MMS. A sensibilidade dos mutantes *uvs* a tais agentes foi utilizada como parâmetro para a classificação dos mesmos em quatro grupos epistáticos: UvsB, UvsC, UvsF e UvsI (CHAE; KAFER, 1993; KAFER; MAY, 1998). Os mutantes *uvsB* e *uvsD*, participantes do grupo UvsB, apresentam fenótipo consistente com a incapacidade de regular a reposta ao dano ao DNA. Além disso, apresentam sensibilidade a uma série de agentes mutagênicos e são defectivos na função de parada do ciclo celular através de pontos de checagem na presença de dano ao DNA. Adicionalmente, apresentam aberrações cromossômicas e incapacidade de completar a formação do septo (citocinese) na presença de dano ao DNA, indicando que estes genes codificam proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular (KAFER; MAYOR, 1986; HARRIS; KRAUS, 1998). De Souza, Ye e Osmani (1999) sequenciaram os genes *uvsB* e *uvsD*, e encontraram que o *uvsB* faz parte da família das proteínas quinases ATM/ATR (*Homo sapiens*) Rad3/Mec1/Tel1 (*S. cerevisiae*), enquanto que o *uvsD* apresentou identidade com *Rad26* de *S. cerevisiae*, o ortólogo de *ATRIP* em humanos. Hofmann e Harris (2000) demonstraram que a proteína UvsB^{ATR} é necessária para vários aspectos da resposta ao dano ao DNA, como a parada do ciclo celular, a inibição da septação, e sugeriram que esta proteína funciona como um regulador central na resposta ao dano ao DNA em *A. nidulans*. Esses mesmos autores observaram ainda que a mutação *musN227* (um membro da família das helicases do DNA RecQ) suprime parcialmente a deficiência na resposta ao dano ao DNA provocada pela mutação *uvsB* (HOFMANN; HARRIS, 2000). Além disso, UvsB também regula e expressão do homólogo de *NBS1* em *A. nidulans* (FAGUNDES et al., 2004).

Mutantes do grupo epistático UvsC (*uvsC*, *uvsE*, *musK*, *musL* e *musN*) apresentam fenótipos consistentes com defeitos no reparo medido por recombinação. Por exemplo, os genes *uvsC* e *uvsE* apresentam defeitos pronunciados na via de recombinação homóloga e são sensíveis a vários agentes que causam DSB (KAHER; MAYOR, 1986). Essas observações são fundamentadas pela observação de que *uvsC* é o ortólogo de Rad51 de *S. cerevisiae* (ICHIOKA et al., 2001) necessário para a interação das duas fitas de DNA durante a recombinação homóloga.

Mutantes do grupo UvsF/H (*uvsF*, *uvsH* e *uvsJ*) apresentam fenótipos consistentes com defeitos no sistema de reparo por excisão e incluem altas taxas de mutagenese induzida por luz UV e recombinação. Entretanto, a caracterização molecular dos genes: (i) *uvsF*, um ortólogo da subunidade maior do fator de replicação C (RFC) que é essencial para replicação; (ii) *uvsH* um ortólogo do gene Rad18 de *S. cerevisiae* envolvido no reparo pós replicacional (PPR) e (iii) *uvsJ*, um ortólogo de gene Rad26 de *S. cerevisiae* também envolvido em PPR sugeriu que este grupo provavelmente desempenha funções no reparo pós replicacional (GOLDMAN; MACGUIRE; HARRIS, 2002; GOLDMAN; KAHER, 2004).

A partir do isolamento da coleção de mutantes *sca*, sensível ao quimioterápico camptotecina (“sensitive to camptotecin”), foi possível a identificação do mutante *sca299*, que apresentou alta sensibilidade a esta droga e a outros agentes mutagênicos (BRUSCHI et al., 2001). A proteína identificada ScaA mostrou moderada similaridade com a nibrina humana (*NBS1*) e de camundongo. Recentemente com intuito de identificar novas proteínas que pudessem interferir na via metabólica do complexo em que a proteína ScaA está normalmente envolvida, foram isolados quinze supressores extragênicos da mutação *scaA1*, tendo sido descrito o gene da topoisomerase I como capaz de complementar um desses supressores (*scsA*^{TOP1}). Além disso, foi demonstrada interação sinérgica entre *scaA*^{NBS1} e *scsA*^{TOP1} (FAGUNDES et al., 2003). Adicionalmente, ensaios de duplo híbridos conduzidos por Semighini et al. (2003) utilizando o cDNA de *scaA*^{NBS1} como “isca” permitiram a clonagem e a caracterização molecular do gene *mreA*, o homólogo de Mre11 em *A. nidulans*. No presente trabalho, foi caracterizada a terceira proteína do complexo Mre11 de *A. nidulans*, *sldI*^{RAD50} e também o homólogo da quinase apical ATM em *A. nidulans* denominado *atmA*.

2.0. OBJETIVOS

O sistema de reparo do dano ao DNA foi desenvolvido ao longo da evolução como um mecanismo de proteção celular responsável pela manutenção da integridade do genoma. Em humanos, as síndromes de instabilidade cromossômicas herdadas são doenças autossômicas recessivas caracterizadas, por exemplo, pelo aumento das quebras cromossômicas, predisposição ao câncer e imunodeficiências decorrentes de alterações no funcionamento deste sistema de reparo. Em geral, mutações hipomórficas em genes alvo levam ao fenótipo dessas diversas síndromes. No entanto, alguns dos genes participantes do sistema de reparo são essenciais em mamíferos causando letalidade embriônica e, portanto dificultando a sua caracterização genética e funcional. O fungo filamentoso *Aspergillus nidulans* apresenta um sofisticado sistema de reparo ao dano ao DNA o que o torna um modelo apropriado para o estudo dos mecanismos envolvidos no reparo do dano no DNA. Assim, neste trabalho, a via de sinalização definida pelas proteínas do complexo MreA^{MRE11}, SldI^{RAD50} e ScaA^{NBS1} e pela quinases apicais AtmA^{ATM} e UvsB^{ATR} tiveram especial interesse. Assim, os principais objetivos deste trabalho foram:

- i) o isolamento e a caracterização fenotípica do mutante $\Delta sldI^{RAD50}$ em *A. nidulans*.
- ii) o isolamento e a caracterização fenotípica do mutante $\Delta atmA^{ATM}$ em *A. nidulans*.
- iii) a avaliação do perfil transcricional do mutante $\Delta atmA^{ATM}$ utilizando a técnica de microarray a partir de conídios crescidos por 60, 90 e 120 minutos.
- iv) a avaliação do perfil transcricional do mutante $\Delta atmA^{ATM}$ utilizando a técnica de microarray a partir de conídios crescidos por 60, 90 e 120 minutos após liberação do bloqueio com HU.

v) a construção de membranas de macroarrays a partir de ESTs de *A. nidulans* seqüenciados a partir de uma biblioteca de cDNA construída com mRNA de uma cultura induzida com a droga camptothecin (CPT).

vi) a hibridização das membranas de macroarray com cDNAs isolados a partir da linhagem selvagem e do mutante $\Delta uvsB^{ATR}$ de *A. nidulans*, crescidas em presença da droga CPT.

vii) o isolamento e a caracterização fenotípica de linhagens mutantes de alguns dos genes identificados como diferencialmente expressos nos experimentos de macroarray e RT-PCR em tempo real, visando averiguar o papel dos mesmos na resposta celular ao dano ao DNA.

3.0. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Linhagens de *A. nidulans* utilizadas neste trabalho

Tabela 1: Genótipos das linhagens de *A. nidulans* utilizadas neste trabalho

Linhagens	Genótipo	Referência
1444D	<i>pyrG89; yA2; sld1</i>	EFIMOV; MORRIS, 1999
A154	<i>adE biA1; wA2 cnxE16; sC12; methG1; nicA2; lacA1; choA1; chaA1</i>	FGSC [§]
A26	<i>biA1</i>	FGSC
A4	Glasgow wild type (<i>veA+</i>)	FGSC
A776	<i>pabaA1; acrA1; bimE7; riboB2 chaA1</i>	FGSC
A781	<i>wA3; nimA5</i>	FGSC
ACS16	<i>pyroA4 pyrG89, wA3; ΔatmA::</i>	estoque laboratório
AAH14	<i>pyrG89 pabaA1; yA2; ΔuvsB::argB</i>	HOFFMAN; HARRIS, 2000
AAV1	<i>pyroA4 pyrG89; spaA::gfp::pyr4</i>	VIRAG; HARRIS, 2006a
AAV11	<i>pyroA4 pyrG89; wA3; ΔspaA::pyr4</i>	VIRAG; HARRIS, 2006a
AAV2	<i>pyroA4 pyrG89; wA3; alcA::gfp::budA::pyr4</i>	VIRAG; HARRIS, 2006a
ACP115	<i>pyroA4 pyrG89; wA3; tpmA::gfp::pyr4</i>	PEARSON et al., 2004
AKS70	<i>pyrG89 pabaA1 yA2; sepA::gfp::pyr4</i>	SHARPLESS; HARRIS, 2002
AML37	<i>pyrG89 argB2; alcA::modA^{G14V}::argB</i>	VIRAG; HARRIS, 2007
APK35	<i>choA1; pabaA1; ankA</i>	KRAUS; HARRIS, 2001
ASH270	<i>pyrG89; pabaA;1 yA2; uvsB110</i>	HOFFMAN; HARRIS, 2000
ATr60cd1	<i>pyrG89; argB2; chaA1; uvsC::pyr4</i>	ICHIOKA et al., 2001
DC1	<i>pyrG89; argB2 chaA1</i>	ICHIOKA et al., 2001
G840 [‡]	<i>yA2; pyroA4; lacA1; pppA1</i>	HANKINSON, 1974
G840 16A10 [†]	<i>yA2; pyroA4; lacA1; pppA1; pppA⁺</i>	este trabalho
GR5	<i>pyroA4 pyrG89, wA3</i>	FGSCA773
IM14	<i>pyrG89 yA2; argB2; sldl::pyrG; ΔuvsB::argB</i>	este trabalho
IM238	<i>bimE7; sldl::pyrG</i>	este trabalho
IM25	<i>pyrG89 yA2; argB2; sldl::pyrG</i>	este trabalho
IM69	<i>pyroA4 pyrG89, wA1; ΔatmA::pyrG</i>	este trabalho
IM69-1	<i>pyroA4 pyrG89, wA1; alcA::gfp::atmA::pyr4</i>	este trabalho
IM69-221	<i>pyrG89; wA3; nimA5; ΔatmA::pyrG</i>	este trabalho
IM69-228	<i>pyrG89; wA3; bimE7; ΔatmA::pyrG</i>	este trabalho
IM69-270.1	<i>wA3; alcA::gfp::atmA::pyr4; uvsB101</i>	este trabalho
IM69-25	<i>pyrG89 yA2; sldl::pyrG; ΔatmA::</i>	este trabalho
IM69-3	<i>pyrG89 yA2; ΔatmA::pyrG; ΔnpkA::argB</i>	este trabalho
IM69-78	<i>wA3; calC2; ΔatmA::pyrG</i>	este trabalho
IM69-840	<i>pppA1; ΔatmA::</i>	este trabalho
IM69-AV1	<i>chaA1; spaA::gfp; ΔatmA::</i>	este trabalho
IM69-AV2	<i>wa3; alcA::gfp::budA::pyr4; ΔatmA::</i>	este trabalho

Linhagens	Genótipo	Referência
IM69-AV11A	<i>wa3; ΔspaA::pyr4; ΔatmA::</i>	este trabalho
IM69-ACP	<i>wA3; tpmA::gfp::pyr4; ΔatmA::</i>	este trabalho
IM69-K13	<i>ΔkipA; ΔatmA::</i>	este trabalho
IM69-K99	<i>alcA::gfp::kipA::pyr4; ΔatmA::</i>	este trabalho
IM69-KS70	<i>yA2; sepA::gfp::pyr4; ΔatmA::</i>	este trabalho
IM69-37	<i>wa3; alcA::modA^{G14V}::argB; ΔatmA::pyrG</i>	este trabalho
IM69-RE	<i>wA3; mreA::pyr4; ΔatmA::</i>	este trabalho
IM-TR20 [¶]	<i>yA2; pyroA4; lacA1; pppA1; pppA⁺</i>	este trabalho
IM-TR21 [¶]	<i>yA2; pyroA4; lacA1; pppA1; pppA⁺</i>	este trabalho
IM69-W100	<i>wA3; alcA::gfp::tubA, ΔatmA::</i>	este trabalho
IM70	<i>pyrG89 yA2; argB2; ΔphbA::pyrG</i>	este trabalho
IM70-14	<i>pyrG89 yA2; argB2; ΔphbA::pyrG; ΔuvsB::argB</i>	este trabalho
IM71	<i>pyrG89 yA2; argB2; ΔmshA::pyrG</i>	este trabalho
IM71-14	<i>pyrG89 yA2; argB2; ΔmshA::pyrG; ΔuvsB::argB</i>	este trabalho
IM72-2.14	<i>pyrG89 yA2; argB2; ΔcshA::pyrG; ΔuvsB::argB</i>	este trabalho
IM72-3	<i>pyrG89 argB2; chaA1; ΔcshA::pyrG</i>	este trabalho
IM73-104	<i>pyrG89; argB2; chaA; ΔfhdA::pyrG</i>	este trabalho
IM73-104.14A	<i>pyrG89 yA2; argB2; ΔfhdA::pyrG; ΔuvsB::argB</i>	este trabalho
IM74-10	<i>pyrG89; argB2; chaA1; ΔtprA::pyrG</i>	este trabalho
IM74-10.14A	<i>pyrG89 yA2; argB2; ΔtprA::pyrG; ΔuvsB::argB</i>	este trabalho
IMT	<i>pyrG89 yA2; sldI::pyrG; scaA::</i>	este trabalho
MV3	<i>pyrG89 yA2; argB2; ΔnpkA::argB</i>	FAGUNDES et al., 2004
R153	<i>pyroA4; wA3</i>	FGSC
R21	<i>pabaA1; yA2</i>	FGSC
R78	<i>pyroA4 pyrG89, wA3; calC2</i>	TEEPE et al., 2007
SJW100	<i>wA3; pyroA4; ΔargB::trpCΔB; alcA::gfp::tubA; veA; alcA::stuA(NLS)::DsRed</i>	KONZACK et al., 2005
SSK13	<i>pabaA1; wA3; ΔkipA::pyr4; veA1</i>	KONZACK et al., 2005
SSK99	<i>pyroA4 pyrG8; wA3; alcA::gfp::kipA::pyr4; gpd::stuA(NLS)::DsRed</i>	KONZACK et al., 2005
T20	<i>pyroA4 pyrG89; wA3; scaA::pyr4</i>	BRUSCHI et al., 2001
T20-17	<i>pyroA4 pyrG89; wA3; scaA::</i>	estoque laboratório
TMRE	<i>pyrG89 yA2; argB; mreA::pyr4</i>	SEMIGHINI et al., 2003
TNO2A3	<i>pyroA4 pyrG89; chaA1; ΔnKuA::argB</i>	NAYAK et al., 2006
UI224	<i>pyrG89 yA2; argB2</i>	FGSC
XX61	<i>pyroA4 pyrG89; wA3; alcA(p)::nudA::pyr4</i>	EFIMOV; MORIS, 1999

[§] Fungal Genetics Stock Center (<<http://www.fgsc.net>>)

[‡] FGSC A690

[†] complementação da linhagem G840 com biblioteca cosmidial

[¶] complementação da linhagem G840 com ORF AN0240.3 (transaldolase)

3.2. Meios de Cultura

3.2.1. Meios de cultura para *A. nidulans*

3.2.1.1. Meio mínimo (MM)

20X solução de sais (Kafer, 1997)	1X
Elementos traços	0,1% (v/v)
Glicose	1% (p/v)
Agar	2% (p/v)

O pH foi ajustado para 6,5 com hidróxido de sódio (2M). Esterilizou-se em autoclave. Para MM+Glicerol, a glicose foi substituída por 2% de glicerol (v/v).

3.2.1.2. Meio completo (YAG, YUU, YG e YG+UU)

Extrato de levedura	0,5%
Glicose	2% (p/v)
Ágar	2% (p/v)
Solução de elementos Traços	0,1% (v/v)

O volume final foi ajustado com água destilada. Esterilizou-se em autoclave. YUU indica o meio de cultura completo YAG suplementado com uridina 4 mM e uracila 10 mM. Para a regeneração dos protoplastos, utilizou-se meio completo + KCl (0,6M). Os meios YG e YG+UU são iguais em composição, respectivamente, aos meios YAG e YUU, entretanto sem a adição de ágar 2% (p/v). Para meio Top Agar de regeneração dos protoplastos foi adicionado 1% (p/v) de ágar. Em experimentos onde se necessitava de repressão do promotor *alcA*, foi utilizado meio contendo glicose 4%.

3.2.1.3. Meio mínimo de Cove (Cove, 1966)

Solução de sais para MM Cove	1X (v/v)
Solução de elementos traços	0,1% (v/v)
Agar	2% (p/v)

O volume final foi ajustado com água destilada. Esterilizou-se em autoclave. As fontes de carbono foram adicionadas posteriormente no momento do uso de acordo com a

necessidade na concentração final 1% (xilose ou glicose) a partir de soluções estoque devidamente filtradas. A fonte de nitrogênio utilizada para os experimentos foi uréia 5mM (concentração final), de acordo com Hankinson, 1974.

3.2.2. Meio de cultura para *E. coli*

3.2.2.1. Meio Luria Bertani (LB)

Extrato de Levedura	0,5% (p/v)
Cloreto de Sódio	0,17 M
Triptona	1% (p/v)

Os componentes foram dissolvidos em água destilada e o meio foi esterilizado em autoclave. Para meio sólido foi adicionado 2% (p/v) ágar.

3.2.2.2. Terrific Broth

Dihidrogenofosfato de potássio	0,17 M
Hidrogenofosfato de potássio	0,72 M

Os componentes foram dissolvidos no volume final de 100 ml em água destilada e esterilizado em autoclave.

Bacto peptona	1,2% (p/v)
Extrato de levedura	2,4% (p/v)
Glicerol	4% (v/v)

Os componentes foram dissolvidos no volume final de 900 ml de água destilada e esterilizado em autoclave. As duas soluções resfriadas (60°C) foram misturadas para a obtenção de 1 L de meio.

3.3. Soluções e Tampões

3.3.1. Solução de elementos traços

Sulfato de zinco heptahidratado	75 mM
Ácido bórico	180 mM
Cloreto de manganês tetrahidratado	25 mM
Sulfato de ferro heptahidratado	18 mM
Cloreto de cobalto pentahidratado	6 mM
Sulfato de cobre pentahidratado	6 mM
Molibdato de amônio tetrahidratado	1 mM
EDTA	140 mM

Os componentes foram adicionados na ordem listada em 1/8 do volume final de água destilada. Cada componente foi dissolvido completamente antes de adição do próximo. A solução foi aquecida até 100°C e então resfriada para 60°C. Ajustou-se o pH entre 6,5 e 6,8 com solução de hidróxido de sódio (10 M). Deixou-se resfriar até atingir a temperatura ambiente para acerto do volume final.

3.3.2. Solução de sais 20X concentrada para MM (Kaffer, 1977)

Nitrato de Sódio	3,2 M
Cloreto de Potássio	0,14 M
Dihidrogenofosfato de Potássio	0,2 M
Sulfato de Magnésio heptahidratado	0,04 M

Os componentes foram dissolvidos em água destilada e utilizados na composição do Meio Mínimo.

3.3.3. Solução de sais 50X concentrada para MM Cove (Cove, 1966)

Cloreto de Potássio	0,35 M
Sulfato de Magnésio heptahidratado	0,11 M
Dihidrogenofosfato de Potássio	0,56 M

Os componentes foram dissolvidos em água destilada e utilizados na composição do Meio Mínimo de Cove.

3.3.4. Soluções de protoplastização para transformação em *A. nidulans*

3.3.4.1. Solução 1 de protoplastização

Sulfato de amônio	0,8 M
Ácido cítrico pH 6	100 mM

Dissolveu-se o sulfato de amônio em água destilada e adicionou-se o volume adequado de solução de ácido cítrico 1 M, pH 6 previamente preparada. Ajustou-se o volume e esterilizou-se em autoclave.

3.3.4.2. Solução 2 de protoplastização

Extrato de levedura	1% (p/v)
Sacarose	2% (p/v)

Os componentes foram dissolvidos em água destilada. Esterilizou-se em autoclave.

3.3.4.3. Solução 3 de protoplastização

Sulfato de amônio	0,4 M
Sacarose	1% (p/v)
Ácido cítrico pH 6	50 mM

Sulfato de amônio e sacarose foram dissolvidos em água destilada. Adicionou-se o volume necessário de uma solução de ácido cítrico 1 M, pH 6 previamente preparada. Esterilizou-se em autoclave.

3.3.4.4. Solução 4 de protoplastização

Polietilenoglicol PM 6000 g/mol	25% (p/v)
Cloreto de cálcio dihidratado	100 mM
Cloreto de potássio	0,6 M
Tris HCl pH 7,5	10 mM

Dissolveram-se os componentes em água destilada e acrescentou-se o volume necessário de solução Tris HCl, pH 7,5 (1 M) previamente preparada. Esterilizou-se em autoclave.

3.3.4.5. Solução 5 de protoplastização

Cloreto de cálcio dihidratado	50 mM
Cloreto de potássio	0,6 M
MES pH 6,0	10 mM

Os componentes foram dissolvidos em água destilada. Esterilizou-se em autoclave.

3.3.5. Solução de lise para mini prep

Hidróxido de sódio	0,2 M
SDS	1%

Preparou-se no momento do uso a partir de soluções estoque de NaOH 4 M e SDS 10%.

3.3.6. Solução de neutralização para mini prep

Acetato de Potássio	3 M
Ácido acético glacial	7,5 ml

Dissolveu-se o acetato de potássio em água destilada e acrescentou-se o ácido acético. Ajustou-se o volume com água destilada para 500 ml e esterilizou em autoclave. Armazenou-se à 4°C.

3.3.7. Solução de Denhardt (100X concentrada)

Soro albumina bovina (BSA) (Fração V, Sigma)	2% (p/v)
Ficoll tipo 400	2% (p/v)
Polivinilpirrolidona	2% (p/v)

Dissolveu-se o Ficoll e a polivinilpirrolidona em água destilada com calor suave. Foi então adicionada a BSA na solução resfriada e ajustou-se o volume adequado. Estocou-se a -20°C.

3.3.8. Solução depurinizante

Ácido clorídrico	0,25 M
------------------	--------

O volume necessário de ácido foi diluído em água destilada e o volume final acertado.

3.3.9. Solução salina citrato (SSC) 20X concentrada

Cloreto de sódio	3 M
Citrato de sódio dihidratado	300 mM

Dissolveu-se em água destilada, ajustou-se em pH 7,0 com hidróxido de sódio (4 M) e completou-se o volume com água destilada.

3.3.10. Solução OLB para produção de sonda “overgo”

Solução O:

Tris HCl pH 8	1,25 M
Cloreto de magnésio	125 mM

Solução A:

Solução O	66,6 µl
β-mercaptoetanol	1,2 µl
dATG “mix” (100 mM cada)	1 µl

Solução B:

HEPES	2 M
-------	-----

Ajustar o pH com hidróxido de sódio (2M) para 6,6

Solução C:

Tris HCl pH 7,4	3 mM
EDTA	0,2 mM

Para a solução OLB de uso misturou-se 10 µl da solução A, 25 µl da solução B e 15 µl da solução C.

3.3.11. Solução SDS 10%

SDS	10 g
Água destilada q.s.p.	100 ml

Dissolveu-se em água destilada e acertou-se o volume.

3.3.12. Solução de fixação para microscopia I

Formaldeído	3,7% (v/v)
Dihidrogenofosfato de sódio	50 mM pH 7,0
Tween 80	0,2% (v/v)

Dissolveu-se em água destilada. Os germinantes foram tratados por 30 minutos para fixação.

3.3.13. Solução de fixação para microscopia II

PBS	1X
DMSO	5% (v/v)
Formaldeído	3,7% (v/v)
Metanol	10% (v/v)

Dissolveu-se em água destilada. Os germinantes foram tratados por 15 minutos para fixação.

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

DAPI	100 µg/ml
------	-----------

Esta solução foi mantida fora do alcance da luz, -20°C.

3.3.15. Solução estoque de calcoflúor

Dissolveu-se o equivalente a 100 µg/ml de calcoflúor (Blankophor BBH, Standard SV-2460, Miles Organic Products Division), em uma gota de KOH 1 M e a seguir adicionou-se o volume adequado de água destilada. A solução foi mantida fora do alcance da luz a -20°C.

3.3.16. Solução estoque de xilose

xilose	30% (p/v)
--------	-----------

Dissolveu-se em água destilada. Esterilizou-se por filtração, filtros 25 µM (PVDF)

3.3.17. Solução estoque de lovastatina

A solução estoque de lovastatina foi preparada pela hidrólise de uma solução na concentração de 85 mg/ml em etanol/NaOH 0,2 M a 65°C por 40 minutos. A solução obtida foi diluída para a concentração de 25 mg/ml com Tris-HCl 25 mM, pH 8. As alíquotas foram mantidas a -20°C.

3.3.18. Solução estoque de miriocina

Miriocina obtida de *Micelia sterilia* foi obtida (Sigma número de catálogo M1177) e reconstituída em etanol 100% na concentração de 5 mg/ml.

3.3.19. Solução estoque de filipina

A filipina obtida (Sigma, número de catálogo F9765) foi reconstituída na concentração de 25 mg/ml em DMSO. Para marcação foi usado 25 µg/ml (concentração final) em meio de cultura adequado pré-aquecido 37°C.

3.3.20. Solução estoque de “nitro blue tetrazolium” (NBT)

Foi utilizada solução estoque de NBT (Sigma) na concentração de 1% em água destilada estéril. Para coloração dos germinantes foi utilizado NBT na concentração final de 0,05% em água destilada.

3.3.21. Solução estoque de FM4-64

Foi utilizada a sonda FM4-64 “(N-(3-thiethylammoniumpropyl)-4-(p-diethylaminophenyl)hexatrienyl) pyridinium dibromide)” análogo fixável (Invitrogen Molecular Probes, número de catálogo F34653) comercializado em alíquotas dissecadas de 100 µg cada. Cada alíquota foi reconstituída para a concentração final de 200 µM em água destilada estéril. A solução de uso (fresca) foi de 10 µM diluída a partir do estoque em meio de cultura adequado pré-aquecido a 37°C.

3.3.22. Solução estoque de difenileniodônio

Foi utilizado o inibidor da enzima NADP oxidase difenileniodônio (DPI) (Sigma, D2926). Foi utilizada solução estoque na concentração de 16 mM em DMSO a qual foi armazenada -20°C.

3.3.23. Solução estoque de H₂DCFDA

Foi utilizada a sonda CM-H₂DCFDA 5-(e-6)-clorometil-2',7'-diclorohidrofluoresceína diacetato acetil éster (Invitrogen Molecular Probes, número de catálogo C6827) comercializado em alíquotas dissecadas de 50 µg cada. Cada alíquota foi reconstituída para a concentração de 1 mM em DMSO ao abrigo da luz. A solução de uso (fresca) foi de 20 µM diluída a partir do estoque em meio de cultura adequado pré-aquecido a 30°C. A sonda CM-H₂DCFDA é um derivado que contém

um grupamento reativo tiol clorometil que permite a ligação covalente da sonda às estruturas intracelulares possibilitando longa retenção desta dentro da célula.

3.3.24. Soluções estoque de requisitos nutricionais

As soluções estoques de vitaminas e aminoácidos foram preparadas segundo Kafer (1977), como descrito na Tabela 2, sendo esterilizadas por filtração e adicionadas ao meio de cultura de maneira estéril no momento do uso.

Tabela 2: Soluções estoque de requisitos nutricionais recomendados para complementação das auxotrofias em *A. nidulans*.

	Solução estoque [§]	Concentração/ 1 L de meio de cultura
Vitaminas		
10X Ác. p-aminobenzóico (PABA)	0,17 g/100 ml H ₂ O	500 µl
biotina	0,03 g/100 ml H ₂ O	100 µl
100X Piridoxina-HCl (PIRO)	0,10 g/100 ml H ₂ O	50 µl
Pirimidinas		
5 mM Uridina	-	1,22 g
10 mM Uracila	-	1,12 g
Aminoácidos		
2X L-Arginina	8,4 g/100 ml H ₂ O	2,5 ml
100 mM L-Citrulina	1,75 g/100 ml H ₂ O	10 ml

[§] Soluções filtradas em filtro 0,45µm (PVDF, Millipore).

3.3.25. Soluções estoque de drogas mutagênicas utilizadas

Tabela 3: Soluções estoque das drogas mutagênicas

Drogas	Mecanismo de ação	Estoque
bleomicina (BLEO)	causa fragmentação do DNA, mimético de radiação gama	3 mg/ml (em água)
camptothecin (CPT)	inibidor da topoisomerase I	200 mM (em DMSO)
hidroxiuréia (HU)	inibidor da síntese de DNA por depleção de nucleotídeos (inibe a enzima ribonucleotídeo redutase)	3 M (em DMSO)
bleomicina (PHLEO)	causa fragmentação do DNA, mimético de radiação gama	10 mg/ml em água
methyl methanesulfonate (MMS)	agente alquilante do DNA	5% (em água)
paraquat (PARAQ)	indutor de estresse oxidativo	1 M (em água)
menadiona (MENA)	indutor de estresse oxidativo	0,5 M (em DMSO)
4-nitroquinoline oxide (4NQO)	mimetizante de radiação UV	100 µg/ml (em DMSO)
nocodazol	Inibe a despolimerização dos microtúbulos	3 mg/ml (em DMSO)

3.3.26. Tampão PBS (“Phosphate buffered saline”) 10X concentrado

Cloreto de sódio 350 mM

Cloreto de potássio 180 mM

Hidrogenofosfato de sódio 25 mM

Dihidrogenofosfato de potássio 18 mM

Dissolveu-se em água destilada, acertou-se para pH 7,4 e completou-se o volume final. Esterilizou-se em autoclave.

3.3.27. Tampão MOPS 10X concentrado

MOPS 0,2 M

Acetato de sódio 0,5 M

EDTA 0,01 M

Dissolveu-se os componentes em água deionizada tratada com dietil pirocarbonato (DEPC) 0,1% e o pH foi ajustado para 7.

3.3.28. Tampão de amostra para eletroforese de RNA

Azul de Bromofenol 0,1 mg/ml

Glicerol 50% (v/v)

Tampão MOPS 1x

Dissolveu-se os componentes no volume necessário.

3.3.29. Tampão de amostra para eletroforese de DNA

Azul de Bromofenol 0,1 mg/ml

Xileno cianol 0,1 mg/ml

Glicerol 50% (v/v)

Dissolveu-se os componentes no volume necessário.

3.3.30. Tampão de amostra para eletroforese de proteínas

Tris-HCl 313 mM

SDS 10% (p/v)

Sacarose ou Glicerol 10% (p/v) ou (v/v)

Azul de bromofenol 0,1% (p/v)

Para a utilização, era realizada uma diluição 3:1 do tampão de amostra com β -mercaptoetanol e adicionado em cada amostra, um quinto do volume final da amostra ressuspensa com PBS 1X. As amostras eram fervidas (100°C) por 3 minutos e imediatamente aplicadas no gel SDS-PAGE.

3.3.31. Tampão TRIS-Acetato-EDTA (TAE) 50X concentrado

Tris Base	242 g
Ácido Acético Glacial	57,1 ml
EDTA 0,5M pH 8,0	100 ml
Água destilada q.s.p.	1 L

Acertou-se para pH 8 e esterilizou-se em autoclave. Para uso na eletroforese de DNA, o tampão foi diluído 1X.

3.3.32. Tampão GET para “mini prep”

Glicose anidra	0,92% (p/v)
EDTA	10 mM
Tris-HCl	26 mM

Dissolveu-se a glicose em água destilada e adicionou-se volume necessário de solução estoque de EDTA (0,5 M, pH 8) e Tris-HCl (1 M, pH 7,4). A solução foi esterilizada em autoclave e as alíquotas estocadas -20°C.

3.3.33. Tampão de eletroforese de proteína

Tris base	25 mM
Glicina	19 mM
SDS	0,1% (p/v)

Dissolveu-se em água milli-Q e acertou-se o volume final.

3.3.34. Tampão de extração de DNA

Tris-HCl pH 8,5	200 mM
Cloreto de sódio	250 mM
EDTA	25 mM
SDS	0,5% (p/v)

Dissolveu-se em água destilada.

3.3.35. Tampão de extração de proteína

p-Nitrofenilfosfato	15 mM
Tris Base pH 7,5	25 mM
EGTA pH 7,5	15 mM
Cloreto de magnésio	15 mM

Dissolveu-se em água milli-Q e acertou-se o volume final para as concentrações finais indicadas acima. Para o uso adicionou-se os inibidores de protease na concentração final requerida.

3.3.36. Inibidores de protease (concentrações finais para uso)

Leupeptina	10 µg/ml
Benzamidina	1 mM
Aprotinina	2,2 µg/ml
Pefabloc	1 mM
PMSF	1 mM

3.3.37. Corante comassie

Comassie Brilliant Blue	0,25% (p/v)
Ácido Acético Glacial	30% (v/v)
Metanol	50% (v/v)

Os componentes foram misturados e o volume necessário ajustado.

3.3.38. Descorante de comassie

Ácido acético glacial	10% (v/v)
Etanol	30% (v/v)

Os componentes foram misturados e o volume necessário ajustado.

3.3.39. SDS PAGE 10%**3.3.39.1. Gel de poliacrilamida - empilhamento**

Tris-HCl pH 6,8	125 mM
SDS	0,1% (p/v)
acrilamida:bisacrilamida (0,8:30)	5% (v/v)
TEMED	0,15% (v/v)
Persulfato de amônia)	1,25 mg/ml

Dissolveu-se em água milli-Q e aplicou-se no suporte. Aguardou-se a polimerização do gel por no mínimo 30 minutos.

3.3.39.2. Gel de poliacrilamida - corrida

Tris-HCl pH 8,0	375 mM
acrilamida:bisacrilamida (0,8:30)	10 ou 12% (v/v)
TEMED	0,1% (v/v)
Persulfato de amônia	0,6 mg/ml

Dissolveu-se em água milli-Q e aplicou-se no suporte. Aguardou-se a polimerização do gel por no mínimo 30 minutos.

3.4. Protocolos adotados

3.4.1. Construção da biblioteca de cDNA induzida por camptothecin

A linhagem selvagem de *A. nidulans* GR5 foi crescida por 16 horas a 37°C em meio completo acrescido de uridina e uracila. Após esse tempo, o micélio foi filtrado assepticamente e transferido para novos frascos contendo meio de cultura na presença e ausência de 25 µM de CPT. Amostras foram retiradas da indução nos tempos 0, 30 e 60 e 120 minutos, filtradas em papel Whatman 1, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para extração do RNA. A fim de se comprovar se houve indução da expressão de genes envolvidos na resposta celular ao dano ao DNA nesse experimento, uma alíquota do RNA total foi tratada com DNase livre de RNase e submetida a reação de RT PCR em tempo real utilizando-se as sondas fluorescentes para os genes *mreA*^{MRE11} e *UvsC*^{RAD51}. Para a produção da biblioteca de cDNA, o mRNA da linhagem GR5 tratada por 60 minutos com 25 µM de CPT foi extraído a partir de 250 µg de RNA total utilizando-se o kit de extração Oligotex mRNA kit (Quiagen, Alemanha) que está baseado na adsorção do RNA pela sua cauda poli adenilato numa resina recoberta com poli timidilato. A biblioteca foi construída utilizando-se o kit Superscript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning® (Life Technologies, EUA) segundo as recomendações do fabricante. Foram gerados cDNAs contendo adaptadores 5' *Sal*I e 3' *Not*I para clonagem unidirecional em plasmídeo pSPORT1 (amp^r). O cDNA obtido na

transcrição reversa foi fracionado em gel de agarose antes da ligação, de forma a se obter insertos variando em tamanho, ou seja, menores que 250 pb; entre 250 a 500 pb; de 500 a 1000 pb e maiores que 1000 pb. A transformação foi feita por eletroporação em *E. coli* DH10BF' eletrocompetente (F^- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*dlacZ* Δ M15 Δ *lacX74 deoR recA1 araD139 Δ (*ara leu*)7697 *galU galK rpsL endA1 nupG*). O DNA plasmidial das bactérias transformantes foi extraído e seqüenciado com os primers M13R e M13F. Para armazenar as seqüências obtidas, um “pipeline” foi construído para direcionar a análise e reunir as seqüências de ESTs de *A. nidulans*. Os cromatogramas eram submetidos ao banco via Internet e automaticamente analisadas para cada EST usando o programa Phred-Phrap-Consed (EWING et al., 1998; EWING; GREEN, 1998; GORDON et al., 1998) e automaticamente analisadas quanto a presença de seqüências do vetor utilizado na clonagem. Somente ESTs com um tamanho mínimo de 300 pb foram consideradas adequadas. Após a análise Phred-Phrap, as seqüências foram “clusterizadas” usando o programa CAP3 (HUANG; MADAN, 1999). Os clusters foram submetidos a análise de similaridade (BLASTN) com o banco de ORFs do projeto genoma de *A. nidulans* (<<http://www.genome.wi.mit.edu/annotation/fungi/aspergillus/>>) para encontrar o número da ORF correspondente nesse banco. A seguir, para fins de anotação dos genes, as ORFs foram submetidas à análise de similaridade (BLASTX) com o banco não redundante “G proteome” do NCBI.*

3.4.2. Produção das membranas de macroarray

As membranas de macroarray foram obtidas a partir da “spotagem” do DNA plasmidial de um representante de cada cluster, obtido a partir do sequenciamento da biblioteca de ESTs de *A. nidulans* induzida por CPT descrita acima. Os “spots” foram feitos mecanicamente pelo robô Q-bot (Genetix, UK), locado no Centro Brasileiro de Estocagem de Clones (BCC Center, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal - UNESP.). Os clones da biblioteca de cDNA que inicialmente estavam armazenados em placas de 96 poços foram reorganizados em placas de 384 poços, resultando num total de 11 placas (10 placas completas contendo 345 ESTs cada e 179 ESTs na 11ª placa, sendo que os 10 últimos poços foram destinados aos controles). A homogeneidade das mini preps antes as “spotagem” foi verificada visualmente em gel de agarose 1% a para se determinar a

quantidade de DNA plasmidial a ser usada para a produção das membranas. Foram utilizados 20 µl da mini prep em cada poço das placas de 384. Esse volume foi submetido a secagem total e então ressuspendido em 40 µl de DMSO 50% por 24 horas a temperatura ambiente antes da execução dos “spots”. Foram utilizadas membranas de nylon positivamente carregadas com dimensões 222 X 222mm (Genetix, UK). Cada membrana com essas dimensões produziu 6 membranas idênticas que contemplava o total de clones depositado em todas as 11 placas de 384 poços. Para o processo de “spotagem” as membranas foram rapidamente embebidas em solução denaturante (NaCl 1,5 M; NaOH 0,5 M) e cuidadosamente colocadas sobre papel Whatman também embebido na mesma solução depositada sobre um suporte apropriado. A fim de eliminar bolhas de ar decorrentes desse procedimento, uma pipeta estéril foi utilizada para retirá-las por rolagem horizontal sobre as membranas. Os “spots” foram feitos de forma quatro vezes concentrado, ou seja, em cada ponto de aplicação, o mesmo material foi aplicado quatro vezes pela agulha do robô Q bot. A densidade da membrana foi do tipo 5X5, o que possibilitava a obtenção de “spots” para até 12 placas de 384 com duplicata de cada ponto e distância de 900 µm entre cada spot. Como o estoque de clones foi acomodado em 11 placas, foram introduzidos dois “blanks” no programa do robô. Assim, a matriz de cada ponto da membrana ficou arranjada de forma que houvesse duplicata de cada ponto (Figura 57).

Após o término da realização dos “spots”, as membranas foram novamente submetidas à desnaturação sobre papel Whatman previamente umedecido em solução denaturante descrita acima. A seguir, as membranas foram neutralizadas em papel Whatman umedecido em solução neutralizante (NaCl 1,5 M; Tris HCl, pH 7 1M) por 10 minutos, por duas vezes. As membranas foram transferidas para papel Whatman seco e após secagem foram fixadas em UV com o lado dos “spots” para cima por duas vezes em potência de 160.000 µJ/cm².

3.4.3. Mini preparação do DNA plasmidial

O protocolo de extração do DNA plasmidial abaixo descrito foi utilizado para as reações de sequenciamento da biblioteca de ESTs induzida pela droga camptothecin. Para estabelecimento da cultura pura, os clones de interesse foram inoculados em 1,5 ml de meio LB para cada poço da placa de cultura, adicionado do

antibiótico ampicilina (50 µg/ml, concentração final) para a seleção do plasmídeo. A placa era selada com adesivo e cada poço perfurado com uma agulha para promover aeração. As placas eram incubadas em um agitador orbital (300 rpm) a 37°C a por 22 a 24 horas. Depois do crescimento as placas eram centrifugadas a 3220 g por 6 min para precipitar as células. O adesivo era removido e o sobrenadante descartado. As placas eram colocadas viradas para baixo para permitir a secagem por 10 minutos. Ao “pellet” resultante era adicionado 240 µl de tampão GTE em cada poço. As placas foram novamente seladas e agitadas em agitador de placas para a ressuspensão. Esse homogeneizado foi centrifugado por 6 minutos a 3220 g, o sobrenadante desprezado e as placas viradas por mais 5 minutos para secagem. A cada poço foi adicionado 80 µl de tampão GET e 5 µl de RNase A (Quiagen, Alemanha) a partir de um estoque na concentração de 10 mg/ml. A seguir as células foram ressuspensas em agitador de placas, brevemente centrifugadas até a velocidade de 2415 g e imediatamente submetidas ao agitador de placas. Desta suspensão, 60 µl foram transferidos para uma nova placa receptora resistente ao calor. A lise alcalina foi efetuada pela adição de 60 µl da solução de lise fresca em cada poço. A placa era selada, misturada por inversão e a seguir incubada a temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugadas até 2415 g. Para neutralização foram adicionados 60 µl de acetato de potássio 3 M a cada poço da placa receptora homogeneizando-se novamente por inversão, seguindo-se incubação a temperatura ambiente por 10 minutos. Depois de breve centrifugação, o adesivo era retirado e a placa incubada a 90°C por 30 minutos. Após esse tempo, as placas eram resfriadas em banho de gelo por 10 minutos e submetidas a centrifugação por 5 minutos a 3220 g (20°C). Todo o sobrenadante resultante era transferido para um sistema de filtração que consistia de uma placa filtro de PVDF (0,2 µm, Corning, EUA) colocada sobre uma nova placa de 96 poços fixada com fita adesiva. A filtração retirava os debris celulares do lisado. O sistema era centrifugado por 5 minutos a 3220 g (20°C). Ao filtrado em cada poço era adicionado 110 µl de isopropanol absoluto. A placa era novamente selada com um novo adesivo e homogeneizada por inversão. Para precipitação do DNA plasmidial as placas eram centrifugadas por 45-60 minutos a 3220 g (20°C). O sobrenadante era descartado e 200 µl de etanol 70% gelado adicionado a cada poço. As placas eram seladas e centrifugadas por 5 minutos a 3220 g (20°C) e o sobrenadante descartado. Para acelerar a secagem, as placas eram centrifugadas invertidas sob papel absorvente

por 2 minutos a 163 g. A seguir, as placas eram secas à temperatura ambiente por 1 hora. Depois disso, o DNA era eluído adicionando-se 40 µl de água milliQ por poço durante 16 horas. A qualidade do DNA plasmidial foi verificada em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X corado com brometo de etídeo (10 µg/µl) para assegurar a quantidade necessária para as aplicações posteriores.

3.4.4. Maxi preparação do DNA cosmidial

Uma colônia isolada do clone contendo o cosmídeo de interesse foi inoculada em 500 ml de meio Terrific Broth contendo antibiótico e incubada a 37°C por 18 horas a 250 rpm. A cultura foi transferida para frascos de 250 ml e centrifugada a 4221 g por 15 minutos a 4°C. Os “pellets” foram combinados em ressuspendidos em 20 ml de solução I (10 mM EDTA, pH 8 estéril). O material foi misturado e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. A seguir, foram adicionados 40 ml de solução II (NaOH 0,2 M; SDS 1%) às células e a solução homogeneizada por inversão (3 a 4 vezes) seguindo-se uma incubação por 5-10 minutos em temperatura ambiente. Após esse tempo, foi adicionado 30 ml de solução III gelada (50 ml de acetato de potássio 7,5 M; 23 ml de ácido acético; 127 ml de água), misturou-se por inversão e incubou-se por 5-10 minutos à temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada a 15081 g por 15 minutos e o sobrenadante removido. Nova centrifugação nas mesmas condições foi efetuada para retirar qualquer traço de precipitado ainda presente na amostra. A seguir foram adicionados 45 ml de isopropanol ao sobrenadante e este centrifugado por 15 minutos (10808 g). O sobrenadante foi descartado e ao “pellet” adicionou-se 9 ml de TE (Tris 10 mM pH 8; 50 mM EDTA) para dissolver o precipitado. A seguir, foram adicionados 4,5 ml de acetato de potássio (7,5 M) e o material foi transferido para tubos cônicos de 50 ml. Os tubos foram congelados a -70°C por 1 hora. O material foi descongelado e centrifugado por 10 minutos a 3000 g. Ao sobrenadante foi adicionado 27 ml de etanol 100%. O material foi centrifugado a 3000 g por 10 minutos e o precipitado ressuspendido em 700 µl de Tris HCl (Tris 50 mM; EDTA 50 mM). A amostra foi tratada com 10 µl de RNase A (10 mg/ml, Quiagen) por 60 minutos a 37°C. Para cada tubo de microcentrífuga foram adicionados 700 µl de fenol, misturados gentilmente e centrifugados por 5 minutos (1700 g) para remover a fase aquosa. A seguir foram adicionados 700 µl de fenol clorofórmio (1:1) à fase aquosa,

centrifugou-se por 5 minutos (1700 g) e novamente removeu-se a fase aquosa. Foram adicionados 700 µl de clorofórmio para nova centrifugação por 5 minutos (1700 g). A fase aquosa foi novamente recuperada e misturada com 700 µl de isopropanol. Centrifugou-se o material por 5 minutos (1700 g) e o 'pellet' obtido foi lavado com etanol 70 % e seco. O material foi ressuspensionado em 100 µl de TE para ser utilizado.

3.4.5. Reação de sequenciamento do DNA

O sequenciamento das amostras foi feito pelo método automático através do "Kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction" (Applied Biosystems, EUA). A reação foi executada em volume final de 10 µl com uma mistura de reação contendo: 2 µl de uma mistura do "Kit Big Dye" contendo os quatro nucleotídeos terminadores com diferentes fluoróforos; 1 ou 2 µl de mini prep (ou cerca de 500 ng do DNA dupla fita no caso de sequenciamento direto de produto de PCR); 2 µl do oligonucleotídeo adequado (estoque 5 pmol/µl); 2 µl de tampão "Big Dye" (Abi Prism) e 3 µl água milliQ. A reação foi amplificada em termociclador nas seguintes condições: pré PCR por 2 minutos a 96°C, seguidos de 36 ciclos de 96°C por 45 segundos; 50°C por 30 segundos; 60°C por 4 minutos. Para a precipitação do material, foram adicionados 80 µl de isopropanol 75% em cada poço e selou-se a placa, agitando-se levemente em agitador de tubos. As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos. O material foi centrifugado a 3220 g por 45 minutos (20°C). O sobrenadante descartado e a placa centrifugada sob papel absorvente por 1 minuto a 163 g. Foram adicionados em cada poço 200 µl de etanol (Merck, Alemanha) 70% e selou-se a placa para centrifugação (2415 g por 10 minutos a 20°C). Esse ciclo de lavagem com etanol 70% e centrifugação foi repetido e as placas deixadas secar a temperatura ambiente por 1 hora. A placa foi protegida da luz. O sedimento foi ressuspensionado em 4 µl de tampão de ressuspensão (5:1 de formamida, 25 mM de EDTA e 50 mg/ml de Dextran blue). A amostra foi desnaturada por 3 minutos a 94°C, centrifugada brevemente e estocada no gelo. Aplicou-se 1 µl de cada amostra no gel de sequenciamento do aparelho ABI Prism 377-36 Sequencer. As seqüências geradas foram enviadas ao computador PowerMac (Macintosh) conectado ao aparelho seqüenciador. Estes cromatogramas foram interpretados pelo software Sequencing Analysis 3.3 e convertidos em

seqüências de DNA. Após o sequenciamento, cada amostra foi analisada e as seqüências foram então submetidas, pela Internet para o “pipeline” de análise e armazenamento destas <<http://143.107.203.68>>. Quando necessário, seqüências gênicas contínuas foram obtidas através do alinhamento de fragmentos adjacentes utilizando-se o software Sequencher 3.1. para Macintosh.

3.4.6. Extração de DNA genômico

Para a produção de biomassa de micélio, esporos de linhagens de *A. nidulans* foram inoculados em meio de cultura completo e incubados por aproximadamente 16 horas a 37°C e 250 rpm. Os micélios foram coletados por filtração a vácuo e congelados imediatamente em nitrogênio líquido para serem triturados com pistilo e cadinho. Para cada cerca de 40 mg de micélio foram acrescentados 500 µl de Tampão de Extração de DNA. Foi adicionado em cada amostra, um volume igual de fenol:clorofórmio (1:1) e agitado mecanicamente em agitador de tubos por 10 minutos. Para sedimentar as proteínas precipitadas e debris celulares, as amostras foram centrifugadas a 20800 g por 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga onde foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio para a retirada de resíduos de fenol ou clorofórmio. As amostras foram centrifugadas a 20800 g por 5 minutos e a fase aquosa superior foi novamente transferida para outro tubo de microcentrífuga onde foi adicionado 540 µl de isopropanol para precipitar o DNA. A amostra foi centrifugada a 20800 g por 1 minuto, o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi lavado com etanol 70% e centrifugado novamente a 20800 g por 1 minuto. O sobrenadante foi novamente descartado e o resíduo de etanol evaporado a temperatura ambiente por 30 minutos. O sedimento foi ressuspendido em água milliQ estéril e estocado a 4°C e quantificado por espectrofotometria quando necessário (260/280 nm).

3.4.7. Extração e manipulação de RNA

Conídios das linhagens que teriam RNA extraído foram crescidos por tempos adequados conforme descrito em cada experimento e tratados com droga quando era necessário. O micélio era filtrado a vácuo e imediatamente congelado em nitrogênio líquido para se evitar a degradação do RNA. Com a finalidade de

romper a parede celular do fungo, os micélios congelados foram triturados em nitrogênio líquido com auxílio de cadinho e pistilo esterilizados. O RNA foi extraído utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen, EUA), segundo as recomendações do fabricante. A integridade do RNA total foi verificada em gel de agarose 1,2% sob condições desnaturantes corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz UV de acordo com Sambrook e Russel (2001), tendo como critério a presença das bandas intactas correspondentes ao RNA ribossomal 28S e 18S, sendo a intensidade da primeira banda cerca de duas vezes maior que a da segunda. Os RNAs que seriam utilizados nas reações de RT-PCR em tempo real foram tratados com DNase livre de RNase. O tratamento foi realizado num volume final de 50 µl, contendo: 1X Buffer DNase (40 mM Tris-HCl pH 7,5 e 6 mM MgCl₂); 2,5 µl de ditioneitol (100 mM, Invitrogen, EUA); 1 µl of RNase Out (40 U/µl, Invitrogen, EUA), 10 µl de DNase (1 U/µl, Promega, Madison, EUA), e 20 µg de RNA alvo. A reação foi incubada a 37°C por 60 minutos, seguindo-se a etapa de purificação pelo método de fenol clorofórmio (1:1) e precipitação do RNA com acetato de sódio 0,3 M por 16 horas a -80°C para aumentar o rendimento. A ausência de DNA após tratamento foi verificada por reação de RT-PCR na qual era utilizada sonda fluorescente do gene constitutivo tubC de *A. nidulans*. Amostras com detecção de sinal negativo foram utilizadas para a síntese do cDNA.

Para a produção do cDNA usados nas reações de RT-PCR em tempo real, foram utilizados 20 µg de RNA total livre de DNA contido num volume de 6 µl e 1,5 µl de Oligo dTV (100 µM estoque). A mistura foi aquecida a 75°C por 10 minutos, rapidamente centrifugada e acondicionada em gelo. A seguir foram adicionados 5 µl de First Strand Buffer (5X, Invitrogen); 2,5 µl de DTT (100 mM, Invitrogen); 2 µl de RNase Out (40 U/µl, Invitrogen); 2,5 µl de dNTP (10 mM cada). O tubo foi aquecido a 42°C por 5 minutos para termostatizar a reação e a seguir 1 µl da enzima transcriptase reversa (Superscript II, Invitrogen EUA; 200U/µl) foi adicionado. A reação foi incubada a 42°C por uma hora e trinta minutos para síntese.

3.4.8. Extração de proteínas

Os micélios utilizados para a extração de proteína foram crescidos inicialmente por um período de 16 horas e tratados conforme as necessidades de cada experimento. Em seguida foram filtrados a vácuo e imediatamente congelados

em nitrogênio líquido para evitar a degradação das proteínas. Com a finalidade de romper a parede celular do fungo, os micélios congelados foram triturados em nitrogênio líquido com auxílio de cadinho e pistilo. O extrato protéico total foi extraído com tampão de extração de proteína, adicionado de inibidores de protease e agitando-se por 10 vezes de 30 segundos com intervalos de 30 segundos em gelo para minimizar a degradação. As amostras foram centrifugadas a 20000 g por 10 minutos a 4°C para a retirada do material precipitado. O sobrenadante de cada amostra foi congelado em nitrogênio líquido e estocado a -80°C. A integridade da proteína foi verificada através de eletroforese em gel SDS-PAGE 10% e quantificada pelo método colorimétrico de Bradford Modificado com reagente comercial (Bio Rad).

3.4.9. Ensaio de fosforilação *in vitro* da proteína ScaA

Para fins desse experimento, as linhagens selvagem e $\Delta atmA$ foram crescidas por 16 horas e o extrato protéico total foi extraído das amostras tratadas e não tratadas com 25 μ M de CPT por 5, 10, 15, 30, 60 e 120 minutos. Foram incubados 25 μ g da proteína ScaA^{NBS1::His6X} purificada de acordo com Fagundes et al. (2005) com 25 μ g de extrato protéico bruto provenientes das linhagens selvagem e $\Delta atmA$ por 5 minutos a 30°C para termostatizar a reação. A seguir, foi adicionado à mistura protéica o tampão para a reação de fosforilação para o volume final de 100 μ l. O tampão de reação continha 0,2 mM dATP; 2,5 mM MgCl₂; 2,5 mM MnCl₂ e 0,5 μ l [γ -³²P]-dATP (250 μ Ci). A reação foi incubada por 1 hora a 30°C. A resina Ni-NTA Super Flow (Qiagen, Alemanha), a qual possui moléculas de níquel na região aniônica da agarose, foi preparada lavando-se esta uma vez em PBS. A resina foi posteriormente equilibrada em tampão de ligação (fosfato de sódio 20 mM pH 7.6; NaCl 500 mM, imidazol 20 mM; PMSF 1 mM e benzamidina 1 mM) e incubada a 30°C por 1 hora. Foram misturados 90 μ l desta resina com os 100 μ l da reação de fosforilação (ScaA^{NBS1::His6x} + extrato bruto protéico) os quais foram centrifugados por 1 minuto a 2415 g e lavados três vezes com tampão de ligação e finalmente centrifugados a 2415 g por 1 minuto. As amostras foram então preparadas para corrida eletroforética em SDS-PAGE 10%. Para tanto, adicionou-se 1X tampão de amostra de proteínas e ferveram-se as amostras por 3 minutos a 100°C. Os géis de poliacrilamida radioativos foram corados com Azul de Comassie e secos para exposição em filmes fotográficos (Kodak, MXG/Plus 35 x 43 cm). A análise

densitométrica da razão da intensidade do sinal (sinal radioativo/ScaA) foi realizada utilizando-se o programa de análise de imagem Image J (disponível em <<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>>).

3.4.10. Marcação de sonda radioativa

As sondas de DNA que seriam utilizadas nos experimentos de Southern blotting e hibridização de colônia foram marcadas pelo método de “random primer extension” utilizando-se o kit comercial Random Primer DNA Labeling System (Invitrogen, EUA) com [α - 32 P]dCTP seguindo-se o protocolo do fabricante. Os nucleotídeos não incorporados na reação da Klenow foram retirados pela passagem da mistura de reação em coluna de Sephadex G50 previamente hidratada em TE. Antes de serem adicionadas à solução de hibridização, as sondas foram desnaturadas por fervura (100°C) por 5 minutos e resfriadas em banho de gelo para evitar renaturação.

3.4.11. Hibridização de ácidos nucléicos

3.4.11.1. Hibridização das membranas de Southern blot e hibridização de colônia

As membranas de nylon utilizadas (Hybond N⁺, GE Heath Care) foram pré-hibridizadas por 3 horas a 65°C em solução de hibridização adicionada de 5 mg de DNA de esperma de salmão fragmentado e desnaturado. A sonda foi marcada radioativamente sendo acrescentada diretamente à solução de hibridização após sua desnaturação. As membranas foram incubadas com a sonda a 65°C por aproximadamente 16 horas, sendo então lavadas com SSC 2X 0,1% SDS a 65°C por 15 minutos, SSC 1X 0,1% SDS a 65°C por 15 minutos e, em seguida, com SSC 0,2X 0,1% SDS. As membranas foram finalmente expostas a filmes autoradiográficos (XAR-5 X-Ray, Kodak) em intensificadores e mantidas a -80°C até a obtenção do sinal. O filme de raios-X contém cristais de haletos de prata, os quais são excitados pelas partículas β -radioativas e passam a emitir elétrons. Íons Ag⁺ se ligam aos elétrons emitidos, gerando precipitados de átomos de prata, permitindo a visualização do sinal.

3.4.11.2. Hibridização das membranas de macroarray com sonda “overgo”

As membranas de macroarray que seriam submetidas a hibridização pela primeira vez, passaram por um tratamento com uma solução fervente de SDS 0,1% para redução do “background” de hibridização. Esta solução foi colocada no recipiente onde estavam as membranas, porém não diretamente sobre elas. O recipiente tapado foi deixado resfriar até a temperatura ambiente. Após isso, as membranas foram utilizadas nas hibridizações pertinentes.

A fim de verificar a homogeneidade e a reprodutibilidade do processo de “spotagem” pelo robô Q-bot entre as membranas-réplica, bem como a homogeneidade entre as duplicatas dentro de cada ponto (vide matriz das membranas Figura 57), as membranas foram hibridizadas inicialmente com a sonda “overgo”. A sonda “overgo” foi produzida a partir de dois oligonucleotídeos com homologia parcial de bases cujo alvo é o gene de resistência a ampicilina, no caso direcionado ao vetor pSPORT 1, (Gibco, EUA) com o qual fora construída a biblioteca de cDNA induzida por CPT. A sequência dos oligonucleotídeos é: OSG208: 5'-GTGGTCCTGCAACTTTATCCGC-3' e OGA243: 5'-TAGACTGGATGGAGGCGGATAA-3'. A marcação da sonda “overgo” foi feita em um volume de 10 µl. Um mix de oligonucleotídeos OGA243 e OSG208 (10 pmol cada) foi aquecido a 80°C por 5 minutos e resfriado a 37°C por 10 minutos para anelamento das seqüências e mantido no gelo após esse tempo. A mistura de reação consistiu de 0,5 µl de BSA (estoque 2 mg/ml); 2 µl de solução OLB; 5 µl de água milliQ; 1 µl de enzima Klenow (3U/µl) (Invitrogen) e 0,5 µl de [α -³³P]dCTP, de acordo com o protocolo descrito por J. D. McPherson (<<http://www.tree.caltech.edu/protocols/overgo.html>>). A reação foi incubada a temperatura ambiente por 1 hora e as sondas purificadas em colunas de Sephadex G50. A pré-hibridização foi feita em 50 ml de solução contendo 1% BSA; 1mM EDTA; 0,5 M fosfato de sódio e 7% de SDS. As membranas foram pré hibridizadas por 4 horas. A sonda “overgo” obtida foi desnaturada por 5 minutos a 94°C seguido de incubação no gelo por 2 minutos antes da sua adição na solução de pré-hibridização e hibridizada por 18 horas a 58°C.

3.4.11.3. Hibridização das membranas de macroarray com sonda de cDNA

Inicialmente, as amostras de cDNA de cada uma das linhagens que seriam hibridizadas com as membranas de macroarray (linhagem selvagem e $\Delta uvsB$) tiveram a expressão do gene $uvsC^{RAD51}$ em cada ponto quantificada por

reação de RT-PCR em tempo real para garantir a indução de genes relacionados ao reparo ao dano ao DNA. Uma vez que a indução de *uvrC*^{RAD51} foi verificada, as sondas de cDNA utilizadas na hibridização do macroarray foram produzidas a partir do protocolo de Schummer et al. (1999) modificado utilizando o radioisótopo [α -³³P]dCTP. A emissão radioativa das mesmas foi quantificada em cintilador para a equalização das sondas provenientes das duas linhagens tratadas e não tratadas com 25 μ M de CPT. Variações de até 20% dos valores brutos de emissão radioativa das sondas (cpm) tratadas versus não tratadas foram considerados aceitáveis e utilizadas nas hibridizações. Inicialmente as membranas foram pré-hibridizadas por 4 horas a 42°C, em solução de pré-hibridização contendo: 5X SSC, 10X solução de Denhardt, 20 mM de Tris-HCl pH 7,5, 1% de SDS, 50% de formamida e 100 μ g/ml de DNA de esperma de salmão desnaturado e fragmentado. Após esse tempo, a solução de pré-hibridização foi descartada e adicionou-se a solução de hibridização contendo a sonda desnaturada sobre as membranas. A solução de hibridização foi composta de 5X SSC, 2X solução de Denhardt, 20 mM de Tris-HCl pH 7,5, 1% de SDS, 50% de formamida, dextran sulfato 5% (Calbiochem, EUA) e 100 μ g/ml de DNA de esperma de salmão desnaturado e fragmentado. Foram hibridizadas duas membranas réplicas conjuntamente para cada sonda de cDNA (duplicata experimental), em volume de 20 ml de solução de hibridização. Após 24 horas de hibridização, as membranas foram lavadas em 150 ml de cada uma das soluções pré-aquecidas da seguinte forma: 2 X SSC, 0,1% SDS 15 minutos a 65°C; 2 X SSC, 0,1% SDS 15 minutos a 65°C; 1 X SSC, 0,1% SDS 15 minutos a 65°C; 0,1 X SSC, 0,1% SDS 15 minutos a 65°C; 0,1 X SSC, 0,1% SDS 15 minutos a 65°C.

As membranas foram seladas e expostas por 96 horas em “imaging plates” (Fuji Film, Japão) e reveladas em aparelho de phosphorimager FLA3000 (Fuji Film, Japão).

3.4.11.4. Retirada das sondas das membranas de macroarray (“probe stripping”)

A retirada das sondas “overgo” das membranas foi realizada através de 2 lavagens sucessivas com SDS 0,1% fervente por 5 minutos cada, a temperatura ambiente. Para a retirada das sondas de cDNA, as membranas foram lavadas 2 vezes em solução NaOH 0,4 M; SDS 0,1% a 65°C seguido de mais 2 ciclos de lavagem de 15 minutos cada com solução Tris HCl, 2 M pH 8; 0,1% SDS em

temperatura ambiente. O sucesso da retirada das sondas foi verificado pela exposição das membranas por 48 horas em “imaging plates”. Caso nenhum sinal fosse detectado, as membranas eram armazenadas a -20°C para posterior utilização, ou submetidas a novo ciclo de hibridização. Em caso de obtenção de sinal remanescente, as lavagens eram repetidas e novamente expostas em “image plates”. Não mais que dois ciclos de lavagem foram necessários para remover completamente o sinal radioativo.

3.4.11.5. Captura e análise estatística das imagens de macroarray

As membranas hibridizadas com sondas de cDNA e sonda “overgo” por 96 horas foram expostas em “image plates” (Fuji Film, Japão). Nesse procedimento, o sinal radioativo é detectado quando a emulsão do “image plate” é excitada pela energia liberada do radioisótopo utilizado para marcação. As imagens foram captadas no aparelho FLA3000 (FujiFilm, Tóquio, Japão) utilizando-se resolução de 16 bits, sensibilidade 50 e latitude 5. Um laser em um comprimento de onda apropriado incide sobre a placa dessa forma liberando a energia dos elétrons excitados. Essa energia liberada é captada pelo phosphorimager gerando uma imagem digital equivalente a posição espacial e intensidade do sinal detectado.

A quantificação das imagens digitais obtidas foi realizada utilizando-se o programa Array Vision (Imaging Research, St. Catherina, ON, Canadá) que quantifica os pixels dentro de cada “spot”. O programa Array Vision é bastante apropriado para análises de imagens derivadas de filtros de macroarray, uma vez que permite o trabalho em um único canal, já que nas hibridizações com radioisótopos não existe marcação diferencial para as sondas empregadas nas hibridizações. Para cada imagem obtida, foi estabelecida manualmente uma grade para otimizar o reconhecimento dos pontos da membrana pelo programa Array vision e cada spot foi quantificado isoladamente. O “background” local foi automaticamente subtraído do valor da quantificação usando como referencia para esse procedimento a área circundante de cada spot. A subtração automática local em filtros de nylon de média e alta densidade é um recurso melhor empregado uma vez que as variações dos níveis de background ao longo de toda a membrana inviabilizam a subtração efetuada pela inserção de “spots” contendo plasmídeos sem insertos de DNA (FELIX et al., 2002). Para a análise dos dados, foi utilizado o

“pipeline” desenvolvido pela equipe de bioinformática do laboratório do Professor Marcelo Menossi (Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética - CEBMEG, UNICAMP) denominado PmmA (“pipeline for macro and microarray analysis”) disponível em <<http://ipe.cebmeg.unicamp.br/bioinfo>> (para detalhes, ver documentação disponível na mesma URL e NOGUEIRA et al., 2002; MARQUES et al., 2004). Para análise das membranas hibridizadas com a sonda “overgo”, o valor da mediana para a intensidade de todos os pontos de cada membrana foi determinado. O coeficiente de variação (CV) destes valores foi calculado e serviu como referência para identificar variações na quantidade de DNA entre cada “spot” réplica nas membranas. Apenas “spots” com coeficiente de variação menor ou igual a 10% dentro de uma membrana foram considerados válidos. Além deste critério para o controle de qualidade dos filtros, membrana réplicas que foram hibridizadas com a mesma sonda de cDNA tiveram o coeficiente de correlação de Pearson calculado para verificar a reprodutibilidade dos experimentos réplicas.

Para a análise dos dados gerados nas hibridizações com sonda de cDNA, foram considerados os valores relativos à emissão de fundo de cada spot (“background”), a emissão bruta de cada ponto (valor denominado Vol) e a diferença entre eles, ou seja, o valor corrigido denominado sVol. Esses valores foram exportados do Array Vision em formato texto (.txt) para utilização nas etapas seguintes do “pipeline” de análise. Genes com perfil de expressão próximo ao do ruído de fundo foram descartados em cada hibridização. Para cada gene depositado nas membranas foram obtidos quatro valores de intensidade do sinal diferentes (2 “spots” réplicas em dois experimentos independentes) os quais foram utilizados para a obtenção da média dos sinais (sVol) e para obtenção da razão de expressão (log-ratio) entre as amostras tratadas com 25 μ M de CPT e não tratadas (controle). Para evitar tendência na análise causadas por flutuações do método e/ou diferença de atividade específica de uma sonda em relação a outra e supondo que a expressão da maioria dos genes não variou durante o experimento, o sinal de cada spot foi normalizado pela mediana dos sinais. Para tanto, todos os valores de sVol de uma membrana foram divididos pela mediana da mesma membrana de forma que a mediana dos valores normalizados (nVol) fosse sempre igual a 1. Genes diferencialmente expressos nas condições testadas foram identificados pelo Teste t de Student ($p < 0,05$) usando o $\log_2$ dos valores normalizados (nVol) dos dois

experimentos de hibridização (duplicatas experimentais de hibridização) uma vez que a distribuição dos dados é uma distribuição log-normal (Marques et al., 2004). Dessa forma foram submetidos ao Teste t de Student dois tratamentos com duplicata experimental em cada um. A fim de verificar se os dados das duplicatas de hibridização em cada um dos pontos experimentais (30, 60 ou 120 minutos) eram reprodutíveis, o coeficiente de correlação entre elas foi determinado.

Os dados referentes a cada um dos genes modulados identificados pelo Teste t de Student foram exportados para planilhas do MS Excel (Microsoft, EUA) para futuras operações lógicas e matemáticas. Médias (M) dos valores normalizados nVol para os genes que mostraram modulação positiva me pelo menos um dos pontos de indução com CPT foram calculadas. O número de vezes de indução denominado F.I. ("Fold Increase") foi calculado para cada gene, sendo que: $F.I. = M_{\text{tratado com CPT no tempo } x} - M_{\text{não tratado no tempo } x}$, onde x indica 30, 60 ou 120 minutos de indução com CPT. Durante a análise comparativa, cada transcrito foi avaliado e os genes definidos como diferencialmente expressos foram aqueles cujos valores de expressão, ou seja, o número de vezes de indução ou repressão foi igual, maior ou menor que 1,0 (-1,0). Estes genes identificados foram classificados de acordo com sua função biológica e os mais relevantes estão dispostos em Tabelas (ver seção resultados). Os valores de razão das intensidades de cada experimento ($\log_2$) foram então carregados no programa TMEV v3.03 (SAEED et al., 2003) ("Mult Experiment Viewer", disponível em <<http://tigr.org>>). O programa TMEV permite trabalhar simultaneamente com os resultados de várias hibridações, sejam elas réplicas de um mesmo experimento, ou de múltiplos experimentos. Para fins de agrupamentos dos dados obtidos que apresentam perfil de expressão semelhante foi utilizado o algoritmo "k-means" de clusterização, também disponibilizado no programa TMEV utilizando a distância euclidiana como algoritmo aglomerativo.

3.4.11.6. Hibridização das lâminas de microarray de *A. nidulans*.

Para as hibridizações foram utilizados os arrays de oligonucleotídeos (70 mers, 11481 oligonucleotídeos) de *A. nidulans*, versão 1 arranjados em lâminas com cobertura epóxi (para maiores informações sobre o microarray *A. nidulans* versão 1 ver <http://pgfrc.tigr.org/slide_html/microarray_descriptions.shtml>). As lâminas de microarrays foram produzidas e distribuídas para a comunidade pela

TIGR mediante competição internacional. Os RNAs destinados à hibridização de microarrays foram extraídos utilizando-se o método do Trizol (descrito anteriormente) e purificados com o auxílio do Kit RNAeasy (Qiagen), segundo especificações do fabricante. O RNA purificado através desta metodologia possui pureza suficiente para permitir eficiente marcação. A reação de síntese do cDNA modificado foi realizada por marcação direta de Cy3-dUTP ou Cy5-dUTP (Ge Health Care) partindo-se de 30 µg de RNA total purificado, 20 µg de Randon Primer Hexamer (Ge Health Care), 100 pmol de oligo dTV e 1 µl (40 U) de RNase Out (Invitrogen), num volume de 13 µl. A mistura foi incubada a 70°C por 5 minutos e por mais 4°C por 5 minutos. A seguir, adicionou-se a reação 5 µl de tampão Superscript (5X), 2 µl de DTT (0,1 M) e 2 µl da mistura de dNTPs (5 mM de dATP, dGTP, dCTP, 2 mM de dTTP) e 2 µl de Superscript II (Invitrogen). Em seguida adicionou-se 1 µl de Cy3-dUTP na reação referência e 1 µl Cy5 na reação teste. O material foi incubado por 5 minutos a 25°C e depois por mais 3 horas a 42°C. Após esse tempo, a reação foi inativada pela adição de 2,5 µl de EDTA 0,5 M pH 8 e 5 µl de NaOH 1 M. A reação foi incubada por adicionais 40 minutos a 37°C. O cDNA marcado produzido foi então purificado em colunas Microcon YM-50[®] (Millipore).

Os cDNAs marcados com Cy3-dUTP e Cy5-dUTP, provenientes das duas condições experimentais testadas foram misturados em quantidades equimolares e submetidos à hibridização com os microarrays em uma estação de hibridização GeneTac (Genomic Solutions, Inc.). A solução de hibridização foi composta de Líquido Bloqueador RPN 3601 Batch 24 (GE Health Care), 5,5 µl de SDS 2% e 19 µl de SSC 20X. O volume total de sonda foi ajustado para 110 µl para preencher o compartimento da estação de hibridização. A sonda foi desnaturada por 3 minutos a 95°C antes da colocação desta sobre as lâminas. A hibridização se processou por 20 horas a 42°C. Após esse tempo, as lâminas foram lavadas com 2 X SSC + 0,5% SDS, 0,5 X SSC e 0,05 X SSC. Todas as incubações na estação de hibridização foram realizadas com 1 minuto de fluxo a cada 5 minutos de incubação. Após a hibridização as lâminas foram centrifugadas a 163 g por 10 minutos para a secagem.

3.4.11.7. Captura e análise estatística das imagens de microarray

Imagens das hibridizações foram geradas para cada fluoróforo (Cy3 e Cy5) independentemente utilizando-se o detector GMS 418 Array Scanner

(Affymetrix Inc., Santa Clara, CA). Para cada leitura, a potência do laser e o ganho do fotomultiplicador foram ajustados para minimizar o “background” e evitar saturação de sinal em diferentes spots do microarray. A quantificação dos valores de intensidade de cada spot foi feita através de um processo de segmentação “Otsu thresholding” implementado no programa TIGR Spotfinder v 3.1.0. (disponível publicamente em <<http://www.tigr.org/software/tm4>>, SAEED et al., 2003) a partir das imagens .TIFF geradas para cada lâmina. Para cada imagem, um “grid” de identificação foi definido de acordo com as dimensões do microarray utilizado, delimitando cada spot e extraíndo dados relativos à intensidade de sinal, assim como os valores de background local e de controle de qualidade. Os spots que não possuíam intensidade mediana equivalente ao “background” local mais dois desvios-padrão.

Dados relativos a cada experimento foram salvos em uma planilha gerada especificamente pelo TIGR Spotfinder (denominada arquivo .mev). Nesta planilha, estão compiladas todas as informações sobre as intensidades das leituras e “background” local para cada spot, assim como dados acerca da qualidade de cada um destes elementos. Os arquivos .mev foram submetidos a diversos tipos de transformações matemáticas e normalização dos sinais com o auxílio do programa TIGR MIDAS v2.19 (Multi-Experiment Viewer, disponível em <<http://www.tigr.org/software/tm4>>, SAEED et al., 2003). Primeiramente, os dados brutos contidos nos arquivos .mev oriundos da quantificação das imagens foram submetidos a um segundo filtro de intensidade, que descartou todos os spots cujo valor mediano de sinal fosse inferior a 10.000 unidades análogo-digitais (a/d) para os valores gerados a partir dos sinais obtidos de ambos fluoróforos Cy3 e Cy5. A seguir, as intensidades totais dos dois canais (Cy3 e Cy5) foram normalizadas utilizando o método de LOWESS (LOcally WEighted Scatter plot Smoothing). Após isso, um novo filtro proporcionou que os valores da razão Cy5/Cy3 dos dados fossem equalizados em todos os setores da lâmina, de maneira a apresentar um mesmo desvio-padrão. Finalmente, os dados de cada experimento foram submetidos a uma análise de consistência contra seu par invertido (“dye swap”). Em suma, para cada condição experimental estudada, foram obtidos 4 sinais independentes para cada spot presente nas lâminas de microarray (duas hibridizações independentes sendo uma delas “dye swap”). Cada par de hibridizações foi realizado com amostras do mesmo material biológico. Após as etapas de

normalização dos dados, os genes regulados positivamente ou negativamente durante as condições estudadas foram identificados com nível de confiança de 95% através de critérios estatísticos não paramétricos, utilizando limites de corte dependentes da razão da intensidade de fluorescência das hibridizações (“intensity dependent z-scores”) ($z=1,96$) usando parâmetros estridentes para a função “Slice Analysis” implementado no programa TIGR MIDAS, como descrito anteriormente (CHEADLE et al., 2003; FERREIRA et al., 2006b). Os valores de razão das intensidades de cada experimento foram então carregados no programa TIGR MEV v3.03 (disponível em <<http://www.tigr.org/software/tm4>>, SAEED et al., 2003). O programa TIGR MEV permite trabalhar simultaneamente com os resultados de várias hibridizações, sejam elas réplicas de um mesmo experimento, ou de múltiplos experimentos diferentes. Análises posteriores da variação de expressão gênica foram feitas com o auxílio de algoritmos de clusterização hierárquica ou de “K-means clustering”, também implementados no programa TIGR MEV utilizando a distância euclidiana como algoritmo aglomerativo (para uma revisão sobre estes métodos, veja EISEN et al., 1998).

3.4.12. Identificação da mutação na linhagem 1444D e inativação do gene *sldl*^{RAD50}

Para esta construção foi inicialmente utilizado o vetor pEYFP (*amp*^R), gentilmente cedido pelo Dr. A. F. Ram). O gene *sldl*^{RAD50} foi amplificado por PCR com a enzima Taq Platinun High Fidelity[®] (Invitrogen, EUA) com os seguintes primers que possuem na porção 5' e 3', sítios de reconhecimento para *Bam*HI (regiões sublinhadas): RAD50 ST BHI: 5'- CGGGATCCATGCACAGTATTGTTGCC-3' e RAD50 BHI 3': 5'- CGGGATCCCATAACCTAGATTAGGTAGTG-3'. O produto da PCR que correspondia a sequência genômica completa de *sldl*^{RAD50} contendo 4.454 pb foi submetido a restrição enzimática com *Bam*HI e em seguida ligado ao vetor linearizado com *Bam*HI e defosforilado com fosfatase alcalina de intestino de bezerro (CIP, Roche, EUA). O material ligado foi eletrotransformado em *E. coli* (DH10BF') e inoculado em meio de cultura LB contendo 50 µg/ml de ampicilina. As colônias que cresceram foram repicadas ordenadamente em meio de cultura LB líquido acrescido de 50 µg/ml de ampicilina e testadas por hibridização de colônia utilizando-se como sonda o gene *sldl*^{RAD50} marcado com [α -³²P]dCTP. O vetor obtido foi chamado

pEYFP-rad50. Este foi digerido com a enzima *Bgl*II e defosforilado com CIP. Nessa digestão um fragmento de 927 pb da região 3' do gene foi liberado deixando extremidades coesivas *Bgl*II. A fim de introduzir um marcador auxotrófico para a posterior identificação da linhagem deletada, o gene *zeo-pyrG* de *Aspergillus fumigatus* que confere resistência ao antibiótico zeocina e auxotrofia para uridina e uracila foi amplificado a partir do vetor pCDA21 (CHAVEROUCHE et al, 2000). Este fragmento *zeo-pyrG* amplificado, além do gene *pyrG* (aproximadamente 1,9 kb) apresenta também o gene de resistência a zeocina (*zeo*) o que gera um fragmento de 2417 pb, por isso chamado de *zeo-pyrG*. O fragmento correspondente de 2417 pb foi amplificado por PCR utilizando a enzima Taq Platinun High Fidelity® (Invitrogen, EUA) utilizando-se os primers: ZEO *Bgl* II F: 5'-GAAGATCTTCAGTCCTGCTCCTCGG-3' e PYR *Bgl* II R: 5'-GAAGATCTGCCTCAAACAATGCTCTTC-3' (sítios de *Bgl*II regiões sublinhadas). O produto da PCR foi digerido com *Bgl*II e ligado no vetor pEYFP-rad50. O material ligado foi eletrotransformado em *E.coli* (DH10BF') e inoculado em meio de cultura LB acrescido de 50 µg/ml de ampicilina. As colônias que cresceram foram repicadas ordenadamente em meio de cultura LB líquido contendo 50 µg/ml de ampicilina. O DNA plasmidial de algumas colônias transformantes foi isolado e a presença do gene *zeo-pyrG* na construção foi verificada pela digestão dos plasmídeos recuperados com as endonucleases de restrição *Bgl*II e *Bam*HI, cujos sítios de restrição flanqueiam o gene *zeo-pyrG* e *sld*^{RAD50} respectivamente. O vetor obtido foi chamado pEYFP-rad50-zeo pyrG. Este vetor foi digerido com as enzimas *Sfi*I e *Sph*I para a obtenção do cassete de deleção o qual foi usado para transformar a linhagem *pyrG89* UI224. A deleção do gene foi confirmada através da extração do DNA genômico dos transformantes que cresceram na ausência de uridina e uracila e posterior digestão com *Scal* para a realização de Southern blotting. O gene *sld*^{RAD50} amplificado a partir do DNA genômico da linhagem GR5 foi utilizado como sonda.

Para a identificação da mutação no *sld*^{RAD50} na linhagem 1444D, foi sintetizado um conjunto de primers para o sequenciamento completo desse gene a partir do produto de PCR amplificado das linhagens 1444D e seu parental R153 com enzima Taq Platinun High Fidelity® (Invitrogen, EUA). Foram seqüenciados três produtos de PCR independentes de ambas as linhagens. Os seguintes primers foram utilizados para o sequenciamento: RAD50 ST BHI: 5'-

ATGCACAGTATTGTTGCC-3'; RAD50 BHI 3': 5'-CACTACCTAATCTAGGTTATC-3';
RAD50-1: 5'-CTGCCTCGCGGCAATAA-3'; RAD50-2: 5'-TTATTCGGGCGAGGCAG-
3'; RAD50-3: 5'-GAGCCGATTCAAGGA-3'; RAD50-4: 5'-TCCTTGAATCGGCTC-3';
RAD50-5: 5'-CCTGGTGTATGCTGTC-3'; RAD50-6: 5'-TCGTCTTTGGATTTCA-3';
RAD50-8: 5'-ATTCTAGGGTAAGTGGAC-3'; RAD50-10: 5'-
GATGTAACAGCTGTGTGG-3'; RAD50-12: 5'-GCGAGCCTTCTGTTCTG-3'; RAD50-
14: 5'-GTGCACTGGAAGGTAAAC-3'; RAD50-16: 5'-ATGGCAAGAATACGGAAG-3';
RAD50-18: 5'-AGACCTGGCTCGCTTG-3'; RAD50-20: 5'-
ATCGAAGAGTACATGAGC-3'; RAD50-22: 5'-ATAGTGACATCAAATCGAC-3';
RAD50-24: 5'-ACAGACGTTGACACCATC-3'

3.4.13. Identificação da mutação no gene *bimE*^{APC1} na linhagem A776

Para a identificação da mutação no gene *bimE* na linhagem A776 foi sintetizado um conjunto de primers para o sequenciamento da região compreendida entre os sítios de *Clal* e *BamHI* da ORF. Resultados anteriores (ENGLE et al., 1990) mostraram que a região *Clal-BamHI* de 2537 pb compreendida entre as posições 3571 e 6102 da sequência genômica de *bimE*^{APC1} era capaz de complementar o defeito do mutante na temperatura restritiva. Dessa forma, foram sintetizados dois pares de primers para a amplificação de dois fragmentos independentes cobrindo a região de complementação *Clal/BamHI* sendo eles: BimE-3: 5'-AGGCAACCTCCGATGAACG-3' e BimE-4: 5'-TGGTTACGTGTACGGACAGC-3' (fragmento de 2382 pb); BimE-5: 5'-GACTGACTCAGATCTTCTCG-3' e BimE-6: 5'-CTAAGAGCCTTC AGAACCC-3' (fragmento de 2478 pb). Três PCRs independentes usando Platinum Taq DNA polimerase High Fidelity® (Invitrogen, EUA) foram realizadas para cada fragmento, tanto para a linhagem mutante A776 quanto para a linhagem selvagem A154. Os produtos de PCR foram clonados no vetor pCR2.4 (Invitrogen, EUA) gerando, portanto, três subclones denominados wt-BimE3+BimE4 (1-3) e três subclones denominados wt-BimE5+BimE6 (1-3). Da mesma forma, três subclones denominados A776-BimE3+BimE4 (1-3) e três subclones denominados A776-BimE5+BimE6 (1-3). Os clones foram seqüenciados utilizando os primers: M13r, M13f, BimE-4, BimE-5, BimE-6, BimE-7 (5'-GATCTCTTGCCAAATGGG-3'), BimE-8 (5'-AACGTTGACCTAGCCCAT-3'), BimE-9 (5'-CGTTCGTCATTGCCAAGA-

3'), BimE-10 (5'-GTTCTCAGTCCTGATTAC-3'), BimE-11 (5'-CTGTGGATAGCAAGCTTC-3').

3.4.14. Identificação da mutação no gene *pppA1* na linhagem G840

O gene da transaldolase (AN0240.3) foi identificado neste trabalho como o produto do gene *pppA* (ver seção 4.3.2.1). A fim de identificar a mutação *pppA1* na linhagem G840, a ORF *pppA* (1158 pb) assim como 1000 pb de regiões regulatórias “upstream” e “downstream” ao gene foram amplificadas a partir do DNA genômico da linhagem selvagem A26 e do mutante G840 usando Platinum Taq DNA polimerase High Fidelity® (Invitrogen, EUA) em três PCRs independentes para cada linhagem. Para tanto, foram utilizados os primers Transaldolase F: 5'-CTATCTCTCATGCTCAAAGTCC-3' e Transaldolase R: 5'-GACAATCACAACCTTACCAGCCT-3' gerando um produto de 3087 pb. O produto dessa PCR foi diretamente transformado na linhagem G840 e os transformantes obtidos foram testados quanto a capacidade de crescerem em MM Cove contendo xilose 1% como única fonte de carbono. O gene *pppA* foi seqüenciado na sua totalidade no sentido 5' → 3' utilizando-se os primers: Transaldolase 1F: 5'-CTCCTATTCTTCCTCCATC-3'; Transaldolase 2F: 5'-CTTCTCCTTTGACACAAAG-3'; Transaldolase 3F: 5'-TGCCTCTTTCCGTAATGTC-3' para a identificação da mutação.

3.4.15. Inativação gênica em *A. nidulans* pela técnica “PCR-mediated”

A deleção dos genes utilizando a técnica “PCR-mediated” (KUWAYAMA et al., 2002) dispensa a necessidade da subclonagem do gene de interesse em um plasmídeo adequado, bem como a digestão do gene alvo com enzima de restrição apropriada para se inserir o gene marcador de auxotrofia. Para a obtenção do cassete de deleção, três PCRs independentes são realizadas onde se amplificam respectivamente as regiões flangeadoras 5' e 3' do gene que será inativado e o gene marcador de prototrofia, no caso, o gene *pyrG* de *A. fumigatus*. A partir destes três fragmentos independentes é realizada uma PCR de fusão utilizando os primers mais distais. A técnica de geração de cassetes de deleção mediada por PCR já fora descrita em *S. cerevisiae*, entretanto nesse organismo,

regiões flanqueadoras de apenas 50 pb já fornecem condições para uma alta taxa de integração homóloga na levedura (BAUDIN et al., 1993). Em *A. nidulans*, por outro lado, tem sido verificada a necessidade uma região flanqueadora maior com cerca de 1 a 2 Kb em cada lado do cassete para permitir maior eficiência de transformação (YANG et al., 2004). Os primers utilizados na obtenção dos cassetes de deleção para cada um dos genes inativados nesse trabalho estão mostrados na Tabela 4. Na nomenclatura dos primers, aqueles com números 1 e 2 indicam que foram usados na amplificação da borda 5'; 3 e 4 para a amplificação da borda 3' e ZEO PYR indicam a amplificação do gene *zeo-pyrG* a partir do plasmídeo pCDA21. Vale ressaltar que os primers 2 e 3 são primers quiméricos os quais apresentam homologia parcial com os genes *zeo* e *pyrG*, respectivamente. Da mesma forma, os primers ZEO e PYR também são quiméricos apresentando homologia com as regiões flanqueadoras 5' e 3', respectivamente. As regiões de homologia estão destacadas na Tabela 4.

Todas as amplificações foram realizadas em um volume final de 50 µl de reação. O DNA genômico da linhagem GR5 ou A4 de *A. nidulans* (600 ng), foi usado como molde para amplificar a região 5' e 3' que flanqueiam a região aberta de leitura de cada um dos genes de interesse gerando os produtos de PCR cujos tamanhos estão descritos na Tabela 4. Para a amplificação desses fragmentos foi usada a enzima Platinum *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen, EUA). Para as amplificações do gene *zeo-pyrG* foram utilizados 200 ng do vetor pCDA21 e a enzima Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity. Cada um dos três produtos da PCR, para cada gene a ser deletado, foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1%. As bandas específicas de cada amplificação foram recortadas do gel e purificadas com o kit "PerfectPrep gel cleanup" (Eppendorf) seguindo as instruções do fabricante. O cassete de deleção foi gerado a partir da PCR final de fusão realizada com 50 µl de volume total com quantidades equimolares dos fragmentos independentes purificados e 20 pmol dos primers 1 e 4. Todo o volume da PCR foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% para purificação da banda correspondente ao cassete de deleção.

Tabela 4: Sequência dos primers utilizados para a produção dos cassetes de deleção pela técnica “PCR-mediated”

Gene	Primer	Sequência ^s	Fragmento (pb)
<i>phbA</i>	PROHIB-1	5'-TGCGCGAAACATAGGAGTC-3'	1996
	PROHIB-2B	5'-GGAGCAGGACTGAGAATTCCTGTCCAGATGACAAGGTCG-3'	
	PROHIB 5' ZEO-B	5'-cgacctgtcatctggacaGGAATTCTCAGTCCTGCTCC-3'	2417
	PROHIB1600 3' PYR	5'-cacttgaaagcgcgacaactGAATTCGCCTCAAACAATGCT-3'	
	PROHIB1600-3	5'-AGCATTGTTTGAGGCGAATTCAGTTGTGCGGCTTTCAAGTG-3'	1962
	PROHIB1600-4	5'-CTTCATTTCTGCGACAACGG-3'	
<i>mshA</i>	MUTS-1	5'-CGTTCATGGTTCTCGCTTG-3'	1973
	MUTS-2B	5'-GGAGCAGGACTGAGAATTCCTCGTCAACGATGCACAATATC-3'	
	MUTS 5' ZEO-B	5'-gatattgtcatcgttgacgGGAATTCTCAGTCCTGCTCC-3'	2417
	MUTS 3' PYR-B	5'-catcacacttgagatggccGAATTCGCCTCAAACAATGCT-3'	
	MUTS-3B	5'-AGCATTGTTTGAGGCGAATTCGGCCATCTCCAAGTGTGATG-3'	1383
	MUTS-4A	5'-TTCCGAGACAGACCGAGGT-3'	
<i>csaA</i>	RAD26-1	5'-AGCGAAGGAATTGGCGTTACT-3'	1552
	RAD26-2	5'-GGAGCAGGACTGAGAATTCCTGATCGACGGTCGTATTCATG-3'	
	RAD26 5' ZEO	5'-catgaatacgaccgtgatcaGGAATTCTCAGTCCTGCTCC-3'	2417
	RAD26 3' PYR	5'-tatgcagcgtgatattgcctgGAATTCGCCTCAAACAATGCT-3'	
	RAD26-3	5'-AGCATTGTTTGAGGCGAATTCAGGCAATATCACGCTGCATA-3'	1710
	RAD26-4	5'-TGTCATAACACGGTTCACGCA-3'	
<i>fhadA</i>	SMAD-1	5'-TTGGTTGCCTTCTCGATGTG-3'	1844
	SMAD-2	5'-GGAGCAGGACTGAGAATTCAGTCTCTGCGGCAAAAACA-3'	
	SMAD 5' ZEO	5'-tgtttttgccgcagagactcGGAATTCTCAGTCCTGCTCC-3'	2417
	SMAD 3' PYR	5'-tgtgaccaaccgttgatgaagGAATTCGCCTCAAACAATGCT-3'	
	SMAD-3	5'-AGCATTGTTTGAGGCGAATTCCTTCATCAACGGTTGGTCACA-3'	1785

Gene	Primer	Sequência [§]	Fragmento (pb)
	SMAD-4	5'-TTATATCTCACGCCACGCCA-3'	
<i>tprA</i>	TRP-1	5'-TAATTCGGGCAAACACAGC-3'	1601
	TPR-2	5'- <u>GGAGCAGGACTGAGAATTCC</u> GCATCCGAATGGTAAACTGA-3'	
	TPR 5' ZEO	5'-tcagtttaccattcggatcgGGAATTCTCAGTCCTGCTCC-3'	2417
	TPR 3' PYR	5'-ttggcggatagcttgagatGAATTCGCCTCAAACAATGCT-3'	
	TPR-3	5'- <u>AGCATTGTTTGAGGCGAATTC</u> ATCTCCAAGCTATCCGCCAA-3'	1556
	TPR-4	5'-GATGCGCAGCATTTGTTACTG-3'	
<i>atmA</i>	ATM1	5'-AATCTTAATGACATGATATGC-3'	2000
	ATM2	5'- <u>CTGAGAATTCC</u> GGCTGAGGAAGCTACCG-3'	
	ATM 5' ZEO	5'-ggtagcttcctcagccGGAATTCTCAGTCCTGCT-3'	2417
	ATM 3' PYR	5'-aggcgctgggcttcatGAATTCGCCTCAAACAAT-3'	
	ATM3	5'- <u>IGAGGCGAATTC</u> ATGAAGCCCAGCGCCTG-3'	750
	ATM4	5'-TCATGCATAAGCGGCCCC-3'	

[§] Regiões sublinhadas indicam homologia com o gene *zeo-pyrG* e regiões com letras minúsculas indicam homologia com as regiões flangeadoras 5' e 3', respectivamente, do gene de interesse.

Para a comprovação da integração do cassete de deleção no locus do gene em questão e confirmação da inativação gênica, foi utilizada a técnica de Southern blot. Um fragmento de PCR de cada gene de interesse amplificado a partir do DNA genômico da linhagem GR5 ou A4 foi utilizado como sonda. A fim de verificar se ocorreu apenas um evento de integração do cassete de deleção na linhagem mutante, a sonda foi retirada das membranas e estas foram submetidas a novo ciclo de hibridização com a sonda *pyrG* de *A. fumigatus*. Para a obtenção da sonda *pyrG* o gene *zeo-pyrG* (2417 pb) foi amplificado a partir do plasmídeo pCDA21 utilizando-se os primers ZEO: 5'-GGAATTCTCAGTCCTGCTC-3' e PYR: 5'-GAATTCGCCTCAAACAATGC-3'. A seguir o produto de PCR foi digerido com a enzima *KpnI*. O produto da digestão foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% e a banda de 1524 pb correspondendo somente ao gene *pyrG* foi recortada e purificada do gel para ser usada como sonda.

3.4.15.1. Inativação do gene *atmA*^{ATM}

O gene *atmA*^{ATM} de *A. nidulans* apresenta 8382 pb e foi inativado pela deleção de uma região interna do gene na porção C-terminal onde está localizado o domínio FAT (FRAP/ATM/TRRAP) e o domínio catalítico da enzima (PI3Kc - “PI 3-kinase catalytic domain”) (para detalhes ver Figura 13). Os primers usados para a obtenção do cassete de deleção estão mostrados na Tabela 4. Para a comprovação da deleção pela técnica de Southern blot, um fragmento de 3325 foi amplificado a partir do DNA genômico da linhagem GR5 utilizando-se os primers ATM1 (Tabela 4) e ATM5 (5'-TACGAAGCTGCTCAATCC-3'), este último localizado dentro da região alvo da deleção. O produto dessa PCR foi digerido com *BglII* e o fragmento de 1963 pb resultante foi utilizado como sonda.

3.4.16. Construção de uma linhagem condicional *alcA::gfp::atmA*

Nesta construção, foi utilizado o vetor pMCB17apx que contém o promotor do gene *alcA* (álcool desidrogenase) de *A. nidulans* fusionado com a proteína fluorescente verde (GFP). Esse plasmídeo permite a fusão N-terminal do gene de interesse sob o controle do promotor *alcA*. O vetor contém o gene *pyr4* de *Neurospora crassa* como marcador auxotrófico em *A. nidulans*. Para a construção,

uma sequência de 2000 pb do gene *atmA* da região 5' (a partir do códon de iniciação) foi amplificada com os primers ATM *AscI* 5': 5'-GGCGCGCCAATGAAGGGCGAAATTACCTTAG-3' e ATM2000 *PacI*: CCTTAATTAAAGGCAATGTACCAGTAGACCA-3' (regiões sublinhadas indicam respectivamente os sítios de *AscI* e *PacI*) a partir do DNA genômico da linhagem A4 utilizando Platinun Taq DNA polimerase High Fidelity® (Invitrogen, EUA). O material amplificado foi purificado e digerido com *AscI* e *PacI* para clonagem unidirecional no vetor pMCB17apx previamente digerido com as mesmas enzimas. A reação de ligação se processou em 20 µl utilizando-se 1 U de T4 DNA ligase (Invitrogen, EUA). O material ligado foi eletrotransformado em *E. coli* DH10B e inoculado em LB contendo 50 µg/ml de ampicilina. Clones positivos foram testados por análise de digestão e seqüenciados para comprovar o ajuste da janela de leitura entre a GFP e o gene *atmA*. O clone identificado, chamado pMCB17apx-ATM2000 foi transformado na linhagem selvagem GR5 e selecionado para prototrofia de uridina e uracila em meio YAG. Os transformantes recuperados do meio YAG foram purificados e crescidos em condições de indução e repressão para verificar o fenótipo de crescimento na presença de CPT em comparação à linhagem selvagem e $\Delta atmA$. Os transformantes que apresentaram fenótipo de sensibilidade a CPT (50 µM) em meio completo (glicose 4% para repressão) semelhante ao mutante $\Delta atmA$, e, resistência a CPT (50 µM) em meio de indução (MM glicerol 2%) foram selecionados para análise da integração homóloga da construção no locus *atmA*. Para tanto, o DNA genômico de 10 candidatos que apresentaram o perfil de sensibilidade a CPT acima descrito foi extraído e submetido a PCR com os primers GFP VE FW: 5'-AAGTTTGAGGGAGACACC-3' e ATM2796: 5'-CTACCTGATCAGTTGACG-3'. O primeiro primer encontra homologia no gene da GFP, enquanto o segundo primer situa-se 1000 pb "downstream" aos 2000 pb amplificados para clonagem no vetor. Dessa forma, a amplificação de um fragmento esperado de 3259 pb indica que houve integração homóloga do vetor no locus *atmA* gerando após recombinação, uma porção 5' truncada do gene sob o controle do promotor endógeno e uma cópia íntegra do gene sob o controle do promotor *alcA* em fusão com GFP como descrito anteriormente (KONZACK et al., 2005; VIRAG, HARRIS, 2006a). A linhagem obtida foi denominada IM69-1.

3.4.17. Transformação em *A. nidulans*

A transformação de diferentes linhagens de *A. nidulans* seguiu metodologia descrita por Osmani et al. (1987). Além das linhagens selvagens UI224 e GR5 comumente utilizadas no laboratório, foi também utilizada a linhagem TNO2A3. Esta linhagem foi gentilmente cedida ao laboratório pelo Dr. B. R. Oakley e se trata de um mutante cujo homólogo de *KU70* de *A. nidulans* (*nkuA*) está inativado (NAYAK et al., 2006). Esse mutante se tornou uma ferramenta vantajosa para facilitar a obtenção de linhagens “knock out” em *A. nidulans*. Como se sabe os produtos dos genes *KU70* e *KU80* são essenciais para o processo de “non homologous end joining” (NHEJ) no reparo do material genético. A exemplo do que foi verificado inicialmente em *N. crassa* (NINOMIYA et al., 2004), a inativação do gene *KU70* leva a ruptura do sistema de NHEJ e todo o DNA exógeno introduzido na célula durante o processo de transformação é direcionado para a via de recombinação homóloga, o que aumenta consideravelmente a eficiência da transformação e a inserção do cassete de deleção no locus do gene de interesse (NINOMIYA et al., 2004). Da mesma forma, a taxa de recombinação homóloga é aumentada em *A. nidulans* chegando até 100% na linhagem TNO2A3 (NAYAK et al., 2006). Os mutantes obtidos a partir da transformação na linhagem TNO2A3 (*pyrA4 pyrG89; chaA1; ΔKu70::argB*) foram retrocruzados com a linhagem selvagem UI224 (*pyrG89; yA2; argB*) para o isolamento de segregantes sem o “background” genético da deleção do gene *nkuA*. Esses segregantes foram utilizados as análises e caracterizações fenotípicas dos mutantes inativados por esse sistema.

Um inóculo de aproximadamente 10^7 conídios da linhagem a ser transformada foi incubado a 37°C por 16 horas em 50 ml de meio YG acrescido de suplementos apropriados. Os tubos germinativos foram coletados e, em seguida, ressuspensos na seguinte solução de protoplastização: 20 ml de Solução 1 de Protoplastização, 20 ml de Solução 2 de Protoplastização, 6,5 ml de Sulfato de Magnésio 1 M, 400 mg de soroalbumina bovina (BSA) (Sigma) e 300 mg de Glucanex® (Novo Nordisk Ferment, Dinamarca). A enzima Glucanex apresenta uma mistura de atividades, incluindo glucanase, quitinase e protease, utilizada na digestão da parede celular dos tubos germinativos, na presença do estabilizador osmótico BSA. Os protoplastos foram obtidos após 5 horas de incubação a 30°C sob agitação (80 rpm), sendo então separados dos restos celulares por filtração em lã de

vidro estéril. Os protoplastos foram coletados por centrifugação a 3220 g por 10 minutos e lavados duas vezes com Solução 3 de Protoplastização gelada para se retirar o excesso de enzimas. Para equilibrar osmoticamente os protoplastos, os mesmos foram ressuspensos no volume apropriado de Solução 5 de Protoplastização, e incubados no gelo por 10 minutos. Para a transformação foram adicionados 4-20 µg do DNA a 100 µl de protoplastos, e 50 µl da Solução 4 de Protoplastização contendo PEG para promover a fusão das membranas dos protoplastos. O DNA entra no protoplasto na forma de um precipitado de cálcio, também presente na Solução 4, provavelmente através de transporte vesicular. Após incubação dessa solução em gelo por 20 minutos, adicionou-se 1ml da Solução 4 de Protoplastização com posterior incubação a temperatura ambiente por 20 minutos. A suspensão de protoplastos foi transferida para 30 ml de meio completo top agar acrescido de KCl e semeada em meio de regeneração apropriado também contendo KCl a 37°C, até o aparecimento de colônias transformantes.

3.4.18. Preparo de células eletrocompetentes de *E. coli*

Uma colônia isolada da linhagem de *E. coli* DH10B foi inoculada em 10 mL de meio de cultura LB a 37°C e 200 rpm (Innova 4000 - New Brunswick Scientific) por 16 horas. Este pré-inóculo foi adicionado a 1 L de LB e cultivada a 37°C sob agitação de 250 rpm (Innova 4000 - New Brunswick Scientific), até que a densidade óptica da cultura a 600 nm atingisse 0,4 a 0,5. O frasco da cultura foi resfriado em banho de gelo por 30 minutos e as células foram recuperadas por centrifugação a 4000 g a 4°C por 15 minutos. As células precipitadas foram cuidadosamente ressuspensas em 500 ml de água destilada estéril resfriada a 0°C. As células foram precipitadas por centrifugação e novamente lavadas como descrito anteriormente. Tais lavagens com água promovem a diminuição da força iônica da suspensão de células, facilitando a entrada do DNA a ser transformado na bactéria. Em seguida, as células são equilibradas em 50 mL de solução de glicerol 10% (v/v) resfriada a 0°C e centrifugadas nas mesmas condições descritas anteriormente. O precipitado foi ressuspendido em glicerol 10% (v/v) com volume necessário para atingir uma concentração de 1 a 3×10^{10} células/ml (aproximadamente 40 µl de suspensão de células). A suspensão de células

eletrocompetentes foi aliquotada em microtubos e estocada a -80°C até o momento do uso.

3.4.19. Eletrotransformação de *E. coli*

O DNA plasmidial dialisado por 1 hora em membrana com poros de 45 μm (PVDF, Millipore) foi acrescentado a 1 a 3×10^{10} células eletrocompetentes da linhagem DH10BF', misturando-se gentilmente. A mistura foi transferida para cubetas de eletroporação (Biorad) previamente resfriadas a 0°C e submetida a 25 μF , 200 ω e 2,5 kV no aparelho Gene Pulser (Biorad, EUA). A seguir, 1 ml de meio LB foi adicionado à mistura, e esta transferida para tubos de ensaio estéreis e incubada a 37°C (200 rpm). Após uma hora, a cultura foi semeada em LB sólido acrescido da concentração adequada de antibiótico apropriado e incubada a 37°C por aproximadamente 16 horas. Foram adicionados ao meio LB sólido IPTG (isopropylthio- β -D-galactosídeo) e X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo) para transformação de plasmídeos com a propriedade de alfa complementação do gene da β -galactosidase (*lacZ*). Na ausência de alfa complementação, as colônias recombinantes apresentavam coloração branca. Todos os passos descritos foram feitos de maneira asséptica e em baixa temperatura, o que aumenta a eficiência da eletrotransformação (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

3.4.20. Southern blot alcalino

O gel de agarose que foi submetido a eletroforese para o fracionamento do DNA foi tratado com solução depurinizante por 15 minutos. Após este tratamento, o gel foi colocado sobre papel 3MM previamente embebido em NaOH 0,4 M. Sobre o gel foi colocada a membrana de nylon (Hybond-N⁺, GE Health Care, EUA) e 3 papéis 3MM do tamanho do gel que foram também previamente umedecidos em NaOH 0,4 M. O papel 3MM abaixo do gel estava conectado a um reservatório contendo NaOH 0,4 M. Acima desse bloco foram colocadas várias folhas de papel absorvente e um peso de aproximadamente 0,5Kg (400 cm³/Kg). Um plástico filme foi colocado entre as bordas do gel e do papel 3MM para evitar contato entre o reservatório de NaOH e os papéis absorventes acima do gel. Após aproximadamente 12 horas de transferência, o sistema foi desmontado e o filtro de

nylon lavado em SSC 2X. O DNA foi fixado à membrana utilizando-se a função "autocrosslink" do aparelho Stratalinker (UV Stratalinker 1800 Stratagene, EUA).

3.4.21. Reação de PCR quantitativo em tempo real ("Real time RT- PCR")

O Kit Taq-Man[®] EZ RT-PCR (Applied Biosystems, EUA) foi utilizado nas reações de PCR e RT-PCR em tempo real, segundo as instruções do fabricante. Os primers e sondas fluorescentes usados no trabalho utilizando a tecnologia Taq-Man[®] foram desenhados através do software Primer Express 1.5 (Applied Biosystems, EUA) e estão descritos na Tabela 5. Os fluoróforos usados na construção das sondas fluorescentes também estão indicados na mesma Tabela. Os primers e sondas fluorescentes usados utilizando-se a tecnologia LUX[®] (Invitrogen) foram desenhados seguindo-se as instruções do fabricante através do endereço eletrônico (<<http://orf.invitrogen.com/lux>>). As condições de termociclagem para reações de PCR em tempo real compreendem uma etapa inicial a 50°C por 2', seguido de 10' a 95°C e 40 ciclos de 15" a 95°C e 1' a 60°C. A quantidade inicial do número de cópias dos genes de interesse utilizada na construção das curvas padrões foi determinada através de duas considerações: (i) o *A. nidulans* é um organismo haplóide e, portanto os genes investigados são representados uma única vez em seu genoma e (ii) considerando-se o tamanho do genoma de *A. nidulans* igual a 30 Mb, um genoma corresponde à aproximadamente 30×10^{-15} g. Teoricamente, cada 30 fg de DNA genômico de *A. nidulans* apresenta uma cópia de cada um dos genes desse fungo. Diluições seriadas de 1 a 10^7 cópias do genoma da linhagem selvagem GR5 foram utilizadas para construir as curvas padrões para cada gene investigado. A equação da reta obtida para cada curva padrão, bem como seu respectivo coeficiente de correlação (r^2) foram obtidos em cada experimento. As possíveis variações na concentração inicial de mRNA entre as amostras foram calculadas através da normalização com um gene constitutivamente expresso, neste caso, o gene da tubulina C (AN6838.2) (*tubC*) de acordo com Semighini et al. (2002). O aparelho para detecção imediata da fluorescência utilizado nos experimentos de PCR e RT-PCR em Tempo Real foi o ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

Tabela 5: Descrição dos primers e sondas fluorescentes utilizados nas reações de RT-PCR em Tempo Real

Identificação	Seqüência	Gene
mreA (FW)	5'-GCGGGTGATCTTTTCCATGA-3'	AN0556.3
mreA (REV)	5'-CATTCGGATTGAGCGCATC-3'	
Sonda ^a mreA	5'-[VIC] AGCCTTCCCGGAAATCCATGTACCAAG[TAMRA]-3'	
tubC_525FL ^b	5'-CACTTTATGCCGTCGCCGAAAG[FAM]G-3'	AN6838.3
tubC_525FL_583RU	5'-GCAGAAATGTCTCGTCCGAATG-3'	
AN_Ubiq CT Hydr_356RL ^b	5'-GTACTGGTCCATGTGAATTACCGCCAG[FAM]AC-3'	AN7422.3
AN_Ubiq CT Hydr_356RL_316FUa	5'-TGATTGAGCAGGAGTCCAAGC-3'	
AN_Ubiq Modf._172FL ^b	5'-GAACTGGGAAACAGCCGTCAACAG[FAM]TC-3'	AN1191.3
AN_Ubiq Modf._172FL_211RUa	5'-ATGTCGAGCGTGTCTGGTGT-3'	
AN_Ubiq Ned8_542RL ^b	5'-CACACCTATCCTGCCATGCTATCTGGTG[FAM]G-3'	AN2416.3
AN_Ubiq Ned8_542RL_507FU	5'-CGCTCTGCACTATCGCCACT-3'	
AN_MUTS_866FL ^b	5'- GACCAACATCCCTCCTCTCGCTTGG[FAM]C-3'	AN1708.3
AN_MUTS_866_966RUa	5'- ATGTCCGATAGTGGCGTCATTC-3'	
AN_Helicase_2650RL ^b	5'-GACCGTGCGGAGAATCTTGCGG[FAM]C-3'	AN2285.3
AN_Helicase_2650RL_2584FU	5'-GGCATCCACCTCCACAAC-3'	
AN_Smad_397RL ^b	5'-CACAGATTGCCGCGAGTGTCTG[FAM]G-3'	AN2893.3
AN_Smad_397RL_299FU	5'-GGCGACGGCTACACCATTC-3'	
AN_Hist ACTrasnf_217RL ^b	5'-GACGGGTTTGTGGTCTGCGCCG[FAM]C-3'	AN3071.3
AN_Hist ACTransf_217_RL_190FU	5'-CATTCAAACGCACGCCAGTC-3'	
AN_Histon H2Avar_112FL ^b	5'-GACCGTTGCAGTTCCCATGCGG[FAM]C-3'	AN8039.3
AN_Histon H2Avar_112FL_219RU	5'-CAGCATTTCCGGCAAGTTCC-3'	
AN_Prohibitin_684FL ^b	5'-GACAAGCGGGCAGCCTTCCTTG[FAM]C-3'	AN6073.3
AN_Prohibitin_684FL_757RU	5'-GCTCTTCTTGATGGCGTCTCC-3'	
AN_MYB_524RL ^b	5'-CAACTGGGAGAACGTGGAGGCAG[FAM]TG-3'	AN0279.3
AN_MYB_524_491FU	5'-CCCTATACCTCATGGACCTCTCG-3'	
AN_HPMS2_936FL ^b	5'-CACATTGGGACGACCGGAATG[FAM]G - 3'	AN4365.3
AN_HPMS2_939FL_986RUB	5'- AACATGGGCCATTTGTTACAG - 3'	
AN_RAD2_490FL ^b	5'-CACATTAGGCAGAGGCGCAATG[FAM]G-3'	AN2764.3
AN_RAD2_490FL_545RU	5'-GCGCCTCGAAGCATAACG-3'	
AN_RAD26_1590RL ^b	5'-CACCACGCAAGCCCGAATAAGTGG[FAM]G-3'	AN7103.3
AN_RAD26_1590RL_1500FU	5'-CGCGAGGACGCACTTATGTAT-3'	
AN_RAD52_998RL ^b	5'-GACAATGGGAGCGGAACGGATTG[FAM]C-3'	AN4407.3
AN_RAD52_998RL_937FU	5'-AGCGGGCAGGCAGATTCTCTA-3'	
An_RAD18(uvsH)_393FL ^b	5'-GACAATGAAATAGAGCCGAATGCCATTG[FAM]C-3'	AN7309.3
An_RAD18(uvsH)_393FL_420RU	5'-CTCTGTGATCGGGTGCGAATA-3'	
AN_SconB_388FL ^b	5'-CACCTTACTGGAATCGCTTCCTCAAGG[FAM]G-3'	AN6359.3
AN_SconB_388FL_410RU	5'-GCAGCAGAGAACAAGGACCAGA-3'	
PARP_ANIDULANS_1161RL ^b	5'-CTACTTTCTGTCGGAATTCTGGTAAAG[FAM]AG-3'	AN3129.3
PARP_ANIDULANS_1161RL_1083FU	5'-CGCTCAAGGAAGTGGCAGAG-3'	

Identificação	Seqüência	Gene
npka-3F	5'-GCGCCTGAACCATATTGAAGA-3'	AN6044.3
npka-3R	5'-CGGTTGTGAGCTCCTTTGC-3'	
npka-3M2 ^a	5'-AACCCAGCCGTATGAG[FAM]-3'	
TOP1_1311FL ^b	5'-CACCTCAAGGCCACAAGTGGAAGAGG[FAM]G-3'	AN0253.3
TOP1-1311FL_1384RU	5'-ACGTCGGAATTAGCCGCAAG-3'	
rib_reduct_820RL ^b	5'-CACACCAGGCAGGCAAAGTCGGTG[FAM]G-3'	AN0067.3
rib_reduct_820RL_768FU	5'-GGCTGAAGAAGCGAGGCTTG -3'	
rns_2P_reduct_1560FL ^b	5'-GACACCGCCCGATTGCTCTTGGTG[FAM]C-3'	AN4380.3
rns_2P_reduct_1560 FL_1598RU	5'-GGCTTCAGCCGAATCGAAAG-3'	
uvsC_429FL ^b	5'-GACGGTTGCCATACCCTTGCCG[FAM]C-3'	AN1237.3
uvsC_429FL_450RU	5'-CTTCGCCGCACCCAT-3'	
AN0913.3_791RL ^b	5'-CGGCTAACTGGGAACGAGACTGC[FAM]G-3'	AN0913.3
AN0913.3_791RL/773FU	5'-GGGCCAACAAGATTGACAGCTT-3'	
AN2766.3_1897FL ^b	5'-CGGGTAATCCAGAAGGAGCGTCC[FAM]G-3'	AN2766.3
AN2766.3 1897FL/1919RU	5'-AGGATCTCGTCTGGCATCTTTG-3'	
AN1016.3_737FL ^b	CGGTTGAAGAGGGAAACCAGAAC[FAM]G	AN1016.3
AN1016.3_737FL/769RU	TGAACCATCGAGAGTTGACGAC	
AN5100.3_765FL ^b	CGGAAAACCAGGTGCGGTAGTTC[FAM]G	AN5100.3
AN5100.3_765FL/798RU	CAGATTTGGGATTCCACTGTCTG	
AN4743.3_315FL ^b	CGGGCGTCAAGTCTAAGTGGTTCC[FAM]G	AN4743.3
AN4743.3_315FL/347RU	AGCTTGGTGCCAACTAGGATGA	
AN3434.3_325FL ^b	CGGCGATATGATCGAGATGGAAGC[FAM]G	AN3434.3
AN3434.3_325FL/341RU	TTCTCTCATCAACCGCAAGTTGT	
Phosph_D_3176RL ^b	CGGATAGACCGAGAGCTTCTAAATC[FAM]G	AN10413.3
Phosph_D_3176RL/3155FU	CCCGACGCCTTTCCTACTACC	

^a Sondas Taq Man[®] (Applied Biosystems)

^b Sondas LUX[®] (Invitrogen)

FAM: 6-carboxifluoresceína; TAMRA: 6-carboxi- *N, N, N', N'*-tetrametilrodamina

3.4.22. Ensaio de viabilidade após bloqueio na fase S

As linhagens a serem submetidas ao experimento de viabilidade foram inoculadas em meio completo acrescido dos suplementos apropriados para a obtenção de suspensão de esporos. A suspensão de esporos obtida foi contada apropriadamente em câmara de Neubauer. Um total de 1×10^8 esporos/ml foi incubado em microtubos contendo meio completo contendo 0, 6 e 100 mM de HU. Esses tubos foram incubados em agitador a 37°C ou a 30°C para aquelas linhagens com marcador condicional de temperatura por 6 horas. Após esse tempo as suspensões foram diluídas seriadamente até a obtenção de uma suspensão com 10^3

esporos/ml. Foram tomados 100 µl dessa suspensão diluída que foram inoculados em meio completo sólido e incubados por 48 horas na temperatura adequada. A viabilidade foi determinada como o percentual de colônias obtidas a partir de germinantes tratados com HU em relação às placas controles contendo os germinantes incubados em ausência de HU. Os resultados mostrados indicam a média $\pm$ desvio padrão de pelo menos três repetições independentes realizadas em duplicata cada uma para cada linhagem analisada.

3.4.23. Ensaio de viabilidade após tratamento com peróxido de hidrogênio

A capacidade das linhagens em sobreviver ao estresse oxidativo causado por peróxido de hidrogênio foi verificada nesse experimento (NOVENTA-JORDÃO et al., 1999). Para tanto, 1×10^7 conídios/ml foram incubados em 1 ml de meio de cultura completo líquido na presença e ausência de 50 mM de peróxido de hidrogênio por 20 minutos sob agitação (250 rpm) a 30°C. Após esse tempo as suspensões foram diluídas seriadamente até a obtenção de uma suspensão com 10^3 esporos/ml. Foram tomados 100 µl dessa suspensão diluída que foram inoculados em meio completo sólido e incubados por 48 horas a 37°C. A viabilidade foi determinada como o percentual de colônias obtidas a partir de germinantes tratados com peróxido de hidrogênio em relação às placas controles contendo os germinantes incubados na ausência de peróxido de hidrogênio. Os resultados mostrados tratam-se de média $\pm$ desvio padrão de pelo menos três repetições independentes realizadas em duplicata cada uma para cada linhagem analisada.

3.4.24. Experimentos de microscopia de fluorescência

3.4.24.1. Coloração dos germinantes com as sondas fluorescentes utilizadas (DAPI, calcofluor, filipina, FM4-64 e H₂DCFDA)

Incubou-se cerca de 10^4 conídios sobre lamínulas esterilizadas dispostas no fundo de placas de Petri contendo o meio de cultura líquido e temperatura apropriados para cada experimento. As amostras usadas na determinação da cinética de divisão nuclear foram crescidas por 2, 4, 6 e 8 horas a 37°C.

Após os tempos de incubação necessários, as lamínulas foram retiradas das placas e fixadas por 30 minutos com solução de fixação I. As

lamínulas foram lavadas em tampão PBS 1X e, em seguida, coradas por 5 minutos com 1,2 µg/ml de calcofluor e/ou 0,1 µg/ml de DAPI (Sigma, EUA). O calcofluor (Fluorescent brightener, Sigma Chemical, EUA) se liga às β-glucanas e à quitina, corando tanto a parede celular quanto os septos. O DAPI apresenta especificidade para o DNA, evidenciando os núcleos que se coram de azul brilhante. Os núcleos interfásicos apresentam uma cromatina característica, localizada em torno de um único nucléolo representado por um ponto escuro. Durante a mitose estas regiões não podem ser distinguidas, já que a cromatina se condensa e o nucléolo desaparece. Portanto, o núcleo passa a ser visualizado como um ponto azul brilhante durante a mitose. Após o tempo de coloração, as lamínulas foram incubadas em tampão PBS 1X por 5 a 10 minutos para descoloração, lavadas com água destilada e então montadas em lâminas contendo uma gota de solução de montagem (glicerol 50% em PBS 1X) para a análise.

A fim de se verificar o padrão de distribuição de esteróis no mutante $\Delta atmA^{ATM}$, os conídios das linhagens selvagem e mutante $\Delta atmA$ foram crescidos por 14 horas a 44°C em MM+glicerol e imediatamente corados com filipina na concentração final de 25 µg/ml por 5 minutos em meio de cultura previamente aquecido a 37°C. Após esse tempo, as lamínulas foram lavadas com o meio de cultura aquecido, montadas como descrito anteriormente e analisadas.

As lâminas foram visualizadas utilizando-se um microscópio Carl Zeiss (Jena, Alemanha), em objetiva de imersão em óleo 100X (EC Plan-Neofluar, abertura numérica 1.3) equipado com módulo de epifluorescência e lâmpada de mercúrio HBO 100W. As imagens em campo claro com contraste de fase e em campo escuro de fluorescência foram capturadas com câmera AxioCan (Carl Zeiss), visualizadas e processadas pelo programa AxioVision versão 3.1. Imagens no formato .TIFF foram salvas para modificações adicionais e montagem dos painéis com o auxílio do programa Adobe Photoshop 7.0.

Para a marcação das membranas e visualização do tráfico endocítico no mutante $\Delta atmA^{ATM}$, foi utilizado o marcador vital esteril lipofílico FM4-64 (N-(3-thiethylammoniumpropyl)-4-(p-diethylaminophenyl)hexatrienyl) pyridinium dibromide (Invitrogen Molecular Probes) para se verificar a sua internalização pela membrana e o transporte vacuolar (VIDA; EMR, 1995). Conídios das linhagens selvagem e mutante $\Delta atmA$ foram crescidos por 14 horas a 44°C em 2 ml de MM+glicerol em placas de

cultivo do tipo “glass botton dishes” (Mattek Corporation, EUA) e corados com FM4-64 baseado no protocolo previamente descrito por Peñalva (2005). Foram utilizados 10 μM de FM4-64 (em meio de cultura pré-aquecido a 37°C) por 2 minutos. Após esse tempo as lamínulas foram lavadas e incubadas em meio de cultura pré-aquecido isento de FM4-64 à 37°C por 3 horas para a internalização do marcador.

Para a marcação das células com H₂DCFDA e visualização do padrão de distribuição de radicais livres nos germinantes da linhagem selvagem e do mutante $\Delta atmA^{\text{ATM}}$, conídios das linhagens selvagem e mutante $\Delta atmA$ foram crescidos por 12 horas a 44°C em 2 ml de MM+glicerol em placas de cultivo do tipo “glass botton dishes” (Mattek Corporation, EUA) e corados com H₂DCFDA. Os germinantes foram expostos a 20 μM de H₂DCFDA (em meio de cultura pré-aquecido a 37°C) por 30 minutos. Após esse tempo, as lamínulas foram lavadas com meio de cultura pré-aquecido a 30°C e incubadas em meio de cultura isento de H₂DCFDA a 30°C por 30 minutos para a internalização do marcador.

As células vivas marcadas com FM4-64 ou H₂DCFDA foram visualizadas em temperatura ambiente em microscópio confocal Leica TCS SP5 Laser Scanning Confocal Microscope (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemanha) no Laboratório de Microscopia Confocal, Faculdade de Medicina da Riberião Preto, USP usando objetiva de 63X com imersão em água e utilizando o canal de laser de 514 nm para FM4-64 e 488 nm para H₂DCFDA. As imagens foram capturadas pela aquisição direta com “Z step” variando de 0,5 a 2 μm através do programa LAS AF (Leica Microsystems). Processamentos adicionais nas imagens e a montagem dos painéis foram realizadas com auxílio do programa Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Incorporated, CA).

3.4.24.2. Análise das linhagens que apresentavam fusão com GFP

Para a visualização de fluorescência nas linhagens com genes fusionados com GFP, 1×10^4 conídios foram incubados 18 a 24 horas a 30°C em 2 ml de MM + glicerol acrescido dos suplementos nutricionais necessários. Em linhagens onde a fusão com GFP estava sob o controle do promotor *a/cA* foi utilizado MM + glicerol + etanol 2%. O incubação foi realizada em placas de cultivo do tipo “glass botton dishes” (Mattek Corporation, EUA). Após o período de crescimento, quando necessário, as células foram tratadas com 2 $\mu\text{g/ml}$ de phleomicina para

induzir o dano ao DNA e a formação do foco nuclear. Para os experimentos de co-localização, as células foram submetidas à fixação por 15 minutos com solução de fixação II e coradas com DAPI como descrito anteriormente.

As células foram analisadas em temperatura ambiente em microscópio confocal Leica TCS SP5 Laser Scanning Confocal Microscope (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemanha) no Laboratório de Microscopia Confocal, Faculdade de Medicina da Ribeirão Preto, USP usando objetiva de 63X com imersão em água e utilizando os canais de laser 405 nm para DAPI e 488 nm para GPP. As imagens foram capturadas pela aquisição direta com “Z step” variando de 0,5 a 2 µm através do programa LAS AF (Leica Microsystems). Processamentos adicionais nas imagens e a montagem dos painéis foram realizadas com auxílio do programa Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Incorporated, CA).

3.4.24.3. Determinação da funcionalidade do ponto de checagem intrafase S (Ensaio de Mitose)

Cerca de 1×10^6 conídios foram inoculadas sobre lamínulas esterilizadas dispostas no fundo de placas de Petri contendo meio completo líquido acrescidos dos suplementos necessários bem como 0, 6 e 100 mM de HU e crescidas a 37°C ou 30°C para linhagens com marcador condicional de temperatura. A incubação estendeu-se por um período de 4 a 6 horas dependendo da cinética de divisão nuclear da linhagem em questão, de forma a obter-se semelhança nas taxas de divisão nuclear entre as linhagens. As amostras foram coletadas após a incubação para a determinação do percentual de germinantes que não bloquearam o ciclo celular na fase S por ocasião do estresse replicacional e dano ao DNA causado por HU. Conídios que apresentavam mais um núcleo foram contados como aqueles que romperam o bloqueio intrafase S. Foram analisados 100 núcleos em cada experimentos e os resultados apresentados indicam médias $\pm$ desvios padrões de pelo menos 4 experimentos independentes.

3.4.24.4. Determinação da funcionalidade do ponto de checagem G2/M

Vários mutantes termosensíveis defectivos em diversos aspectos do ciclo celular foram isolados e caracterizados em *A. nidulans* (AIST, MORRIS, 1999; OSMANI;

MIRABITO, 2004). Dentre essa coleção de mutantes, células que apresentam a mutação *nimA5* (“never in mitosis”) são incapazes de entrar em mitose na temperatura restritiva de 44°C e, portanto estão bloqueadas na fase G2 do ciclo celular. O gene *nimA* codifica para uma proteína serina/treonina quinase necessária para iniciar a mitose em *A. nidulans* (OSMANI; MAY; MORRIS, 1987). Conídios de ambas as linhagens; *nimA5 atmA⁺* (A781) e *nimA5 ΔatmA* (IM69-221) foram inicialmente incubados a 30°C em meio completo por 5 horas sobre lamínulas em placas de Petri para que saíssem do estado de quiescência (G1). A seguir os esporos foram transferidos para a temperatura restritiva de 44°C onde foram incubados por 3 horas para que fossem sincronizados na fase G2 do ciclo celular. A seguir, MMS (0.025%) foi adicionado ao meio de cultura e incubado por adicionais 75 minutos a 44°C para causar dano ao DNA. Após esse tempo, a droga foi retirada do meio de cultura por lavagem com meio completo previamente termostatizado a 30°C. Novo meio de cultura contendo 5 µg/ml de nocodazol foi adicionado às lamínulas ao mesmo tempo em que os germinantes eram trazidos para a temperatura permissiva (30°C) para a liberação do bloqueio em G2 na presença de nocodazol que inibe a despolimerização dos microtúbulos e bloqueia as células em mitose. Amostras da linhagem *nimA5 ΔatmA* e da linhagem *nimA5 atmA⁺* foram retiradas nos tempos 0, 10, 20, 30 e 40 minutos a após a retirada da droga e incubação na temperatura permissiva. As lamínulas correspondentes a cada tempo foram então coradas com DAPI e calcofluor e analisadas em microscopia de fluorescência para identificar os germinantes que romperam o bloqueio na fase G2/M. A porcentagem do Índice de Cromossomos em Mitose (CMI), isto é, porcentagem de germinantes cujos núcleos se encontram condensados, foi determinada para as amostras.

3.4.24.5. Ensaio de TUNEL

A presença de quebras de dupla fita do DNA para a linhagem *ΔatmA^{ATM}* foi demonstrada pelo ensaio de TUNEL (deoxynucleotidyltransferase mediated dUTP-biotin nick end labeling). Nesse experimento as extremidades 3' OH livres foram marcadas com dUTP conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) usando o kit “In situ Detection Kit” (Roche Diagnostics, Penzeberg, Alemanha). Esporos das linhagens selvagem *ΔatmA* foram germinados sobre lamínulas em meio completo (YG) ou meio mínimo (MM) por 12 horas a 30°C. As

lamínulas foram lavadas e submetidas a reação para digestão da parede celular (HARRIS et al., 1999). A reação de TUNEL foi então realizada de acordo com o descrito por Madeo et al. (1997) para a levedura *S. cerevisiae*. A seguir as células foram submetidas a coloração dos núcleos e parede celular com Hoechst 33258 (Molecular Probes, EUA) e calcoflúor, respectivamente. As lâminas foram analisadas em microscópio confocal (UNL, Microscopy Core Facility) usando laser com os seguintes comprimentos de onda; 405 nm para Hoechst 33258 e Calcoflúor; e 488 nm para FITC. As imagens foram subsequenteiramente processadas usando o programa Adobe Photoshop (Adobe Systems, Mountain View, CA).

3.4.24.6. Determinação da polarização do crescimento em conídios após liberação do bloqueio com HU

Incubou-se cerca de 10^4 conídios das linhagens analisadas a 37°C por 5 horas em meio de cultura líquido completo e 50 mM de hidroxirúria (HU) em lamínulas no fundo de placas de Petri. Após o tempo de sincronização dos germinantes na fase S, as lamínulas contendo os germinantes aderidos foram extensivamente lavadas com o meio de cultura pré-aquecido a 37°C isento de HU para a retirada da droga. Após a lavagem, as lamínulas foram novamente incubadas em meio de cultura líquido completo e amostras foram retiradas nos tempos 0, 30, 60, 90, 120 e 150 minutos após liberação do bloqueio com HU. Os germinantes foram fixados (solução de fixação I), corados com DAPI e calcoflúor e observados em microscópio de fluorescência sob luz ultravioleta e em campo claro com contraste de fase como descrito anteriormente. Foram considerados conídios com crescimento polarizado aqueles que mostravam protuberância (HARRIS, 1999) na superfície do esporo alterando sua forma redonda característica. Foram analisados 100 germinantes em cada experimento independente e os resultados apresentados representam médias $\pm$ desvios padrões de pelo menos três experimentos independentes.

Para verificação do crescimento polarizado no mutante $\Delta atmA^{ATM}$ na presença de miriocina, lovastatina, 1-butanol e difenilenoiodônio (DPI), concentrações crescentes dessas drogas foram adicionadas ao meio de cultura (YG+UU) logo após a lavagem e liberação do bloqueio com HU em cada experimento. Para estes experimentos, os conídios foram incubados por 150

minutos na presença das drogas utilizadas em cada experimento e o percentual de polarização foi verificado. Foram utilizadas as seguintes concentrações de drogas: miriocina: 0, 20, 40, 60 e 80 µg/ml; lovastatina: 0, 0,01, 0,1, 0,5, 1,0 e 1,5 mg/ml; 1-butanol: 0, 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1%; DPI: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 µM. Para a verificação do crescimento polarizado na linhagem duplo mutante $\Delta atmA^{ATM}$ *alca::modA^{G14V}* e no parental *alca::modA^{G14V}* (linhagem AML37), os conídios foram inicialmente crescidos em meio completo (YG+UU) contendo 50 mM de HU (condições de repressão) e após liberação do bloqueio foram incubados em MM glicerol + etanol 2% + suplementos para a indução da expressão da proteína dominante negativa ModA^{G14V}.

3.4.24.7. Determinação do percentual de septação

Os conídios utilizados nos experimentos de septação foram inicialmente crescidos por 16 horas a 30°C na presença e na ausência de MMS em meio completo acrescido de suplementos, em lamínulas de vidro esterilizadas colocadas em placas de Petri. Para as linhagens sensíveis a MMS foi utilizada menor concentração da droga que aquela usada para o controle. Após a incubação, as lamínulas foram retiradas das placas, fixadas e lavadas em PBS 1X. As lamínulas foram submetidas a coloração com DAPI e calcoflúor. A septação dos germinantes que apresentavam mais de 8 núcleos e mais de 45 µm foi analisada contando 100 germinantes em cada experimento independente e os resultados mostrados representam média ± desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. A contagem foi feita inicialmente em objetiva de 40X para facilitar a visualização de toda a extensão da hifa.

3.4.24.8. Estudo da inibição da divisão nuclear na presença de bleomicina

As linhagens de *A. nidulans* foram inoculadas na concentração de 10^5 conídios/ml em placas de Petri com lamínulas estéreis em meio de cultura completo com os suplementos necessários e incubadas a 37°C. As linhagens foram incubadas de 3 a 5 horas, dependendo da cinética de divisão nuclear para possibilitar que as células saíssem do estado de quiescência (G1) e iniciassem a divisão nuclear. O dano ao DNA foi induzido com 1 µg/ml de bleomicina, um mimético de radiação ionizante, por um período de 30 minutos. Após esse período a droga foi retirada pela

lavagem extensiva das lamínulas com meio de cultura pré-aquecido a 37°C e novamente incubado por adicionais 30 minutos retirando-se amostras em intervalos regulares de 10 minutos. Estas amostras foram fixadas e coradas com DAPI e calcoflúor. As células foram observadas em microscópio de epifluorescência onde foi contado o número de células que apresentavam dois ou mais núcleos. Foram analisados 100 núcleos em cada experimento e os resultados apresentados indicam médias e desvios padrões de pelo menos quatro experimentos independentes.

3.4.25. Coloração dos germinantes com NBT

As lamínulas contendo os germinantes aderidos (cerca de 1×10^4 esporos) foram lavadas com PBS para retirar o excesso de meio de cultura e submetidas a coloração com solução de NBT 0,05% em água destilada por 30 minutos no escuro. As lamínulas foram lavadas em PBS e montadas. As lâminas foram visualizadas utilizando-se um microscópio Carl Zeiss (Jena, Alemanha), em objetiva de imersão em óleo 100X (EC Plan-Neofluar, abertura numérica 1.3) em campo claro. As imagens foram capturadas com câmera AxioCan (Carl Zeiss), visualizadas e processadas pelo programa AxioVision versão 3.1. Imagens no formato .TIFF foram salvas para modificações adicionais e montagem dos painéis com o auxílio do programa Adobe Photoshop 7.0.

3.4.26. Determinação de NADPH/NADP⁺

Para a determinação quantitativa dos nucleotídeos de nicotinamida, NADPH e NADP⁺, 1×10^{10} conídios/ml foram inoculados em YG + suplementos por 60, 90, 120 e 150 minutos a 37°C sob agitação (250 rpm), seguindo mesmo desenho experimental utilizado para as hibridizações de microarray como descrito anteriormente. Em cada ponto experimental, os germinantes foram recuperados e congelados em nitrogênio líquido. Para a extração de NADPH e NADP⁺ os conídios foram triturados em nitrogênio líquido com ajuda de almofariz e pistilo e ressuspensos em 400 µl de tampão de extração comercial (NADP⁺/NADPH quantification kit, Bio Vision, EUA). A extração foi realizada por agitação mecânica por 2 minutos. O material extraído foi centrifugado a 20800 g por 2 minutos para a separação do sobrenadante. Um novo ciclo de centrifugação foi realizado nas

mesmas condições para retirar qualquer resíduo celular remanescente. O sobrenadante foi utilizado para a determinação de proteínas pelo método de Bradford modificado utilizando reagente comercial (Biorad, EUA) e de NADPH e NADP⁺ por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O sistema de HPLC utilizado consistiu de duas bombas de solvente LC-10AD, um sistema controlador SLC-10A, um forno de coluna CTO-10AS, um injetor Rheodyne com “loop” de 20 µl e um detector diodo (SPD-M10A) ajustado para 254 nm (Shimadzu, Japão). O fracionamento foi executado através de coluna Lichrospher C18 (125 x 4.6 mm I.D., tamanho das partículas 5mm, Merck, Alemanha). Uma pré-coluna C18 (4 x 4 mm I.D., Merck, Alemanha) do mesmo material foi usada para proteger a coluna analítica. A fase móvel consistiu de NaH₂PO₄ - metanol (96:4), com fluxo regulado para 1 ml/min. A quantidade de NADPH e NADP⁺ foi expressa em relação à quantidade proteína presente em cada amostra analisada.

3.4.27. Cruzamentos entre linhagens de *A. nidulans*

As linhagens com auxotrofias contrastantes a serem cruzadas foram inoculadas lado a lado em meio completo adicionado de suplementos adequados e incubadas a 30°C até que o crescimento das duas linhagens se encontrasse. A região de anastomose das hifas contendo os heterocários foi recortada e transferida para placas contendo meio mínimo, onde apenas os heterocários são capazes de crescer (PONTECORVO, 1953). Para os experimentos de indução do ciclo sexual, a placa contendo os heterocários foi selada com fita adesiva para reduzir a tensão de oxigênio. Após incubação por cerca de 10 dias a 30°C, os cleistotécios foram isolados com o auxílio de estereomicroscópio e limpos em uma placa de Petri contendo agar 4% (p/v) estéril. Este passo remove os conídios e as células Hülle aderidos à parede dos cleistotécios. Os cleistotécios foram rompidos em microtubos contendo água, a fim de se liberar os ascosporo. Os cleistotécios híbridos foram selecionados através da identificação dos marcadores genéticos das linhagens parentais nas colônias resultantes do crescimento da suspensão de ascosporo, chamadas de segregantes meióticos. Um marcador de fácil visualização que permite a seleção dos cleistotécios híbridos é a coloração dos segregantes meióticos, mas também as marcas auxotróficas esperadas após o cruzamento.

3.4.28. Determinação da sensibilidade a agentes mutagênicos

Diferentes concentrações das drogas indicadas nos experimentos foram adicionadas ao meio completo acrescido de suplementos. Colônias jovens das linhagens a serem testadas foram inoculadas pontualmente com auxílio de palitos esterilizados, bem como as linhagens selvagens usadas como controle. As placas foram incubadas a 37°C e os fenótipos das linhagens testadas foram confirmados após 3 dias. Para os experimentos quantitativos, o diâmetro radial das colônias em cada concentração de droga utilizada era medido e o valor expresso nos gráficos como valor percentual de redução em relação a linhagem selvagem controle. A fim de se eliminar a possibilidade de inibição do crescimento devido ao solvente DMSO, um controle com DMSO foi realizado para cada experimento. Este controle consistia em uma placa contendo o solvente DMSO acrescentado na mesma proporção que o maior volume de solução estoque de droga usado. As imagens foram obtidas pela captura da imagem por câmera CCD e os painéis foram montados usando os recursos do programa Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Incorporated, CA).

3.4.29. Estoque de linhagens

As linhagens de *A. nidulans* utilizadas neste trabalho foram estocadas em sílica estéril a temperatura ambiente, de acordo com a metodologia descrita pelo Fungal Genetics Stock Center (<<http://www.fgsc.net/methods/fgscpres.html>>). As linhagens de bactérias foram estocadas em glicerol 40% (v/v) a -80°C, de acordo com Sambrook; Russel (2001).

3.4.30. Análise estatística

A fim de verificar diferenças entre o comportamento das linhagens de *A. nidulans* submetidas aos experimentos de viabilidade após bloqueio na fase S, ensaio de mitose e viabilidade dos germinantes após irradiação com luz ultravioleta, utilizou-se o teste ANOVA fator único, com $\alpha=0,05$ utilizando-se o programa de análise estatística Sigma Stat 3.1 (Systat Software, Inc., EUA). Diferenças de média significantes apontadas pelo teste ANOVA foram identificadas pelo teste Student Newman-Keuls de comparação múltipla (Sigma Stat 3.1; Systat Software, Inc., EUA).

4.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Módulo 4.1: Isolamento e caracterização fenotípica do mutante Δsld^{RAD50} em *A. nidulans*.

Malavazi et al., *Aspergillus nidulans sld^{RAD50}* gene interacts with *bimE^{APC1}*, a homolog of an anaphase promoting complex subunit. **Molecular Microbiology**, v. 57, p. 222-237, 2005.

As funções celulares do gene *sdl*^{RAD50} foram avaliadas a partir da utilização de duas linhagens de *A. nidulans*. Uma delas apresenta uma mutação no gene *sdl*^{RAD50} (1444D) e foi cedida ao laboratório pelo Dr. Vladimir Efimov (University of Medicine and Dentistry, New Jersey, EUA). A outra linhagem (IM25) foi obtida neste trabalho e apresenta a inativação da função deste gene como será mostrado a seguir.

4.1.1. Identificação do gene *sdl*^{RAD50} através do “screening” de letais sintéticos na ausência de dineína

A proteína citoplasmática dineína é amplamente expressa sendo uma proteína motora componente dos microtúbulos. Juntamente com a proteína kinesina, ambas movimentam-se ao longo dos microtúbulos em direções opostas uma à outra e utilizam energia derivada do ATP para produzir força e movimento para uma variedade de eventos celulares incluindo: transporte intracelular, posicionamento de vesículas e organelas, mitose, migração nuclear e orientação das fibras do fuso (VALLE et al., 2004).

Em *A. nidulans* a inativação da dineína citoplasmática, embora não seja letal, severamente prejudica o processo de migração nuclear e reduz o crescimento radial das colônias (XIANG; BECKWITH; MORRIS, 1994). Com o intuito de verificar o amplo espectro de função da proteína dineína, Efimov e Morris (1998) buscaram por mutações que significativamente reduzissem o crescimento colonial na ausência de dineína, mas que tivessem pouco efeito na sua presença através de um “screening” de letalidade sintética. A partir desses experimentos foram isolados 19 mutantes denominados *sdl* (“*s*ynthetic *l*ethality without *d*ynein”) em nove diferentes genes, sendo que um deles (*sdl*) foi caracterizado no presente trabalho. A mutação do gene *sdl* conferiu ausência de esporos assexuais e menor tamanho radial da colônia (Figura 7). O gene *sdl* foi clonado por complementação do restabelecimento da produção de esporos da linhagem 1444D, e pela obtenção de colônias de tamanho normal. Para a clonagem foi utilizado o método de ligação “in vivo” (EFIMOV; MORRIS, 1998). A linhagem mutante 1444D foi transformada com uma mistura de ligação contendo o vetor autossômico pAID (digerido com *Bam*HI e defosforilado) e fragmentos de DNA genômico da linhagem selvagem R153 obtidos por digestão parcial com a enzima *Sau*3AI. O vetor pAID apresenta o fragmento

auto-replicativo AMA1 e o gene *pyrG* como marcador que confere prototrofia para uridina e uracila (GEMS; JOHNSTONE; CLUTTERBUCK, 1991). Os protoplastos resultantes da transformação foram inoculados em YAG. Três transformantes independentes que apresentaram conidiação e tamanho normal foram obtidos. Os plasmídeos responsáveis pela reversão fenotípica foram recuperados pela transformação do DNA total obtido desses transformantes em *E. coli*. Os três plasmídeos recuperados apresentavam insertos de aproximadamente 5 Kb (pi1-1), 20 Kb (pi4-5) e 6 Kb (pi6-4). Os três insertos apresentam fragmentos sobrepostos da mesma região genômica (dados não apresentados). O plasmídeo pi1-1 foi usado para o sequenciamento e definição da região de complementação. Foram obtidos quatro subclones desse inserto os quais foram novamente transformados na linhagem mutante 1444D. A análise do sequenciamento mostrou que o inserto correspondia ao gene cujo produto apresentava alta similaridade com a proteína Rad50 de *Saccharomyces cerevisiae* (ORF AN3619.2; <<http://genome.wi.mit.edu/annotation/fungi/aspergillus>>) A Figura 3 mostra o esquema de complementação para os subclones obtidos, bem como a região onde a mutação foi identificada. Apenas os subclones piSK3 e piSR1 foram capazes de reparar os defeitos do mutante *sld1*1444 pela integração no gene *sld1*^{RAD50} mutado, indicando que a mutação estava localizada na porção central do gene.

Figura 3: Análise de complementação dos subclones de pi1-1 na linhagem *sld1*1444 (1444D). A complementação da mutação foi verificada pelo restabelecimento da produção normal de esporos e do tamanho normal da colônia. A região que contém a mutação está indicada pelo asterisco.

A sequência genômica do gene *sld*^{RAD50} apresenta 4454 pb e codifica uma proteína predita de 1319 aminoácidos com um peso molecular calculado de aproximadamente 152 KDa e ponto isoelétrico calculado de 5,54. O gene *sld*^{RAD50} apresenta cinco íntrons de 230, 101, 51, 48 e 59 pb localizados nas posições 52-282, 285-386, 508-559, 644-692 e 4386-4454 respectivamente. A busca no banco genômico de *A. nidulans* indicou que o gene *sld*^{RAD50} está presente em uma única cópia (dados não apresentados). A proteína predita Sld^{RAD50} de *A. nidulans* apresentou alta similaridade com a mesma proteína de outras espécies indicando que realmente foi identificado o seu homólogo neste organismo. A Figura 4 mostra o alinhamento obtido com as proteínas de *Homo sapiens* e *S. cerevisiae* e evidencia que os domínios principais (assinalados na Figura 4) apresentam alto grau de conservação. Os domínios Walker A e B, a região de assinatura da proteína (“signature motif”) bem como os motivos “Q loop” e “H loop” estão todos localizados dentro da porção ABC-ATPase compreendidas entre os aminoácidos 51-58, 1241-1251, 1213-1222, 170-174 e 1277-1282 respectivamente. Os domínios de ligação e interação com Mre11 estão contidos nas regiões “coiled coil” nas posições 193-214 (N terminal) e 1133-1156 (C terminal). As duas regiões “coiled coil” por sua vez estão compreendidas entre os aminoácidos 178-690 e 707-1212, interrompida pela região de dobradiça (“hinge”) CXXC da proteína nas posições 691-706.

Figura 4: Alinhamento da proteína SldI^{Kad50}. Os números indicam os principais domínios conservados da proteína entre as espécies. **1** Walker A; **2** "Q-loop"; **3** e **5** domínios de interação com Mre11; **4** CXXC "hinge"; **6** "Signature motif"; **7** Walker B; **8** "H-loop".

No intuito de identificar a natureza da mutação *sldI*, o DNA genômico da linhagem 1444D foi extraído e o gene *sldI*^{RAD50} foi amplificado de acordo com o descrito em materiais e métodos. Três PCRs independentes foram realizadas e o produto delas foi seqüenciado na sua totalidade com os primers que cobriam toda a extensão do gene *sldI*^{RAD50} no sentido 5'→3'. Paralelamente, foi também seqüenciado o gene obtido a partir de PCRs independentes da linhagem selvagem parental R153. As seqüências geradas foram analisadas pelo programa Sequencer 3.0 e foi utilizada também a seqüência do gene obtida do banco de dados do projeto genoma *A. nidulans* (AN3619.2) para fins de comparação. A análise desse seqüenciamento mostrou que a seqüência do gene *sldI*^{RAD50} obtida a partir da linhagem selvagem R153 foi 100% idêntica àquela disponível no projeto genoma de *A. nidulans*. Por outro lado, a seqüência do gene na linhagem mutante *sldI*1444 apresentou uma transversão G→C na posição 2509 pb, que corresponde a uma mutação na posição 2074 pb da fase aberta de leitura, isto é, uma mutação Ala→Pro no resíduo 692 no éxon 5 (Figura 5). A mutação C2074G é até o presente momento não descrita para o gene *sldI*^{RAD50} e está dentro do domínio CXXC da proteína Rad50 (região de dobradiça). A localização dessa mutação na proteína reforça a sua importância para a função biológica de *RAD50* no que diz respeito a sua estrutura tridimensional (Figura 1).

Figura 5: Esquema estrutural da proteína *sldI*^{Rad50} e localização da mutação C2074G na linhagem 1444D. A proteína Rad50 é um membro da família SMC ("Structural Maintenance Chromosome"). A região cinza indica o domínio ABC-ATPase contendo os motivos Walker A (WA) e Walker B (WB). A porção "coiled coil" (CC) da proteína está marcada na Figura em preto (ver também Figura 1). Esta contém os domínios de ligação à proteína Mre11 (hachuras

horizontais). As hachuras verticais no centro indicam a região de dobradiça (“hinge”) e o motif CXXC (CysXXCys). Acima do diagrama está mostrada esquematicamente a região deletada na linhagem mutante *sldl::pyrG* (Figura 6) a qual compreendeu parte da porção “coiled coil” e exatamente 3 aminoácidos no domínio de interação com Mre11. O esquema abaixo do diagrama mostra a posição da mutação *sldl1444* encontrada na linhagem 1444D que resulta na substituição na posição 692 de uma alanina (A), por uma prolina (P).

4.1.2. Inativação da função do gene *sldl*^{RAD50}

Para investigar as funções do gene *sldl*^{RAD50}, uma linhagem de *A. nidulans* com o gene *sldl*^{RAD50} inativado foi construída. A região escolhida para a deleção ficou compreendida na porção 3’ do gene a qual compreende a porção final do domínio “coiled coil” N-terminal da proteína e os três primeiros aminoácidos da sequência conservada de ligação de Rad50 com a proteína Mre11. A linhagem resultante dessa inativação foi denominada IM25. A região deletada na fase aberta de leitura está compreendida entre os nucleotídeos 2479 e 3406 dentro do éxon 5, (aminoácidos 825 a 1135), sendo que 927 pb, ou seja, 310 aminoácidos estão ausentes na proteína Rad50 na linhagem IM25 (Figura 6).

Para a construção do cassete de deleção o gene *sldl*^{RAD50} foi amplificado por PCR e ligado no vetor pEYFP, originando o vetor pEYFP-rad50. Um fragmento de 927 pb, alvo da deleção, foi liberado do vetor pEYFP-rad50 pela digestão com *Bgl*II. O gene *zeo-pyrG* amplificado por PCR foi ligado neste vetor pEYFP-rad50 linearizado e defosforilado. Esse novo vetor pEYFP-rad50-zeopyrG foi digerido com as enzimas *Sfi*I e *Sph*I e o cassete de deleção de aproximadamente 6 Kb contendo as regiões flangeadoras do gene *sldl*^{RAD50} e o marcador *pyrG* foi liberado e usado para transformar a linhagem UI224 (Figura 6A) Os transformantes foram selecionados em meio YAG (prototrofia para uridina e uracila) e testados para a sensibilidade a 25 µM de CPT. O DNA genômico de seis transformantes que apresentaram sensibilidade a CPT, bem como da linhagem selvagem (UI224) foi extraído e tratado com a enzima *Scal* para a análise por Southern blot e verificação de integração homóloga do cassete no locus *sldl*^{RAD50}. O gene *sldl*^{RAD50} apresenta um único sítio para *Scal* e nenhum sítio para essa enzima está presente dentro do marcador *zeo-pyrG*. Na linhagem IM25, um sinal com 2.417 pb a mais (referente ao marcador *zeo-pyrG*) foi verificado em relação à linhagem selvagem como mostra a Figura 6B. Experimentos de RT-PCR em tempo real e Northern blot mostraram ausência de transcrito do gene *sldl*^{RAD50} na linhagem IM25 (dados não apresentados). Ao contrário do que foi observado nas linhagens inativadas dos genes *scaA*^{NBS1} e *mreA*^{MRE11} (SEMIGHINI et al., 2003), a linhagem *sldl*^{RAD50} não

apresentou morfologia de DNA anormal, isto é, estrutura de cromatina que se alonga à medida que as hifas progridem em crescimento. Esse fenótipo é compatível com fragmentação nuclear e pode ser observado nos conídios germinantes corados com DAPI e calcoflúor.

Figura 6: Construção da linhagem *sld1*^{RAD50}::*pyrG*. **(A)** Construção e transformação do cassete de deleção na linhagem selvagem UI224. A clivagem com *Bgl*II liberou um fragmento de 927 pb na região 3' do gene *sld1*^{RAD50} o qual foi substituído pelo marcador *zeo-pyrG* no plasmídeo pEYFP-rad50. O cassete obtido a partir do plasmídeo pEYFP-rad50-zeopyrG foi transformado na linhagem UI224. **(B)** O DNA genômico das linhagens IM25 e UI224 foram isolados e digeridos com a enzima *Scal*. O gene *sld1*^{RAD50} foi usado como sonda.

4.1.3. Caracterização fenotípica da linhagem *sld1*^{RAD50}::*pyrG*

4.1.3.1. Papel do gene *sld1*^{RAD50} na resposta celular ao dano ao DNA

A proteína *RAD50* é um elemento chave do complexo Mre11 que desempenha papel na manutenção da estabilidade genômica através de funções como o processamento meiótico, RH, NHEJ e manutenção dos telômeros. Em especial, *RAD50* é uma molécula que na presença de quebra de dupla fita tem a capacidade de se ligar às duas extremidades do DNA mantendo-as em proximidade física a fim de permitir que o reparo aconteça. Para desempenhar tal função, a estrutura tridimensional dessa proteína é extremamente importante, sendo que as regiões “coiled coil” desta funcionam como braços que seguram o DNA no local da lesão (Figura 1B e 1C). Dessa forma, com o intuito de verificar a função dessa proteína durante o dano ao DNA, as linhagens *sld1*^{RAD50}::*pyrG* e *sld11444* foram crescidas na presença de diferentes agentes mutagênicos. Esses mutantes apresentam diferenças de crescimento, devendo-se isso provavelmente aos

diferentes “backgrounds” genéticos a partir dos quais foram gerados (Figura 7). Na ausência de drogas, a linhagem *sldI1444* (derivada da linhagem XX61) cresce pobremente enquanto a linhagem *sldI^{RAD50}::pyrG* (derivada da linhagem UI224) cresce de forma semelhante ao seu parental. A linhagem *sldI^{RAD50}::pyrG* foi mais sensível a vários agentes que causam dano ao DNA como 4NQO, CPT, MMS, HU e BLEO. Interessantemente, a mutação A692P também conferiu sensibilidade a estes agentes na mesma extensão quando comparada a linhagem *sldI^{RAD50}::pyrG*, exceto para HU. Esses resultados indicam que o gene *sldI^{RAD50}* é responsável pelo reparo e/ou sensoramento do dano causado pelas drogas testadas, sendo que todas elas interferem direta ou indiretamente no metabolismo do DNA. Dados prévios sobre o estudo das funções dos outros dois componentes do complexo Mre11, *scaA^{NBS1}* e *mreA^{MRE11}* apresentam resultados semelhantes (BRUSCH et al., 2001; SEMIGINI et al., 2003).

Figura 7: Fenótipo do crescimento radial das linhagens *sldI^{RAD50}::pyrG*, *sldI1444* e wt. As linhagens foram crescidas por 72 horas a 37°C na presença e na ausência de 4NQO, BLEO, HU, MMS e CPT.

Além disso, a linhagem *sldI*^{RAD50}::*pyrG* apresentou sensibilidade aumentada ao dano ao DNA causado pela luz ultravioleta (UV), tanto em conídios quiescentes quanto em conídios germinantes (Figura 8). A sensibilidade à luz UV nos conídios quiescentes da linhagem *sldI*^{RAD50}::*pyrG* foi significativamente diferente daquela da linhagem selvagem nas intensidades 0,22 e 0,25 J/m²/s ($p < 0,001$) enquanto que em conídios germinantes a sensibilidade do mutante foi maior em todas as intensidades de energia aplicada ($p < 0,001$).

Figura 8: Viabilidade dos conídios da linhagem *sldI*^{RAD50}::*pyrG* e duplo mutantes após exposição a luz UV. **(A)** Conídios quiescentes. **(B)** Conídios germinantes. A viabilidade dos conídios das linhagens analisadas foi determinada como o percentual de colônias que cresceram nas placas irradiadas em relação ao controle. Conídios germinantes foram aqueles incubados por 4,5 horas a 30°C previamente à irradiação. Os resultados expressos são a média $\pm$ desvio padrão de quatro experimentos independentes realizados em duplicata cada um. Diferenças estatísticas foram verificadas pelo teste ANOVA fator único seguido, quando significantes, do teste Student Newman-Keuls de comparação múltipla. $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4.1.3.2. Participação do gene *sldI*^{RAD50} no ponto de checagem intrafase S

A linhagem *sldI*^{RAD50}::*pyrG* é sensível ao estresse replicacional causado pela droga hidroxiuréia (Figura 7). HU é um inibidor da enzima ribonucleotídeo redutase, uma enzima limitante na via metabólica de produção de dNTPs. A HU suprime a conversão de ribose trifosfato para desoxirribose trifosfato (BERGEN; MORRIS, 1983). A depleção de dNTPs ativa o ponto de checagem da fase G1/S do ciclo celular o que causa bloqueio na fase S (DESANY et al., 1998). Além disso, o início da replicação do DNA na presença de altas concentrações de HU causa quebra de dupla fita, bem como estresse replicacional (MERRILL; HOLM, 1999). Tendo em vista que HU é um potente inibidor da síntese de DNA em *A. nidulans* (BERGEN; MORRIS, 1983) e a fim de se verificar o papel do gene *sldI*^{rad50} no reparo de quebra de dupla fita, ou na ativação do ponto de checagem intrafase S, a capacidade da linhagem *sldI*^{RAD50}::*pyrG* de crescer nas concentrações de 6 e 100 mM de HU foi investigada. De acordo com Allen et al. (1994) o tratamento agudo com HU causa letalidade severa em mutantes que são especialmente defectivos no ponto de checagem intrafase S, porém não naqueles defectivos no reparo de quebra de dupla fita ou em outros pontos de checagem relacionados ao dano ao DNA. Dessa forma, é possível diferenciar, baseado na hipersensibilidade a HU, um mutante que está envolvido ou no reparo do DNA ou na ativação de pontos de checagem do ciclo celular. Dois ensaios diferentes foram utilizados para verificar a função do ponto de checagem de replicação do DNA (FAGUNDES et al., 2004). O primeiro deles, isto é, o ensaio de mitose, monitora a mitose nas linhagens mutantes e na linhagem selvagem incubadas na presença ou ausência de 6 e 100 mM de HU durante 5 a 7 horas. O número de núcleos foi verificado pela coloração com DAPI e germinantes que apresentavam dois ou mais núcleos foram categorizados como defectivos no bloqueio de mitose (Tabela 6). O segundo ensaio, isto é, o ensaio de viabilidade foi utilizado para quantificar a viabilidade dos germinantes após incubação por 5 horas na presença ou ausência de 6 ou 100 mM de HU (Tabela 7). Ambos ensaios medem o estado da resposta do ponto de checagem de replicação do DNA. A linhagem mutante *sldI*^{RAD50}::*pyrG* apresentou defeitos nos dois ensaios em ambas concentrações de HU (6 e 100 mM) como mostram as Tabelas 6 e 7.

Tabela 6: Ensaio de mitose da linhagem *sldl*^{RAD50}::*pyrG* e duplo mutantes

Linhagens	HU (mM) ^a		
	0	6	100
GR5 (wt)	63,0 ± 12,7	8,5 ± 0,7	1,5 ± 0,7
IM25 (<i>sldl</i> :: <i>pyrG</i>)	61,0 ± 2,1	23,0 ± 3,1 ^b	3,0 ± 0,7 ^b
T20 (<i>scaA</i> :: <i>pyr4</i>)	69,3 ± 2,1	39,0 ± 6,0 ^b	8,5 ± 2,6 ^b
A776 (<i>bimE7</i>)	39,3 ± 2,5	23,3 ± 5,9 ^b	0,0 ± 0,0
AAH14 (Δ <i>uvsB</i>)	61,5 ± 7,78 ^b	16,5 ± 2,1 ^b	15,5 ± 0,7 ^b
IMT (<i>sldl</i> :: <i>pyrG scaA</i> :: <i>pyr4</i>)	66,5 ± 3,7	22,3 ± 2,2 ^b	2,0 ± 0,8
IM238 (<i>sldl</i> :: <i>pyrG bimE7</i>)	66,5 ± 4,2	26,3 ± 3,0 ^b	6,5 ± 3,5 ^b
IM14 (<i>sldl</i> :: <i>pyrG</i> Δ <i>uvsB</i>)	60,5 ± 7,7	25,0 ± 2,8 ^b	1,0 ± 0,0

^a O percentual dos germinantes que apresentavam dois ou mais núcleos após incubação com HU foi determinado como germinantes que não apresentavam bloqueio de mitose. Os resultados representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes com 100 germinantes tendo sido analisados em cada um. Diferenças estatísticas foram verificadas pelo teste ANOVA fator único seguido, quando significantes, do teste Student Newman-Keuls de comparação múltipla. $p < 0,05$ foi considerado significativo.

^b Significativamente diferente da linhagem selvagem ($p < 0,01$).

Tabela 7: Ensaio de viabilidade da linhagem *sldl*^{RAD50} e duplo mutantes

Linhagens	HU (mM) ^a	
	6	100
GR5 (wt)	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
IM25 (<i>sldl</i> :: <i>pyrG</i>)	78,2 ± 2,8 ^b	54,2 ± 2,4 ^b
T20 (<i>scaA</i> :: <i>pyr4</i>)	78,2 ± 8,1 ^b	70,0 ± 6,3 ^b
A776 (<i>bimE7</i>)	94,8 ± 6,5	97,8 ± 4,4
AAH14 (Δ <i>uvsB</i>)	74,7 ± 12,8 ^b	74,7 ± 10,3 ^b
IMT (<i>sldl</i> :: <i>pyrG scaA</i> :: <i>pyr4</i>)	78,9 ± 11,9 ^b	78,5 ± 11,7 ^b
IM238 (<i>sldl</i> :: <i>pyrG bimE7</i>)	46,3 ± 6,4 ^b	37,5 ± 4,0 ^b
IM14 (<i>sldl</i> :: <i>pyrG</i> Δ <i>uvsB</i>)	59,8 ± 3,3 ^b	67,5 ± 5,1 ^b

^a Viabilidade foi determinada como o percentual de colônias crescidas nas placas cujos conídios foram tratados com HU em comparação com o controle não tratado. Os resultados representam a média ± desvio padrão das determinações em triplicata de três experimentos independentes. Diferenças estatísticas foram verificadas pelo teste ANOVA fator único seguido, quando significantes, do teste Student Newman-Keuls de comparação múltipla. $p < 0,05$ foi considerado significativo.

^b Significativamente diferente da linhagem selvagem.

Um traço fenotípico marcante da inativação do complexo Mre11 em células de mamíferos e em células de portadores das síndromes AT, ATLD e NBS é a síntese de DNA radioresistente (para uma revisão ver D'AMOURS; JACKSON, 2002). Nessas circunstâncias, a síntese de DNA progride mesmo após o tratamento com radiação ionizante ou drogas radiomiméticas verificada através da incorporação de material radioativo pela célula. A síntese de DNA radioresistente indica uma falha na supressão das origens de replicação durante o dano ao DNA sugerindo uma incapacidade da célula de induzir o ponto de checagem intrafase S. O complexo Mre11 está envolvido na ativação dos pontos de checagem do dano ao DNA em todas as fases do ciclo celular (D'AMOURS; JACKSON, 2002). Como uma abordagem preliminar para averiguar se o complexo Mre11 em *A. nidulans* está envolvido na síntese de DNA radioresistente, a capacidade dos germinantes das linhagens mutantes *sldI*^{RAD50}::*pyrG* (IM25) e *mreA*^{MRE11}::*pyr4* (TMRE) de promover atraso da divisão nuclear na presença do radiomimético bleomicina (BLEO) foi avaliada. Como pode ser observado na Figura 9, as linhagens mutantes *sldI1444* e *sldI*^{RAD50}::*pyrG* não mostraram atraso na divisão celular após a retirada da droga do meio de cultura sugerindo um fenótipo RDS. O mesmo comportamento pode ser observado para a linhagem *mreA*^{MRE11}::*pyr4*. Interessantemente, as linhagens *sldI1444* e *sldI*^{RAD50}::*pyrG* apresentaram uma cinética de divisão nuclear mais rápida que aquela observada para a linhagem selvagem (UI224) e *mreA*^{MRE11}::*pyr4*. A linhagem selvagem mostrou um claro atraso na divisão celular na presença de BLEO indicando que nesta linhagem, o ponto de checagem ao dano causado por BLEO encontra-se intacto.

Figura 9: Fenótipos da síntese de DNA radioresistente das linhagens *sldI*^{RAD50}, *sldI*^{RAD50::pyrG}, *mreA*^{MRE11::pyr4} e wt. As linhagens mutantes não apresentaram atraso na progressão do ciclo celular após exposição a bleomicina (BLEO).

4.1.3.3. Interações genéticas entre os genes *sldI*^{RAD50}, *scaA*^{NBS1}, *uvrB*^{ATR} e *bimE*^{APC1}

Os genes *uvrB*^{ATR} e *scaA*^{NBS1} contribuem para a funcionalidade do ponto de checagem intrafase S (SEMIGHINI et al., 2003; FAGUNDES et al., 2004; FAGUNDES et al., 2005). Osmani e Ye (1996) demonstraram em *A. nidulans* a existência de dois sistemas regulatórios do ponto de checagem intrafase S que iniciam a mitose. Um deles envolve a fosforilação inibitória da tirosina 15 (Y15) de p34^{CDC2} e o segundo previne a mitose também via fosforilação da Y15 p34^{Cdc2} e via função da proteína BimE^{APC1}. Dessa forma, visando identificar possíveis interações genéticas entre os genes *sldI*^{RAD50}, *scaA*^{NBS1}, *uvrB*^{ATR} e *bimE*^{APC1}, foram construídas as linhagens duplo mutantes *sldI*^{RAD50::pyrG}, *scaA*^{NBS1::pyr4} (IMT), *sldI*^{RAD50::pyrG} *bimE*^{APC1} (IM238) e *sldI*^{RAD50::pyrG} Δ *uvrB*^{ATR} (IM14). A identificação dos grupos epistáticos foi determinada pela comparação dos fenótipos das linhagens duplo mutantes em relação a linhagem selvagem e seus respectivos parentais nos seguintes experimentos: (i) crescimento radial das colônias na presença dos agentes mutagênicos CPT, 4NQO, MMS e HU; (ii) viabilidade dos conídios (quiescentes e germinantes) após exposição a

luz UV; (iii) ensaio de mitose na presença de HU e (iv) ensaio de viabilidade na presença de HU. Ao longo deste trabalho, quando uma linhagem duplo mutante apresentava seu fenótipo exacerbado em relação aos seus parentais, a relação entre os genes de reparo foi tida como sinérgica, sugerindo que os genes em questão estariam atuando em vias de reparo paralelas. Por outro lado, quando a linhagem duplo mutante apresentava fenótipo equiparado aos seus respectivos parentais, isto é, sem diferença estatística significativa, a relação foi classificada como epistática, sugerindo que ambos os genes estão atuando em uma mesma via de reparo.

O duplo mutante *sldI*^{RAD50}::*pyrG* *bimE7*^{APC1} foi mais sensível a HU que seus parentais correspondentes (Figura 10) enquanto o duplo mutante *sldI*^{RAD50}::*pyrG*, *scaA*^{NBS1}::*pyr4* apresentou o mesmo perfil de sensibilidade em relação aos seus parentais em presença de HU, CPT, 4NQO, porém não MMS (dados não apresentados). Esses resultados sugerem que *bimE*^{APC1} e *sldI*^{RAD50} apresentam interação sinérgica enquanto os genes *sldI*^{RAD50} e *scaA*^{NBS1} apresentam o esperado perfil de epistasia dentre os componentes do complexo Mre11.

Figura 10: Inibição do crescimento radial das linhagens *sldI*^{RAD50}::*pyrG*, *bimE7* e *sldI*^{RAD50}::*pyrG* *bimE7* na presença de HU. (A) As linhagens foram crescidas a 30°C na presença e ausência de HU. (B) Conídios das linhagens IM25, IM238 e A776 foram crescidos em diferentes concentrações de HU e o percentual de inibição calculado em relação ao crescimento na ausência da droga após 72 horas de incubação a 30°C.

Em seguida, foi verificado o comportamento das linhagens duplo mutantes em relação ao ponto de checagem de replicação do DNA (Tabelas 6 e 7). No ensaio de mitose, o mutante *bimE7^{APC1}* apresentou defeito apenas na concentração de 6 mM de HU enquanto que interessante no ensaio de viabilidade para o mesmo mutante, o ponto de checagem estava intacto em ambas as concentrações de HU. Durante o ensaio de mitose na concentração de 6 mM, foi observado interação epistática entre os genes *bimE^{APC1}* e *sldI^{RAD50}* e *sldI^{RAD50}* e *scaA^{NBS1}* ($p>0,05$) uma vez que os duplo mutantes apresentaram percentual de duplicação celular comparável aos parentais na presença de HU (Tabela 6). Da mesma forma, há também interação epistática a 100 mM de HU entre os genes *bimE^{APC1}* e *sldI^{RAD50}* neste mesmo ensaio de mitose. No ensaio de viabilidade, foi observada interação sinérgica entre os genes *bimE^{APC1}* e *sldI^{RAD50}* a 6 e 100 mM de HU ($p>0,05$) e novamente interação epistática foi verificada entre os genes *sldI^{RAD50}* e *scaA^{NBS1}* ($p>0,05$) a 6 e 100 mM de HU (Tabela 7).

Como a luz UV interfere na função das forquilhas de replicação (NYBERG et al., 2002), possíveis interações genéticas também foram pesquisadas nas linhagens duplo mutantes através da sensibilidade dos conídios quiescentes e germinantes dessas linhagens expostos a luz UV. Como esperado, a radiação UV aplicada sobre conídios quiescentes e germinantes das linhagens *sldI^{RAD50}::pyrG* e *scaA^{NBS1}::pyr4* mostrou interação epistática entre os genes *sldI^{RAD50}* e *scaA^{NBS1}* ($p>0,05$) (Figura 8A e B, primeiro painel). Novamente foi verificada interação epistática entre os genes *sldI^{RAD50}* e *bimE^{APC1}* ($p>0,05$) quando a luz UV foi aplicada em conídios quiescentes da linhagem *sldI^{RAD50}::pyrG bimE7^{APC1}* (Figura 8A, segundo painel), indicando mais uma vez que esses genes interagem epistaticamente. Quando a radiação UV foi aplicada em conídios quiescentes, a falta de função de *sldI^{RAD50}* parcialmente suprime a sensibilidade à luz UV da linhagem $\Delta uvrsB^{ATR}$ (Figura 8C, terceiro painel, $p<0,05$). Por outro lado quando conídios germinantes foram expostos a luz UV, o duplo mutante *sldI^{RAD50} ΔuvrsB^{ATR}* apresentou a mesma sensibilidade em relação às linhagens parentais *sldI^{RAD50}* ou $\Delta uvrsB^{ATR}$ ($p>0,05$), indicando que esses genes estão atuando em numa mesma via de reparo ao dano causado pela radiação UV em conídios germinantes.

A linhagem A776 (*bimE7^{APC1}*), é um mutante sensível a temperatura que na temperatura restritiva (44°C) apresenta-se bloqueado na fase M do ciclo

celular (ENGLE et al., 1990). O gene *bimE7* (“blocked in mitosis”) codifica para o homólogo do complexo promotor da anáfase 1 (APC1) em *A. nidulans* é um regulador negativo da mitose em *A. nidulans* (ver texto seção 4.1.4 para detalhes), entretanto, sua seqüência não revela homologia significativa com outras proteínas apresentando apenas vários sítios de N-glicosilação e vários domínios putativos de fosforilação dependente de cAMP. A seqüência de aminoácidos indica que ela apresenta três domínios transmembrana (ENGLE et al., 1990) Dessa forma, um fragmento (*Clal-BamHI*) do gene *bimE*^{APC1} que complementa o defeito na temperatura restritiva (ENGLE et al., 1990) foi seqüenciado considerando-se que a identificação da mutação *bimE7* poderia fornecer maiores informações sobre as interações genéticas observadas com *bimE* no decorrer deste trabalho (ver também seção 4.2.2.9).

A seqüência genômica de *bimE*^{APC1} (AN2272.2) apresenta 6203 pb e o cDNA correspondente apresenta 6138 pb devido a ocorrência de um único íntron de 65 pb na posição 4795-4859 da seqüência genômica. O fragmento *Clal - BamHI* de 2537 pb está compreendido entre as posições 3571 e 6102 da seqüência genômica de *bimE*^{APC1}. A seqüência de 2478 pb clonada no plasmídeo pBIME5+6 (ver seção 3.4.13 para detalhes) foi seqüenciada e foram identificadas duas mutações adjacentes nas posições 5961 e 5962. As mutações foram mapeadas a partir da comparação da seqüência da linhagem mutante A776 e das linhagens selvagens A154 e A4. A linhagem A154 é o parental do mutante enquanto que a cepa A4 foi àquela utilizada no sequenciamento do genoma de *A. nidulans*, disponível no banco de dados. Em ambas as linhagens, a seqüência de *bimE* mostrou-se 100% idêntica. Os resultados obtidos com o sequenciamento do gene *bimE* mostraram a introdução de um códon de parada na posição 5961, o que fez com que o gene truncado perdesse 242 bases, como mostra a Figura 11.

Figura 11: Identificação da mutação *sld1444* na linhagem 1444D. Fragmento da sequência *Clal-BamHI* do gene *bimE^{APC1}* amplificado com os primers BimE-5 e BimE6. O fragmento *Clal-BamHI* complementa o fenótipo de bloqueio na fase M da linhagem mutante A776 (*bimE7*) na temperatura restritiva de 44°C. O sítio de restrição de *Clal* (posição 3571) não está presente nesse fragmento, pois se localiza “upstream” ao primer BimE-5 (setas). O fragmento foi seqüenciado no sentido 5’ e a região mostrada está destacada evidenciando alteração de duas bases adjacentes nas posições 5960 e 5961 levando a uma mutação silenciosa e ao aparecimento de um códon de parada.

Com isso, embora os resultados do sequenciamento mostrem a presença dessas duas mutações no gene *bimE^{APC1}* os resultados permanecem inconclusivos. De modo geral, seria muito incomum a presença de um códon de parada prematuro num mutante sensível a temperatura. Uma vez que a mutação inseriu esse códon de terminação no final do gene, isso pode ter mantido a proteína funcional na temperatura permissiva (30°C) e a alteração da estrutura dessa proteína somente foi perturbada na temperatura restritiva (44°C). Infelizmente não existem anticorpos disponíveis para o reconhecimento de BimE e assim esta hipótese não pode ser confirmada neste trabalho.

4.1.3.4. Participação do gene *sld1^{RAD50}* no programa meiótico em *A. nidulans*

O complexo Mre11 tem um papel crucial no reparo de quebra de dupla fita do DNA pela sua função no processo de recombinação homóloga (ABRAHAM, 2001, D’AMOURS; JACKSON, 2002). Além disso, ele participa do processo de formação controlada de quebras de dupla fita e de seu processamento durante o processo de recombinação V(D)J e durante a recombinação meiótica. Diversas espécies nas quais o complexo Mre11 é defectivo não conseguem executar com sucesso o programa meiótico da célula, uma vez que a indução da meiose leva a

letalidade (D'AMOURS; JACKSON, 2002). Em *S. cerevisiae* a letalidade é suprimida pela mutação no gene SPO13, de que é essencial para a segregação cromossômica durante a meiose (MALONE; ESPOSITO, 1981; IVANOV; KOROLEV; FABRE, 1992; D'AMOURS; JACKSON, 2002). Dessa forma, a supressão da letalidade de mutantes de Rad50 dependente de SPO13 foi originalmente interpretada como uma indicação do papel do complexo Mre11 na meiose. Especificamente durante a meiose em *S. cerevisiae*, as quebras de dupla fita são produzidas em locais determinados do genoma denominados de "hotspots" os quais são processados para produzir longas regiões 3' "overhang". O monitoramento da quebra DSB tem mostrado que o complexo Mre11 é essencial tanto para a formação da DSB como pra seu processamento (D'AMOURS; KACKSON, 2002; BORDE et al., 2004; BLEUYARD; GALLEGGO; WHITEI, 2004). Dessa forma, como uma abordagem inicial para entender o envolvimento do gene *sldI*^{RAD50} no processo meiótico em *A. nidulans*, a fertilidade da linhagem IM25 foi avaliada. *A. nidulans* é um fungo homotálico, isto é, um único conídio tem o potencial de formar hifas, as quais sob condições ambientais adequadas podem prosseguir num ciclo de reprodução sexuada. A autofertilização de cada um dos parentais pode ocorrer mesmo quando linhagens diferentes são crescidas juntas, e, além disso, o cruzamento entre as duas linhagens parentais dá origem a descendentes recombinantes. Em ambos os casos, a maturidade sexual pode ser observada pelo aparecimento dos corpos de frutificação, chamados cleistotécios (0,1 a 0,2 mm de diâmetro). Os esporos sexuais, chamados de ascósporos estão contidos dentro dos cleistotécios. Assim, foram analisados os cleistotécios produzidos a partir da autofertilização da linhagem IM25 e do cruzamento desta com uma linhagem selvagem de auxotrofia contrastante, no caso, R21. Com os cleistotécios obtidos foram analisados os seguintes parâmetros: viabilidade dos cleistotécios, números de ascósporo no interior dos cleistotécios e a viabilidade dos ascósporo (Tabela 8), segundo a metodologia descrita por Semighini et al. (2003). Quando autofertilizada, a linhagem selvagem apresentou 100% dos cleistotécios produzindo ascósporo viáveis com uma média de $3,3 \pm 0,1 \times 10^5$ ascósporos em seu interior dos quais 75,6% eram viáveis. A linhagem *sldI*^{RAD50}::*pyrG* apresentou 62% de cleistotécios viáveis contendo aproximadamente 10 vezes menos ascósporos em seu interior com apenas 6,31% de ascósporos viáveis. Tais resultados indicam que na ausência do gene *sldI*^{RAD50} a meiose está prejudicada. Embora sejam formados os esporos sexuais, estes se apresentam

menos viáveis e em menor número, a exemplo do que acontece em linhagens onde os dois outros componentes do complexo Mre11 de *A. nidulans* (*mreA*^{MRE11} e *scaA*^{NBS1}) estão inativados (SEMIGHINI et al., 2003). Durante a fertilização cruzada, a presença de uma cópia mutada de *sdl*^{RAD50} ainda é capaz de manter fertilidade, embora essa taxa tenha sido reduzida para 66,6%. Esses resultados indicam que a inativação de *sdl*^{RAD50} é recessiva e este gene é essencial para o processo de ascosporigênese e para o programa meiótico da célula.

Tabela 8: Papel do gene *sdl*^{RAD50} no processo de gametogênese em *A. nidulans*

	Autofertilização		Cruzamento
	<i>sdl</i> ^{RAD50+} ^a (GR5)	<i>sdl</i> ^{RAD50} ^b <i>::pyrG</i> (IM25)	<i>rad50</i> ⁺ ^c x <i>sdl</i> ^{RAD50} ^b <i>::pyrG</i>
Viabilidade dos cleistotécios (%) ^d	100	62	100
Rendimento dos ascósporos ^e	3,3±0,1 x 10 ⁵	1,6±1,0 x 10 ⁴	3,4±2,7 x 10 ⁴
Viabilidade dos ascósporos ^f	75,6 ± 5,0	6,31±3,0	66,6±15,9

^a Linhagem selvagem GR5

^b Linhagem UI224 foi utilizada para a inativação

^c Linhagem R21

^d Número de cleistotécios contendo ascósporo viáveis dividido pelo número total de cleistotécios analisados.

^e Valores representam o número médio de ascósporo estimados pela análise de três cleistotécios. Para a autofertilização da linhagem *sdl*^{RAD50} *::pyrG*, o conteúdo total de 50 cleistotécios foi examinado em microscopia para a presença de ascósporo.

^f Valores representam a média do percentual de ascósporo que apresentaram tubo germinativo após 8 horas de incubação a 37°C, 200 rpm em meio completo. Vinte cleistotécios foram analisados em cada experimento.

4.1.4. Discussão - O gene *sdl*^{RAD50}, o complexo Mre11 e a reposta ao dano ao DNA

Em *A. nidulans* mutações no gene *nudA* que codifica as cadeias pesadas da molécula de dineína citoplasmática prejudicam a migração nuclear e reduzem o crescimento radial das colônias em cerca de 20% em comparação a uma linhagem selvagem (XIANG; BECKWITH; MORRIS, et al., 1994). Entretanto, *nudA* não é um gene essencial. Assim, com o intuito de identificar outras funções celulares que requeriam a molécula de dineína citoplasmática, Efimov e Morris (1998) realizaram um “screening” de letais sintéticos através do qual buscaram identificar mutações que significativamente reduziam o crescimento das colônias de *A. nidulans* na ausência de dineína, mas que apresentassem pouco ou nenhum efeito

por si só. A partir desse trabalho, foi possível identificar o gene *sldI* (“*synthetic lethality without dynein I*”) como o homólogo do gene Rad50. Interessantemente, o mutante *sldI* apresentou letalidade sintética não só com a dineína citoplasmática, mas também com a kinesina *bimC* de *A. nidulans* indicando que este gene certamente desempenha papel na mitose (EFIMOV; MORRIS, 1998). No total, seis dos nove genes *sldI* identificados foram clonados. Os genes *sldA* e *sldB* são os homólogos dos genes BUB1 e BUB3 de *S. cerevisiae* (EFIMOV; MORRIS, 1998) envolvidos no ponto de checagem da ligação das fibras do fuso (“spindle pole assembly checkpoint”). As proteínas envolvidas nesse ponto de checagem impedem o desencadeamento da anáfase caso as fibras do fuso não estejam adequadamente ligadas aos cromossomos antes da segregação. O *sldC* é o homólogo do gene DNA2 de *S. cerevisiae* que é uma DNA helicase/nuclease; o *sldD* é uma topoisomerase II e o *sldE* codifica uma “open reading frame” sem identidade com proteínas caracterizadas até então (V. P. EFIMOV, dados não publicados). A razão pela qual esse “screening” identificou tantos genes relacionados a manutenção da integridade do DNA não é muito bem estabelecida. É possível que o “screening” não tenha sido suficientemente estridente de forma que as interações dos genes *sldI* com dineína sejam apenas “doentes sintéticos” e não letais sintéticos verdadeiros, sendo que nesse caso os genes *sld* não tenham relação real com a dineína. Uma outra explicação possível é que os genes *sldA*, *-B*, *-C*, *-D* e *-I* cada um, causem defeitos de coesão entre os cromossomos e as proteínas motoras que são quase letais na ausência de função da dineína. Hartsuiker et al. (2001) mostraram que a proteína Rad50 de *Schizosaccharomyces pombe* estimula e recombinação entre as cromátides irmãs e produz uma ligação funcional entre “coesão e reparo”. Entretanto, uma explicação mais convincente dentro do escopo deste trabalho recai sobre o fato de que a maquinaria de percepção e/ou reparo do dano ao DNA requer a função íntegra das proteínas motoras corretamente posicionadas em diferentes compartimentos subcelulares para executarem sua função. Como se sabe, a dineína é uma proteína motora e juntamente com a kinesina movem-se em direções opostas ao longo dos microtúbulos (em geral, a dineína move-se em direção a extremidade “-” e kinesina em direção a extremidade “+” dos microtúbulos), dessa forma possibilitando o transporte das proteínas envolvidas no reparo e/ou pontos de checagem para o núcleo. Assim, é possível que haja letalidade sintética quando as duas mutações estão presentes, embora para o nosso conhecimento não tenha sido

relatada até o momento nenhuma evidência de interação genética entre o complexo Mre11 e a dineína citoplasmática. Entretanto algumas evidências sugerem a ligação entre proteínas envolvidas no reparo e na função de transporte intracelular. Por exemplo, a localização nuclear da proteína p53 em resposta ao dano ao DNA requer a função da dineína (GIANNAKAKOU et al., 2000, GIANNAKAKOU et al., 2002). A destruição da atividade motora da dineína pela injeção de anticorpos dirigidos contra a cadeia intermediária dessa molécula (IC74) ou contra a proteína dinamitina (p50) resulta no acúmulo alterado de p53 no núcleo após o dano ao DNA. Ainda, a desestabilização dos microtúbulos pelo tratamento com alcalóides da vinca, como a vinblastina, impede também o acúmulo de p53 no núcleo durante o dano ao DNA (GIANNAKAKOU et al., 2000; GIANNAKAKOU et al., 2002). As bases moleculares para o transporte de p53 para o núcleo mediado por dineína não são completamente entendidas, uma vez que não se conhece a interação protéica direta entre p53 e o complexo motor da dineína. Recentemente, Lo et al. (2004) mostraram que a cadeia leve (8 KDa) da molécula de dineína (LC8) liga-se a uma proteína ligante de p53 (53BP1). Essa proteína é tida como um mediador da DDR de acordo com Sancar et al., (2004). O domínio de ligação de LC8 foi mapeado como uma sequência peptídica curta imediatamente N-terminal a região de localização do cinetocoro na proteína 53BP1. Dessa forma, 53BP1 pode potencialmente agir como uma molécula adaptadora para a ligação o complexo dineína a proteína p53. Galigniana et al. (2004) mostraram que o complexo hsp90/imunofilina pode também agir como um adaptador para ligar p53 a uma subunidade de dineína em células de câncer de cólon em humanos.

Tanto em *S. cerevisiae* quanto em *S. pombe*, os movimentos nucleares mediados pelo complexo dineína são importantes para as quebras cromossômicas e a recombinação homóloga (YAMAMOTO et al., 1999; THROWER et al., 2003). Dessa forma, a verificação de que o posicionamento da proteína Sld1^{RAD50} no núcleo de *A. nidulans* mediado pelo dano ao DNA é dependente de dineína foi buscada ao longo deste trabalho através da tentativa da construção de linhagens Rad50::GFP para serem testadas nos “backgrounds” genéticos dos mutantes de dineína e kinesina. Entretanto, as linhagens *rad50::gfp* sob o controle do seu próprio promotor mostraram-se incapazes de emitir fluorescência. Fato semelhante já havia sido verificado em resultados prévios quando outro componente do complexo Mre11,

ScaA^{NBS1} fusionado com GFP foi colocado sobre o controle de seu promotor endógeno evidenciando que a baixa expressão dessas proteínas na célula impede a utilização dessa estratégia (FAGUNDES et al., 2005).

A proteína Rad50 é parte do complexo heterotetramérico (Mre11)₂/(Rad50)₂ (HOPFNER et al., 2001). Em eucariotos superiores, mutações nos componentes do complexo Mre11 são letais (LUO et al., 1999; YAMAGUCHI-IWAI et al., 1999; ZHU et al., 2001; GORSKI et al., 2004) enquanto mutações hipomórficas nos genes NBS1 e MRE11 causam as síndromes de instabilidade cromossômicas NBS e ATLD (CARNEY et al., 1998; MATSUURA et al., 1998; VARON et al., 1998; STEWART et al., 1999). Uma mutação hipomórfica no gene RAD50 originalmente identificada em *S. cerevisiae* (ALANI; PADMORE; KLECKNER, 1990), resulta em letalidade embriônica e susceptibilidade a câncer em ratos (BENDER et al., 2002). Mutantes de RAD50 em *S. cerevisiae* estão bloqueados na fase inicial de progressão da meiose (KEENEY et al., 1997). A mutação *sld11444* em *A. nidulans* está localizada na região de dobradiça (“hinge”) no domínio CXXC da molécula Rad50, sendo que as duas linhagens mutantes *sld11444* e *sld1^{RAD50}::pyrG* apresentam o mesmo perfil de sensibilidade a agentes mutagênicos (exceto para HU) e o mesmo defeito no ponto de checagem intrafase S em resposta ao tratamento com o radiomimético bleomicina. A estrutura molecular da proteína Rad50 apresenta os segmentos com atividade ATPásica N e C terminal que se unem num domínio ATPásico do tipo ABC (“ATP binding cassette”) no final das estruturas antiparalelas “coiled-coil”. *In vivo*, a molécula de ATP é essencial para a atividade de Rad50, uma vez que inativações dos motifs Walker A e Walker B (responsáveis pela ligação do ATP) causam fenótipo nulo de Rad50 em *S. cerevisiae*. O Rad50 liga-se ao DNA de uma maneira ATP dependente e a ligação do ATP por ambos o domínio Walker proporciona a união dos dois cassetes ABC da proteína induzindo uma mudança conformacional. Uma vez os dois dímeros ABC unidos, a ligação ao DNA é favorecida sugerindo que o ATP controla a ligação ao DNA bem como os ciclos de união e disjunção dos cassetes ABC da proteína. Em todos os organismos estudados até agora, Mre11 e Rad50 formam um complexo estável que é co-purificado (HOPFNER et al., 2001). O domínio “ABC binding cassette” sozinho, entretanto, não é capaz de formar um complexo estável com Mre11, sugerindo que a estrutura antiparalela “coiled-coil” que varia de 400 a 900

aminoácidos em Rad50 contém o domínio de ligação ao seu parceiro protéico Mre11. Além disso, o domínio “ABC binding cassette” juntamente com a região de 40 aminoácidos adjacentes do segmento “coiled-coil” é capaz de dimerizar com Mre11. A região crítica para a ligação de Rad50 a Mre11 é um trecho hidrofóbico dentro de uma região altamente hidrofílica na porção “coiled-coil”. Essa região mínima é altamente conservada. Além disso, o domínio ABC-ATPase, juntamente com suas porções “coiled-coil” adjacentes definem um complexo compacto Mre11/Rad50-ATPase que sugere que a mudança conformacional ocasionada pela ligação de ATP a Rad50 diretamente controla a atividade exonucleásica inerente de Mre11 (HOPFNER et al., 2001). Embora tenham sido deletados apenas três aminoácidos do domínio conservado de ligação Rad50/Mre11 na linhagem *sld1*^{RAD50}::*pyrG*, isso foi suficiente para a alteração do fenótipo observado nesta linhagem. O domínio CXXC está localizado no meio das duas regiões “coiled-coil” da proteína as quais se dobram intramolecularmente. O domínio CXXC localizado então no ápice da proteína é um domínio de dimerização conhecido como “zinc-hook” por ser uma interação metal-dependente do íon zinco. A dimerização das moléculas de Rad50 ocorre *in vivo* e *in vitro* (HOPFNER; PUTNAM; TAINER, 2002; HOPFNER et al., 2002). O complexo Mre11 se liga às extremidades do DNA via proteína Mre11, com as extensões dos braços “coiled-coil” da proteína Rad50 emergindo dessa porção globular e interagindo com outro complexo Mre11 do outro lado da quebra de dupla fita através do domínio CXXC “zinc hook” (HOPFNER; PUTNAM; TAINER, 2002; HOPFNER et al., 2002; VAN DEN BOSCH et al., 2003). O domínio “Zn-hook” é essencial para a prevenção do dano ao cromossomo (LOBACHEV et al., 2004) uma vez que possibilita a manutenção das extremidades do DNA com quebra de dupla fita em proximidade física pela interação com uma mesma cromátide irmã e também inter-cromátides (HOPFNER; PUTNAM; TAINER, 2002). Essa ligação ao DNA facilita o reconhecimento de seqüências com homologia de pequenas ou grandes seqüências para que o reparo seja processado por NHEJ ou recombinação HR (LISBY; ROTHSTEIN, 2004). Além disso, a proximidade física das extremidades lesionadas do DNA é capaz de ativar a atividade de ligases para a promoção do reparo do esqueleto carbônico do DNA (D'AMOURS; JACKSON, 2002). Possivelmente a mutação *sld1444* observada em *A. nidulans*, no domínio CXXC interfere na dimerização da molécula de Rad50 e na aproximação das duas

extremidades do DNA que sofreram quebra de dupla fita e conseqüentemente impede a estabilização do complexo Mre11.

O complexo Mre11 é um elemento chave na resposta celular ao dano causado por DSB e está envolvido virtualmente em todos os processos do metabolismo do DNA incluindo: detecção de DSB, processamento das DSBs, recombinação homóloga e meiose, NHEJ, manutenção das extremidades dos telômeros e a ativação dos pontos de checagem celular em resposta a DSB (para revisões ver D'AMOURS; JACKSON, 2002; HOPFNER; PUTNAM; TAINER, 2002; VAN DEN BOSCH et al., 2003; ASSENMACHER; HOPFNER, 2004). Esse grande número de funções pode ser explicado pelo fato de que o complexo Mre11 combina várias atividades enzimáticas e não enzimáticas incluindo processamento das extremidades do DNA por sua atividade exonucleásica de fita simples e fita dupla, coesão do DNA, ativação das quinases apicais ATM e possivelmente ATR na presença de dano ao DNA (ASSENMACHER; HOPFNER, 2004; NAKADA; HIRANO, Y.; SUGIMOTO, 2004). Em especial, neste trabalho alguns aspectos do gene *sld1*^{RAD50} e do complexo Mre11 foram avaliados como: (i) a sensibilidade a agentes que causam dano ao DNA; (ii) a funcionalidade do ponto de checagem intrafase S em resposta ao estresse replicacional causado por HU e, (iii) interações genéticas do gene *sld1*^{RAD50}.

Estudos prévios mostraram que *mreA*^{MRE11} e *scaA*^{NBS1} estão envolvidos no ponto de checagem intrafase S (SEMIGHINI et al., 2003). A linhagem que possui a inativação do gene *sld1*^{RAD50} apresentou defeitos tanto no ensaio de mitose quanto no ensaio de viabilidade a 6 e 100 mM de HU. Além disso, não há atraso no ciclo celular quando germinantes das linhagens mutantes *sld1*^{RAD50} e *mreA*^{MRE11} foram expostas a BLEO. Existem pelo menos dois mecanismos que controlam o ponto de checagem intrafase S e conseqüentemente a mitose em *A. nidulans*. O primeiro deles é ativado durante a replicação ao DNA que é atrasada pela presença de concentrações de HU que não são suficientes para bloquear a replicação. Ele responde à taxa de replicação do DNA e inibe a mitose via fosforilação inibitória de NimX^{CDC2}. Se a replicação do DNA é totalmente bloqueada por altas concentrações de HU, o segundo ponto de checagem é ativado e envolve a proteína BimE^{APC1}, uma subunidade do complexo ubiquitina ligase chamado complexo promotor da anáfase (APC - “Anaphase Promoting Complex”) ou

ciclossomo. Essas informações foram obtidas a partir de estudos com duplo mutantes de *A. nidulans* contendo o gene *nimX*^{CDC2AF} [uma versão mutada na qual a tirosina 14 foi convertida em uma alanina (A) e a tirosina 15 numa fenilalanina (F)] e a mutação termosensível *bimE*^{APC1} (OSMANI; YE, et al., 1997). Tanto o mutante *nimX*^{CDC2AF} quanto *bimE*^{APC1} apresentaram uma capacidade limitada de promover a mitose quando a fase S estava bloqueada. Entretanto, em combinação esses dois mutantes permitiam que a célula entrasse em mitose prematura e letal antes que a replicação do DNA estivesse completa. Baseado neste fato foram investigadas possíveis interações genéticas entre *SldI*^{RAD50} e *BimE*^{APC1} através da construção do duplo mutante *sldI*^{RAD50::pyrG} *bimE*^{APC1}. Esses dois genes estão interagindo geneticamente baseado nas seguintes evidências: (i) a linhagem duplo mutante apresentou maior sensibilidade a HU que as correspondentes linhagens parentais, (ii) durante o ensaio de mitose (6 e 100 mM HU) o duplo mutante apresentou epistasia com as linhagens parentais, (iii) no ensaio de viabilidade (6 e 100mM de HU) ocorreu interação sinérgica entre *sldI*^{RAD50::pyrG} *bimE*^{APC1}, e (iv) a interação epistática também foi observada quando conídios quiescentes da linhagem duplo mutante foram expostos a luz UV. Conjuntamente esses dados podem indicar uma nova característica do complexo Mre11 em *A. nidulans*, isto é, uma interação com o gene *bimE*^{APC1}. Parece ser possível que *sldI*^{RAD50} seja necessário para o controle do ponto de checagem intrafase S do ciclo celular mediado pela quinase *NimX*^{CDC2}. Adicionalmente, essa interação pode revelar uma relação concreta entre o dano ao DNA causado por quebra de dupla fita e o “spindle pole checkpoint”. Lobachev et al. (2004) demonstraram que o complexo Mre11 é necessário *in vivo* para manter unidas as duas extremidades dos cromossomos que sofreram DSB até que o reparo se processe. Esses mesmos autores verificaram que a mutação no domínio “Zn-hook” CXXC resultou em dispersão das extremidades do DNA rompido em cerca de 10 a 20% das células. Dessa forma, além de manter unidas as extremidades dos cromossomos com DSB, o complexo Mre11 neutraliza as forças derivadas no “spindle pole checkpoint”, as quais poderiam ser destrutivas na presença de cromossomos danificados (LOBACHEV et al., 2004).

Durante a mitose em células selvagens cujo DNA não foi danificado, as cromátides irmãs são separadas pelas forças tensoras das fibras do fuso mitóticos unidas ao centrômero, após a clivagem proteolítica da proteína coesina (UHLMANN,

2004). Esta coesão das cromátides irmãs é estabelecida por um complexo de coesão durante a replicação do DNA o qual persiste até a segregação cromossômica (HAERING; NASMYTH, 2003). Inúmeras proteínas identificadas em vários organismos são necessárias para manter tal coesão. Algumas dessas proteínas tais como Smc1, Smc3, Scc1 e Scc3 formam o complexo de coesão em *S. cerevisiae* (HAERING; NASMYTH, 2003). Dessa forma, o “spindle pole checkpoint” assegura alta fidelidade na transmissão dos cromossomos para as células filhas. De maneira geral, quando todas as cromátides irmãs encontram-se na posição bidirecional e seus respectivos cinetocoros estão sob tensão com as fibras do fuso na região equatorial da célula, a ubiquitina ligase, APC (BimE em *A. nidulans*) em associação com um de seus cofatores, a proteína Cdc20 (que leva a interação do APC com seu substrato) adiciona uma cadeia de poliubiquitina na molécula de securina. A proteína securina acredita-se bloquear o acesso ao sítio ativo de separase pela interação na sua região amino terminal fazendo com que esta permaneça inativa em associação com a securina (HAERING; NASMYTH, 2003). A degradação da proteína securina dessa forma ativa a proteína separase. Esta proteína em última instância então cliva um dos componentes do complexo de coesão, a proteína Scc1, destruindo dessa forma a coesão entre as cromátides irmãs, desencadeando assim a anáfase na célula em divisão. A clivagem de Scc1 pela separase é irreversível. As fibras do fuso então deslocam as cromátides nas direções opostas do pólo celular e como consequência cada célula filha recebe quantidade idêntica de informação genética (para uma revisão ver PETERS, 2002; YU, 2002). Um único cinetocoro não unido à fibra do fuso é suficiente para ativar o “spindle pole checkpoint”, dessa forma produzindo um efeito inibitório que se difunde na célula bloqueando a ação ubiquitina ligase de APC (YU, 2002). Em *S. cerevisiae* a inibição de APC ocorre via proteína Mad2 que se liga a Cdc20, um dos ativadores de APC, inibindo assim o complexo (YU, 2002). Dessa forma, é possível que a interação observada entre a linhagem inativada *sls1^{RAD50}::pyrG* e a linhagem mutante *bimE^{APC1}* reflita uma provável interação entre o complexo Mre11 e as forças motoras dependentes de microtúbulos através do “spindle pole checkpoint” o que parece não ter sido descrito até então.

O pareamento dos cromossomos durante a meiose é seguido pelo “crossing-over” e que em conjunto com o sistema de coesão entre as cromátides

irmãs permite o estabelecimento temporário de conexão entre os cromossomos homólogos. Esse evento permite que os cromossomos se alinhem em orientação aos pólos opostos da célula pelas fibras do fuso da meiose I (MOORE; ORR-WAEVER, 1998). A recombinação entre os cromossomos homólogos se inicia em pontos do genoma que são alvo da produção controlada de quebra de dupla fita por ação enzimática, os chamados “hot spots”, que ocorrem precocemente na prófase da meiose I, mais especificamente no estágio leptóteno. Nessa fase da meiose, o complexo Mre11 desempenha papel tanto na formação quanto no processamento das extremidades das DSB pela sua conhecida função exonucleolítica que inicia o processo de recombinação meiótica em *S. cerevisiae* (ALANI et al., 1990; CAO; ALANI; KLECKNER, 1990; JOHZUKA; OGAWA, 1995; NAIRZ; KELIN, 1997). Os mutantes do complexo Mre11 são defectivos na formação de quebra de dupla fita meiótica e na indução da recombinação homóloga em *S. cerevisiae* e *S. pombe* levando a ausência de esporos sexuais viáveis (AJIMURA; LEEM; OGAWA, 1993; TRAVASSOLI et al., 1995).

O gene *sld1*^{RAD50} mostrou estar envolvido na viabilidade dos ascósporos. Resultados prévios já haviam mostrado que os genes *mreA*^{MRE11} e *scaA*^{NBS1} estavam também envolvidos no programa meiótico em *A. nidulans* (SEMIGHINI et al., 2003). Os componentes do complexo Mre11 são sabidamente essenciais para a gametogênese (AJIMURA; LEEM; OGAWA, 1993; CHIN; VILLENEUVE, 2001; GALLEGRO et al., 2001; BUNDOCK; HOOYKAAS, 2002). Chin e Villeneuve (2001) demonstraram que o processo de recombinação meiótica em *Caenorhabditis elegans* é profundamente prejudicado e possivelmente eliminado na ausência da função de *mre11*. Essas conclusões estiveram baseadas na impossibilidade de se detectar citologicamente as estruturas chiasmata e geneticamente os eventos de recombinação por “crossing-over”. Gallego et al. (2001) mostraram que mutantes de homozigotos de Rad50 para a inserção de T-DNA em *Arabidopsis thaliana* apresentaram fenótipo de esterilidade. Bundock e Hooykaas (2002) da mesma forma demonstraram que mutantes de *mre11* homozigotos para a inserção de T-DNA não produziam pólen em *A. thaliana*. Além disso, a gametogênese em *A. thaliana* estava prejudicada no mutante Rad50 tanto em plantas masculinas quanto femininas. Além disso, as observações citológicas da meiose em plantas masculinas evidenciaram que na ausência da proteína AtRad50,

os cromossomos homólogos não formavam sinapse que normalmente ocorre no estágio zigóteno. Adicionalmente, a mutação de AtRad50 levou a destruição dos cromossomos durante a meiose (BLEUYARD; GALLEGO; WHITE, 2004). Gereck e Zolan (2000) demonstraram que em *Coprinus cinereus* mutantes de *mre11* apresentaram atraso na formação do corpo de frutificação e vários defeitos durante a meiose. Nesse mutante, a condensação da cromatina no estágio paquíteno esteve prejudicada e embora algumas células meióticas pudessem atingir condensação na metáfase I, a progressão da meiose não foi observada. Adicionalmente, esse mutante apresentou também defeitos na formação de sinapse. Por analogia das funções das proteínas do complexo Mre11 em leveduras, *C. cinereus*, *C. elegans* e *A. thaliana* na recombinação meiótica, pode-se sugerir que a participação do complexo Mre11 de *A. nidulans* na meiose pode se situar “downstream” do passo inicial que promove o processamento das extremidades das quebras de dupla fita induzidas no processo, gerando assim substrato para o estágio de invasão das cromátides irmãs durante a recombinação homóloga (AJIMURA; LEEM; OGAWA, 1993; NAIRZ; KELIN, 1997; USUI et al., 1998; CHIN; VILLENEUVE, 2001).

Módulo 4.2: Isolamento e caracterização fenotípica do mutante $\Delta atmA^{ATM}$ em *A. nidulans*

MALAVAZI et al., Regulation of hyphal morphogenesis and the DNA damage response by the *Aspergillus nidulans* ATM homologue, AtmA. **Genetics**, v. 173, p. 99-109, 2006.

Como mencionado anteriormente, o reparo da quebra de dupla fita é um processo essencial para a sobrevivência celular. A maquinaria de reparo é um sistema que requer a ação de inúmeras proteínas e complexos protéicos que monitoram a presença de dano (sensores) e transduzem o sinal de sua presença a proteínas efetoras propriamente ditas. A resposta à quebra de dupla fita requer claramente a presença da proteína ATM em todos os eucariotos. A proteína ATM, mutada na síndrome de instabilidade cromossômica autossômica recessiva Ataxia Telangiectasia, é uma das proteínas quinases apicais transdutoras de sinal na resposta ao dano. ATM age em ação coordenada e por vezes redundante com outra importante quinase apical, a ATR. Recentemente, mutações no gene ATR têm sido associadas à Síndrome de Seckel (DRISCOLL et al., 2003). Em *A. nidulans* foi isolada uma linhagem onde cerca de 70% da ORF do gene *uvsB*^{ATR} esta deletada (HOFMAN; HARRIS, 2000). A partir dessa linhagem foi verificado o papel dessa proteína na resposta celular ao dano ao DNA e sua extensa interação com o complexo Mre11 através da proteína *scaA*^{NBS1} (HOFMAN; HARRIS, 2000; FAGUNDES et al., 2004; FAGUNDES et al., 2005). Diante do importante papel da proteína UvsB^{ATR}, e buscando o início da caracterização fenotípica do ortólogo ATM em *A. nidulans*, foi construída uma linhagem onde este gene está inativado tendo sido realizada uma caracterização funcional desse mutante.

4.2.1. A clonagem e a inativação do gene *atmA*^{ATM} de *A. nidulans*

A conclusão do sequenciamento do genoma do fungo *A. nidulans* (<<http://www.genome.wi.mit.edu/annotation/fungi/aspergillus/>>; GALAGAN et al., 2005) proporcionou facilidades do sentido de tornar possível estudos sistemáticos que utilizem este fungo como modelo para o estudo do reparo ao dano ao DNA. Recentemente, a partir do banco de dados do projeto genoma de *A. nidulans*, Goldman e Kafer (2004) realizaram uma compilação dos genes envolvidos em reparo ao DNA neste organismo. Nesta lista, foram identificados os homólogos ATM e ATR, o primeiro denominado a partir deste trabalho *atmA* (AN0038.2), e o segundo previamente caracterizado *uvsB*^{ATR} (AN6975.2), devido a sua capacidade de complementar a mutação *uvsB110* (HOFMAN; HARRIS, 2000). Além destes, foram identificados outros dois membros da família PI-3 kinase (“phosphatidyl inositide 3-kinase”) sendo eles AN5982.1 e AN8000.1. Curiosamente, *A. nidulans* não

apresenta um homólogo para o gene DNA-PKcs, a subunidade catalítica da proteína quinase dependente de DNA, a qual está envolvida no reparo por NHEJ de DSB em ação com o heterodímero KU70/80. A Figura 12 mostra uma comparação entre os principais domínios das quatro proteínas codificadas por esses genes. Os genes AN5982.2 e AN8000.2 codificam respectivamente os homólogos das proteínas TOR2 de *S. cerevisiae* (e-value=0.0; 47% identidade e 66% de similaridade) e TRA1 de *S. cerevisiae* (uma histona acetiltransferase cujo possível ortólogo em humanos é a proteína TRAP; e-value=0.0; 37% identidade e 56% similaridade).

Figura 12: Domínios comuns e tamanhos dos membros da família PI 3K (“phosphoinositide 3-kinase”) no fungo filamentoso *A. nidulans*. O número de resíduos está indicado em cada proteína. Esta família compreende 4 proteínas: AN0038.2; AN6975.2; AN5982.2 e AN8000.2 as quais apresentam 3 domínios: FAT, FATC e PI3K. Os dois primeiros domínios apresentam função não bem estabelecida e o terceiro abriga o sítio catalítico dessas proteínas quinases ativas (para revisão ver SHILOH, 2003).

O gene *atmA*^{ATM} apresenta nove íntrons de 51, 55, 55, 285, 114, 46, 43, 47 e 65 pb, compreendidos entre os nucleotídeos 83-133, 177-231, 1594-1648, 1960-2244, 2530-2643, 6503-6548, 6940-6982, 8051-8097 e 9054-9123 respectivamente. A fase aberta de leitura do gene *atmA*^{ATM} apresenta 8.382 pb e codifica uma proteína predita de 2.793 aminoácidos com 30% de identidade e 48% de similaridade com a *ATM* humana, e-value de 4e-137.

Para a caracterização do gene *atmA*^{ATM} uma deleção interna do gene foi gerada. A região deletada compreendeu 2418 pb (806 aminoácidos), na região compreendida entre os nucleotídeos 5214 e 7632, o que culminou com a deleção de parte do éxon 6, a totalidade dos éxons 7 e 8 e parte do éxon 9 que apresentam originalmente 3859, 391, 1068 e 961 pb, respectivamente. Essa estratégia levou a completa deleção do domínio FAT (595 resíduos) da proteína. Esse domínio está compreendido entre os nucleotídeos 5214 e 6999 (aminoácidos 1738-2333). Além disso, foram deletados 109 dos 276 resíduos do sítio catalítico da proteína (PI3Kc), o qual está compreendido entre os resíduos 2435 a 2711 (7305-8133 pb). Dessa forma, cerca de 30% da ORF da *atmA*^{ATM} está ausente nesse mutante.

Para a produção do cassete de deleção foi utilizada a técnica “PCR-mediated” (KUWAYAMA et al., 2002). Foram amplificados 2000 pb na região 5’ “upstream” ao nucleotídeo +5214 (seqüência genômica) e 750 pb na região 3’ “downstream” ao nucleotídeo +7632 (seqüência genômica), como mostrado na Figura 13A. O gene *zeo-pyrG* de *A. fumigatus* (amplificado a partir do plasmídeo pCDA21) foi utilizado como marca de seleção. O fragmento resultante da PCR de fusão dos três fragmentos isolados (5167 pb) foi transformado na linhagem selvagem GR5 que carrega a mutação *pyrG89* e os transformantes foram testados para a independência de uridina e uracila. A transformação do cassete rendeu cerca de 130 transformantes que foram pré-selecionados para sensibilidade a 25 e 50 µM de CPT. O DNA genômico de 25 candidatos que cresceram em meio YAG e apresentaram sensibilidade a CPT foi extraído para comprovação da substituição alélica do gene *atmA*^{ATM} por análise de Southern blot. A integração homóloga do cassete de deleção no locus *atmA*^{ATM} aconteceu em vários candidatos e um deles foi selecionado para a caracterização fenotípica neste trabalho, o qual foi denominado IM69 ($\Delta atmA$), como mostrado na Figura 13B.

Figura 13: Construção da linhagem $\Delta atmA^{ATM}$. **(A)** Estrutura do gene $atmA^{ATM}$ identificando a região de 2418 pb deletada na linhagem IM69 e obtenção do cassete de deleção pela técnica “PCR-mediated”. Os sítios de *KpnI* estão assinalados na Figura **(B)** Análise por Southern blot da linhagem selvagem (GR5) e $\Delta atmA^{ATM}$ (IM69). O DNA genômico foi extraído e clivado com a enzima *KpnI*; uma região interna de 1963 pb foi utilizada como sonda. Esse fragmento reconhece uma única banda de aproximadamente 9,0 Kb na linhagem selvagem. Na linhagem $\Delta atmA^{ATM}$, a presença de um sítio de *KpnI* na posição 894 do gene *zeo-pyrG* leva ao reconhecimento de uma única banda de 1,6 Kb indicando a integração homóloga do cassete de deleção.

Foram realizados experimentos de RT-PCR, os quais verificaram a ausência de transcritos do gene $atmA^{ATM}$ “upstream” a região deletada nessa linhagem como mostra a Figura 14. A transcrição reversa foi realizada a partir do RNA total (30 μ g) da linhagem selvagem e da linhagem $\Delta atmA^{ATM}$, ambas tratadas por 30 minutos com CPT para o enriquecimento dos transcritos relacionados ao reparo do dano ao DNA. Para as reações de RT-PCR foram utilizados dois primers diferentes. Na primeira reação, utilizou-se o primer ATM2, o qual marca o início da região deletada no mutante (posição +5214 pb) para propiciar o enriquecimento dos transcritos do gene $atmA$ unicamente, e, na segunda utilizou-se oligo dTV. O transcrito do gene $atmA$ parece ser pouco abundante, pois a reação apresentou amplificação apenas no cDNA controle da linhagem selvagem obtido a partir do primer ATM2 (Figura 14).

Figura 14: Experimento de RT-PCR para o gene *atmA*^{ATM} na linhagem IM69. As RT-PCRs foram realizadas utilizando como molde os cDNAs obtidos nas condições descritas (ver texto para detalhes) utilizando-se os primers ATM0 (5'-TCGAGTGATCAATCAAGC-3') ("forward"), localizado na posição 2761pb da sequência genômica de *atmA* e ATM2 ("reverse") gerando um produto de 2454 pb. **1:** cDNA da linhagem selvagem obtido a partir do RNA isolado com o primer *atmA* específico, ATM2; **2:** cDNA da linhagem $\Delta atmA$ amplificado a partir do RNA isolado com o primer *atmA* específico ATM2; **3:** cDNA da linhagem selvagem amplificado a partir do RNA total isolado com oligo dTV; **4:** cDNA da linhagem $\Delta atmA$ amplificado a partir do RNA isolado com oligo dTV; **5:** DNA genômico da linhagem selvagem; **6:** DNA genômico da linhagem $\Delta atmA$; **M** marcador de peso molecular λ *Pst* I.

4.2.2. Caracterização fenotípica da linhagem IM69 ($\Delta atmA$ ^{ATM})

4.2.2.1. Papel do gene *atmA*^{ATM} na resposta celular ao dano ao DNA

O papel da ATM na transdução do sinal durante a resposta celular ao dano ao DNA é fundamental para a efetivação do reparo. Na ausência de função da ATM, os alvos de fosforilação conhecidos dessa proteína não serão ativados, ou alternativamente em alguns casos podem ser fosforilados com proteínas que tenham papel redundante a ATM, como é o caso da ATR (ABRAHAM, 2001). Dessa forma, o envolvimento do gene *atmA*^{ATM} na resposta ao dano ao DNA foi inicialmente testado verificando-se o efeito de vários agentes mutagênicos sobre o crescimento da linhagem $\Delta atmA$ ^{ATM}. Foi observada uma clara sensibilidade desta linhagem a droga CPT e BLEO e em menor extensão a MMS (Figura 15). A sensibilidade dessa linhagem a BLEO pode refletir o conhecido papel da *atmA*^{ATM} na transdução do sinal a partir de dano causado por radiação ionizante em células de mamíferos (ABRAHAM, 2001). Recentemente, foi verificado que a linhagem $\Delta atmA$ ^{ATM} também mostra sensibilidade a concentrações maiores de 4NQO (0,1 μ g/ml), (dados não apresentados).

Figura 15: Sensibilidade do mutante $\Delta atmA^{ATM}$ a drogas que causam dano ao DNA. As linhagens foram crescidas por 72 horas a 37°C na presença e na ausência de 4NQO, BLEO, HU, MMS e CPT.

Além disso, conídios germinantes da linhagem $\Delta atmA^{ATM}$ exibiram um perfil ligeiramente aumentado de sensibilidade à radiação UV em comparação a linhagem selvagem, enquanto conídios quiescentes apresentaram perfil de sensibilidade equivalente ao da linhagem selvagem (Figura 32).

4.2.2.2. Participação do gene $atmA^{ATM}$ no ponto de checagem intrafase S e G2/M

A participação da AtmA no ponto de checagem intrafase S foi também verificada. Os resultados obtidos no ensaio de mitose (Tabela 10) mostram que a linhagem $\Delta atmA^{ATM}$ claramente progride no ciclo celular na presença de HU, mostrando dessa forma seu defeito no bloqueio intrafase S tanto a 6, como a 100 mM de HU ($p < 0,05$) evidenciando assim o papel de $atmA$ nesse ponto de checagem. Interessantemente, o defeito na linhagem $\Delta atmA^{ATM}$ é mais exacerbado que aquele observado para linhagem $\Delta uvsB^{ATR}$ como demonstrado por Fagundes et al. (2004). Como uma segunda abordagem para a compreensão das bases da sensibilidade ao dano ao DNA no mutante $\Delta atmA^{ATM}$, o comportamento deste em relação ao ponto de checagem G2/M e da entrada em mitose também foi avaliado. Para isso, foi utilizada a mutação condicional $nimA5$ (G2 específica) para sincronizar as células na fase G2 na temperatura restritiva (para detalhes ver seção 3.4.24.4). Inicialmente, foi construída uma linhagem duplo mutante $nimA5 \Delta atmA^{ATM}$. Testes preliminares indicaram que a mutação $nimA5$ não interferia no crescimento do mutante $\Delta atmA$. A

adição de MMS ao meio de cultura das células *nimA5 atmA⁺* bloqueadas em G2 visivelmente fez com que ocorresse um atraso na entrada em mitose (Figura 16A). Por outro lado, a adição de MMS nas células *nimA5 ΔatmA* bloqueadas em G2 não causou o mesmo atraso na entrada em mitose (Figura 16B). Esses resultados claramente sugerem o envolvimento do gene *atmA^{ATM}* no ponto de checagem G2/M em *A. nidulans*.

Figura 16: O gene *atmA^{ATM}* é necessário para a funcionalidade do ponto de checagem G2/M. O índice de cromossomos em mitose (% CMI) foi determinado para as linhagens A781 (*nimA5*) (A) e para a linhagem IM69-221 (*nimA5 ΔatmA^{ATM}*) (B). Conídios foram incubados em meio contendo 0,0025% de MMS após a liberação do bloqueio em G2. Os gráficos mostram média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes com 100 germinantes avaliados em cada um.

4.2.2.3. A inativação do gene *atmA^{ATM}* leva ao fenótipo RDS e a ausência de fosforilação de *scaA^{NBS1}*

Como discutido anteriormente, as células AT são incapazes de bloquear transitoriamente a maquinaria da síntese *de novo* de DNA após a exposição dessas células a radiação ionizante, uma característica chamada de

síntese de DNA radioresistente (RDS). Assim, o mutante $\Delta atmA^{ATM}$ foi testado quanto ao fenótipo RDS após a exposição ao radiomimético BLEO. A exemplo do que foi observado para os mutantes $sld1^{RAD50::pyrG}$, $mreA^{MRE11::pyr4}$ (Figura 9), a linhagem $\Delta atmA^{ATM}$ também não apresentou atraso na divisão celular, indicando que a exposição a BLEO não bloqueia a síntese de DNA quando a função do gene $\Delta atmA^{ATM}$ está comprometida como mostrado na Figura 17.

Figura 17: Fenótipo da síntese de DNA radioresistente (RDS) da linhagem $\Delta atmA^{ATM}$. A linhagem mutante (B) não apresentou atraso na progressão do ciclo celular após exposição a BLEO em relação a linhagem selvagem (A).

Outra importante função da ATM é a fosforilação da proteína p95/NBS1 (nibrina) no resíduo 343 de serina *in vitro* e *in vivo* logo após radiação ionizante (LIM et al., 2000; WU et al., 2000; ZHAO et al., 2000; GATEI et al., 2000). Dessa forma, o próximo passo foi analisar a capacidade dos extratos protéicos brutos da linhagem selvagem e do mutante $\Delta atmA^{ATM}$ de fosforilar o ortólogo de *NBS1* em *A. nidulans*, ScaA. A análise densitométrica da razão da intensidade (sinal radioativo/ScaA) aumentou de acordo com o tempo de incubação do micélio com a droga CPT, variando de 0,8 (unidades arbitrárias) no tempo 15 minutos de incubação a 7,6 no tempo 120 minutos (Figura 18A). Por outro lado, o mesmo experimento conduzido com o extrato bruto da linhagem mutante $\Delta atmA$ não apresentou fosforilação de ScaA^{NBS1}. A razão da intensidade do sinal foi baixa (em torno de 0,3) e permaneceu constante de 5 a 120 minutos de incubação (Figura 18B). A intensidade do sinal radioativo obtido mostrou-se cerca de 35 vezes maior na linhagem selvagem em relação à linhagem mutante no tempo 120 minutos de incubação com CPT. Um controle negativo de fosforilação (KD; “kinase dead”) foi também realizado utilizando-

se um extrato protéico da linhagem selvagem (incubado por 30 minutos com CPT) inativado por 10 minutos a 100°C para inativação de AtmA. Esses resultados conjuntamente indicam que a AtmA apresenta funções similares à de seu homólogo ATM em humanos.

Figura 18: Ensaio de fosforilação *in vitro* da proteína ScaA^{NBS1} pelos extratos brutos da linhagem selvagem GR5 (**A**) e da linhagem $\Delta atmA$ (**B**). Os extratos foram preparados e os ensaios de fosforilação realizados como descrito em materiais e métodos. Depois da reação de fosforilação, a proteína ScaA^{NBS1} foi precipitada com a resina Ni-NTA super flow (Quiagen). Géis SDS-PAGE foram corados com Comassie blue (A e B painéis superiores), secos e expostos em filmes fotográficos (B e C painéis inferiores). Os gráficos (A e B) representam a razão normalizada das intensidades obtidas através da análise densitométrica das imagens do gel corado pelo Comassie em relação ao sinal obtido no filme auto-radiográfico (unidades arbitrárias). Um controle negativo de fosforilação foi realizado fervendo-se os extratos brutos das linhagens a 100°C por 10 minutos e chamado de KD (“kinase dead”).

4.2.2.4. A localização subcelular da proteína AtmA

Durante a resposta celular ao dano ao DNA a quinase apical ATM é descrita como presente no foco nuclear de reparo em todos os organismos estudados. Alguns estudos ainda controversos mostram que em células de mamíferos, uma porção encontra-se no citoplasma (BROWN et al., 1997; LAKIN et al., 1996; WATTERS et al., 1997). A fim de investigar a localização celular de AtmA

durante o dano ao DNA, foi construída uma linhagem em que esta proteína foi fusionada com o promotor induzível do gene da álcool desidrogenase (*alcA*) de *A. nidulans*. A expressão de proteínas sob o controle do promotor *alcA* pode ser reprimida em meio contendo glicose, induzida em meio contendo glicerol e superinduzida na presença de glicerol e etanol (2%) ou treonina (100 mM).

A linhagem *alcA::gfp::atmA* (IM69-1) apresenta fenótipo idêntico àquele da linhagem $\Delta atmA$ (sensibilidade a CPT quando em condições de repressão) e fenótipo igual ao da linhagem selvagem quando em condições de indução indicando que a proteína de fusão *gfp::atmA* é completamente ativa *in vivo* (Figura 19).

Figura 19: Fenótipo do crescimento radial dos mutantes $\Delta atmA$ e *alcA::gfp::atmA*. Repressão em YUU (glicose 4%) e indução em MM glicerol (2%). As linhagens foram crescidas por 72 horas a 37°C.

Para a localização de *atmA* nos germinantes, conídios da linhagem *alcA::gfp::atmA* foram crescidos em condições de indução (MM glicerol + etanol 2%) na presença e na ausência de 2 μ g/ml de fleomicina (2 horas de tratamento) para indução do dano ao DNA e do foco nuclear. Na ausência de droga, uma marcação bastante sutil foi observada no núcleo dos germinantes. Por outro lado, a fluorescência no núcleo dos germinantes tratados com fleomicina pode ser vista claramente (Figura 20). Esse resultado mais uma vez enfatiza a função de AtmA na resposta ao dano ao DNA, isto é, na presença de quebra de dupla fita, induzindo o foco de localização nuclear, como observado em células de mamíferos e levedura.

Figura 20: Localização subcelular da proteína AtmA. **(A)** Germinantes crescidos em MM glicerol+ etanol. **(B)** Germinantes crescidos em MM glicerol + etanol tratados com 2 µg/ml de fleomicina por 2 horas. Barras 10 µm.

4.2.2.5. O papel do gene *atmA*^{ATM} no ponto de checagem de septação

Em *A. nidulans* a presença de dano ao DNA na célula inibe a formação de septo através da modulação da atividade da proteína NimX^{CDC2} (HARRIS; KRAUS, 1998; DE SOUZA et al., 1999). A exposição crônica de hifas pré-divisionais ao dano ao DNA leva ao aumento da atividade de Anka^{WEE1} proteína quinase levando a inativação de CDK1 (NimX^{CDC2}/ciclinaB) mediada pela fosforilação inibitória da tirosina 15 de NimX^{CDC2} (KRAUS; HARRIS, 2001) que previne a septação ainda que a divisão nuclear ocorra (HARRIS; KRAUS, 1998). Normalmente a formação do primeiro septo nos germinantes de *A. nidulans* ocorre após a terceira

divisão nuclear, ocasião em que o aumento do volume citoplasmático passa a diluir um inibidor da septação (HARRIS; MORRELL; HAMER, 1994). Notavelmente, o bloqueio da septação mediante a presença de dano ao DNA requer a função da proteína UvsB^{ATR} (HARRIS; KRAUS, 1998) de modo que esses autores propuseram que UvsB^{ATR} pode ser responsável pela modulação da atividade da NimX^{CDC2} através de dois mecanismos. Um deles via fosforilação da tirosina 15 inibindo NimX^{CDC2} proteína quinase e outro via a modulação da atividade de ciclina(s) que se associam com NimX^{CDC2} para controlar a septação. Diante do conhecido papel de UvsB^{ATR} durante a septação, a influência do gene *atmA*^{ATM} na citocinese foi investigada através da determinação do percentual de germinantes septados da linhagem selvagem e $\Delta atmA$ após 16 horas de crescimento a 30°C, na presença e na ausência de 0,0025% de MMS. A septação de germinantes com mais de 8 núcleos e/ou com mais de 45 μ m de comprimento foi analisada, pois este é o tamanho celular crítico que deve ser atingido para que ocorra a formação do primeiro septo em *A. nidulans* (WOLKOW; HARRIS; HAMER, 1996). Como esperado, a exposição prolongada a MMS reduziu os valores de septação em hifas da linhagem selvagem (Figura 21). Entretanto, diferentemente do que ocorre nos mutantes *uvsB*^{ATR} (HARRIS; KRAUS, 1998; HOFMANN; HARRIS, 2000), não ocorre formação de septo no mutante $\Delta atmA$ ^{ATM}. Ao contrário, a inibição da septação foi ainda mais intensa, sugerindo que AtmA^{ATM} não desempenha papel direto no bloqueio da formação de septo sob ativação da reposta celular ao dano ao DNA.

Figura 21: Análise da septação dos germinantes na linhagem selvagem e $\Delta atmA$ ^{ATM}. O percentual de septação foi determinado para os germinantes com mais de 8 núcleos e/ou mais de 45 μ m de comprimento após 16 horas de crescimento a 30°C na presença e na ausência de 0,0025% de MMS. Cada coluna representa a análise de 100 germinantes em dois experimentos independentes.

4.2.2.6. Participação do gene *atmA*^{ATM} no programa meiótico em *A. nidulans*

Como descrito anteriormente (seção 4.1.3.4), a análise do ciclo sexual e da ascosporigênese em *A. nidulans* fornece informações sobre o programa meiótico da célula. Assim, foram analisados os cleistotécios produzidos a partir da autofertilização da linhagem $\Delta atmA$ e do cruzamento desta com uma linhagem selvagem de auxotrofia contrastante, no caso, R21. Com os cleistotécios obtidos foram analisados os parâmetros: de viabilidade dos cleistotécios, do número de ascosporo no interior dos cleistotécios e de viabilidade dos ascosporos segundo a metodologia descrita por Semighini et al. (2003). A Tabela 9 mostra o sumário dos dados obtidos. Enquanto 100% dos cleistotécios recuperados do autocruzamento da linhagem selvagem GR5 foram viáveis, 100% dos cleistotécios obtidos do autocruzamento da linhagem $\Delta atmA$ foram inviáveis. A quantidade de ascosporos por cleistotécios resultantes do autocruzamento da linhagem $\Delta atmA$ foi menor que aquela resultante da linhagem selvagem. A contagem de três cleistotécios de cada autocruzamento indicou que aqueles derivados da linhagem selvagem apresentavam em média $3,3 \pm 0,1 \times 10^5$ ascosporos por cleistotécio dos quais 75,6% eram viáveis. Por outro lado, os cleistotécios derivados da autofertilização da linhagem $\Delta atmA$ apresentam cerca de 15 vezes menos ascosporos ($1.19 \pm 0.79 \times 10^4$) sendo que 0% eram viáveis. Tais resultados indicam que na ausência do gene *atmA* o processo meiótico está prejudicado. Durante o cruzamento da linhagem $\Delta atmA$ com a linhagem selvagem, embora sejam formados os esporos sexuais, estes se apresentam menos viáveis (69%) e em menor número. A exemplo do que acontece para os genes *mreA*^{MRE11}, *scaA*^{NBS1} e *sldI*^{RAD50} (SEMIGHINI et al., 2003 e Tabela 8), o gene *atmA* de *A. nidulans* é essencial para o processo de ascosporigênese e para o programa meiótico da célula. A presença de uma cópia mutada de *atmA* ainda é capaz de manter fertilidade, embora essa taxa tenha sido reduzida indicando que a inativação do gene *atmA* é recessiva.

Tabela 9: Papel do gene *atmA*^{ATM} no processo de gametogênese em *A. nidulans*

	Autofertilização		Cruzamento
	<i>atmA</i> ⁺ ^a (GR5)	Δ <i>atmA</i> ^b (IM69)	<i>atmA</i> ⁺ ^c x Δ <i>atmA</i>
Viabilidade dos Cleistotécios (%) ^d	100	0	47
Rendimento dos ascosporos ^e	3,3±0,1 x 10 ⁵	1,2±0,79 x 10 ⁴	3.13±1.87 x 10 ⁴
Viabilidade dos ascosporos ^f	75.6±5.0	0	69.0±11.0

^a Linhagem GR5^b Linhagem GR5 foi utilizada para a deleção^c Linhagem R21^d Número de cleistotécios contendo ascosporo viáveis dividido pelo número total de cleistotécios analisados^e Valores representam o número médio de ascosporo estimados pela análise de três cleistotécios. Para a autofertilização da linhagem Δ *atmA*, o conteúdo total de 50 cleistotécios foi examinado em microscopia para a presença de ascosporo^f Valores representam a media do percentual de ascosporo que apresentaram tubo germinativo após 8 horas de incubação a 37°C, 200 rpm em meio completo. Vinte cleistotécios foram analisados em cada experimento.

4.2.2.7. O papel do gene *atmA*^{ATM} na formação do eixo polarizado de crescimento

Durante a análise dos germinantes da linhagem Δ *atmA*^{ATM}, uma das características mais importantes observadas foi a presença de alterações morfológicas mesmo quando estes eram cultivados em condições normais, isto é, na ausência de dano exógeno ao DNA e em meio completo como será mostrado a seguir.

Inicialmente, foi verificada a ocorrência de alterações da morfologia das estruturas aéreas do mutante. A análise da estrutura dos conidióforos na linhagem mutante mostrou que os esporos assexuais e as vesículas apresentavam-se maiores do que aqueles da linhagem selvagem crescidas em meio completo ou meio sintético (aproximadamente o dobro e o triplo do tamanho respectivamente) como pode ser observado na Figura 22 (setas claras e escuras). Além disso, os conídios mostraram-se mais facilmente destacáveis do conidióforo. Adicionalmente, parece não ser possível observar as estruturas de fiálides e metulas, que são claramente visíveis nos conidióforos da linhagem selvagem (Figura 22, setas duplas escura e clara respectivamente) indicando que essas estruturas possam ser atrofiadas ou mesmo ausentes no mutante Δ *atmA*^{ATM}. As metulas e as fiálides são estruturas altamente polarizadas que servem como sustentáculo dos conídios. Resultados

semelhantes foram observados por Virag et al (2007) quando os genes *modA*^{CDC42} e *racA*^{RAC1} foram inativados. *CDC42* e *RAC1* são proteínas chave que coordenam a organização e o posicionamento da maquinaria morfogênica para permitir a formação e manutenção do eixo de crescimento polarizado (o homólogo *racA*^{RAC1} foi um dos genes reprimidos no mutante $\Delta atmA$ nos experimentos de microarray; ver seção 4.3.3). A ausência dessas estruturas indica também falha no estabelecimento do eixo de crescimento polarizado na linhagem mutante como será mostrado a seguir.

Figura 22: Morfologia dos conidióforos do mutante $\Delta atmA^{ATM}$. Linhagem selvagem em meio completo (1A e 1B); $\Delta atmA$ em meio completo (2); linhagem selvagem em meio mínimo (3); linhagem $\Delta atmA$ em meio mínimo (4A e 4B). Setas claras e escuras indicam respectivamente a diferença de tamanho das vesículas e dos conídios na linhagem mutante em relação a linhagem selvagem. Setas duplas claras e escuras indicam respectivamente a presença de metulas e fiálides na linhagem selvagem. Barras 5 μ m.

Em *A. nidulans*, os esporos assexuais apresentam um único núcleo estacionado em G1 (BERGEN; MORRIS, 1983). Durante o processo de germinação, ocorre um breve período de expansão isotrópica, que ocorre pela deposição de

novas camadas de parede celular em todas as direções, e o intumescimento do conídio. Posteriormente segue-se um estado de formação de um eixo estável de crescimento polarizado e emissão do tubo germinativo. Estes eventos levam a formação das hifas, células multinucleadas que crescem unicamente por extensão apical (MOMANY, 2002). Entretanto, proteínas chaves que atuam na definição posicional de sítios para o crescimento polarizado não foram ainda completamente identificadas em *A. nidulans* (HARRIS; MOMANY, 2004). Em meio de cultura padrão rico em glicose (YG), conídios da linhagem $\Delta atmA^{ATM}$ produziram germinantes com cinética de crescimento polarizado de crescimento comparável à da linhagem selvagem, porém com aumentada cinética de divisão nuclear. No entanto, as hifas resultantes apresentaram padrões morfológicos de crescimento em “zig-zag” e/ou encurvadas (Figura 23), sugerindo a presença de defeitos na regulação do crescimento hifal dependente de microtúbulos. Em concordância com essas observações, o padrão normal bipolar de emissão do tubo germinativo foi abolido no mutante $\Delta atmA^{ATM}$. Enquanto mais de 90% dos germinantes da linhagem selvagem produziam o segundo tubo germinativo diametralmente oposto ao primeiro, menos de 40% dos germinantes da linhagem mutante apresentaram o mesmo padrão (Figura 23H). Observações prévias (HARRIS, 1999) sugerem que o padrão bipolar requer a função de um citoesqueleto intacto, o qual presumivelmente transporta proteínas chaves aos sítios de polarização recém iniciados. O padrão de crescimento da linhagem selvagem leva a formação de colônias miceliais cujas bordas consistem de hifas bem espaçadas entre si e que crescem orientadas para a periferia da colônia de maneira linear e ordenada. Por outro lado, na linhagem $\Delta atmA^{ATM}$, as bordas das colônias são extremamente desorganizadas contendo hifas que entre si apresentam um crescimento randômico e desorientado em relação ao centro da colônia (Figura 23F e G).

Quando crescidos em meio mínimo sintético contendo glicerol (MM-glicerol), os germinantes da linhagem $\Delta atmA^{ATM}$ apresentaram um pronunciado defeito no estabelecimento do tubo germinativo. Ao invés de emitirem o tubo germinativo, os germinantes continuaram a crescer isotopicamente de maneira a produzir grandes células multinucleadas (Figura 23E). Visando quantificar o defeito de polarização no mutante, foi realizado um ensaio para a determinação percentual das células que emitiram tubo germinativo após liberação do bloqueio com HU

(Figura 24). O crescimento polarizado é uma das características mais peculiares do crescimento das células fúngicas, tanto em de células de levedura ou de fungos filamentosos (HARRIS, 1999). A forma mais conveniente de se verificar o crescimento polarizado do esporo é a presença do tubo germinativo. Embora alguns experimentos relatem que a polarização das moléculas de actina do citoesqueleto ocorra primariamente à emissão do tubo germinativo, este evento não pode ser detectado convenientemente nas condições de cultura utilizadas no experimento. Dessa forma, um esporo é classificado como polarizado microscopicamente pela presença do tubo germinativo. Uma vez que os esporos de *A. nidulans* apresentam uma morfologia esférica, o tubo germinativo pode ser facilmente detectado pela presença de pequenas protuberâncias na superfície do conídio corado com DAPI e calcoflúor (HARRIS, 1999). A Figura 24 mostra uma diminuição percentual da emissão do tubo germinativo de até 50% no mutante $\Delta atmA^{ATM}$ em relação a linhagem selvagem.

Os conídios intumescidos da linhagem $\Delta atmA^{ATM}$ apresentam um maior número de núcleos em relação a linhagem selvagem para um mesmo período de crescimento (Figura 25). A cinética de polarização para o mutante $\Delta atmA^{ATM}$ além de confirmar o grande atraso no crescimento polarizado, mostrou uma descontrolada cinética de divisão nuclear. Germinantes da linhagem selvagem apresentaram cerca de 5 a 8 núcleos após 6 horas de germinação e mais de 16 núcleos somente após 8 horas de crescimento. Por outro lado, a linhagem $\Delta atmA^{ATM}$ apresentou em média cerca de 16 núcleos já com 6 horas de incubação e mais de 32 núcleos com 8 horas de crescimento. Dessa forma, existe um período de crescimento isotrópico e intumescimento do esporo seguido por várias divisões nucleares. Porém, a polarização acontece tardiamente, seis a sete divisões nucleares pelo menos, ou seja, quando existem mais de 32 núcleos na célula. Esses resultados novamente sugerem que a $AtmA^{ATM}$ pode desempenhar um papel no recrutamento da maquinaria morfogenética para os sítios de polarização.

Figura 23: Defeitos morfológicos relacionados ao crescimento polarizado no mutante $\Delta atmA^{ATM}$. (A e B) hifas da linhagem selvagem crescida em YG (A) ou MM+Glicerol (B). (C, D e E) mutante $\Delta atmA^{ATM}$ crescido em meio YG (C e D) ou MM+Glicerol (E). As hifas em padrão “zig-zag” e curvadas estão mostradas em C e D e a falha no estabelecimento do crescimento polarizado em E com a presença de células esféricas e multinucleadas características. (F e G) Hifas da linhagem selvagem (F) e $\Delta atmA^{ATM}$ (G) crescidas sobre a superfície de uma placa de YAG. A linhagem selvagem apresenta o crescimento característico radial de forma linear para fora da colônia enquanto a linhagem mutante frequentemente apresenta hifas curvadas e voltadas para o interior da colônia. (H) Padrão de germinação dos conídios da linhagem selvagem e $\Delta atmA^{ATM}$. Os esporos foram germinados em YG por 11 horas. Esporos que apresentavam dois tubos germinativos foram classificados em padrões como mostrado no esquema (da esquerda pra direita): “bipolar” (com ângulo de 180°), “quartopolar” (com ângulo de 90°) ou “randômico”. N = 200 germinantes. Barras indicam 10 μ m.

Figura 24: Percentual de células com crescimento polarizado em germinantes do mutante $\Delta atmA^{ATM}$ após liberação do bloqueio com HU. Conídios da linhagem $\Delta atmA$ foram inoculados em meio completo acrescido de 50 mM de HU para o bloqueio as células na fase S do ciclo celular. Após 5 horas de incubação, os germinantes foram lavados e incubados em meio de cultura para liberação do bloqueio. Amostras foram retiradas a cada 30 minutos e coradas com DAPI e calcoflúor para determinação do percentual de células que emitiram tubo germinativo.

Figura 25: Perfil de divisão nuclear no mutante $\Delta atmA^{ATM}$. Conídios das linhagens selvagem e $\Delta atmA^{ATM}$ foram germinados a 37°C por diferentes tempos em meio completo YG, fixados e corados com DAPI e calcoflúor.

Diante da morfologia nuclear anormal observada na linhagem $\Delta atmA^{ATM}$ foram realizados experimentos para identificar se ocorria dano ao DNA de forma constitutiva nesse mutante durante a divisão nuclear que poderiam se refletir na morfologia observada na Figura 25. A metodologia de TUNEL (“terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling”), que permite verificar a extensão da fragmentação do DNA em células individuais, (GAVRIELI; SHERMAN; BEN-SASSON, 1992; GORCZYCA; GONG; DARZYNKIEWICZ, 1993) foi utilizada e os produtos de DNA clivados observados pela incorporação de dUTP

conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC-dUTP). A Figura 26 mostra os germinantes da linhagem selvagem e $\Delta atmA^{ATM}$ crescidos em meio completo (YG) e meio mínimo (MM). Como esperado, a marcação observada para a linhagem selvagem foi pouco evidente. Por outro lado ela foi bastante acentuada nos núcleos da linhagem $\Delta atmA^{ATM}$. Esses resultados sugerem que existe extensiva fragmentação do DNA na linhagem mutante, a qual interessantemente acontece mesmo na ausência de dano ao DNA exógeno.

Figura 26: Presença de fragmentação do DNA constitutiva em germinantes da linhagem $\Delta atmA^{ATM}$. O DNA fragmentado foi visualizado através da reação da desoxinucleotidiltransferase pela incorporação de nucleotídeos (dUTP) conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (ensaio TUNEL). Conídios da linhagem selvagem e $\Delta atmA^{ATM}$ foram germinados sobre lamínulas em meio completo (YG) e meio mínimo (MM) por 12 horas a 30°C. Os germinantes foram fixados e núcleos e parede celular corados com Hoeschst 33258 e calcoflúor respectivamente. As imagens representam a máxima projeção de uma série de seções z (1 μ m) obtidas com microscopia de varredura confocal a laser nos seguintes comprimentos de onda: 405nm para Hoeschst 33258 e calcoflúor; e 488 nm para FITC. Barras indicam 10 μ m.

Os padrões anormais de crescimento em meio rico e a falha no estabelecimento do eixo de crescimento polarizado exacerbada em meio mínimo ocorrem apesar da divisão nuclear e crescimento celular aparentemente normais. Dessa forma foi idealizado um experimento que permitia quantificar a capacidade das células da linhagem mutante $\Delta atmA^{ATM}$ de manter um eixo estável de crescimento polarizado das hifas. Este ensaio está baseado na ação do agente citocalasina A (CA). CA liga-se na extremidade positiva dos filamentos de actina e bloqueia sua elongação (COOPER; HAUSMAN, 2004). Quando incubadas na presença de 2 $\mu\text{g/ml}$ de CA por uma hora, as extremidades das hifas intumescem de maneira isotrópica (Figura 27A). Quando a droga CA é retirada e o crescimento permitido em meio de cultura isento de CA, o crescimento polarizado continua. Em 94% das hifas da linhagem selvagem testada ($n=300$, dois experimentos independentes) o crescimento continua a partir do eixo de polarização original (Figura 27A). Esses resultados indicam que mesmo perante a perda detectável dos filamentos de actina, a maquinaria morfogenética é mantida nos sítios de polarização por pelo menos uma hora. Entretanto, após a retirada da CA na linhagem $\Delta atmA^{ATM}$, o crescimento polarizado não prossegue a partir do eixo original. Ao invés disso, 79% das hifas testadas ($n=300$, dois experimentos independentes), um novo eixo de crescimento é estabelecido na região sub-apical na extremidade da hifa, produzindo dessa forma um novo ramo de crescimento lateral (Figura 27B). Além disso, 16% das hifas da linhagem $\Delta atmA^{ATM}$ mostraram-se incapazes de reassumir o crescimento, o que nunca foi observado em hifas de uma linhagem selvagem tratada com CA. Esses resultados implicam que a maquinaria morfogenética não se apresenta estavelmente localizada na extremidade das hifas em crescimento na linhagem mutante $\Delta atmA^{ATM}$. Desse modo, pode-se inferir que estes resultados refletem a falha da linhagem mutante em identificar pontos de crescimento na extremidade das hifas, ou mesmo a perda desses pontos de sinalização impedindo a continuidade de crescimento polarizado.

Figura 27: Falha no restabelecimento do eixo polarizado de crescimento no mutante $\Delta atmA^{ATM}$ no ensaio com citocalasina A. As hifas foram incubadas com 2 $\mu\text{g/ml}$ de citocalasina A (CA) por uma hora para prejudicar o crescimento polarizado pela despolimerização dos filamentos de acina e provocar intumescimento nas extremidades das hifas (setas escuras). Após a retirada da droga e continuidade do crescimento em meio isento de CA, a linhagem selvagem reassume o crescimento a partir do eixo de crescimento original (A, seta clara). Por outro lado, o mutante $\Delta atmA^{ATM}$ estabelece novos eixos de crescimento que se tornam ramos laterais de crescimento (B, seta clara).

4.2.2.8. Papel do gene $atmA^{ATM}$ na organização dos microtúbulos nas extremidades das hifas

Em *A. nidulans* a aglutinina de germe de trigo (WGA) conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC-WGA) pode ser usada para detectar sítios ativos de deposição de parede celular (HARRIS, HOFMANN, 1999). Na concentração de 5 $\mu\text{g/ml}$, a marcação com FITC-WGA é exclusivamente restrita às extremidades das hifas na linhagem selvagem GR5 (Figura 28A). Por outro lado, no mutante $\Delta atmA^{ATM}$ a marcação por FITC-WGA acontece no corpo dos esporos além da extremidade das hifas (Figura 28B). Essa observação sugere que o “pool” de vesículas que transporta os precursores para a biosíntese de parede celular está inapropriadamente localizado dentro do corpo dos esporos. Condizente com essa informação, as hifas da linhagem selvagem crescidas na presença de benomil, um agente que causa despolarização de microtúbulos apresentam o mesmo padrão de marcação com FITC-WGA ao redor do corpo do esporo (Figura 28C). Dessa forma, pode-se propor que um defeito no transporte de vesículas dependentes de microtúbulos seja o responsável pela alterada deposição de parede celular no mutante $\Delta atmA$.

As características fenotípicas anormais do mutante $\Delta atmA^{ATM}$ relacionadas ao crescimento polarizado e restrito na extremidade das hifas sugerem que a organização dos microtúbulos apresenta-se irregular nessa linhagem. Assim, para obter mais informações a esse respeito, foi utilizada microscopia de fluorescência com anticorpo anti β -tubulina para verificar a organização dos microtúbulos citoplasmáticos no mutante $\Delta atmA^{ATM}$. Quando visualizados com microscopia de varredura confocal a laser, as hifas provenientes da linhagem selvagem apresentaram um arranjo longitudinal dos microtúbulos citoplasmáticos os quais terminavam num discreto sítio bem organizado exatamente na extremidade da hifa (Figura 29A e D). Por outro lado, no mutante $\Delta atmA^{ATM}$ o arranjo dos microtúbulos não terminava num sítio discreto, mas ao invés disso apareciam descontínuos e arranjados de maneira randômica. A quantificação dessa característica fenotípica revelou que 51% das hifas provenientes do mutante $\Delta atmA^{ATM}$ apresentavam os microtúbulos citoplasmáticos que eram defectivos em convergir num sítio discreto na extremidade das hifas, em comparação com apenas 9,5% para as hifas da linhagem selvagem ($n=100$; dois experimentos independentes). Essas observações sugerem que os defeitos morfogenéticos encontrado no mutante $\Delta atmA^{ATM}$ refletem a sua incapacidade em distinguir um sítio cortical de convergência dos microtúbulos.

Figura 28: O crescimento dos germinantes não está restrito às extremidades das hifas no mutante $\Delta atmA^{ATM}$. As hifas foram marcadas com aglutinina de gérmen de trigo (WGA) que se localiza em sítios ativos de deposição de parede celular. O crescimento ocorre a partir da extremidade das hifas na linhagem selvagem (A, seta). No mutante $\Delta atmA$ (B), o crescimento é também observado no corpo do esporo (seta). Na linhagem selvagem tratada com benomil, um despolimerizante de microtúbulos, o crescimento é altamente visualizado no corpo do esporo, como nas células do mutante (C). Barras 10 μ m.

Figura 29: Microtúbulos não convergem na extremidade das hifas no mutante $\Delta atmA^{ATM}$. Hifas da linhagem selvagem (A-D) e da linhagem mutante (E-H) foram analisadas por microscopia de varredura confocal a laser Hoechst 33258; 488 nm para FITC. (A e E) Núcleos visualizados usando Hoechst 33258. (B e F) Microtúbulos visualizados com anticorpo anti β -tubulina marcados com FITC. (C e G) Imagens sobrepostas. (D e H) Imagens DIC. (I e J) Imagem aproximada da extremidade da hifa evidenciando as diferenças na organização dos microtúbulos. Barras 5 μ m.

4.2.2.9. Possíveis interações genéticas do gene *atmA*^{ATM}, e outros componentes do sistema de reparo

As possíveis interações genéticas entre os genes *atmA*^{ATM} e os genes *bimE*^{APC1}, *sldI*^{RAD50}, *mreA*^{MRE11}, *ankA*^{WEE1} e *npkA* foram investigadas neste trabalho. Para esse propósito, foram construídas as linhagens duplo mutantes $\Delta atmA^{ATM}$ $\Delta npkA$ (IM69-3); $\Delta atmA^{ATM}$ *ankA*^{WEE1} (IM69-35); $\Delta atmA^{ATM}$ *bimE*^{APC1} (IM69-228); $\Delta atmA^{ATM}$ *mreA*^{MRE11}::*pyr4* (IM69-RE); $\Delta atmA^{ATM}$ *sldI*^{RAD50}::*pyrG* (IM69-25). Num primeiro grupo de experimentos, as interações entre esses genes foram verificadas pela comparação da sensibilidade aos agentes mutagênicos testados (Figura 30). Quando um duplo mutante apresentava maior sensibilidade a uma droga mutagênica em comparação às duas linhagens parentais, a relação entre as duas mutações era determinada como sinérgica, sugerindo que os dois genes estão atuando em vias paralelas de reparo. Por outro lado, quando um duplo mutante apresentava sensibilidade comparável àquela de seus dois parentais isoladamente, as relações foram ditas epistáticas, sugerindo que os dois genes de reparo ao dano ao DNA estavam atuando em uma mesma via.

O duplo mutante $\Delta atmA^{ATM}$ $\Delta npkA$ apresentou maior sensibilidade a HU e 4NQO enquanto a linhagem $\Delta atmA^{ATM}$ *ankA*^{WEE1} foi mais sensível a MMS, 4NQO e CPT em relação às linhagens parentais (Figura 30 e 31A-D). Esses resultados indicam que os genes *atmA*^{ATM} *ankA*^{WEE1} e *npkA* apresentam interação sinérgica entre si. Interessantemente, foi verificada uma relação epistática entre os genes *atmA*^{ATM}, *bimE*^{APC1} e *mreA*^{MRE11} na presença de HU, MMS, 4NQO e CPT (Figura 31 A-D) uma vez que o duplo mutante apresentou o mesmo perfil de crescimento que suas respectivas linhagens parentais (Figura 30).

Figura 30: Fenótipo do crescimento radial da linhagem $\Delta atmA^{ATM}$ e duplo mutantes na presença de dano ao DNA. As linhagens $\Delta atmA^{ATM} \Delta npkA$ (IM69-3); $\Delta atmA^{ATM} ankA^{WEE1}$ (IM69-35); $\Delta atmA^{ATM} bimE^{APC1}$ (IM69-228); $\Delta atmA^{ATM} mreA^{MRE11}::pyr4$ (IM69-RE) foram inoculadas em placas de meio completo acrescidos de suplementos na presença das drogas indicadas e incubadas por 72 horas a 30°C.

Figura 31: Percentual de inibição do crescimento radial da linhagem $atmA^{ATM}$ e duplo mutantes na presença de dano ao DNA. Conídios das linhagens $\Delta atmA^{ATM} \Delta npkA$ (IM69-3); $\Delta atmA^{ATM} ankA^{WEE1}$ (IM69-35); $\Delta atmA^{ATM} bimE^{APC1}$ (IM69-228); $\Delta atmA^{ATM} mreA^{MRE11::pyr4}$ (IM69-RE) foram inoculados em placas de meio completo na presença das drogas HU (A), MMS (B), 4-NQO (C) e CPT (D). O percentual de inibição do crescimento radial foi avaliado após 72 horas de incubação a 30°C. Os resultados mostrados indicam média $\pm$ desvio padrão de quatro experimentos independentes.

Figura 31: Continuação.

Como segunda abordagem para a identificação de interações genéticas do gene *atmA*^{ATM}, foi verificado o estado de funcionalidade do ponto de checagem da replicação do DNA através do ensaio de mitose. Sabidamente, os mutantes *bimE*^{APC1}, $\Delta npkA$, *sldI*^{RAD50}::*pyrG* e *anka*^{WEE1} mostram defeito no ponto de checagem de replicação do DNA a 6 mM de HU (Tabela 6 e FAGUNDES et al., 2004). Dessa forma, durante o ensaio de mitose, foi verificada interação sinérgica entre os genes *anka*^{WEE1} e *atmA*^{ATM} tanto a 6 quanto a 100 mM de HU (Tabela 10). Além disso foi também verificada a supressão do defeito no bloqueio do ponto de checagem intrafase S no mutante $\Delta atmA$ ^{ATM} pelas mutações $\Delta sldI$ ^{RAD50}::*pyrG* (6 e 100 mM de HU), $\Delta npkA$ (6 mM HU) e *bimE* (6 mM HU).

Tabela 10: Ensaio de mitose da linhagem *atmA*^{ATM} e duplo mutantes

Linhagens	HU (mM) [§]		
	0	6	100
GR5 (wild type)	62,60 ± 2,9	10,40 ± 2,19	1,00 ± 0,00
IM69 (Δatm :: <i>pyrG</i>)	67,70 ± 2,50	31,33 ± 4,04 ^a	3,67 ± 0,58 ^a
A776 (<i>bimE</i> 7)	39,33 ± 2,52	21,67 ± 3,06 ^{a, b, f}	0,00 ± 0,00 ^{b, f}
MV3 ($\Delta npkA$)	67,00 ± 3,00	27,33 ± 3,21 ^{a, e}	2,67 ± 1,15
IM25 (<i>sldI</i> :: <i>pyrG</i>)	61,00 ± 2,16	23,50 ± 3,11 ^{a, b, d}	3,00 ± 0,82
APK35 (<i>anka</i>)	78,50 ± 4,51	31,50 ± 2,08 ^{a, c}	1,25 ± 0,50 ^{b, c}
IM69-25 (Δatm <i>sldI</i> :: <i>pyrG</i>)	61,50 ± 0,71	9,50 ± 3,54 ^b	0,00 ± 0,00 ^b
IM69-3 (Δatm $\Delta npkA$)	64,25 ± 4,35	7,25 ± 3,20 ^b	0,0 ± 0,00 ^b
IM69-228 (Δatm <i>bimE</i> 7)	56,67 ± 3,51	9,00 ± 1,00 ^b	4,00 ± 0,00 ^a
IM69-35 (Δatm <i>anka</i>)	69,00 ± 7,07	41,20 ± 4,09 ^a	13,00 ± 4,24 ^{a, b}

[§] O percentual dos germinantes que apresentavam dois ou mais núcleos após incubação com HU foi determinado como germinantes que romperam bloqueio de mitose. Os resultados representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes com 100 germinantes tendo sido analisados em cada um. Diferenças estatísticas foram verificadas pelo teste ANOVA fator único seguido, quando significantes, do teste Student Newman-Keuls de comparação múltipla. $p < 0,05$ foi considerado significativo.

^a Significativamente diferente da linhagem GR5 ($p < 0,001$).

^b Significativamente diferente da linhagem IM69 ($p < 0,03$).

^c Significativamente diferente da linhagem IM69-35 ($p < 0,001$).

^d Significativamente diferente da linhagem IM69-25 ($p < 0,001$).

^e Significativamente diferente da linhagem IM69-3 ($p < 0,001$).

^f Significativamente diferente da linhagem IM69-228 ($p < 0,001$).

O terceiro grupo de experimentos para classificar as interações genéticas do gene *atmA* foi verificada na presença de luz UV. A sensibilidade à luz UV foi testada em conídios quiescentes e germinantes das linhagens mutantes estudadas. O duplo $\Delta atmA^{ATM} ankA^{WEE1}$ apresentou maior sensibilidade que seus parentais quando a luz UV foi aplicada tanto em conídios germinantes como quiescentes (Figura 32A e B). A exemplo do que ocorreu nos experimentos de crescimento radial, foi novamente verificada interação epistática entre os genes *atmA*^{ATM} e *bimE*^{APC} quando conídios quiescentes foram irradiados com luz UV (Figura 32A). Conídios germinantes da linhagem duplo mutante $\Delta atmA^{ATM} \Delta npkA$ foram também mais sensíveis a luz UV que seus parentais (Figura 32B) indicando novamente que estes dois genes estão atuando em vias paralelas de reparo ao dano causado pela luz UV. Além disso, a mutação *sld*^{RAD50}::*pyrG* foi capaz de suprimir a sensibilidade dos conídios germinantes da linhagem $\Delta atmA^{ATM}$ isoladamente da mesma maneira observada no ensaio de mitose. Conjuntamente esses resultados indicam que os genes *atmA*^{ATM} e *ankA*^{WEE1} atuam em vias paralelas no reparo do dano ao DNA causado pela luz UV tanto em conídios quiescentes e germinantes. Por outro lado, os genes *atmA* e *npkA* atuam em vias paralelas somente no reparo e/ou monitoramento do dano causado em conídios germinantes.

sldI^{RAD50}::*pyrG* (IM25); $\Delta atmA^{ATM} \Delta npka$ (IM69-3); $\Delta atmA^{ATM} bimE$ (IM69-228); $\Delta atmA^{ATM} sldI^{RAD50}::*pyrG* (IM69-25); $\Delta atmA^{ATM} ankA^{WEE1}$ (IM69-35) e GR5 (linhagem selvagem) foi determinada como o percentual de colônias que cresceram nas placas irradiadas em relação ao controle. Conídios germinantes foram aqueles incubados por 4,5 horas a 30°C previamente à irradiação. Os resultados expressos são a média $\pm$ desvio padrão de pelo menos quatro experimentos independentes realizados em duplicata cada um. Diferenças estatísticas foram verificadas pelo teste ANOVA fator único seguido, quando significantes, do teste Student Newman-Keuls de comparação múltipla. $p < 0,05$ foi considerado significativo.$

4.2.2.10. Possíveis interações genéticas entre as quinases *atmA*^{ATM} e *uvsB*^{ATR}.

Como mencionado anteriormente na seção 1.2., as quinases *ATM* e *ATR* são cruciais para o estabelecimento da resposta ao dano ao DNA. Por esse motivo foi construído um duplo mutante condicional *alcA::atmA* com a mutação *uvsB101* para os estudos da função desses genes na resposta ao dano ao DNA e no crescimento polarizado em *A. nidulans*. Como primeira abordagem, foi verificado se os genes apresentam alguma função redundante no reparo ao dano ao DNA. A linhagem $\Delta atmA$ originalmente apresenta sensibilidade a CTP, BLEO e MMS como mostrado na Figura 15 e a 4NQO em altas concentrações. Dessa forma, a linhagem duplo mutante condicional e seus parentais foram crescidos na presença dessas drogas em meios de cultura que permitem a repressão (YUU), indução (MM + glicerol) e superexpressão (MM + glicerol + treonina) de *atmA*. A indução e a superexpressão de *atmA* foram capazes de suprimir parcialmente o fenótipo de sensibilidade a MMS das linhagens parentais como pode ser visto na Figura 33. Esse efeito não foi observado para outras drogas (dados não apresentados). Além disso, a perda de função de *atmA* leva a letalidade sintética quando combinada com a mutação *uvsB101*. (Figura 33A, primeira linha).

Figura 33: A superexpressão de *atmA*^{ATM} suprime parcialmente a sensibilidade a MMS do mutante $\Delta atmA$. Fenótipo do crescimento radial da linhagem $\Delta atmA$ e duplo mutante

uvrB101 alcA::atmA na presença de dano ao DNA. (A) YUU glicose 4% (repressão), (B) MM glicerol (indução) (C) MM glicerol + treonina 100 mM (superexpressão). As linhagens foram crescidas por 72 horas a 37°C.

Resultados prévios obtidos neste trabalho (ver seção 4.4.2.4) demonstraram que o mutante $\Delta uvrB^{ATR}$ apresenta sensibilidade a agentes que causam estresse oxidativo. Assim, a viabilidade dos mutantes após exposição ao peróxido de hidrogênio foi testada de acordo com metodologia previamente descrita (NOVENTA-JORDÃO et al., 1999). As linhagens *uvrB101* e $\Delta atmA$ apresentaram um perfil de sobrevivência semelhante com redução de cerca de 30 e 50% respectivamente em comparação à linhagem selvagem (Figura 34). Por outro lado o duplo mutante *uvrB101 alcA::atmA* apresentou viabilidade bastante diminuída indicando interação sinérgica entre esses genes com relação ao reparo ao dano causado por estresse oxidativo na célula.

Figura 34: Ensaio de viabilidade com peróxido de hidrogênio no duplo mutante *uvrB101 alcA::atmA*. Após incubação com peróxido de hidrogênio os conídios foram inoculados em YUU 4% glicose para repressão do gene *atmA*. * Significativamente diferente das outras linhagens analisadas, $p < 0,05$.

A partir desses resultados, os germinantes dessas linhagens foram corados com “nitro blue tetrazolium” (NBT). O reagente NBT precipita um sal de formazana azul/púrpura quando reduzido na presença de ânion superóxido. A precipitação cora as células evidenciando as áreas de maior concentração de radicais livres facilmente visualizáveis em microscopia ótica. Normalmente, o NBT cora a extremidade das hifas indicando que nas áreas de novo crescimento celular há um gradiente de radicais livres. Acredita-se inclusive que essas áreas sejam

sinalizadoras para o crescimento polarizado onde a maquinaria morfogenética de crescimento apical se posiciona como será discutido adiante. No mutante $\Delta atmA$ a localização de radicais livres na célula foi perturbada e a coloração aparece no corpo do germinante, e não somente na extremidade da hifa (Figura 35). Entretanto, no duplo mutante *alcA::atmA uvsB101* a marcação pelo NBT é mais intensa indicando um acúmulo maior de espécies ROS também em toda a extensão das células apresentando inclusive subáreas de maior coloração condizente com a morfologia anormal dos germinantes dessa linhagem (ver Figura 36).

Figura 35: Distribuição de radicais livres no mutante *uvsB101 alcA::atmA* pela coloração com NBT. Linhagem selvagem (A), $\Delta atmA$ (B), *uvsB101* (C), *uvsB101 alcA::atmA* (D). As células foram crescidas em YG+UU (glicose 4%) a 44°C por 14 horas. Barras 10 μm .

A seguir, a morfologia dos germinantes *alcA::atmA uvsB101* foi avaliada com mais detalhes. Foram observadas células maiores que os germinantes da linhagem selvagem e com morfologia de cromatina e cinética de divisão nuclear que se assemelha ao mutante $\Delta atmA$ (Figura 36, setas duplas). As células emitem múltiplos eixos de polarização que não obedecem ao padrão convencional bipolar, como mostrado na Figura 23. Essas formas estão assinaladas pelas setas simples na Figura 36 e não foram observadas na linhagem selvagem indicando que na linhagem duplo mutante, os germinantes perderam parte do controle da informação sobre as áreas de novo crescimento celular.

Figura 36: Fenótipo dos germinantes do mutante *uvsB101 alcA::atmA* verificado após 8 horas de crescimento em meio YG+UU (glicose 4%) a 37°C. A linhagem parental *uvsB101* foi suprimida na Figura pois não apresenta nenhum defeito durante o crescimento e se comporta estritamente como a linhagem selvagem. As setas simples indicam os múltiplos pontos de emissão de tubos germinativos na célula e as setas duplas indicam germinantes que guardam a característica de divisão e distribuição nuclear semelhante ao mutante $\Delta atmA$.

Durante o ensaio de polarização após liberação do bloqueio com HU, os germinantes da linhagem *alcA::atmA uvsB101* apresentaram padrões de polarização bastante anormais o que impediu a sua quantificação. A polarização desses germinantes foge da normalidade, pois embora ocorra a emissão de um tubo germinativo, este não apresenta morfologia convencional. Algumas células ao emitirem o tubo germinativo assemelham-se a células de levedura quando emitem o broto a partir da célula mãe. Além disso, a cromatina dessas células também

apresenta alteração morfológica uma vez que em alguns germinantes os núcleos apresentam-se fragmentados e o DNA apresenta-se “esticado” ao passo que o crescimento da hifa se processa (Figura 37 setas duplas). Essa característica morfológica do DNA na linhagem duplo mutante reafirma o papel das quinases AtmA e UvsB na sinalização e no reparo do dano ao DNA uma vez que a ausência desses dois genes pode levar a instabilidade genética e a anormalidade cromossômica.

Figura 37: Fenótipo dos germinantes no ensaio de polarização após liberação do bloqueio com HU do mutante *uvsB101 alcA::atmA*. A linhagem parental *uvsB101* foi suprimida na Figura pois, esta não apresenta nenhum defeito de polarização e se comporta estritamente como a linhagem selvagem. As setas indicam germinantes que apresentam um perfil de polarização do tipo “leveduriforme”. As setas duplas indicam as anormalidades na morfologia do DNA com aspecto de núcleo alongado e aparentemente fragmentado. Os conídios foram incubados por 5 horas em YG+UU (4% glicose) acrescido de 50 mM de HU. Após esse tempo os germinantes foram lavados incubados por adicionais 150 minutos em YUU (4% glicose) isento de droga

4.2.3. Discussão - O gene *atmA*^{ATM}, seu papel no reparo ao dano ao DNA e na formação do eixo estável de crescimento polarizado

ATM é uma serina-treonina quinase que sofre autofosforilação e subseqüentemente desencadeia uma cascata de transdução do sinal a qual envolve em última instância a fosforilação de inúmeros substratos (KASTAN; LIM, 2000; SHILOH, 2003). Como descrito anteriormente, este gene está mutado na síndrome de instabilidade cromossômica Ataxia Telangiectasia e é crucial para o início das vias de sinalização em células de mamíferos após a exposição a RI e outros agentes que causam DSB (SHILOH, 2003). Os portadores de AT apresentam anormalidade na manutenção dos telômeros e resposta prejudicada a RI incluindo morte celular, aumento de quebras cromossômicas, defeitos nos pontos de checagem do ciclo celular e aumento da predisposição ao câncer (SHILOH, 2003; MCKINNON, 2004). Clinicamente os portadores de AT apresentam falta de coordenação dos movimentos, ou seja, uma grande disfunção neuromotora (ataxia), geralmente associada à dilatação anormal dos vasos sanguíneos oculares (telangiectasia) e perda da função cerebelar (MCKINNON, 2004). Além do seu claro papel na sinalização do dano ao DNA, a atividade imunoreativa da ATM foi verificada na fração microssomal de fibroblastos (WATTERS et al., 1997). Kuljis et al. (1999) mostraram que ATM está presente no interior de endossomos levantando a hipótese de que a neurodegeneração observada em pacientes AT pode ser devido a distúrbios no tráfico citoplasmático. Adicionalmente foi verificado que ATM se liga a β -adaptina que é uma proteína mediadora envolvida no processo de endocitose mediada por moléculas de clatrina ("clathrin-coated pits"), novamente indicando que ATM apresenta funções relacionadas aos mecanismos de transporte de vesículas e/ou de proteínas dentro da célula (LIM et al., 1998). Ainda, foi verificado que a ATM está também presente no citoplasma de células neuronais cerebelares (células de Purkinje), e não no núcleo destas durante o desenvolvimento indicando uma função dessa proteína no citoplasma de neurônios do córtex cerebelar (OKA; TAKASHIMA, 1998).

Neste trabalho, o gene que codifica uma proteína quinase PIKK ("phosphoinositide-3-kinase-related") que corresponde ao homólogo *atmA*^{ATM} foi identificado e caracterizado e representa a primeira análise da ATM em fungos filamentosos. A exemplo de outras quinases ATM e de seu parálogo, ATR, essas

proteínas modulam a resposta celular ao dano ao DNA em células eucarióticas (SHILOH; KASTAN, 2001; MACKINNON, 2004), sendo que estas duas quinases apicais apresentam funções distintas e redundantes na regulação dessa resposta. Entretanto, este trabalho também fornece evidências de que *AtmA*^{ATM} apresenta um papel adicional, atuando na formação do eixo estável de crescimento polarizado nas hifas. Nesse contexto, *AtmA*^{ATM} pode compartilhar funções essenciais com seus homólogos presentes em células altamente polarizadas como, por exemplo, os neurônios, como será discutido adiante.

A exemplo do que acontece para os genes *mreA*^{MRE11}, *scaA*^{NBS1} e *sld1*^{RAD50} (SEMIGHINI et al., 2003 e este trabalho), o gene *atmA* de *A. nidulans* é essencial para o processo de ascosporigênese e para o programa meiótico da célula. A presença de uma cópia mutada de *atmA* ainda é capaz de manter fertilidade, embora essa taxa tenha sido reduzida indicando que a inativação do gene *atmA* é recessiva. Além disso, tem sido verificado que um dos fenótipos associados com mutações no gene da ATM em mamíferos é a anormalidade do processo de gametogênese de ratos machos e fêmeas (BARLOW et al., 1996; LAVIN; SHILOH, 1997). O mutante homozigoto (ATM -/-) em ratos, embora seja viável apresenta crescimento retardado e infertilidade (XU et al., 1996). A infertilidade dos ratos ATM -/- resulta de falha meiótica uma vez que a meiose está paralisada no estágio zigóteno/paquíteno da prófase I. Como consequência, verifica-se fragmentação cromossômica. Em *A. thaliana*, mutantes do gene ATM são parcialmente estéreis devido a fragmentação cromossômica durante a meiose (GARCIA et al., 2003).

Os resultados observados nesse trabalho demonstram que *AtmA*^{ATM} previne a entrada em mitose na presença de dano ao DNA durante as fases S e G2/M do ciclo celular. Em parte, isso pode explicar a sensibilidade a alguns agentes mutagênicos observada no mutante $\Delta atmA$ ^{ATM}, uma vez que esporos assexuais quiescentes (nos quais os pontos de checagem do ciclo celular são dispensáveis) apresentaram sensibilidade a alguns tipos de dano ao DNA semelhante ao da linhagem selvagem. Por outro lado, *AtmA*^{ATM} apresenta funções adicionais no reparo ao dano ao DNA. Como em outros eucariotos, uma dessas funções parece ser a regulação da atividade do complexo Mre11 (D'AMOURS; JACKSON, 2002). Notavelmente, *UvsB*^{ATR} regula tanto a expressão e a localização nuclear de

scaA^{NBS1} (FAGUNDES et al., 2005), enquanto *AtmA*^{ATM} controla os níveis de fosforilação dessa proteína. Essas características regulatórias distintas podem conferir as proteínas ATR e ATM funções específicas no complexo Mre11 em *A. nidulans*. Alternativamente, elas podem agir em conjunto para garantir que o complexo esteja plenamente ativo na presença de dano ao DNA. Dessa forma, uma análise mais detalhada das interações entre o complexo Mre11 e ambas as proteínas *UvsB*^{ATR} e *AtmA*^{ATM} poderia ser interessante para elucidar essas possibilidades. Em células de mamíferos os papéis de ATM e ATR durante a reposta ao dano ao DNA parecem ser definidos e com um certo grau de distinção de funções, o que ainda não é elucidado em *A. nidulans*.

Na maioria dos fenótipos investigados na seção onde se tratou das possíveis interações genéticas do gene *atmA*, foram observadas consistentes interações epistáticas entre os genes *atmA*^{ATM} e *bimE*^{APC1} e interações sinérgicas entre os genes *atmA*^{ATM} e *npkA* e *ankA*^{WEE1}. Novamente, a exemplo do que foi observado para as interações genéticas de *sld*^{RAD50}, só é possível especular acerca das bases moleculares destas interações. A interação entre *atmA*^{ATM} e *bimE*^{APC1} igualmente revela uma relação entre DSB e o ponto de checagem das fibras do fuso durante a mitose (“mitotic spindle checkpoint”), como discutido na seção 4.1.4. Recentemente, Tritarelli et al. (2004) mostraram que a *ATM* está envolvida na localização de p53 no centrôssomo durante a mitose e que a associação de p53 dependente de *ATM* no centrôssomo está estritamente ligada ao ponto de checagem pós mitótico em resposta ao rompimento das fibras do fuso. Dessa forma, é possível que a interação genética observada entre *atmA*^{ATM} e *bimE*^{APC1} reflita a interação entre esta proteína quinase e a ação dos microtúbulos durante o “spindle pole checkpoint”.

A progressão do ciclo celular está acoplada a ativação de ciclinas dependentes de quinase (CDKs) (PINES et al., 1999). ATM e ATR ativam respectivamente CHK2 e CHK1 que por sua vez regulam negativamente as quinases CDK1/ciclina B e CDK2/ciclina E, via fosforilação inibitória de Cdc25 fosfatase, dessa forma reforçando o sinal de bloqueio do ciclo celular em G2/M e G1/S respectivamente (NYBERG et al., 2002; MAUDE; ENDERS, 2005; NIIDA; NAKANISHI, 2006). A via de fosforilação ATR/CHK1 parece desempenhar um papel crítico na manutenção da estabilidade genômica, oferecendo uma explicação parcial

para a presença de mutações em CHK1 e para a superexpressão de *CDC25* fosfatase em alguns tipos de cânceres humanos o que sobrepõe a ação de *WEE1* proteína quinase tornando CDK1 constantemente ativo (BARTEK; LUKAS, 2001; NIIDA NAKANISHI, 2006). As interações sinérgicas entre os genes *atmA*^{ATM} e *npkA* e entre *atmA*^{ATM} e *anka*^{WEE1} podem refletir o fato de que eventos críticos envolvidos nos pontos de checagem do ciclo celular em resposta ao dano ao DNA estão desregulados e por isso não podem inibir a progressão do ciclo celular. Recentemente, Maude e Enders (2005) mostraram que inibidores de Cdk1/2 resultaram em efeitos díspares nas vias de CHK1 e CHK2. Quando a expressão de CHK1 é reduzida pelo tratamento com inibidores de Cdk1, ocorreu uma extensiva resposta ao dano ao DNA marcada pelo acúmulo das formas ativas de *ATM* e *CHK2*, bem como a presença de foco nuclear contendo substratos fosforilados de *ATM* e *ATR*, como a histona H2AX. Esses autores propõem um modelo no qual inibidores de Cdk podem mediar o dano ao DNA e potencialmente aumentar a eficácia de alguns tratamentos quimioterápicos contra o câncer. Dessa forma, esses resultados podem explicar o efeito sinérgico observado no duplo mutante $\Delta atmA^{ATM} anka^{WEE1}$. Além disso, é importante enfatizar também a interação sinérgica do gene *atmA*^{ATM} com a quinase relacionada a *cdc2 npkA*. *NpkA* parece ser um componente da via de sinalização de ATM/ATR uma vez que: (i) a expressão do gene *npkA* é dependente de *uvsB*^{ATR} na presença de CPT; (ii) a deleção do gene *npkA* parcialmente suprime a sensibilidade a HU dos mutantes *uvsB*^{ATR} e *uvsD*^{ATRIP}; e (iii) o duplo mutante $\Delta npkA anka^{WEE1}$ é mais sensível a genotoxinas que interferem na função da forquilha de replicação (FAGUNDES et al., 2004). Desse modo, a interação sinérgica entre *atmA*^{ATM} e $\Delta npkA$ indica que *NpkA* desempenha um papel mais amplo na resposta celular ao dano ao DNA em *A. nidulans*, interagindo não só com *uvsB*^{ATR} mas também com *atmA*^{ATM}.

UvsB^{ATR} inibe a formação de septo em hifas em estado de pré-divisão que foram expostas ao dano ao DNA em baixa intensidade (HARRIS; KRAUS, 1998). Esse efeito inibitório é dependente da fosforilação da tirosina 15 de *NimX*^{CDC2} pela quinase *AnkA*^{WEE1} que leva a inativação do MPF ("maturation promoting factor") (KRAUS; HARRIS, 2001). Entretanto, o mecanismo pelo qual *UvsB*^{ATR} influencia a fosforilação de *NimX*^{CDC2} ainda não é estabelecido. Ao contrário, *AtmA*^{ATM} parece não estar envolvido na inibição da septação. Na verdade, a mutação $\Delta atmA^{ATM}$

exacerba o bloqueio da septação nessa linhagem. Esse resultado pode simplesmente refletir um aumento na eficiência do sinal em resposta ao dano ao DNA causado pela perda de função de AtmA^{ATM}.

Neste trabalho, a observação de que AtmA^{ATM} era necessária para a formação do eixo estável de crescimento nos germinantes foi inesperada. Em leveduras, a função da ATM nunca havia sido correlacionada com o estabelecimento e/ou a manutenção da polaridade celular. Apenas em células de Purkinje em humanos e ratos, a ATM tem sido atrelada a funções relacionadas à morfogênese celular (BARLOW et al., 2000; KULJIS et al., 1999). Dessa forma, os resultados ora apresentados levantam a interessante possibilidade de que AtmA^{ATM} apresenta um papel único e até então não caracterizado na manutenção do eixo estável de polaridade celular, o qual é específico em células altamente polarizadas como os neurônios e as hifas fúngicas. Assim, pode ser proposto que a ausência da função da AtmA^{ATM} causa defeitos morfológicos que perturbam a diferenciação neuronal e por conseguinte contribuem para os sintomas observados na AT. Os resultados encontrados sugerem que AtmA^{ATM} é necessária para indicar as zonas de crescimento nas extremidades das hifas. Em fungos filamentosos, um cluster apical de vesículas e elementos de citoesqueleto chamado Spitzenkörper (ou polarissomo) desempenha um papel fundamental na definição dessas zonas de crescimento (para uma revisão ver, HARRIS et al., 2005; VIRAG: HARRIS, 2006b). Notavelmente, interações entre microtúbulos citoplasmáticos e o córtex celular parecem desempenhar um importante papel na manutenção do posicionamento do Spitzenkörper no interior das áreas de novo crescimento celular (KONZACK et al., 2005). Desse modo, fica possível propor que a fosforilação dependente de AtmA^{ATM} pode influenciar estas interações, auxiliando assim a definição de uma zona discreta para o recrutamento cortical dos microtúbulos no citoplasma. A ausência dessas zonas estabelecidas no mutante $\Delta atmA^{ATM}$ poderia levar às interações randômicas entre os microtúbulos e o córtex nas extremidades das hifas os quais por sua vez afetam o posicionamento do Spitzenkörper e a manutenção do eixo de crescimento polarizado. Quais proteínas poderiam ser alvos da regulação dependente da AtmA na extremidade das hifas? Candidatos em potencial incluem proteínas que se associam com as regiões de polaridade positiva de microtúbulos citoplasmáticos, tal como a dinactina, a qual tem sido sugerida como um possível alvo de fosforilação da

ATM (O'NEILL et al., 2000), ou proteínas como as kinesinas e a miosina (miosina V principalmente) as quais estão envolvidas no transporte de proteínas ("carga") dentro da célula. Uma dessas kinesinas, KipA, foi verificada atuando na regulação do posicionamento do Spitzenkörper em *A. nidulans* (KONZACK et al., 2005) e mostrou que sua localização é dependente de AtmA (Figura 50). Alternativamente, homólogos conhecidos de proteínas corticais de ancoramento de microtúbulos de *S. cerevisiae* ou *S. pombe* (por exemplo, Kar9, Tea1, Tea4) podem ser alvos de fosforilação da ATM. A classe de proteínas fúngicas β -adaptinas, cujos homólogos em mamíferos são conhecidos alvos da ATM (LIM et al., 1998) controlam o tráfico de proteínas chave que definem as zonas corticais para interação com os microtúbulos. De acordo com a busca no banco genômico de *A. nidulans*, existem três β -adaptinas (AN0165.2, AN3029.2 e AN5950.2). Recentemente foi isolada uma linhagem mutante na qual uma dessas β -adaptinas, (AN0165.2) está deletada (denominada IM-0165). Entretanto, resultados preliminares indicaram que este mutante parece não apresentar defeito com relação ao crescimento polarizado e emissão do tubo germinativo (dados não apresentados). Em última instância, abordagens utilizando proteômica que objetivem identificar parceiros protéicos da AtmA^{ATM} podem certamente revelar os alvos mais relevantes.

Módulo 4.3: Identificação de genes diferencialmente expressos na linhagem $\Delta atmA^{ATM}$ envolvidos na cinética de divisão nuclear acelerada e com o defeito de polarização no mutante

Malavazi et al. Transcriptome analysis of the *Aspergillus nidulans* AtmA (ATM, Ataxia-Telangiectasia) null mutant. Manuscrito submetido, **Molecular Microbiology**, Jun, 2007.

4.3.1. Uso da técnica de microarray para identificação de genes diferencialmente expressos no mutante $\Delta atmA^{ATM}$

Os resultados apresentados anteriormente neste trabalho mostraram desde as primeiras análises fenotípicas do mutante $\Delta atmA^{ATM}$ o seu acentuado defeito de polarização e sua acelerada cinética de divisão nuclear (para detalhes ver módulo 4.2). Os defeitos morfológicos observados no mutante $\Delta atmA^{ATM}$ são evidentes mesmo quando crescidos em condições normais, isto é, na ausência de dano ao DNA e em meio de cultura completo. Dessa forma, duas principais questões foram levantadas acerca desse mutante com relação ao seu comportamento fenotípico: (i) quais mudanças no perfil transcricional desse mutante levariam ao aumento da cinética de divisão nuclear e (ii) quais genes seriam responsáveis pelo bloqueio da polarização observada. Diante dessas perguntas, a verificação da mudança do perfil transcricional dessas células através de experimentos de microarray poderia proporcionar resultados que auxiliassem na identificação de genes e/ou vias metabólicas envolvidas nestes processos. Com a conclusão do sequenciamento do genoma de *A. nidulans* (GALAGAN et al., 2005) tornou-se possível a produção de lâminas de microarray contendo oligonucleotídeos de 70 pb cobrindo todo o genoma do organismo (para detalhes ver seção 3.4.11.6.). De posse destas lâminas foram, planejados dois experimentos diferentes para a hibridização dos microarrays no intuito de responder as duas questões propostas anteriormente, como será descrito a seguir.

4.3.2. Identificação de genes diferencialmente expressos no mutante $\Delta atmA^{ATM}$ durante o crescimento dos conídios

A fim de se obter RNA para as hibridizações de microarray, neste primeiro experimento, foi estabelecida uma cinética de crescimento de conídios nos primeiros períodos de germinação para que pudessem ser expressos os genes envolvidos na divisão celular anormal no mutante $\Delta atmA^{ATM}$ em comparação com a linhagem selvagem. Para tanto, 1×10^{10} conídios de ambas as linhagens foram crescidos em larga escala por 60, 90, 120 e 150 minutos em meio de cultura completo sob agitação (250 rpm). O RNA total dos germinantes foi extraído para cada ponto de crescimento. Com esse experimento, foi possível comprovar que o mutante $\Delta atmA^{ATM}$ apresentou um aumento na taxa de divisão nuclear, como verificado em resultados anteriores (seção 4.2.2.7.). A Tabela 11 mostra o sumário dos dados obtidos.

Tabela 11: Determinação do percentual de divisão nuclear para a linhagem $\Delta atmA^{ATM}$

Linhagens*	Divisão nuclear (%)		
	1 núcleo	2 núcleos	4 núcleos
wt 60 minutos	100	0	0
wt 90 minutos	98	2	0
wt 120 minutos	96	4	0
wt 150 minutos	95	5	0
$\Delta atmA^{ATM}$ 60 minutos	94	6	0
$\Delta atmA^{ATM}$ 90 minutos	93	7	0
$\Delta atmA^{ATM}$ 120 minutos	87	12	1
$\Delta atmA^{ATM}$ 150 minutos	83	15	2

*Conídios das linhagens selvagem (GR5) e $\Delta atmA^{ATM}$ (IM69) foram crescidos em meio completo a 37°C sob agitação (250 rpm). Amostras foram retiradas nos tempos indicados e as células foram fixadas e coradas com DAPI/calcoflúor. Os valores indicam o percentual de células que apresentam determinado número de núcleos em cada ponto experimental.

Os cDNAs marcados com Cy3 ou Cy5 de cada um dos pontos experimentais foi utilizado para hibridizar os microarrays utilizando o desenho experimental descrito na Figura 38.

Figura 38: Desenho experimental das hibridizações de microarray a partir de conídios crescidos por 60, 90 e 120 minutos. As hibridizações foram realizadas para cada tempo de crescimento dos conídios e consistiram de um par de hibridizações que combinava o RNA referência marcado com Cy3 (linhagem selvagem) ao RNA teste (mutante $\Delta atmA$), marcado com Cy5 e por uma segunda hibridização, que combinava o RNA referência marcado com Cy5 ao RNA teste, marcado com Cy3. Este par experimental era chamado de “Dye Swap Pair” (DSP). Cada DSP originava dois valores de intensidade para cada spot. O conjunto de dados experimentais era, portanto, constituído de 12 conjuntos de dados numéricos, obtidos de 6 hibridizações independentes.

O resultado destas hibridizações identificou 1034 genes modulados em pelo menos um ponto experimental na linhagem mutante em relação à linhagem selvagem. A Figura 39 mostra os genes com variação significativa, obtidos através da determinação de limites de corte dependentes da razão de intensidade de fluorescência das hibridizações ("intensity-dependent Z-scores"). A Figura mostra que o tempo 120 minutos apresentou o maior número de genes modulado durante o curso do experimento.

Figura 39: Distribuição gráfica dos genes modulados durante o experimento de crescimento dos conídios. Gráfico da razão da intensidade dos sinais versus o produto das intensidades onde $I(A)$ e $I(B)$ indicam a intensidade do sinal em cada canal de fluorescência (Cy3 e Cy5 respectivamente). Cada ponto indica um gene modulado com nível de confiança de 95%. As cores azul, vermelho e verde indicam os tempos 60, 90 e 120 minutos de crescimento respectivamente.

O perfil de expressão destes genes foi agrupado com auxílio do programa TMEV em 60 clusters usando o algoritmo aglomerativo "K-means" e o padrão de variação em cada cluster identificado pode ser visualizado na Figura 40.

Figura 40: Clusters de expressão gênica gerados pelo algoritmo aglomerativo “K-means” nas hibridizações de microarray (germinação dos conídios por 60, 90 e 120 minutos). Os 1034 genes modulados em pelo menos um ponto durante o crescimento da linhagem selvagem e da linhagem $\Delta atmA^{ATM}$ foram subdivididos em 60 clusters nos quais estão dispostos os grupos de genes com perfil de expressão semelhante. Os gráficos mostram a razão $\log_2$ Cy5/Cy3 (ordenadas) em relação ao tempo de crescimento (abscissas). Na Figura, os círculos indicam os clusters com maiores valores de repressão (cluster de números 25, 41, 42 e 43) e os quadrados indicam os clusters onde se observaram os maiores valores de indução na linhagem mutante (números 18, 28, 29, 49 e 53).

A análise destes dados permitiu identificar genes envolvidos em vários processos celulares, cuja modulação pode estar relacionada com as características fenotípicas do mutante como mostrado nas Tabelas 12 e 13. Essas Tabelas apresentam uma compilação dos genes mais relevantes diferencialmente modulados na linhagem mutante (razão $\log_2$ Cy5/Cy3 ≥ 1 ou ≤ -1). Os genes foram classificados em categorias funcionais (COG) (<www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>). Como pode ser observado na Tabela 12 foi verificada diminuição da expressão de genes envolvidos no metabolismo de ergosterol [como, por exemplo, AN11065.3 e AN3817.3 que codificam respectivamente para óxido esqualeno ergosterol ciclase e para 3-hidróxi, 3-metilglutaril-CoA (HMGCoA) redutase]; genes envolvidos em transdução do sinal e genes envolvidos na síntese do ácido fosfatídico (sinonímia 1,2-diacyl-sn-glicerol 3-fosfato ou fosfatidato) como por exemplo, AN7787.3 que codifica a enzima

“fosfatidilinositol transfer protein”. Como será mostrado mais adiante, outros genes dessas vias metabólicas foram também reprimidos no mutante $\Delta atmA^{ATM}$ nos experimentos de microarray que serão descritos na próxima seção (Tabela 17). Além disso, foi também observado aumento na expressão de genes envolvidos no controle do ciclo celular, divisão celular, partição cromossômica, metabolismo e transporte de nucleotídeos, metabolismo e transporte de carboidratos, replicação, recombinação e reparo. Interessantemente, nesta categoria de genes induzidos encontram-se os genes da via das pentoses fosfato (glicose 6-fosfato desidrogenase, 6-fosfogluconato desidrogenase, frutose- 1,6 bifosfato aldolase), metabolismo de nucleotídeos como por exemplo as duas subunidades da ribonucleotídeo redutase, e vários fatores de licenciamento da replicação do DNA como pode ser visto na Tabela 13.

Tabela 12: Genes reprimidos transcricionalmente no mutante $\Delta atmA$ de *A. nidulans* durante a germinação dos conídios por 60, 90 e 120 minutos

ORF	Número COG	Função
Estrutura de cromatina		
AN8717.3	COG3105	DNA-binding centromere protein B (CENP-B)
Transporte de lipídeos e metabolismo		
AN11065.3	COG0497	Oxidosqualene-lanosterol cyclase and related proteins
AN3817.3	COG2480	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase
AN0950.3	COG3750	Inositol phospholipid synthesis protein, Scs3p
Transcrição		
AN1984.3	COG1474	Transcription initiation factor TFIID, subunit BDF1
AN7011.3	COG1952	Transcription factor NF-X1, contains NFX-type Zn ²⁺ -binding and R3H domains
AN8803.3	COG2169	Zn-finger transcription factor
AN3810.3	COG2424	Protein involved in transcription start site selection
AN0719.3	COG3902	Histone acetyltransferase PCAF/SAGA, subunit SUPT3H/SPT3
AN7526.3	COG2773	Apoptosis antagonizing transcription factor/protein transport protein
Replicação, recombinação e reparo		
AN8794.3	COG0851	Single-stranded DNA-binding replication protein A (RPA), large (70 kD) subunit
AN7546.3	COG1275	PAB-dependent poly(A) ribonuclease, subunit PAN2
AN10955.3	COG2249	3'-5' exonuclease
Modificação pós traducional, “turn over” de proteínas e chaperonas		
AN6193.3	COG2004	Mitochondrial ATP-dependent protease PIM1/LON
AN5477.3	COG2628	Farnesyl cysteine-carboxyl methyltransferase
Função geral predita apenas		
AN0421.3	COG0110	RNA-binding protein (RRM superfamily)
AN2624.3	COG0254	Predicted transporter (major facilitator superfamily)
AN8122.3	COG0255	Synaptic vesicle transporter SVOP (major facilitator superfamily)
AN10114.3	COG0490	Transcription factor, contains HOX domain

ORF	Número COG	Função
AN2263.3	COG1424	Predicted GTP-binding protein MMR1
AN5782.3	COG1535	Predicted fumarylacetoacetate hydrolase
AN7064.3	COG1535	Predicted fumarylacetoacetate hydrolase
AN4292.3	COG2945	Predicted RNA-binding protein
AN11423.3	COG3552	FERM domain protein FRM-8
AN3415.3	COG3656	FOG: 7 transmembrane receptor
AN5449.3	COG3867	Sulfatase
AN4029.3	COG4246	Predicted DNA-binding protein, contains SAP domain
AN3713.3	COG4684	Uncharacterized conserved protein, contains C4-type Zn-finger
Função desconhecida		
AN3008.3	COG1426	FOG: RCC1 domain
AN5720.3	COG2913	Predicted membrane protein
AN1670.3	COG3017	Defense-related protein containing SCP domain
AN4296.3	COG3444	Uncharacterized conserved protein
AN3983.3	COG3594	FOG: Cadherin repeats
Mecanismos de transdução de sinal		
AN4257.3	COG1620	Inositol polyphosphate multikinase, component of the ARGR complex
AN7787.3	COG3668	Phosphatidylinositol transfer protein
AN5211.3	COG0230	Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase
AN9108.3	COG3514	Neurexin III-alpha
AN5011.3	COG3979	FGF receptor activating protein
AN6249.3	COG4019	Calcineurin-mediated signaling pathway inhibitor DSCR1
AN4689.3	COG0998	Synaptic vesicle protein EHS-1 and related EH domain proteins
Tráfego intracelular, secreção e transporte de vesículas		
AN10878.3	COG3103	Rab GTPase interacting factor, Golgi membrane protein
Estrutura nuclear		
AN8823.3	COG2992	Nucleolar GTPase/ATPase p130
Citoesqueleto		
AN7149.3	COG4462	WASP-interacting protein VRP1/WIP, contains WH2 domain

Tabela 13: Genes induzidos transcricionalmente no mutante $\Delta atmA$ de *A. nidulans* durante a germinação dos conídios por 60, 90 e 120 minutos

ORF	Número COG	Função
Controle do ciclo celular, divisão celular, partição cromossômica		
AN4597.3	COG0996	Structural maintenance of chromosome protein 4 (Condensin, subunit C)
AN7440.3	COG4563	Cell cycle-regulated histone H1-binding protein
AN6895.3	COG0987	DNA helicase PIF1/RRM3
AN6868.3	COG2687	Spindle pole body protein, contains UNC-84 domain
AN3941.3	COG3772	M-phase inducer phosphatase
AN6300.3	COG2035	Replication factor C, subunit RFC3
AN1016.3	COG0082	G-protein alpha subunit (small G protein superfamily)
Transporte de nucleotídeos e metabolismo		
AN4380.3	COG1112	Ribonucleotide reductase, alpha subunit
AN0067.3	COG1567	Ribonucleotide reductase, beta subunit
AN6856.3	COG2056	Equilibrative nucleoside transporter protein
AN4603.3	COG2584	Dihydroorotase and related enzymes
AN0271.3	COG3370	dUTPase
Transporte de carboidratos e metabolismo		
AN2981.3	COG0563	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase [§]
AN1246.3	COG1367	3-phosphoglycerate kinase
AN5604.3	COG1458	Fructose-1,6-bisphosphatase
AN4988.3	COG1616	Protein involved in Snf1 protein kinase complex assembly

ORF	Número COG	Função
AN1015.3	COG2099	Glycogen phosphorylase
AN6286.3	COG2161	Glucosidase I
AN6824.3	COG2178	Predicted sugar kinase
AN6037.3	COG2446	Glucose-6-phosphate isomerase
AN9148.3	COG2638	UDP-glucose pyrophosphorylase
AN3954.3	COG2653	6-phosphogluconate dehydrogenase [§]
AN8010.3	COG3742	Glycogen synthase
AN2875.3	COG4153	Fructose 1,6-bisphosphate aldolase [§]
AN4674.3	COG4157	beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase, contains WSC domain
AN5123.3	COG2741	Dimeric dihydrodiol dehydrogenase
Transporte de lipídeos e metabolismo		
AN7625.3	COG0693	Myo-inositol-1-phosphate synthase
AN6014.3	COG1180	Acyl-CoA synthetase
AN0981.3	COG3072	Long chain fatty acid elongase
AN2953.3	COG4338	Predicted lipoprotein
AN4094.3	COG1435	Sterol reductase/lamin B receptor
Transcrição		
AN7174.3	COG0048	Transcription factor, Myb superfamily
AN10263.3	COG0260	RNA polymerase II, large subunit
AN8858.3	COG0262	RNA polymerase I, large subunit
AN5115.3	COG0384	Chromodomain-helicase DNA-binding protein
AN2020.3	COG0773	Transcription factor MEIS1 and related HOX domain proteins
AN4034.3	COG0869	CCAAT-binding factor, subunit A (HAP3)
AN5056.3	COG1874	KEKE-like motif-containing transcription regulator (Rlr1)/suppressor of sin4
AN8858.3	COG2294	Transcription factor of the Forkhead/HNF3 family
Replicação, recombinação e reparo		
AN1708.3	COG0217	Mismatch repair ATPase MSH6 (MutS family)
AN0855.3	COG0390	DNA repair protein, SNF2 family
AN2491.3	COG0477	DNA replication licensing factor, MCM2 component
AN6070.3	COG0478	DNA replication licensing factor, MCM4 component
AN10497.3	COG0479	DNA replication licensing factor, MCM3 component
AN5992.3	COG0482	DNA replication licensing factor, MCM7 component
AN10755.3	COG0970	DNA polymerase alpha, catalytic subunit
AN10855.3	COG1625	DNA polymerase alpha-primase complex, polymerase-associated subunit B
AN6303.3	COG1968	Replication factor C, subunit RFC1 (large subunit)
AN6692.3	COG2093	Translesion DNA polymerase - REV1 deoxycytidyl transferase
AN0872.3	COG2475	CDC45 (cell division cycle 45)-like protein
AN3035.3	COG2518	5'-3' exonuclease
AN2764.3	COG2519	5'-3' exonuclease
AN5676.3	COG2227	Pre-initiation complex, subunit CDC6, AAA+ superfamily ATPase
Modificação pós traducional, "turn over" de proteínas e chaperonas		
AN0170.3	COG0907	Thioredoxin
AN5895.3	COG1439	RAB proteins geranylgeranyltransferase component A
AN4450.3	COG2699	Predicted ubiquitin regulatory protein
AN5442.3	COG1282	Serine carboxypeptidases (lysosomal cathepsin A)
Transporte de íons inorgânicos e metabolismo		
AN5918.3	COG0047	Catalase
AN0566.3	COG3599	Ca ²⁺ -modulated nonselective cation channel polycystin
AN4249.3	COG3599	Ca ²⁺ -modulated nonselective cation channel polycystin
Função geral predita apenas		
AN6004.3	COG0118	FOG: RRM domain
AN2989.3	COG0118	FOG: RRM domain
AN9295.3	COG0254	Predicted transporter (major facilitator superfamily)
AN1677.3	COG0725	Reductases with broad range of substrate specificities
AN0229.3	COG1134	Uncharacterized conserved protein
AN8145.3	COG1721	FOG: Zn-finger

ORF	Número COG	Função
AN0096.3	COG1721	FOG: Zn-finger
AN4542.3	COG1721	FOG: Zn-finger
AN0885.3	COG1721	FOG: Zn-finger
AN0977.3	COG1721	FOG: Zn-finger
AN1247.3	COG1944	Peroxisomal membrane protein MPV17 and related proteins
AN4830.3	COG2728	Similarity to phosphopantothienoylcysteine synthetase/decarboxylase
AN7710.3	COG2914	Predicted haloacid-halidohydrolase and related hydrolases
AN1089.3	COG3780	Thioredoxin binding protein TBP-2/VDUP1
AN4880.3	COG4525	Jacalin-like lectin domain-containing protein
Função desconhecida		
AN1695.3	COG0290	Conserved WD40 repeat-containing protein AN11
AN6828.3	COG2654	Uncharacterized conserved protein
AN1022.3	COG4539	Uncharacterized conserved protein
AN10847.3	COG4562	Uncharacterized conserved protein (tumor-rejection antigen MAGE in humans)
AN10789.3	COG4735	Extracellular protein with conserved cysteines
AN8339.3	COG4744	Uncharacterized conserved protein
Mecanismos de transdução do sinal		
AN4483.3	COG0032	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase, EF-Hand protein superfamily
AN4113.3	COG0519	Sensory transduction histidine kinase
AN6207.3	COG0787	Dehydrogenase kinase
AN9449.3	COG0902	Phosphatidylinositol 4-kinase
AN2877.3	COG2210	Oxysterol-binding protein
AN7690.3	COG2243	Ca ²⁺ release channel (ryanodine receptor)
AN4940.3	COG3543	Ca ²⁺ -dependent activator protein
AN10737.3	COG3557	Epidermal growth factor receptor kinase substrate
AN2795.3	COG3575	FOG: Hormone receptors
AN8236.3	COG4363	Putative growth response protein
AN8564.3	COG4658	Apoptotic ATPase
AN6578.3	COG4476	Gluconate transport-inducing protein
AN6696.3	COG0998	Synaptic vesicle protein EHS-1 and related EH domain proteins
AN2952.3	COG1225	Teneurin-1 and related extracellular matrix proteins, contain EGF-like repeats
Tráfego intracelular, secreção e transporte de vesículas		
AN2815.3	COG3103	Rab GTPase interacting factor, Golgi membrane protein
AN5217.3	COG3251	Golgi SNAP receptor complex member
Citoesqueleto		
AN5803.3	COG0046	Ca ²⁺ -binding actin-bundling protein (fimbrin/plastin), EF-Hand protein superfamily
AN0306.3	COG2826	Actin-related protein Arp2/3 complex, subunit ARPC2

^s enzimas que atuam na via das pentoses fosfato

4.3.2.1. A via das pentoses fosfato e sua relação com a cinética de divisão nuclear acelerada e com a diminuição do crescimento polarizado no mutante $\Delta atmA^{ATM}$.

A via das pentoses fosfato (ppp) também conhecida como via do fosfogluconato ou via das hexoses monofosfato gera NADPH e ribose 5'- fosfato no citosol através de várias reações bioquímicas em dois estágios da via, a fase

oxidativa e a fase não oxidativa. Na fase oxidativa, o NADP^+ é o aceptor de elétrons que culmina na geração de NADPH e na produção de pentose fosfato. O NADPH gerado na fase oxidativa da ppp convenientemente fornece a célula poder redutor para as reações biosintéticas e/ou permite as células lidar com espécies reativas do oxigênio para se protegerem dos danos causados pelo estresse oxidativo. Além disso, em células com rápida divisão celular, a molécula de ribose 5-fosfato gerada é a precursora para a síntese de DNA, RNA e coenzimas como ATP, NADH, FADH_2 e coenzima A. Por outro lado, em células ou tecidos onde o produto essencial é o aceptor de elétrons NADPH, e não a ribose 5-fosfato, a fase não oxidativa da via das pentoses fosfato converte (recicla) pentose fosfato em glicose 6-fosfato a qual entra novamente na fase oxidativa gerando mais poder redutor na forma de NADPH (NELSON; COX, 2005).

Em *A. nidulans* foram isolados mutantes da via das pentoses fosfatos através da observação que este organismo é capaz de utilizar nitrito e nitrato como fonte de nitrogênio pela redução desses compostos gerando amônia às expensas das desidrogenases da via das pentoses fosfato (HANKINSON, 1974; HANKINSON, COVE, 1974). Esses mutantes não são capazes de crescer em várias fontes de carbono que são catabolizadas pela via das pentoses fosfato como por exemplo xilose, arabinose, lixose entre outras. Dois mutantes da via das pentoses fosfato em *A. nidulans* (*pppA* e *pppB*) foram caracterizados como mutações em diferentes grupos de ligação. Mutantes para o locus *pppB* apresentam atividade reduzida de quatro enzimas da via das pentose fosfato, da enzima glicose fosfato isomerase e da enzima manitol 1-fosfato desidrogenase. Os mutantes *pppA* por sua vez apresentam atividade elevada para as mesmas enzimas, exceto para a transaldolase cujos valores da atividade são muito mais reduzidos (HANKINSON, 1974).

O mapeamento do locus *pppA* realizado pelo método de haploidização demonstrou que este gene está localizado no grupo de ligação VIII. A posição de *pppA1* dentro do grupo de ligação foi realizada através dos cruzamentos apropriados como descrito em Hankinson (1974). *pppA1* está localizado cerca de 26 centimorgans (isto é, frequência de recombinação de 26%) entre *pppA1* e *nirA1* com desvio padrão de 5 centimorgans (em *A. nidulans* 1 centimorgan equivale a 3 kb). O gene *nirA1* é responsável por mediar a indução das enzimas da via de redução de nitrato e também por mediar o efeito do nitrato na atividade das enzimas as via das

pentoses fostato e da glicose-fosfato-isomerase.(HANKINSON, 1974; HANKINSON, COVE; 1974). A verificação do mapa genômico desse intervalo no cromossomo VIII (<<http://www.cadre-genomes.org.uk/>>) mostrou que existem cerca de 10 ORFs nesse intervalo, onde *pppA1* foi mapeado. Como primeiro ponto para a identificação do gene *pppA1*, foi buscada uma forma de comprovar se o mapeamento desse gene no grupo de ligação VIII estava correto. Uma das ORFs presentes no intervalo de mapeamento codificava o gene *scsA1*^{TOP1}, (o homólogo da topoisomerase I, AN0253.3) previamente caracterizado em nosso laboratório como um supressor extragênico da mutação *scaA1* que causa sensibilidade a droga CPT (FAGUNDES et al., 2003). A partir dessa observação, o gene *scsA1*^{TOP1} foi usado como sonda para rastrear uma biblioteca cosmidial cromossomo específico. As placas de 96 poços correspondentes ao cromossomo VIII foram submetidas à hibridização de colônia para identificar o clone onde estava presente o gene *scsA1*^{TOP1} e, por conseguinte o gene *pppA1*. Um único sinal positivo obtido na placa 16 posição A10 foi obtido e o DNA cosmidial desse clone foi extraído em larga escala para transformação na linhagem mutante G840 (*pppA1*). A capacidade dos transformantes em crescer em MM de Cove + xilose 1% demonstrou que o clone 16A10 foi capaz de complementar a mutação *pppA1* e, portanto confirmou o mapeamento da mutação *pppA1* descrito anteriormente (HANKINSON, 1974) (linhagem G840-16A10, dados não apresentados). Nesse intervalo de mapeamento, estava também presente a ORF que codifica a transaldolase (AN0240.3), um gene específico da via das pentoses fosfato (fase não oxidativa). Diante disso foram construídos primers para amplificar o gene da transaldolase contendo 1 Kb de regiões regulatórias “upstream” e “downstream” à fase aberta de leitura (Figura 41A). O produto de PCR foi diretamente transformado no mutante *pppA1* e a capacidade dos transformantes obtidos de crescer em MM de Cove contendo xilose como única fonte de carbono foi mais uma vez testada. Vários transformantes que apresentaram integração homóloga no locus *pppA* foram obtidos após confirmação por Southern blot (Figura 41B), sendo que um deles denominado G840-TR20, foi escolhido para análises posteriores (Figura 41C).

Figura 41: Complementação da mutação *pppA1* com o gene da transaldolase na linhagem *pppA1*. **(A)** O fragmento de PCR (3087 pb) de contendo a ORF da transaldolase (linha tracejada) foi transformado na linhagem *pppA1* (G840). **(B)** O DNA genômico de alguns transformantes que foram capazes de crescer em MM Cove + xilose foi extraído e submetido a digestão com enzima *DraI* para a análise de Southern blot. Um fragmento da região 5' "upstream" à ORF, resultante da digestão do fragmento de 3087 pb com a enzima *EcoRI* foi usado como sonda (linha escura). Um fragmento esperado de 3063 pb (linha fina) foi reconhecido pela sonda na linhagem mutante *pppA1* (G840), na linhagem selvagem (A26) e nos transformantes. Os transformantes números 20, 21 e 22 indicam que houve integração homóloga do fragmento de PCR no locus da transaldolase. As linhagens complementadas foram denominadas G840-TR20 (-21, -22). Os candidatos 20 e 21 foram escolhidos para posteriores análises genéticas. **(C)** Complementação do defeito de crescimento em xilose da linhagem *pppA1* pela linhagem complementada *pppA1 pppA*⁺ (G840-TR20).

Com o intuito de se verificar se a complementação da mutação *pppA1* era devida a presença da sequência selvagem introduzida no mutante ou devida a uma supressão extragênica, foram realizados retrocruzamentos de dois transformantes escolhidos (transformantes números G840-TR20 e G840-TR21), com a linhagem selvagem R21. Se a substituição gênica tivesse ocorrido no locus *pppA*, a progênie recombinante deveria apresentar unicamente segregantes capazes de crescer em xilose como fonte de carbono. Por outro lado, se a complementação do mutante tivesse ocorrido pela introdução de um supressor extragênico seria possível encontrar segregantes que carregavam a condição original de ausência de crescimento em xilose. Nas duas linhagens transformantes testadas, 100% dos segregantes foram capazes de crescer em xilose. Esses resultados levaram a concluir que a complementação do defeito na via das pentoses fosfato no mutante *pppA1* foi obtida a partir de uma cópia selvagem da ORF AN0240.3 e não por um supressor.

A sequência genômica do gene *pppA* (AN0240.3) foi determinada para a linhagem selvagem (A26) e para o mutante (G840). Uma transição C→T foi identificada no mutante *pppA1* 131 pb após o códon de iniciação do gene. Essa transição altera o resíduo de leucina (aminoácido 43) por um resíduo de fenilalanina. Essa mutação acontece próximo ao motif “transaldolase signature 1” compreendido entre os resíduos 32 a 40, o que pode perturbar a ligação do substrato à enzima causando decréscimo da sua atividade catalítica. Esses dados auxiliam na explicação da atividade diminuída da transaldolase encontrada no mutante *pppA1* (HANKINSON, 1974) e levam a concluir que a mutação *pppA1* pode ser complementada pelo gene *pppA* que codifica uma transaldolase.

Para melhor investigar e validar o envolvimento da via das pentoses fosfato com as características fenotípicas do mutante $\Delta atmA^{ATM}$, foi construída uma linhagem duplo mutante $\Delta atmA^{ATM} pppA1$. Não foi observada nenhuma interação genética entre esses genes quando crescidos na presença de agentes que causam dano ao DNA (dados não apresentados). Os fenótipos da cinética de divisão nuclear e de crescimento polarizado foram analisados nessa linhagem (Figura 42). A cinética de divisão nuclear apresentou-se significativamente reduzida (em torno de 40%) na linhagem duplo mutante em comparação à linhagem selvagem (Figura 42A e B). Interessantemente, o mutante *pppA1* apresentou defeito no ensaio de crescimento polarizado comparável ao mutante $\Delta atmA^{ATM}$ e a linhagem duplo mutante $\Delta atmA^{ATM}$

pppA1 (Figura 42C). Esses resultados indicam que parece haver epistasia entre *atmA* e *pppA1* durante o crescimento polarizado. Além disso, evidenciam também um importante papel da via das pentoses fosfato na proliferação celular e no crescimento polarizado em *A. nidulans* monitorado pela quinase AtmA. Em suma, os dados de microarray mostram que a via das pentoses fosfato está altamente ativa para propiciar a célula amplo suprimento de ácidos nucleicos necessário para manter o acelerado padrão de divisão mitótica observado no mutante, como mostrado na Tabela 11.

Figura 42: Fenótipos observados na linhagem duplo mutante $\Delta atmA^{ATM}$ *pppA1*. **(A)** Padrão de germinação dos conídios após 8 horas de crescimento em meio completo: 1 linhagem selvagem; 2 $\Delta atmA$; 3 *pppA1*; 4 $\Delta atmA$ *pppA1* (campo claro; painéis da esquerda e DAPI; painéis da direita). Os germinantes da linhagem $\Delta atmA$ *pppA1* apresentam um grande vacúolo citoplasmático central (setas) sendo que este não é visualizado na linhagem

selvagem e no mutante $\Delta atmA$ (ver também Figura 45). (B) Cinética de divisão nuclear dos mutantes *pppA1* e $\Delta atmA$. Conídios foram incubados nos tempos indicados em meio completo a 37°C. O número de núcleos por célula foi avaliado após coloração com DAPI. Os resultados indicam média $\pm$ desvio padrão de dois experimentos independentes. (C) Ensaio de polarização após liberação do bloqueio com HU.

Como mencionado anteriormente, o poder redutor gerado pela fase oxidativa da via das pentoses fosfato propicia a célula proteção contra estresse oxidativo. Junke et al. (1996) mostraram que em *S. cerevisiae*, mutantes de genes da via das pentoses fosfato (glicose 6-fosfato desidrogenase, ribulose 5-fosfato epimerase, transketolase e transaldolase) apresentam sensibilidade ao peróxido de hidrogênio. Além disso, o gene *ATM* mantém a estabilidade genômica através da ativação de pontos de checagem críticos na célula, não só em resposta ao dano ao DNA e instabilidade telomérica como também mediante ao estresse oxidativo (para uma revisão ver BARZILAI; ROTMAN; SHILOH, 2002; BARZILAI; YAMAMOTO, 2004). A deficiência de ATM é uma das desordens mais extensivamente estudadas com respeito a conexão entre instabilidade genética e estresse oxidativo. Pacientes portadores de AT apresentam valores significativamente reduzidos da capacidade antioxidante (REICHENBACH et al., 1999). Em decorrência do aumento da expressão de genes da via das pentoses fosfato na linhagem mutante $\Delta atmA$ em relação à linhagem selvagem, as concentrações de NADPH/NADP⁺ foram determinadas nessas linhagens. Houve uma diminuição da razão NADPH/NADP⁺ no mutante quando comparada à linhagem selvagem (Tabela 14). Houve também um aumento proporcional nas concentrações de NADP_T (NADPH + NADP⁺). Esses resultados sugerem que os germinantes da linhagem $\Delta atmA$ estão sob condições de estresse oxidativo produzindo maiores quantidades de NADP⁺ e NADP_T que são imediatamente convertidos em NADPH visando possivelmente detoxificar a célula das espécies reativas do oxigênio geradas nesses germinantes (ver Figuras 44 e 45)

Tabela 14: Determinação da concentração de NADPH e NADP⁺ nos germinantes das linhagens selvagem e mutante $\Delta atmA$.

Linhagem*	NADPH/NADP ⁺	NADPH (nmol/mg protein)	NADP ⁺ (nmol/mg protein)	NADP _T
wt 60'	0,131	7,249	55,368	62,617
wt 90'	0,242	5,789	23,900	29,689
wt 120'	0,116	2,918	25,191	28,109
wt 150'	0,048	1,987	41,648	43,635
$\Delta atmA$ 60'	0,049	5,433	110,799	116,232
$\Delta atmA$ 90'	0,087	3,761	42,988	46,749
$\Delta atmA$ 120'	0,091	3,285	36,165	39,450
$\Delta atmA$ 150'	-	ND**	59,120	-

* os valores indicam os resultados representativos de uma série de experientos com diferentes replicatas biológicas

** valores não detectados pelo método na amostra analisada.

O percentual de sobrevivência de conídios das linhagens $\Delta atmA^{ATM}$, $pppA1$ e $\Delta atmA^{ATM} pppA1$ tratados com peróxido de hidrogênio foi quantificado como mostrado na Figura 43. A linhagem selvagem não foi afetada pela presença de peróxido de hidrogênio enquanto que as linhagens $\Delta atmA^{ATM}$, $pppA1$ e $\Delta atmA^{ATM} pppA1$ são mais sensíveis a esse agente com respectivamente 50, 10 e 9% de sobrevivência. Esses resultados mostram que $atmA^{ATM}$ pode estar envolvido no monitoramento e/ou reparo do estresse oxidativo causado por peróxido de hidrogênio. Adicionalmente, a deficiência de transaldolase é responsável por um efeito mais dramático na sensibilidade ao peróxido de hidrogênio. Entretanto, $atmA^{ATM} pppA1$ parecem não estar interagindo geneticamente em presença desse agente.

Figura 43: Ensaio de viabilidade do conídios na presença de peróxido de hidrogênio das linhagens $\Delta atmA$ e *pppA1* e duplo mutante. Os resultados indicam média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. *Significativamente diferente da linhagem selvagem ($p < 0,05$).

Tem sido demonstrado em vários organismos que as NADP oxidases atuam na produção localizada de ROS dentro da célula e que a presença desses radicais livres espacialmente localizados atuam na regulação de eventos como polarização, ramificação lateral das hifas e diferenciação dos cleitotécios (LARA-ORTÍS; RIVEROS-ROSAS; AGUIRRE, 2003; TAKEMOTO; TANAKA; SCOTT, 2006; AGUIRRE et al. 2005; SEMIGHINI; GOLDMAN; HARRIS, 2007). Diante disso, visando melhor caracterizar o efeito da produção localizada de ROS em *A. nidulans* e seu papel no crescimento polarizado, a distribuição de ROS foi verificada nos germinantes da linhagem $\Delta atmA$ e $\Delta atmA$ *pppA1* através da sua capacidade de produzirem ânion superóxido de forma constitutiva, através do ensaio de redução do agente “nitro blue tetrazolium” (NBT). A redução de NBT leva a precipitação de um sal de formazana azul/púrpura na célula fúngica facilmente detectado por microscopia ótica. Como previamente demonstrado em resultados preliminares por Semighini, Goldman e Harris (2007), após 14 horas de germinação, a maioria dos germinantes da linhagem selvagem apresentaram marcação de NBT na extremidade da hifa sugerindo que o gradiente de espécies reativas do oxigênio nessa região

pode regular o crescimento polarizado (Figura 44). No mutante $\Delta atmA$ e no duplo $\Delta atmA pppA1$, altamente defectivos no crescimento polar, a localização da marcação por NBT foi perdida. Todos os germinantes em que não há a emissão de tubo germinativo, NBT apresentou padrão de deposição em toda a célula o mesmo ocorrendo nos germinantes em que houve emissão de tubo germinativo. Dessa forma, esses resultados sugerem que embora as duas mutações $\Delta atmA$ e $pppA1$ causam sensibilidade ao peróxido de hidrogênio, apenas $\Delta atmA$ pode de alguma forma influenciar a produção localizada de ROS dentro da célula.

Figura 44: Distribuição de radicais livres no mutante $\Delta atmA pppA1$ após coloração com NBT. Linhagem selvagem (A), $\Delta atmA$ (B), $pppA1$ (C), $\Delta atmA pppA1$ (D). No duplo mutante $\Delta atmA pppA1$, além de a marcação com NBT não estar localizada na extremidade da hifa, esta também revelou um padrão de deposição “salpicado” em todo o corpo dos germinantes indicando áreas de mais intensa localização de ROS (setas). Barras 10 μm .

Adicionalmente, a distribuição de ROS nas células das linhagens mutantes $\Delta atmA$ e $\Delta atmA pppA1$ foi verificada pela utilização da sonda fluorescente H_2DCFDA . Esse marcador é não fluorescente quando na forma reduzida, até que os grupamentos acetato sejam removidos intracelularmente por esterases e até que sua oxidação ocorra dentro da célula. O sinal emitido pode então ser detectado por microscopia de fluorescência. Embora H_2DCFDA seja oxidado por diferentes ROS, este detecta principalmente ânion superóxido. Nos germinantes da linhagem selvagem, a fluorescência verde quase não foi observada, enquanto que as células

do mutante $\Delta atmA$ apresentaram marcação mais intensa (Figura 45). A fluorescência também foi pouco detectada no mutante *pppA1*, porém na linhagem duplo mutante, a marcação mostrou o mesmo padrão de intensidade observado para a linhagem $\Delta atmA$, além da presença de pontos de mais intensa fluorescência dando aspecto “salpicado” semelhante ao que foi verificado na marcação com NBT (Figura 44)

Figura 45: Distribuição de radicais livres no mutante $\Delta atmA$ *pppA1* após tratamento com H_2DCFDA . Presença de grande vacúolo central no citoplasma do mutante $\Delta atmA$ *pppA1* (ver também Figura 42) e áreas “salpicadas” de maior fluorescência no corpo do germinates como visto na marcação com NBT (Figura 44) Barras 10 μm .

Em *A. nidulans*, os genes *noxA* e *noxR* (NADPH oxidase A/R) codificam respectivamente a subunidade catalítica e regulatória dessa enzima (LARA-ORTÍS; RIVEROS-ROSAS; AGUIRRE, 2003) a qual usa NADPH e H_2O para produzir ânions superóxido em um processo controlado. Em *Epichloë festucae*,

mutante de *noxA* e *noxR* apresentam fenótipo de hiper ramificação lateral e diminuição do tamanho da colônia indicando que a ausência de ROS espacialmente localizados nesses mutantes perturba o crescimento apical nesse fungo. O mesmo fenótipo é observado em *E. festucae* quando células de uma linhagem selvagem são crescidas na presença de difenileniodônio (DPI), um inibidor específico de Nox (TAKEMOTO; TANAKA; SCOTT, 2006). Dessa forma, dado o possível papel regulatório na morfogênese de alguns fungos filamentosos incluindo *A. nidulans*, mediado por ROS, e a alteração na distribuição desses elementos nos germinantes da linhagem $\Delta atmA$ como mostrado na Figura 44, foi verificado se a depleção do “pool” de ROS produzidos pela NADP oxidase conseguido pelo tratamento com DPI poderia levar a uma exacerbação no defeito do crescimento polar da linhagem $\Delta atmA$ ou mesmo produzir uma fenocópia deste mutante nos germinantes da linhagem selvagem tratada com DPI. Interessantemente, os resultados não mostraram aumento no defeito de polarização no mutante $\Delta atmA$ sendo que a redução percentual nas células que apresentavam emissão de tubo germinativo na linhagem selvagem e no mutante foi semelhante (dados não apresentados).

4.3.3. Identificação de genes diferencialmente expressos no mutante $\Delta atmA^{ATM}$ durante o crescimento dos conídios após liberação do bloqueio com HU

Como mencionado anteriormente, uma das características mais marcantes do mutante $\Delta atmA^{ATM}$ é o seu severo defeito no estabelecimento do eixo polarizado de crescimento verificado pelo ensaio de polarização após bloqueio dos germinantes na fase S. Resultados prévios indicaram que o bloqueio dos germinantes em altas concentrações de HU parecia intensificar o defeito de polarização do mutante $\Delta atmA^{ATM}$ (dados não apresentados) tornando mais evidente as formas anormais maiores, não polarizadas e com aumentado número de núcleos (Figura 25). Dessa forma, como segunda abordagem para as hibridizações de microarray, o desenho experimental esteve baseado no ensaio de polarização (seção 3.4.24.6) onde foi estabelecida uma cinética de crescimento de conídios nos primeiros períodos de germinação após a liberação do bloqueio na fase S, visando a identificação de genes relacionados com a polarização celular anormal na linhagem $\Delta atmA^{ATM}$. Para fins de validação prévia dos experimentos, o número de células polarizadas foi verificado previamente à extração do RNA (Tabela 15).

Tabela 15: Determinação do percentual de crescimento polarizado para a linhagem $\Delta atmA^{ATM}$

Linhagens*	Crescimento polarizado (%)				
	0'	60'	90'	120'	150'
wt	1	41	65	75	83
$\Delta atmA^{ATM}$	1	15	23	41	45

*Conídios das linhagens selvagem (GR5) e $\Delta atmA^{ATM}$ (IM69) foram incubados com 50 mM de HU em meio completo à 37°C sob agitação (250 rpm) para bloqueio do ciclo celular na fase S. As células foram centrifugadas e lavadas para liberação do bloqueio e novamente incubadas em meio de cultura nas mesmas condições por tempos determinados. Amostras foram retiradas nos tempos indicados e as células foram coradas com DAPI e calcoflúor. Os valores indicam o percentual de célula que apresentaram tubo germinativo em cada ponto experimental.

Os cDNAs marcados com Cy3 ou Cy5 de cada um dos pontos experimentais foi utilizado para hibridizar os microarrays utilizando o desenho experimental descrito na Figura 46. A expressão gênica tanto na linhagem selvagem quanto na linhagem $\Delta atmA^{ATM}$ foi comparada em cada tempo da cinética de polarização com seu tempo zero. Foram identificados 2190 genes modulados em pelo menos um ponto experimental.

Figura 46: Desenho experimental das hibridizações de microarray a partir de conídios crescidos por 60, 90 e 120 minutos após liberação do bloqueio com HU. As hibridizações foram realizadas para cada tempo de crescimento dos conídios e consistiram de um par de hibridizações que combinava o RNA referência marcado com Cy3 e RNA teste, marcado com Cy5 e por uma segunda hibridização, que combinava o RNA referência marcado com Cy5 e RNA teste, marcado com Cy3. Este par experimental era chamado de “Dye Swap Pair” (DSP). Cada DSP originava dois valores de intensidade para cada spot. O conjunto de dados experimentais era, portanto, constituído de 24 conjuntos de dados numéricos, obtidos de 12 hibridizações independentes.

A Figura 47 mostra os genes modulados na linhagem selvagem e na linhagem mutante $\Delta atmA^{ATM}$ após filtragem dos dados através da determinação de limites de corte dependentes da razão da intensidade de fluorescência das hibridizações (“intensity-dependent Z-scores”). Os resultados indicam que parece ter ocorrido uma modulação maior na linhagem mutante verificada pela maior dispersão dos dados mostrados no gráfico.

Figura 47: Distribuição gráfica dos genes modulados durante o experimento de microarray com conídios crescidos após liberação do bloqueio com HU. Gráfico da razão da intensidade dos sinais versus o produto das intensidades. I(A) e I(B) indicam a intensidade do sinal em cada canal (Cy3 ou Cy5). Cada ponto indica um gene modulado com nível de confiança de 95%. As cores vermelha e preta indicam as hibridizações para a linhagem selvagem e mutante $\Delta atmA^{ATM}$, respectivamente. Os dados apresentados são a junção dos genes modulados no três tempos de crescimento 60, 90 e 120 minutos.

Os genes diferencialmente expressos foram novamente classificados em categorias funcionais COG (<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>>) e os mais relevantes (razão $\log_2$ Cy5/Cy3 ≥ 1 ou ≤ -1) estão dispostos nas Tabelas 16 e 17. Resumidamente, houve aumento da expressão de genes que codificam proteínas envolvidas em modificações pós-traducionais e “turn-over” (como chaperonas), biogênese, tradução e de estrutura ribossomal (como por exemplo, fatores de tradução e várias proteínas ribossômicas). Além disso, houve indução de genes relacionados à transcrição de rRNA (AN3944.3 e AN10316.3 que codificam respectivamente uma proteína predita regulatória da transcrição de rRNA e a subunidade maior da RNA polimerase III). Isso sugere a necessidade do mutante

$\Delta atmA$ em montar corretamente as proteínas e sintetizar moléculas de rRNA para manter o crescimento acelerado (Tabela 16).

Com relação aos transcritos que apresentaram queda da expressão no mutante (Tabela 17), puderam ser observados genes relacionados ao controle do ciclo celular, divisão celular e partição cromossômica, como por exemplo, AN5822.3, AN5100.3, e AN6616.3 que codificam respectivamente a quinase dependente de ciclina *WEE1*, a proteína de controle de ciclo celular *CDC50* também envolvida em polaridade celular e a proteína componente do complexo 9-1-1 *HUS* envolvida no sensoreamento do dano ao DNA. Além disso, genes envolvidos na biosíntese de ergosterol como AN7211.3 (C-8,7 esterol isomerase), AN8283.3 (*CYP51A*, citocromo P450) e AN1901.3 (*CYP51B*, citocromo P450) também tiveram a expressão diminuída. Alguns genes que atuam na biosíntese de inositol e transdução do sinal também foram modulados negativamente no mutante. Dentre esses AN10413.3 (fosfolipase D1), AN0913.3 (fosfatidil inositol sintase), AN2720.3 (lisofosfolipase), AN2766.3 (fosfatidilinositol 4-fosfato 5-quinase). Foram também reprimidos alguns genes envolvidos no tráfico intracelular, secreção e transporte vesicular. Dentre os genes reprimidos, diretamente envolvidos em polaridade celular, foram identificados, por exemplo, o homólogo de Rac Rho GTPase (*racA*; AN4743.3), a proteína Bem2p que ativa Rho GTPase (AN4745.3) e o homólogo de “ β -tubulin folding cofactor C” (AN3022.3) e uma serina treonina quinase envolvida em morfogênese celular como descrito por Seiler e Plamann (2003). Além disso, genes que codificam proteínas motoras como kinesina e miosina (AN3547.3, AN1558.3, AN4513.3, AN2480.3, AN1156.3, and AN4706.3) as quais foram previamente demonstradas no suporte de muitos processos celulares incluindo crescimento polarizado (McGOLDRICK; GRUVER; MAY, 1995; STEINBERG, 2000; SCHUCHARDT et al., 2005).

Tabela 16: Genes induzidos transcricionalmente no mutante $\Delta atmA$ de *A. nidulans* durante a germinação dos conídios por 60, 90 e 120 minutos após bloqueio com HU

ORF	Número COG	Função
Controle de ciclo celular, divisão celular e partição cromossômica		
AN1221.3	COG0964	Structural maintenance of chromosome protein 3 (Cohesin, SMC3)
Transporte de nucleotídeo e metabolismo		
AN2185.3	COG3721	Mitochondrial endonuclease
AN2494.3	COG1097	Adenine deaminase/adenosine deaminase
AN6541.3	COG0237	Glycinamide ribonucleotide synthetase
AN6711.3	COG1448	Ribose-phosphate pyrophosphokinase
Transporte de lipídeos e metabolismo		
AN7008.3	COG2304	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase
AN2573.3	COG0873	C-4 sterol methyl oxidase
AN1036.3	COG1202	Animal-type fatty acid synthase and related proteins
AN10538.3	COG2926	Malonyl-CoA ACP transacylase
Tradução, estrutura ribossomal e biogênese		
AN10195.3	COG0432	Valyl-tRNA synthetase
AN6563.3	COG1627	Translation elongation factor EF-1 gamma
AN3172.3	COG0830	40S ribosomal protein SA (P40)/Laminin receptor 1
AN9151.3	COG2102	Exosomal 3'-5' exoribonuclease complex, subunit Rrp44/Dis3
AN4802.3	COG1732	60S ribosomal protein L21
AN2743.3	COG2072	Translation initiation factor 3, subunit a (eIF-3a)
AN1013.3	COG0875	60S ribosomal protein L5
AN2997.3	COG0643	Translation initiation factor 3, subunit i (eIF-3i)
Transcrição		
AN3944.3	COG1926	Predicted regulator of rRNA gene transcription (MYB-binding protein)
AN10316.3	COG0261	RNA polymerase III, large subunit
Modificação pós traducional, "turn over" de proteínas, chaperonas		
AN0381.3	COG0363	Chaperonin complex component, TCP-1 beta subunit (CCT2)
AN4025.3	COG2157	Predicted tubulin-tyrosine ligase
AN0401.3	COG0868	Glutathione S-transferase
AN5111.3	COG4400	E3 ubiquitin ligase interacting with arginine methyltransferase
AN3481.3	COG0909	Peptide N-glycanase
AN2918.3	COG0358	Chaperonin complex component, TCP-1 delta subunit (CCT4)
AN1851.3	COG0362	Chaperonin complex component, TCP-1 theta subunit (CCT8)
AN10526.3	COG1499	Protein arginine N-methyltransferase PRMT1 and related enzymes
Função geral predita apenas		
AN2801.3	COG1577	Aldo/keto reductase family proteins
AN3836.3	COG0254	Predicted transporter (major facilitator superfamily)
AN11463.3	COG4299	PHD Zn-finger protein
AN8394.3	COG0254	Predicted transporter (major facilitator superfamily)
AN7458.3	COG2055	WD40 repeat protein
AN10848.3	COG0118	FOG RRM domain
AN4816.3	COG2325	Predicted transporter/transmembrane protein
AN5283.3	COG0118	FOG RRM domain
AN5865.3	COG1490	GTP-binding protein CRFG/NOG1 (ODN superfamily)
AN3833.3	COG1552	Predicted alpha/beta hydrolase
AN3771.3	COG3272	Predicted coiled-coil protein
Função desconhecida		
AN6584.3	COG4828	Uncharacterized conserved protein
AN2370.3	COG2521	Uncharacterized conserved protein
AN10231.3	COG0606	Microtubule-associated serine/threonine kinase and related proteins
Tráfego intracelular, secreção e transporte vesicular		
AN9250.3	COG2060	Rab3 effector RIM1 and related proteins, contain PDZ and C2 domains

ORF	Número COG	Função
AN3871.3	COG2319	Vacuolar assembly/sorting protein VPS9
AN6412.3	COG3764	Vesicular amine transporter
AN0958.3	COG1983	Tomosyn and related SNARE-interacting proteins
Estrutura nuclear		
AN6006.3	COG1991	Nuclear transport receptor RANBP7/RANBP8 (importin beta superfamily)
Citoesqueleto		
AN4111.3	COG3565	Cdc42-interacting protein CIP4

Tabela 17: Genes reprimidos transcricionalmente no mutante $\Delta atmA$ de *A. nidulans* durante a germinação dos conídios por 60, 90 e 120 minutos após bloqueio com HU

ORF	Número COG	Função
Estrutura de cromatina e dinâmica		
AN5899.3	COG0933	Structural maintenance of chromosome protein 2 (condensin, subunit E)
AN4894.3	COG1472	Histone acetyltransferase SAGA/ADA, catalytic subunit PCAF/GCN5
AN5795.3	COG1080	Histone H3 (Lys4) methyltransferase complex, subunit SET1
Controle do ciclo celular, divisão celular e partição cromossômica		
AN5822.3	COG0601	Cyclin-dependent kinase WEE1
AN5100.3	COG2952	CDC50
AN6616.3	COG3999	Checkpoint 9-1-1 complex, HUS1 component
AN1016.3	COG0082	G-protein alpha subunit (small G protein superfamily)
AN8270.3	COG2655	Septin family protein (P-loop GTPase)
Transporte de nucleotídeos e metabolismo		
AN0919.3	COG1377	Uridine 5'-monophosphate synthase/urotate phosphoribosyltransferase
AN5613.3	COG0430	Xanthine dehydrogenase
Transporte de carboidratos e metabolismo		
AN7152.3	COG2366	Alpha-D-galactosidase (melibiase)
AN7750.3	COG2175	Protein predicted to be involved in carbohydrate metabolism
AN7454.3	COG4123	Putative alpha 1,2 mannosyltransferase
AN3020.3	COG2246	Galactosyltransferases
AN6985.3	COG2517	Ribulose kinase and related carbohydrate kinases
AN0830.3	COG0224	Aquaporin (major intrinsic protein family)
AN8639.3	COG1050	Trehalose-6-phosphate synthase component TPS1 and related subunits
AN10844.3	COG0234	Fructose-6-phosphate 2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase
AN5523.3	COG1050	Trehalose-6-phosphate synthase component TPS1 and related subunits
AN4674.3	COG4157	beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase, contains WSC domain
Transporte de lipídeos e metabolismo		
AN5107.3	COG1362	Choline transporter-like protein
AN7211.3	COG4826	C-8,7 sterol isomerase
AN8283.3	COG0684	Cytochrome P450
AN1901.3	COG0684	Cytochrome P450
AN6433.3	COG0831	Acyl-CoA
AN10527.3	COG3889	Predicted gamma-butyrobetaine,2-oxoglutarate dioxygenase
AN5646.3	COG1389	3-oxoacyl CoA thiolase
AN10413.3	COG1329	Phospholipase D1
AN0913.3	COG3240	Phosphatidylinositol synthase
AN3796.3	COG1737	Oxysterol-binding protein
AN2720.3	COG1455	Lysophospholipase
AN10807.3	COG2208	Vigilin
AN2277.3	COG1118	Lysophosphatidic acid/acyltransferase endophilin/synaptic vesicle

ORF	Número COG	Função
formation		
Transcrição		
AN4026.3	COG1081	Transcription factor NSD1 and related SET domain proteins
AN8168.3	COG0384	Chromodomain-helicase DNA-binding protein
AN1995.3	COG4210	Nuclear localization sequence binding protein
AN2009.3	COG0849	Transcription factor PRD and related proteins, contain PAX and HOX domains
AN1217.3	COG4577	Transcription factor LIM3, contains LIM and HOX domains
AN9303.3	COG0015	Regulator of arginine metabolism and MADS box-containing transcription factors
AN10822.3	COG2169	Zn-finger transcription factor
AN7038.3	COG1601	GATA-4/5/6 transcription factors
AN0825.3	COG0260	RNA polymerase II, large subunit
AN9087.3	COG3598	Thyroid hormone receptor-associated protein complex, subunit TRAP230
AN4878.3	COG4091	Transcription factor
AN2911.3	COG1414	Transcriptional activator FOSB/c-Fos and related bZIP transcription factors
AN0817.3	COG4124	Putative transcriptional repressor regulating G2/M transition
AN4210.3	COG2043	Signaling protein SWIFT and related BRCT domain proteins
Replicação, recombinação e reparo		
AN2304.3	COG0011	Nucleotide excision repair factor NEF2, RAD23 component
AN7651.3	COG4141	DNA repair and recombination protein RAD52/RAD22
AN6740.3	COG0012	DNA damage inducible protein
AN7712.3	COG3041	Nucleoside diphosphate-sugar hydrolase of the MutT (NUDIX) family
AN3186.3	COG2520	5'-3' exonuclease
AN4555.3	COG1956	DNA topoisomerase III alpha
AN10415.3	COG0250	DNA repair protein RAD18 (SMC family protein)
Biogênese de parede celular e membrana		
AN6318.3	COG2571	Chitin synthase/hyaluronan synthase (glycosyltransferases)
AN5586.3	COG1322	GDP-mannose pyrophosphorylase/mannose-1-phosphate guanylyltransferase
AN4411.3	COG2571	Chitin synthase/hyaluronan synthase (glycosyltransferases)
Modificação pós traducional “turn over” de proteínas, chaperonas		
AN4863.3	COG3496	Cytochrome c oxidase assembly protein/Cu2+ chaperone COX17
AN2302.3	COG1724	SCF ubiquitin ligase, Skp1 component
AN3022.3	COG2512	Beta-tubulin folding cofactor C
AN6686.3	COG1339	Aspartyl protease
AN1339.3	COG0940	Ubiquitin protein ligase RSP5/NEDD4
AN11102.3	COG1872	Ubiquitin-specific protease
AN9304.3	COG0867	Glutathione S-transferase
AN2072.3	COG1868	Ubiquitin C-terminal hydrolase
AN7713.3	COG4265	Predicted E3 ubiquitin ligase
AN10461.3	COG0779	Protease, Ulp1 family
AN4557.3	COG0731	AAA+-type ATPase containing the peptidase M41 domain
AN10339.3	COG0800	FOG Predicted E3 ubiquitin ligase
AN6049.3	COG4628	Predicted E3 ubiquitin ligase
AN0226.3	COG0425	Ubiquitin-protein ligase
AN8269.3	COG0019	Molecular chaperone (HSP90 family)
AN3918.3	COG2195	Transferrin receptor and related proteins with the protease-associated domain
Biossíntese de metabólitos secundários, transporte e catabolismo		
AN5335.3	COG0156	Cytochrome P450 CYP2 subfamily
AN10641.3	COG0061	Transporter, ABC superfamily (Breast cancer resistance protein)
AN3564.3	COG1199	Short-chain alcohol dehydrogenase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase
AN1623.3	COG0029	Amine oxidase

ORF	Número COG	Função
AN3247.3	COG0065	Pleiotropic drug resistance proteins (PDR1-15), ABC superfamily
Função geral predita apenas		
AN3387.3	COG3656	FOG 7 transmembrane receptor
AN3789.3	COG3086	Predicted dioxygenase
AN10373.3	COG3605	Beta amyloid precursor-binding protein
AN3434.3	COG0395	Ras-related GTPase
AN2522.3	COG0391	SNF2 family DNA-dependent ATPase
AN10036.3	COG0255	Synaptic vesicle transporter SVOP (major facilitator superfamily)
AN0979.3	COG4339	RPEL repeat-containing protein
AN4569.3	COG4061	DMQ mono-oxygenase/Ubiquinone biosynthesis protein COQ7/CLK-1/CAT5
AN4743.3	COG0393	Ras-related small GTPase, Rho type cdc42
AN4312.3	COG4443	Putative transcription factor HALR/MLL3, involved in embryonic development
AN4310.3	COG0504	FOG Ankyrin repeat
AN0976.3	COG0956	PHD finger protein AF10
AN1251.3	COG1721	FOG Zn-finger
AN1203.3	COG4300	Predicted methyltransferase
AN0895.3	COG1196	Predicted NAD-dependent oxidoreductase
AN0467.3	COG3175	Protein phosphatase 4 regulatory subunit 2 related protein
AN7083.3	COG1552	Predicted alpha/beta hydrolase
AN7864.3	COG2383	Predicted ATPase
AN7300.3	COG4299	PHD Zn-finger protein
AN9281.3	COG1862	GYF domain containing proteins
AN9498.3	COG4234	TPR repeat-containing protein
AN6008.3	COG4532	WD40-like repeat containing protein
AN4292.3	COG2945	Predicted RNA-binding protein
AN4170.3	COG3780	Thioredoxin binding protein TBP-2/VDUP1
AN4072.3	COG0504	FOG Ankyrin repeat
AN5568.3	COG1947	Leucine rich repeat proteins, some proteins contain F-box
AN10046.3	COG3665	ZYG-1-like serine/threonine protein kinases
AN4889.3	COG3943	THUMP domain-containing proteins
Função desconhecida		
AN0693.3	COG3528	FOG PDZ domain
AN8984.3	COG2922	Uncharacterized conserved protein
AN8237.3	COG4149	Uncharacterized conserved protein
AN8850.3	COG0396	Uncharacterized conserved protein
AN8339.3	COG4744	Uncharacterized conserved protein
AN1001.3	COG2306	Uncharacterized conserved protein
AN6015.3	COG3661	Uncharacterized conserved protein
AN6058.3	COG2342	Uncharacterized conserved protein
AN1022.3	COG4539	Uncharacterized conserved protein
AN4070.3	COG3200	Uncharacterized conserved protein
AN0062.3	COG2594	Uncharacterized conserved protein
AN7101.3	COG3854	SPRT-like metalloprotease
AN9473.3	COG2428	Uncharacterized conserved protein
AN5718.3	COG4674	Uncharacterized conserved coiled-coil protein
AN2567.3	COG4267	Predicted membrane protein
AN2751.3	COG4592	Uncharacterized conserved protein
AN3053.3	COG3594	FOG Cadherin repeats diacylglycerol acyltransferase (DGAT)
AN0424.3	COG4674	Uncharacterized conserved coiled-coil protein
Mecanismos de transdução do sinal		
AN4745.3	COG1450	Predicted Rho GTPase-activating protein
AN6982.3	COG0789	Protein tyrosine phosphatase
AN3834.3	COG3751	Growth factor receptor-bound proteins (GRB7, GRB10, GRB14)
AN6046.3	COG4225	Sorbin and SH3 domain-containing protein
AN4515.3	COG4641	FOG Toll/interleukin receptor and related proteins with LRR and TIR repeats
AN2766.3	COG0229	Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase

ORF	Número COG	Função
AN6305.3	COG0616	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit (PKA)
AN6315.3	COG0583	Serine/threonine protein kinase
AN4935.3	COG0583	Serine/threonine protein kinase
AN6618.3	COG2197	Ypt/Rab-specific GTPase-activating protein GYP7 and related proteins
AN1330.3	COG4306	Glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase C
AN10031.3	COG3653	Growth factor beta/activin receptor subfamily of serine/threonine kinases
AN3746.3	COG4269	Rac GTPase-activating protein BCR/ABR
AN0988.3	COG0671	LAMMER dual specificity kinases
AN1099.3	COG0197	Tyrosine kinases
AN4940.3	COG3543	Ca ²⁺ -dependent activator protein
AN5213.3	COG2052	Activin A type IB receptor, serine/threonine protein kinase
AN10150.3	COG1786	Lysosomal trafficking regulator LYST and related BEACH and WD40 repeats
AN4169.3	COG2122	Beta-catenin-binding protein APC, contains ARM repeats
AN5973.3	COG0598	Serine/threonine protein kinase
Tráfego intracelular, secreção e transporte vesicular		
AN3751.3	COG1013	Synaptic vesicle protein rabphilin-3A
AN5920.3	COG2319	Vacuolar assembly/sorting protein VPS9
AN1179.3	COG4635	Vacuolar import and degradation protein
AN10849.3	COG2063	Vacuolar assembly/sorting proteins VPS39/VAM6/VPS3
AN2979.3	COG0860	Synaptobrevin/VAMP-like protein
AN5219.3	COG3724	Negative regulator of COPII vesicle formation
AN2692.3	COG4809	Rab6 GTPase-interacting protein involved in endosome-to-TGN transport
AN5579.3	COG1809	Vacuolar protein sorting-associated protein
AN6120.3	COG0929	Guanine nucleotide exchange factor
Estrutura nuclear		
AN0085.3	COG2992	Nucleolar GTPase/ATPase p130
AN10996.3	COG2171	Karyopherin (importin) beta 3
Citoesqueleto		
AN3437.3	COG0516	Dystonin, GAS (Growth-arrest-specific protein), and related proteins
AN3547.3	COG1840	Kinesin light chain
AN1558.3	COG0162	Myosin class I heavy chain
AN8244.3	COG0516	Dystonin, GAS (Growth-arrest-specific protein), and related proteins
AN4513.3	COG0242	Kinesin-like protein
AN2480.3	COG0161	Myosin class II heavy chain
AN7256.3	COG1702	Nebulin repeat protein
AN1156.3	COG0161	Myosin class II heavy chain
AN7484.3	COG0613	Projectin/twitchin and related proteins
AN4706.3	COG0161	Myosin class II heavy chain
AN5942.3	COG4568	Cytoskeleton-associated protein and related proteins

Para verificar o grau de confiabilidade do microarray e para validar a expressão de alguns transcritos foram escolhidos sete genes dos clusters II, IV, V e VII (Figura 48) que mostraram repressão transcripcional e estavam envolvidos em algum aspecto de regulação da morfogênese celular: AN0913.3 (fosfatidil glicerofosfato sintase), AN3443.3 (Ras GTPase), AN5100.3 (CDC50, proteína endossomal que regula polaridade celular), AN1016.3 (proteína G subunidade α), AN10413.3 (fosfolipase D), AN2766.3 (fosfatidilinositol-4 fosfato 5- quinase) e

AN4743.3 (Rac1 Rho GTPase *racA*^{RAC1}; VIRAG et al., 2007) [para revisões sobre Rho GTPases envolvidas em polaridade celular ver VIRAG, HARRIS 2006a; HARRIS, 2006].

Figura 48: Clusterização hierárquica comparando o padrão de expressão da linhagem selvagem e $\Delta atmA$ após a liberação do bloqueio com HU (2190 genes). As cores indicam a razão $\log_2$ (Cy5/Cy3) para cada ponto experimental tendo o tempo zero de cada linhagem como o valor de referência. Os clusters I, III e VI e os clusters II, IV e V mostram respectivamente os genes mais e menos expressos no mutante $\Delta atmA$ em comparação com a linhagem selvagem. As Tabelas 16 e 17 mostram alguns genes que pertencem a estes clusters.

Foram sintetizadas sondas fluorescentes (LUX[®], Invitrogen) para quantificação da expressão desses genes por RT-PCR em tempo real nas linhagens selvagem e $\Delta atmA$, 120 minutos de crescimento após liberação do bloqueio com HU. Os resultados foram expressos como o número de vezes de repressão no mutante em comparação com a linhagem selvagem (Figura 49). Os resultados obtidos indicaram que os genes selecionados apresentaram queda na expressão do mRNA e sugerem seu possível envolvimento no processo de polaridade celular e também a confiabilidade das hibridizações de microarray.

Figura 49: Repressão dos valores mRNA no mutante $\Delta atmA^{ATM}$ de genes identificados pela técnica de microarray após liberação do bloqueio com HU. Os valores de mRNA dos genes escolhidos foram avaliados por RT-PCR em tempo real no tempo de 120 minutos de germinação após retirada da droga. O valor de repressão está indicado com relação aos valores obtidos na linhagem selvagem no mesmo ponto experimental de 120 minutos. Fosfatidil inositol sintase (AN0913.3), ras GTPase (AN3434.3), proteína endossomal CDC50 envolvida em polaridade celular (AN5100.3), fosfolipase D (AN10413.3), fosfatidilinositol-4 fosfato 5- quinase (AN2766.3), Rac Rho GTPase (AN4743.3).

Diante desses resultados, alguns desses genes acima descritos foram investigados em mais detalhes. A principal hipótese de investigação diz respeito ao fato de que o mRNA de vários genes envolvidos nessas vias bioquímicas estão diminuídos, pois de alguma forma $atmA^{ATM}$ pode controlar sua expressão direta ou indiretamente. Como estratégia inicial para investigar essa hipótese foram idealizadas duas abordagens: (i) o uso de sondas fluorescentes para localização de estruturas subcelulares e de agentes farmacológicos visando investigar os aspectos de crescimento polarizado no mutante $atmA^{ATM}$ e (ii) a construção de linhagens duplo mutantes $\Delta atmA^{ATM}$ e outras mutações ou fusões com *gfp* de genes envolvidos em algumas das vias metabólicas mencionadas acima. Assim, estes genes puderam ser agrupados em três categoriais de acordo com a hipótese de trabalho: (i) genes envolvidos no estabelecimento e/ou controle do crescimento polarizado (exemplo Rac Rho GTPase); (ii) genes envolvidos na biosíntese de ácido fosfatídico, como fosfolipase D e (iii) genes envolvidos na biosíntese de ergosterol (micro domínios da membrana plasmática, “lipid rafts”), secreção, tráfico endocítico e transporte vesicular.

4.3.3.1. Genes envolvidos na formação do eixo de crescimento polarizado e no controle do crescimento polar

Para a caracterização desses genes no “background” da linhagem $\Delta atmA$ foram realizados vários cruzamentos com mutantes e fusões com gfp que desempenham papel nesse processo como, por exemplo: (i) a β -tubulina (*tubA*) [KONZACK et al., 2005]; (ii) os homólogos das proteínas de *S. cerevisiae* componentes do polarissomo, *spaA*^{SPA2} e *budA*^{BUD6} [VIRAG; HARRIS, 2006a]; (iii) o motor celular kinesina (*kipA*) [KONZACK et al., 2005]; (iv) a tropomiosina (*tpmA*) [PEARSON et al., 2004]; (v) a proteína Rho GTPase *modA*^{G14V}, homólogo de Cdc42 e componente do complexo Cdc42, que atua de maneira seqüencial com Rac GTPase (*racA*^{RAC1}; tabela 17) [VIRAG et al., 2007], (vi) *sepA*, uma formina proteína “scaffold” envolvida em eventos morfogênicos dependentes de actina [SHARPLESS; HARRIS, 2002] (para um resumo ver Tabela 18).

Como mostrado na Figura 29, as hifas da linhagem selvagem apresentam arranjo longitudinal característico que termina em um ponto discreto na extremidade da hifa. Em contraste, as hifas da linhagem $\Delta atmA$ apresentam um arranjo aleatório que não converge em um único ponto. Esses resultados foram inicialmente obtidos através de experimentos de imunofluorescência com anticorpos anti β -tubulina. A fim de comprovar esses resultados, foi obtida a linhagem *alcA::gfp::tubA* $\Delta atmA^{ATM}$ para que o arranjo das moléculas de β -tubulina fosse verificado em células vivas. Os resultados mostraram que cerca de 50% das hifas dessa linhagem (IM69-W100) apresentaram o mesmo fenótipo identificado anteriormente (dados não apresentados) comprovando *in vivo* os resultados obtidos com células fixadas submetidas a imunofluorescência.

Konzack et al. (2005) identificaram que a kinesina (KipA) é necessária para o crescimento polarizado e de microtúbulos em *A. nidulans*. No mutante $\Delta kipA$, microtúbulos com polaridade positiva (“plus ends”) alcançam a extremidade das hifas, mas apresentam movimento lateral contínuo. Com isso, as hifas perdem orientação e crescem encurvadas aparentemente devido a má localização do Spitzenkörper na extremidade da hifa. Na linhagem *gfp::KipA*, KipA localiza-se na extremidade positiva dos microtúbulos, sugerindo que KipA requer sua atividade intrínseca de proteína motora para atingir a extremidade positiva dos microtúbulos. A linhagem $\Delta atmA$ $\Delta kipA$ apresenta fenótipo idêntico ao da linhagem $\Delta atmA$ sozinha

em termos de cinética nuclear e crescimento polar. Entretanto, a linhagem $\Delta atmA$ *gfp::kipA* apresentou resultados diferentes: aproximadamente 70% dos germinantes apresentaram comportamento semelhante a linhagem selvagem, isto é, KipA localiza-se na extremidade da hifa apresentando grande intensidade de fluorescência. Por outro lado, em cerca de 30% dos germinantes, KipA ou não está localizado na extremidade da hifa ou seu conteúdo apresenta-se grandemente diminuído (Figura 50). A falta de localização apropriada de KipA no mutante $\Delta atmA$ coincide com os germinantes onde a extremidade da hifa apresenta-se naturalmente alterada ou é irregularmente desenvolvida (Figura 50 setas). Esses resultados conjuntamente evidenciam a importância da AtmA na organização dos microtúbulos citoplasmáticos na extremidade das hifas.

As linhagens duplo mutantes $\Delta atmA$ *tpmA::gfp*, $\Delta atmA$ *spaA::gfp*, $\Delta atmA$ *sepA::gfp*, e $\Delta atmA$ *alcA::gfp::budA* não apresentaram diferença com relação a localização e a intensidade de fluorescência das linhagens *tpmA::gfp*, *spaA::gfp*, *sepA::gfp* e *alcA::gfp::budA* (dados não apresentados).

Figura 50: Localização subcelular da proteína KipA no mutante $\Delta atmA$. Enquanto na linhagem selvagem ocorre acúmulo da proteína na extremidade da hifa com a presença dos “cometas” gerados durante o trânsito da proteína motora (A), no mutante $\Delta atmA$, KipA está presente em menores quantidades ou mesmo ausente na extremidade das hifas (B). As setas indicam a extremidade das hifas anormais onde o efeito da diminuição de KipA é mais acentuado. Os germinantes foram crescidos em “glass bottom dishes” em MM glicerol + etanol por 18 horas a 30°C e analisados por microscopia de varredura confocal.

Foram também construídas as linhagens duplo mutantes $\Delta atmA$ $\Delta spaA$, $\Delta atmA$ $alcA::modA^{G14V}$ e o efeito dessas mutações sobre o crescimento polarizado foi analisado através do ensaio de polarização após liberação do bloqueio com HU (150 minutos de crescimento em meio completo). A função da proteína SpaA ocorre exclusivamente na extremidade da hifa e acredita-se que ocorra interação desta com várias outras proteínas componentes do polarissomo, inclusive com os componentes do complexo Cdc42, incluindo a proteína Cdc42 (*modA* em *A. nidulans*) facilitando a sua sinalização. Neste ensaio, 75,5% dos germinantes da linhagem selvagem apresentaram crescimento polarizado enquanto as linhagens $\Delta spaA$, $\Delta atmA$, e $\Delta atmA$ $\Delta spaA$ apresentaram respectivamente: $73,5 \pm 9,2\%$; $29,5 \pm 0,7\%$; e $17,0 \pm 2,8\%$. No experimento realizado com a linhagem $alcA::modA^{G14V}$, uma linhagem dominante negativo onde a glicina 14 foi substituída por uma valina, os germinantes foram incubados por 5 horas em meio completo contendo 50 mM de HU, liberados do bloqueio e incubados por 4 horas e trinta minutos em condições de indução do dominante negativo ModA^{G14V} (MM glicerol + etanol 2%). Neste, a linhagem selvagem apresentou $61,5 \pm 2,1\%$ de crescimento polarizado enquanto os mutantes $\Delta atmA$, $alcA::modA^{G14V}$ e $\Delta atmA$ $alcA::modA^{G14V}$ apresentaram respectivamente $39,5 \pm 0,7\%$; $25,0 \pm 1,4\%$ e $10,5 \pm 0,7\%$. Conjuntamente, esses resultados enfatizam a importância de AtmA na organização dos microtúbulos citoplasmáticos e do polarissomo na célula e revelam interação de *atmA* com os genes *spaA* e *modA* para o estabelecimento e manutenção do eixo de crescimento polarizado.

Tabela 18: Interações genéticas observadas no mutante $\Delta atmA$

Linhagem	Genótipo principal	Fenótipo observado
IM69-W100	$\Delta atmA$; $alcA::gfp::tubA$	As hifas da linhagem selvagem apresentam microtúbulos em arranjo longitudinal que terminam em um ponto discreto na extremidade da hifa. Por outro lado, no mutante $\Delta atmA$ os microtúbulos não convergem na extremidade da hifa apresentando-se desestruturados de maneira aleatória. A quantificação desse fenótipo mostrou que cerca de 50% das hifas apresentam microtúbulos que falham na convergência na ponta da hifa. Esses resultados “in vivo” estão em acordo com aqueles previamente descritos utilizando anticorpos anti β -tubulina em células fixadas (Figura 29).
IM69-K100	$\Delta atmA$; $alcA::gfp::kipA$	Aproximadamente 70% das hifas comportam-se como a linhagem selvagem, isto é, KipA localiza-se com a mesma intensidade na extremidade da hifa. Em cerca de 30% das células, KipA ou não está localizado na ponta as hifas, ou seu conteúdo está diminuído (Figura 50).
IM69-K13	$\Delta atmA$; $\Delta kipA$	Não foi observada nenhuma interação genética (dados não apresentados).
IM69-AV1	$\Delta atmA$; $spaA::gfp$	A linhagem duplo mutante comporta-se como a linhagem selvagem, isto é, a fluorescência localiza-se com a mesma intensidade na extremidade das hifas (dados não apresentados).
IM69-AV11	$\Delta atmA$; $\Delta spaA$	Defeito no crescimento polarizado após liberação do bloqueio com HU é mais pronunciado (ver texto).
IM69-AKS4	$\Delta atmA$; $sepA::gfp$	A linhagem duplo mutante comporta-se como a linhagem selvagem, isto é, a fluorescência localiza-se com a mesma intensidade na extremidade das hifas e nos pontos de septação.
IM69-ACP	$\Delta atmA$; $tpmA::gfp$	A linhagem duplo mutante comporta-se como a linhagem selvagem, isto é, a fluorescência localiza-se com a mesma intensidade na extremidade das hifas e nos pontos de septação (dados não apresentados).
IM69-37	$\Delta atmA$; $alcA::modA^{G14V}::a$ rgB	Defeito no crescimento polarizado após liberação do bloqueio com HU é mais pronunciado (ver texto).
IM69-AV2	$\Delta atmA$; $alcA::gfp::budA$	A linhagem duplo mutante comporta-se como a linhagem selvagem, isto é, a fluorescência localiza-se com a mesma intensidade na extremidade das hifas e nos pontos de septação (dados não apresentados).
IM69-78	$\Delta atmA$; $calC2$	Defeito no crescimento polarizado após liberação do bloqueio com HU é mais pronunciado (Figura 52B). Suprime parcialmente a sensibilidade a CPT e MMS do mutante $\Delta atmA$ (dados não apresentados).

4.3.3.2. Genes envolvidos na síntese de ácido fosfatídico

Como pode ser visto na Figura 49, os genes que codificam as enzimas fosfolipase D (AN10403.3), fosfatidil inositol sintase (AN0913.3) e fosfatidil inositol 4-fosfato 5-quinase (AN2766.3) foram verificados como menos expressos no mutante $\Delta atmA$. Esses genes são importantes para a síntese de ácido fosfatídico e para a ativação da proteína quinase C (para uma revisão ver WANG et al., 2006). Para investigar o envolvimento dessas vias no crescimento polarizado, foi realizado um experimento de supressão específica da produção de ácido fosfatídico mediada pela

fosfolipase D utilizando 1-butanol (RITCHIE; SWANSON; GILROY, 2002; POTOCKÝ et al., 2003). Além disso, foi também construída a linhagem duplo mutante $\Delta atmA$ com uma linhagem onde o homólogo da proteína quinase C de *A. nidulans* apresentava uma mutação funcional (*calc2*, C2537G) (TEEPE et al., 2007).

A enzima fosfolipase D (PLD) apresenta uma reação única chamada transfosfatidilação a qual pode ser usada para testar o envolvimento da PLD no sistema e, por conseguinte as funções biológicas do ácido fosfatídico. Se for fornecida a célula um álcool primário (como 1-butanol) a PLD catalisa a reação de transfosfatidilação favorecendo a síntese de um fosfatidil-álcool ao invés do produto esperado ácido fosfatídico (Figura 51). Dessa forma, o uso de 1-butanol pode ser útil para a inibição de vias de sinalização ou eventos celulares mediados por ácido fosfatídico e pela PLD, uma vez que a reciclagem desse metabólito fica prejudicada (Figura 51C). É importante notar que isso acontece somente na presença de álcool primário e não secundário ou terciário e que a atividade de PLD não é inibida, mas sim estimulada pelo álcool primário (WANG et al., 2006). Assim, essa propriedade foi utilizada para investigar se o crescimento polarizado no mutante $\Delta atmA$, após liberação do bloqueio com HU, seria afetado pela redução da concentração celular de ácido fosfatídico em comparação com a linhagem selvagem. Como pode ser observado na Figura 52A, o mutante $\Delta atmA$ apresentou um significativo decréscimo no crescimento polarizado após a adição de 1-butanol.

Figura 51: Ácido fosfatídico está envolvido no defeito de polarização no mutante $\Delta atmA$. **(A)** Estrutura da molécula de fosfatidil inositol 4, 5 bifosfato e os sítios de clivagem das fosfolipases para a produção de diferentes mensageiros secundários. **(B)** Esquema simplificado da via de produção de ácido fosfatídico e diacilglicerol. O esquema mostra a produção de ácido fosfatídico via reação de transfosfatidilação (catalisada pela fosfolipase D) e pela ação da enzima diacil glicerol quinase. As PkCs de fungos tem sido classificadas como classificadas como um sub-grupo de Pkc's cuja regulação é independente de cálcio, como indicada pela linha tracejada. Asteriscos indicam genes reprimidos na linhagem $\Delta atmA$ nos experimentos de microarray. **(C)** Ensaio de transfosfatidilação na presença de um álcool primário para a diminuição da síntese de ácido fosfatídico.

Figura 52: A diminuição do “pool” de ácido fosfatídico e a ausência de *calC2* na célula exacerbam o defeito de crescimento polarizado após liberação do bloqueio com HU. **(A)** Ensaio de polarização do crescimento na presença de 1-butanol. Os germinantes foram liberados do bloqueio com HU e crescidos por adicionais 150 minutos na presença de concentrações crescentes de 1-butanol para depleção da produção de ácido fosfatídico via fosfolipase D (ver texto para detalhes). **(B)** O mesmo experimento foi realizado com a linhagem duplo mutante $\Delta atmA calC2$, porém os germinantes foram crescidos por 150 minutos após liberação do bloqueio com HU na ausência de qualquer droga. Resultados indicam media $\pm$ desvio padrão de dois experimentos independentes com 100 germinantes analisados em cada.

A redução da expressão dos genes fosfatidil inositol sintase e fosfatidil inositol 4-fosfato 5-quinase sugerem que a produção de diacilglicerol via fosfolipase C está prejudicada, possivelmente causando uma redução da ativação de proteína quinase C. Dessa forma o crescimento polarizado após liberação do bloqueio com HU foi também verificado na linhagem duplo mutante $\Delta atmA calC2$ (Figura 52B). Interessantemente, a linhagem duplo mutante apresenta uma drástica redução no percentual de crescimento polarizado em relação aos parentais e à linhagem selvagem, sugerindo uma possível interação entre *atmA* e *calC2*. Além disso, a linhagem duplo mutante $\Delta atmA calC2$ foi capaz de suprimir parcialmente a sensibilidade da linhagem $\Delta atmA$ a CPT (1, 2,5 e 5 μ M) e MMS (0,001, 0,002 e 0,003%), mais uma vez indicando interação entre esses genes (dados não apresentados).

Recentemente, Kobayashi et al., (2005) mostraram que anormalidades na via de biosíntese de esfingolípídeos abole a sinalização “dowstream” via Mss4, o homólogo de fosfatidil inositol 4-fosfato 5-quinase em *S. cerevisiae*. Dessa forma, foi também verificado o efeito da droga miriocina durante a polarização no mutante $\Delta atmA$. A miriocina é um inibidor específico da enzima palmitoil transferase que catalisa a primeira reação passo limitante para a síntese de esfingolípídeos, isto é, a condensação de serina com palmitoil CoA para produzir 3-ketoesfingarina (CHENG

et al., 2001). Não houve crescimento polarizado quando conídios da linhagem $\Delta atmA$ foram crescidos na presença de 80 $\mu\text{g/ml}$ de miriocina por 14 horas (Figura 53A), embora as células tenham mantido a sua cinética de divisão celular semelhante àquela das células controle já que miriocina não causa bloqueio do ciclo celular (CHENG et al., 2001). Houve ainda nesse experimento, uma significativa redução do crescimento polarizado no mutante $\Delta atmA$ no ensaio de polarização após liberação do bloqueio com HU (Figura 53B).

Conjuntamente esses dados indicam que os defeitos de crescimento polarizado no mutante $\Delta atmA$ são provavelmente causados pela redução dos valores de ácido fosfatídico indicando um importante papel dessa via bioquímica no crescimento polar em *A. nidulans*.

Figura 53: Efeito da inibição da síntese de esfingolipídeos na linhagem $\Delta atmA$. **(A)** Conídios foram crescidos por 14 horas a 44°C em MM + glicerol na presença e ausência de 80 $\mu\text{g/ml}$ de miriocina. **(B)** Ensaio de polarização do crescimento na presença de miriocina em meio YG+UU. Os germinantes foram liberados do bloqueio com HU e crescidos por adicionais 150 minutos na presença de concentrações crescentes de miriocina. Os resultados são referentes a análise de 200 germinantes em cada linhagem.

4.3.3.3. Genes envolvidos na biossíntese de ergosterol, tráfico intracelular, secreção e transporte vesicular.

Em células eucarióticas, a membrana plasmática apresenta-se segregada em dois domínios laterais distintos chamados “lipid rafts”. Esses domínios ricos em esteróis ou esfingolipídeos desempenham papéis importantes em processos dinâmicos como o endereçamento de proteínas dentro da célula, polaridade celular e transdução de sinal (ALVAREZ; DOUGLAS; KONOPKA, 2007). Genes envolvidos na biossíntese de ergosterol foram verificados como menos expressos no mutante $\Delta atmA$ em ambos os experimentos de microarray (Tabelas 12 e 17). Os genes envolvidos nessas funções celulares foram investigados através de ensaios utilizando (i) lovastatina, um inibidor da enzima hidróxi-metil-glutaril-CoA redutase, que catalisa o primeiro passo da biossíntese de ergosterol (CHARLTON-MENYS; DURRINGTON, 2007); (ii) a sonda fluorescente filipina (MARTIN; KONOPKA, 2004; PEARSON et al., 2004;) para detectar o principal esterol de membrana, o ergosterol nos domínios ricos em esterol em fungos (para uma revisão ver ALVAREZ; DOUGLAS; KONOPKA, 2007) e (iii) FM4-64 para verificar a internalização do marcador e o transporte para o sistema vacuolar e endomembranas em *A. nidulans* (PENÁLVA, 2005).

Para determinar se os componentes lipídicos se encontravam localizados na extremidade da hifa durante o crescimento, germinantes da linhagem selvagem e $\Delta atmA$ foram corados com filipina para detectar o conteúdo de ergosterol. A filipina é um antibiótico da classe dos polienos com estrutura similar à anfotericina B que se liga aos esteróis e forma um complexo com 3- β hidroxil esterol livre. Esse composto tem sido utilizado para a visualização de esteróis de membrana em uma grande variedade de tipos celulares devido a sua fluorescência que pode ser observada em microscópio no mesmo espectro de emissão do DAPI (GHANNOUM, RICE, 1999; ALVAREZ; DOUGLAS; KONOPKA, 2007). Durante o crescimento polarizado, os germinantes da linhagem selvagem exibiram intensa marcação de filipina bem localizada na extremidade da hifa, (Figura 54A, painel da esquerda), enquanto os germinantes do mutante $\Delta atmA$ não apresentaram o mesmo perfil de marcação. Ao contrário, a distribuição de ergosterol apareceu de forma aleatória, distribuída em todo o corpo da célula com áreas mal distribuídas de marcação mais intensa visualizada em pontos mais claros de fluorescência

localizados apical e sub apicalmente (Figura 54B setas). Por outro lado, a localização de filipina nos sítios de septação não foi perturbada no mutante. O ensaio de polarização na presença de lovastatina mostrou que os germinantes da linhagem $\Delta atmA$ são mais afetados com relação ao estabelecimento do eixo de crescimento polarizado (Figura 54C).

Figura 54: Polarização do ergosterol de membrana e influência da lovastatina durante o crescimento polarizado em *A. nidulans*. **(A)** Conídios foram crescidos em MM+Glicerol a 44°C por 14 horas e imediatamente corados com filipina para visualização da fluorescência.

Na linhagem mutante $\Delta atmA$ a localização de ergosterol na extremidade das hifas não ocorre **(B)** Visão aproximada dos germinantes indicando os pontos de distribuição aleatória em torno da superfície da célula com a presença de pontos ocasionais de intensidade maior de fluorescência visualizada pela marcação com filipina (setas). **(C)** Ensaio de crescimento polarizado na presença de lovastatina, um inibidor específico da biosíntese de ergosterol. Os germinantes foram liberados do bloqueio com HU e crescidos por adicionais 150 minutos em meio YG+UU na presença de concentrações crescentes de lovastatina. Resultados indicam média $\pm$ desvio padrão de dois experimentos independentes com 100 germinantes analisados em cada.

A coloração com FM4-64 revelou que o Spitzenkörper está apropriadamente localizado na extremidade da hifa verificada como uma zona de coloração um pouco mais intensa nos germinantes da linhagem selvagem (Figura 55, setas). Além disso, foram verificadas estruturas bem delimitadas e definidas as quais provavelmente representam vacúolos e endossomos maduros, de uma forma bastante semelhante àquela mostrada por Peñalva (2005). Ao contrário, nos germinantes da linhagem $\Delta atmA$, o Spitzenkörper não pode ser visualizado em pelo menos 50% das hifas. A falta de localização apropriada do Spitzenkörper no mutante $\Delta atmA$ coincide com os germinantes onde a extremidade da hifa apresenta-se naturalmente alterada ou são irregularmente desenvolvidas (Figura 55 setas). Além disso, foi claramente verificada uma diminuição da marcação de estruturas internas de vacúolos e endossomos que são corados pelo FM4-64.

Esses resultados em conjunto corroboram a hipótese que os microdomínios ricos em lipídeos da membrana plasmática podem desempenhar um papel importante na morfogênese da hifa e que no mutante $\Delta atmA$ a polarização desses lipídeos de membranas é deficiente. Adicionalmente, a mutação $\Delta atmA$ pode também afetar o tráfego endocítico e vacuolar em *A. nidulans*.

Figura 55: Marcação com FM4-64 dos germinantes da linhagem $\Delta atmA$. Conídios foram crescidos em “glass bottom dishes” por 14 horas a 44°C em MM + glicerol. Os germinantes foram corados com FM4-64 por dois minutos e incubados a 37°C por 3 horas para a internalização do marcador. Os germinantes foram analisados em microscópio confocal. As setas indicam o Spitzenkörper na linhagem selvagem (painéis da esquerda) e a ausência deste nos germinantes da linhagem $\Delta atmA$.

4.3.4. Discussão - Análise do perfil transcricional do mutante $\Delta atmA$ em *A. nidulans*

Neste trabalho foram fornecidas várias evidências acerca das vias metabólicas onde AtmA atua. Mutantes do gene *ATM* em humanos apresentam sintomas de ataxia cerebelar, telangiectasia (vasos sanguíneos visivelmente dilatados que geralmente aparecem nos olhos e algumas vezes na face), imunodeficiência primária causado por defeitos no sistema imune humoral e celular, degeneração do timo e gônadas, crescimento somático retardado, sinais de envelhecimento precoce e predisposição aguda a malignidades linforeticulares (BARZILAI; ROTMAN; SHILOH, 2002). O gene *ATM* é altamente pleiotrópico e uma questão central sobre a pleiotropia é saber se os efeitos pleiotrópicos de um determinado gene são devidos a ação deste em múltiplas vias metabólicas ou se serão derivados de múltiplas conseqüências de uma única função molecular (DUDLEY et al., 2005; VAN DE PEPPEL; HOLSTEGE, 2005; HE; ZHANG, 2006).

Como descrito anteriormente, *atmA* apresenta funções na resposta ao dano ao DNA, além de ser necessário no processo de crescimento polarizado. Dessa forma, levando em consideração a natureza pleiotrópica do gene *atmA* a avaliação do perfil transcricional da linhagem mutante foi uma estratégia inicial para verificar as vias metabólicas que são controladas por *atmA*. AtmA poderia afetar a função desses genes de maneira direta ou indireta, isto é, ele poderia diretamente regular genes que codificam proteínas envolvidas na resposta ao dano ao DNA e crescimento polar, ou alterar a atividade dessas proteínas via modificações pós-traducionais. Essas modificações poderiam ser realizadas pela AtmA “per se” (isto é, fosforilações) ou por outras enzimas sujeitas a ação pós traducional mediada por AtmA. Existem poucos estudos que tentaram identificar genes regulados pela ATM quinase utilizando a técnica de microarray (CHENG et al., 2004; JANG et al., 2004; ELKON et al., 2005).

A linhagem mutante $\Delta atmA$ apresenta um aumento na cinética de divisão nuclear em comparação com a linhagem selvagem. Essa característica pode se refletir no fato de que os pontos de checagem que controlam a integridade genômica estão perturbados, o que leva a mais rápida replicação e segregação no mutante. O ensaio de TUNEL (GORCZYCA et al., 1993), que é um método sensível para detectar a quantidade de fragmentação do DNA em células individuais, mostrou grande marcação no núcleo das células do mutante $\Delta atmA$ (Figura 26). Esse resultado indica que há extensiva fragmentação no DNA dessa linhagem crescido na ausência de qualquer agente que causa dano ao DNA. De acordo com essa observação, os experimentos de microarray realizados a partir dos primeiros estágios de germinação dos conídios da linhagem mutante identificaram como mais expressos um grande número de genes envolvidos na replicação do DNA. Por outro lado, genes envolvidos em pontos de checagem de dano ao DNA e na progressão do ciclo celular, como os homólogos de *HUS1* e *WEE1* foram menos expressos no mutante $\Delta atmA$. Definitivamente a proteína ATM está envolvida na inibição da progressão do ciclo celular mediante DSBs (KASTAN; LIM, 2000). Células AT são deficientes na inibição na síntese de DNA radioresistente (RDS; PAINTER, 1981), o que também foi observado em *A. nidulans* (Figura 17). A inibição da síntese de DNA mediada por DSB resulta da ativação do ponto de checagem intrafase S e a RDS acontece devido a falha no ponto de checagem. Talvez a AtmA esteja ativando,

direta ou indiretamente, o disparo de novas origens de replicação embora a princípio, essa não seja uma de suas ações. Enquanto a *ATM* claramente responde a DSB, através da parada do ciclo celular pela ativação das vias de reparo, a *ATR* é o elemento primariamente ativado por intermediários de replicação e dessa forma monitora o progresso das forquilhas de replicação (HURLEY; BUNZ, 2007). Entretanto, parece que *ATM* pode desempenhar papel nesse processo também. Em células de *Xenopus*, a ativação localizada de *ATM* e *ATR* durante a replicação do DNA inibe as quinases específicas da fase S e previnem as origens de replicação vizinhas de serem disparadas (SHECHTER, COSTANZO, GAUTIER, 2004; SHECHTER, GAUTIER 2005). Assim, a acelerada proliferação no mutante $\Delta atmA$ indica que há um acúmulo de DSBs durante a fase S. A *ATM* é ativada nos pontos de DSB e via fosforilação de substratos chaves, ativa a cascata de transdução de sinal que desencadeia vias metabólicas que em última instância interagem com a maquinaria dos pontos de checagem do ciclo celular nas fases G1/S, intrafase S e G2/M (SHILOH, 2006; HURLEY; BUNZ, 2007). Assim, a cinética de divisão nuclear e as hibridizações de microarray indicam que o mutante $\Delta atmA$ parece ignorar o dano ao DNA endógeno, não ativando pontos de checagem para a parada da divisão nuclear e ativação das vias de reparo e/ou apoptose.

Considerando a acelerada cinética de divisão nuclear no mutante, este irá requerer quantidades maiores de precursores para a biosíntese de ácidos nucléicos. Foi observado que genes da via das pentoses fosfato e as duas subunidades da ribonucleotídeo redutase tiveram expressão de mRNA aumentada. A via das pentoses fosfato produz duas moléculas de NADPH e uma molécula de ribose 5-fosfato para cada molécula de glicose 6-fosfato oxidada. Entretanto, algumas células necessitam mais de NADPH para as reações de biosíntese que usam NADP como aceptor de elétrons do que necessitariam de ribose 5-fosfato para a incorporação em nucleotídeos e ácido nucléico (NELSON; COX, 2005). Nestes casos, a ribose 5-fosfato é convertida (reciclada) sequencialmente em gliceraldeído 3-fosfato e frutose 6-fosfato pela ação da transketolase e transaldolase. Estas enzimas criam uma ligação reversível entre a via das pentoses fosfato e a glicólise. Adicionalmente, a conversão de ribonucleotídeos em desoxiribonucleotídeos (pela ação da ribonucleotídeo redutase) requer NADPH como doador de elétrons. Dessa forma, qualquer célula em processo de rápida divisão requer grandes quantidades

de NADPH. No mutante $\Delta atmA$ em especial, o “pool” de NADPH ainda terá que ser racionado entre as necessidades da célula de rapidamente replicar seu material genético e na detoxificação desta dos radicais livres amplamente distribuídos na célula em crescimento como mostrado anteriormente (Figuras 44 e 45).

O envolvimento da via das pentoses fosfato nesse sistema foi verificado através da construção de uma linhagem duplo mutante $\Delta atmA$ com uma das mutações dessa via existentes em *A. nidulans* (*pppA1*). Essa mutação confere a célula diminuição do crescimento polarizado e pode ser complementada pelo gene da transaldolase. No duplo mutante $\Delta atmA$ *pppA1*, a diminuição da taxa de proliferação em comparação à linhagem selvagem indica que de alguma forma *atmA* controla a via das pentoses fosfato. Além disso, o defeito no crescimento polarizado no duplo mutante $\Delta atmA$ *pppA1* foi epistático sugerindo um papel da via das pentoses fosfato no controle da polarização em *A. nidulans*. Previamente, foi já demonstrado que mutações em outros genes da via das pentoses fosfato também causam defeito morfológico. Um exemplo disso é o mutante morfológico de *N. crassa* conhecido como colonial, no qual mutações no locus *col-2* alteram a estrutura de glicose 6-fosfato desidrogenase levando a um acúmulo *in vivo* de glicose 6-fosfato e em última instância um acentuado defeito no padrão de crescimento desse fungo (BRODY; TATUM, 1966). Esse mutante apresentou 40% menos NADPH nos extratos celulares em comparação a uma linhagem selvagem, enfatizando assim os efeitos pleiotrópicos da deficiência de NADPH (BRODY, 1970).

As modificações de natureza oxidativa na molécula de DNA são freqüentes em células de mamíferos e têm sido sugerido que este é um importante mecanismo de carcinogênese, diabetes e envelhecimento (POULSE, 2005). Existem inúmeras evidências mostrando que células AT podem sofrer cronicamente do aumento do estresse oxidativo e que a deficiência de ATM está diretamente relacionada com este fenótipo (para uma revisão ver BARZILAI; ROTMAN; SHILOH, 2002). Assim, a influência do estresse oxidativo no crescimento do mutante $\Delta atmA$ foi verificada. Quando comparada com a linhagem selvagem, esta apresentou diminuição da viabilidade na presença de peróxido de hidrogênio e ROS se acumularam nos germinantes da linhagem $\Delta atmA$ como demonstrado pelos ensaios com NBT e H_2DCFDA . As células previnem o dano causado pelo estresse oxidativo mantendo uma atmosfera redutora na célula, isto é, uma alta taxa de NADPH/NADP

(NELSON; COX, 2005). O mutante $\Delta atmA$ apresenta uma razão NADPH/NADP diminuída, aumento dos valores de NADP total e NADP⁺, indicando ineficiência da célula em lidar com as ROS. Nesse sentido, Stern et al., (2002) também mostraram anormalidade no balanço de nucleotídeos de pirimidina no cerebelo de ratos “knock out” ATM^{-/-}. Houve um significativo decréscimo nos valores de NADP⁺ no cerebelo de ratos ATM^{-/-} de 4 meses de idade. Essas mudanças foram resultantes de uma significativa diminuição de NADP⁺ sem nenhuma mudança nas concentrações de NADPH. Ao contrário dos ratos ATM^{-/-}, o aumento da produção de NADP⁺ no mutante $\Delta atmA$ pode refletir o fato de que a via das pentoses fosfato está plenamente ativa produzindo mais NADPH o qual é imediatamente consumido pelos germinantes visando atenuar o estresse oxidativo causado pela inativação do gene *atmA*. Interessantemente, outras vias de detoxificação de ROS na célula estiveram também ativadas como observado nos experimentos de microarray. Dentre elas, os genes da catalase (AN5918.3) e tioredoxina (AN0170.3) estiveram mais expressos no mutante (Tabela 16). Tioredoxina é uma pequena proteína ubíqua que apresenta uma variedade de atividades como doadora de hidrogênio e age como a principal oxidoredutase. Foi verificado um aumento de mais de duas vezes nos valores de tioredoxina no cerebelo de ratos ATM^{-/-} (BARZILAI; ROTMAN; SHILOH, 2002).

No módulo anterior foi demonstrado que *atmA* é requerida para a formação do eixo estável de crescimento polarizado. A função da ATM não tinha sido relacionada com a manutenção e o estabelecimento da polaridade celular em células de levedura. Entretanto, Enserink et al. (2006) e Shi et al. (2007) mostraram que RAD53/CHK2 está envolvido respectivamente no crescimento polar em *S. cerevisiae* e *Candida albicans*. Linhagens inativadas do gene $\Delta chkA^{CHK1}$ e $\Delta chkB^{CHK2}$ foram recentemente isoladas em nosso laboratório, entretanto elas não apresentaram defeitos de crescimento polarizado, o mesmo acontecendo com a linhagem $\Delta uvsB^{ATR}$ (MALAVAZI et al., manuscrito em preparação). Por outro lado foi observado um papel nestes eventos morfogênicos em mutantes do gene ATR em *C. albicans*, mas não para ATM (MALAVAZI et al., dados não publicados). Dessa forma pode-se propor que essas proteínas de “checkpoint” parecem ser importantes na coordenação de eventos morfogênicos conjuntamente com a replicação na resposta ao dano ao DNA durante o crescimento. Assim, para obter maiores informações sobre os genes que são regulados por *atmA* durante esses eventos

morfogenéticos foram realizadas hibridizações comparativas de microarray entre a linhagem selvagem e $\Delta atmA$ após bloqueio das células na fase S com HU. Os resultados indicaram a repressão de vários genes envolvidos em diferentes aspectos do crescimento polarizado no mutante $\Delta atmA$, que foram divididos em quatro categorias: (i) envolvidos diretamente na formação e controle do crescimento polar; (ii) envolvidos na síntese de ergosterol; (iii) envolvidos na síntese de ácido fosfatídico e (iv) envolvidos no tráfico intracelular, secreção e transporte vesicular.

Um dos modelos mais amplamente aceitos para o crescimento apical das hifas e o modelo do “centro provedor de vesículas” proposto por Bartnicki-Garcia (BARTNICKI-GARCIA et al., 1989). Este modelo está baseado no acúmulo de vesículas na extremidade da hifa em crescimento apical chamado Spitzenkörper (para uma revisão ver STEINBERG, 2007). É proposto que o Spitzenkörper - importante para o crescimento polar e para a determinação da direção do crescimento - recebe vesículas derivadas do Complexo de Golgi, que por sua vez libera vesículas exocíticas de maneira controlada, gerando dessa forma um gradiente de exocitose que determina a forma da extremidade apical da hifa (BARTNICKI-GARCIA et al., 1989). O crescimento polarizado requer dois eventos básicos: (i) a especificação do eixo de polaridade e (ii) a subsequente estabilização deste eixo (HARRIS, 2006). Em fungos filamentosos não é conhecido o que especifica um novo eixo de polaridade. Entretanto, uma vez que este novo eixo é definido, ele deve ser estabilizado para permitir a emissão do tubo germinativo. O papel de Cdc42 na polaridade tem sido caracterizado em vários fungos filamentosos (para uma revisão ver HARRIS, 2006). Em *S. cerevisiae*, proteínas chaves como Bud3, Bud4, Bud8, Bud9, Bud10, Rax1, e Rax2 direcionam o estabelecimento da polaridade (HARRIS, 2006). Essas proteínas geram informações posicionais que são reconhecidas por Bud1, uma GTPase relacionada a Ras, e por seus reguladores associados Bud2 e Bud5. Uma vez ativado Bud1, desencadeia a união da maquinaria para o estabelecimento da polaridade na qual Cdc42 desempenha um papel central. No seu estado ativado, isto é, ligado a GTP, Cdc42 interage com efetores “downstream” que incluem as proteínas quinases ativadas por p21, Ste20 e Cla4 e proteínas “scaffold” como a da classe das forminas (PRUYNE; BRETSCHER, 2000). Além disso, Cdc42 ativado recruta e interage com vários complexos protéicos nos sítios de crescimento polarizado (VIRAG; HARRIS, 2006a). Estes complexos

incluem: (i) o exocisto, o qual é necessário para a fusão localizada de vesículas com a membrana plasmática e inclui oito proteínas Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 e Exo84; (ii) o complexo Arp2/3 que inclui as proteínas Arp2, Arp3, Arc40, Arc35, Arc18, Arc19, e Arc15, e é responsável pela inicialização da ramificação dos filamentos de actina que formam uma rede apical de actina envolvida em endocitose; (iii) o polarissomo, localizado na extremidade da hifa logo abaixo da membrana plasmática apical, que controla a formação dos cabos de actina que suportam o transporte das vesículas exocíticas. Membros do polarissomo de *S. cerevisiae* incluem Bni1, Pea2, Spa2 e Bud6. Essas duas últimas proteínas *spaA* e *budA* respectivamente, já foram identificadas e caracterizadas em *A. nidulans* (VIRAG; HARRIS, 2006a). Em última instância a integridade do Spitzenkörper depende do polarissomo (HARRIS et al., 2005; STEINBERG, 2007).

Notavelmente, interações entre os microtúbulos citoplasmáticos e o córtex celular parecem desempenhar um importante papel na manutenção e no posicionamento do Spitzenkörper nas zonas de novo crescimento (KONZACK et al., 2005). No módulo anterior foi proposto que as fosforilações dependente de AtmA poderia influenciar essas interações, dessa forma auxiliando na discriminação de uma área definida para o recrutamento dos microtúbulos citoplasmáticos. A ausência dessas zonas no mutante $\Delta atmA$ levaria a interação aleatória dos microtúbulos nessas áreas de crescimento apical, o que por sua vez afetaria o posicionamento do Spitzenkörper e a manutenção do eixo estável de crescimento. Consistente com essa hipótese, Horio e Oakley (2005) demonstraram que embora os microtúbulos não sejam estritamente necessários para o crescimento polarizado, eles são elementos limitantes desse processo. Essa idéia pode ser verificada neste trabalho, uma vez que a kinesina, KipA, previamente demonstrada regulando o posicionamento do Spitzenkörper (KONZACK et al. 2005), falha na localização precisa na extremidade da hifa no mutante $\Delta atmA$.

As possíveis interações genéticas entre AtmA e os homólogos das proteínas do polarissomo Spa2 (*SpaA*) e Bud6 (*BudA*) (VIRAG; HARRIS, 2006a); e com a formina de SepA (SHARPLES; HARRIS, 2002) foram verificadas. Como mencionado anteriormente, a classe das proteínas Rho GTPase (que inclui Cdc42 e Rac1, respectivamente *modA* e *racA* *A. nidulans*; VIRAG et al., 2007) são proteínas ligadas à membrana que funcionam como “interruptores” para promover informação

espacial e temporal à proteínas efetoras que reorganizam o citoesqueleto de actina. Dentre esses efetores de Rho GTPase estão proteínas que contêm múltiplos domínios de interação proteína-proteína que parecem funcionar como moléculas “scaffold”. Essas moléculas integram os sinais disparados com a dinâmica do citoesqueleto de actina integrando assim as proteínas sinalizadoras e as proteínas ligantes de actina (SHARPLES; HARRIS, 2002). Exemplos dessas moléculas incluem as proteínas da classe das forminas que tem apenas um representante em *A. nidulans*, previamente caracterizado denominado SepA. Ainda, foi verificada a interação entre ModA^{CDC42} e AtmA^{ATM}. Não foram encontradas interações de AtmA com as proteínas BudA e SepA. Entretanto, houve uma exacerbação do defeito de polarização no duplo mutante $\Delta atmA \Delta spaA$ após liberação do bloqueio com HU. Virag e Haris (2006a) verificaram que SpaA funciona exclusivamente no córtex apical e que esta proteína não é requerida para a união e manutenção do Spitzenkörper sendo que as funções do polarissomo são mantidas na ausência desses genes, mas com diferentes contribuições dos outros componentes do polarissomo nesse processo. Entretanto, uma evidência genética adicional das interações entre AtmA e o crescimento polarizado vem da linhagem duplo mutante $\Delta atmA modA^{G14V}$. Nesta linhagem houve também um aumento do defeito de polarização quando a proteína dominante negativa é expressa no “background” do mutante $\Delta atmA$.

A extensão apical demanda o suprimento apropriado de precursores e a remoção do excesso de materiais para reciclagem ou destruição. A via endocítica desempenha um papel chave na aquisição de nutrientes, regulação dos receptores de membrana, transporte, canais iônicos e reciclagem da membrana (PEÑALVA 2005). Há também evidências sugerindo que o Spitzenkörper apresenta funções relacionadas a endocitose, sugerindo assim que a extremidade da hifa não é somente um ponto de exocitose, mas também é importante em eventos como a reciclagem da membrana que permite o crescimento polarizado (STEINBERG, 2007). A marcação com FM4-64 mostrou que no mutante $\Delta atmA$, o Spitzenkörper não pode ser claramente visualizado e que houve um significativo decréscimo nas estruturas internas de vacúolos e endossomos. Esses resultados fortemente sugerem uma interação entre AtmA e a maquinaria envolvida na convergência do

polarissomo e do Spitzenkörper além, de um desequilíbrio no tráfico de vesículas endocíticas/exocíticas no mutante.

A composição de esterol em animais e leveduras influencia a localização apical de proteínas. Domínios de lipídios (“lipid rafts”) são domínios especializados presentes na membrana que contém esfingolipídeos e ergosterol que funcionam como plataformas que ancoram proteínas na membrana plasmática, mediando sua biosíntese e o transporte endocítico (ALAVAREZ; DPUGLAS; KONOPKA, 2007). Ainda, esses domínios ricos em esterol e esfingolipídios desempenham papel importante em processos celulares incluindo endereçamento de proteínas, polaridade e transdução do sinal (ALAVAREZ; DPUGLAS; KONOPKA, 2007). O mutante $\Delta atmA$ apresentou diminuição da expressão de vários genes relacionados a biosíntese de ergosterol e o crescimento polarizado no mutante foi mais afetado quando os “pools” de ergosterol foram reduzidos pela inibição da síntese de ergosterol por lovastatina, um inibidor da HMG-CoA redutase. Além disso, os domínios ricos em ergosterol da membrana não estão propriamente organizados na membrana da linhagem mutante $\Delta atmA$ indicando que AtmA pode direta ou indiretamente controlar a síntese e a deposição de ergosterol de membrana. Nesses microdomínios.

A inibição da biosíntese de esfingolipídios pela miriocina em *C. albicans* e *A. nidulans* reduz o crescimento apical e aumenta a ramificação lateral (MARTIM; KONOPKA, 2004; CHENG et al., 2001). Da mesma forma, o mutante $\Delta atmA$ foi mais afetado pelo tratamento com miriocina em termos de percentual de crescimento polarizado. Essa perda de polaridade é acompanhada do rearranjo dos cabos de actina o que sugere que os microdomínios ricos em esfingolipídios são importantes para a polarização do citoesqueleto de actina (CHENG et al., 2001). Entretanto, a localização de actina no mutante $\Delta atmA$ parece ser normal quando visualizada na linhagem $\Delta atmA tpmA::gfp$. A tropomiosina (*tpmA*) é uma proteína estabilizadora de filamento de actina e, portanto se localiza nos cabos de actina. Um dos genes que apresentou queda da expressão do mRNA nos experimentos de microarray foi o homólogo de MSS4, de *S. cerevisiae*, ou seja, a enzima fosfatidilinositol-4-fosfato 5-quinase (AN2766.3). Estudos em *S. cerevisiae* mostraram que a localização correta do citoesqueleto de actina durante o crescimento polar e a formação dos cabos de actina requerem a função de MSS4,

promovendo uma ligação entre o metabolismo de fosfoinositol e a organização do citoesqueleto de actina *in vivo* (DESRIVIÈRES et al., 1998). Além disso, Kobayashi et al. (2005) mostraram também uma relação funcional indireta entre esfingolipídios e MSS4 uma vez que a perturbação na biosíntese de esfingolipídios abole a sinalização mediada por MSS4 tanto em termos de atividade enzimática quanto em termos de localização na membrana plasmática (KOBAYASHI et al., 2005).

Yorek et al. (1999) verificaram em estudos de “turn over” utilizando fibroblastos em cultura, que células AT mostram menor atividade do metabolismo de glicerofosfolipídios que células normais e que células AT apresentam alterações no metabolismo de myo-inositol e na síntese de fosfolipídeos, o que pode interferir em vias de sinalização celular. Vários genes envolvidos na síntese de ácido fosfatídico tiveram sua expressão reduzida no mutante $\Delta atmA$ e conseqüentemente na produção de diacilglicerol (DAG). O papel de DAG na ativação da proteína quinase C (PKC) de mamíferos é bem conhecido (para uma revisão ver COLON-GONZALEZ; KAZANIETZ, 2006) ao contrário do que ocorre em fungos (para uma revisão ver SHEA; DEL POETA, 2006). Em *Cryptococcus neoformans*, a proteína recombinante purificada Pkc1 mostrou aumento da atividade catalítica na presença de várias subespécies de DAG e fosfatidil serina (SHEA; DEL POETA, 2006). No modelo de células de mamíferos, DAG liga-se ao domínio C1 (rico em cisteína) das PKCs (HURLEY; BUNZ, 2007). *A. nidulans* apresenta dois genes putativos que codificam Pkcs, os quais são designados *pkcA* e *pkcB* (HERMANN et al., 2006). Entretanto, regiões ricas em cisteínas usualmente envolvidas na ligação de DAG e ésteres de forbol não foram encontrados no homólogo *pkcA* e *pkcB* de *A. nidulans*. O gene *pkcA* apresenta seqüência de aminoácidos que se assemelha a seus homólogos em outros fungos. Em sua região regulatória estão presentes os subdomínios conservados CN1, CN2 e CN3 além de duas regiões ricas em cisteína e, na região catalítica, o sítio ativo serina/treonina quinase (HERMANN et al., 2006). O gene que complementa o mutante *calC2* é *pkcA* (TEEPE et al., 2007). O mutante *calC2* foi isolado a partir de estudos que buscaram identificar genes envolvidos no metabolismo da parede celular em fungos filamentosos. Este mutante apresenta elevada sensibilidade a calcoflúor e outros fenótipos que indicam sua função no metabolismo da parede celular (TEEPE et al., 2007). A redução da síntese de ácido fosfatídico causada pelo tratamento das células com um álcool primário teve um

efeito mais pronunciado no mutante $\Delta atmA$ que na linhagem selvagem indicando que a linhagem mutante apresenta-se constitutivamente com menores quantidades de ácido fosfatídico. A proteína quinase C, PkcA apresenta também funções no crescimento polarizado em *A. nidulans* uma vez que *pkcA::gfp* localiza-se na extremidade da hifas em crescimento. Interessantemente, o defeito de crescimento polarizado na linhagem duplo mutante $\Delta atmA calC2$ foi acentuado em comparação às linhagens parentais indicando que AtmA e PkcA podem estar interagindo geneticamente. Embora ainda necessite ser determinado se DAG pode ativar a PkcA, é razoável especular que AtmA pode interagir com PkcA via ativação da via do ácido fosfatídico. Estes resultados sugerem que AtmA está controlando as vias metabólica da produção de ácido fosfatídico e esfingolípídios. A má regulação destas pode certamente contribuir para a redução do crescimento polarizado através de um decréscimo de esfingolípídios e/ou modulação da atividade de PkcA via produção de ácido fosfatídico.

Conjuntamente, esses resultados indicam que AtmA pode controlar uma complexa rede de interações com microtúbulos citoplasmáticos, quinases de lipídios, síntese de ácido fosfatídico e esfingolípídios, atividade da PkcA, e com a maquinaria de polarização dos cabos de actina em *A. nidulans*. Essas complexa rede de interações coordena não só a progressão do ciclo celular mediante dano ao DNA, como também pontos de checagem morfogénéticos.

Módulo 4.4: Análise do transcriptoma de *Aspergillus nidulans* exposto ao dano ao DNA causado por camptothecin através de macroarrays de cDNA

MALAVAZI et al., Transcriptome analysis of *Aspergillus nidulans* exposed to camptothecin-induced DNA damage. **Eukaryotic Cell**, v. 5, p. 688-1704, 2006.

4.4.1 Construção e sequenciamento da biblioteca de cDNA induzida por CPT do fungo *A. nidulans*

A construção de uma biblioteca de cDNA do fungo filamentoso *A. nidulans* induzida pela droga anti topoisomerase I CPT, teve por objetivo reunir informações sobre transcritos diferencialmente expressos durante a resposta celular ao dano ao DNA neste organismo modelo. Inicialmente, visando identificar as melhores condições experimentais para o isolamento de mRNA para a construção da biblioteca de cDNA, foi verificado o acúmulo de mRNA de transcritos relacionados ao dano ao DNA após o tratamento com CPT na linhagem selvagem GR5. Assim, foram realizadas reações de RT-PCR em tempo real utilizando-se sondas fluorescentes para os genes *mreA*^{MRE11} e *uvrC*^{RAD51}, ambos sabidamente mais expressos durante a resposta celular ao dano ao DNA (SEMIGHINI et al., 2003; FAGUNDES et al., 2005). Durante a cinética de indução, o gene *uvrC*^{RAD51} mostrou um aumento nos valores de mRNA de até 13,5 vezes no tempo 60 minutos. Os valores de mRNA de *mreA*^{MRE11} estiveram igualmente aumentado durante o tratamento com CPT sendo que o maior aumento, a exemplo do que aconteceu com *uvrC*^{RAD51}, ocorreu após 60 minutos de exposição à droga (Figura 56). Diante da indução transcricional observada para esses genes, a biblioteca de cDNA foi construída a partir de uma cultura da linhagem selvagem induzida com CPT por 60 minutos visando o enriquecimento dos transcritos relacionados ao reparo ao dano ao DNA

Figura 56: Os genes *mreA*^{MRE11} e *uvrC*^{RAD51} de *A. nidulans* são induzidos transcricionalmente pela presença de CPT.

As seqüências geradas a partir da biblioteca construída foram submetidas a um “pipeline” de análise de seqüências brutas desenvolvido pela equipe de bioinformática do laboratório, que consistia da submissão dos cromatogramas, leitura dos nucleotídeos utilizando-se o aplicativo Phred, marcação do vetor de clonagem utilizando-se o aplicativo Crosmatch do pacote Phrap, remoção das bordas que apresentavam seqüência do vetor de clonagem, organização dos fragmentos e exibição dos resultados em interface gráfica adequada (EWING et al., 1998; EWING; GREEN, 1998; GORDON et al., 1998). A partir desse processamento, foram obtidas 8745 ESTs (“Expressed Sequence Tags”) com um tamanho mínimo de 300 pares de bases e uma qualidade Phred de valores maiores que 20. Do total de ESTs geradas, 8575 foram seqüenciadas a partir da região 5’ e 170 a partir da extremidade 3’. O conjunto de ESTs foi clusterizado com auxílio do programa CAP3 (HUANG; MADAN, 1999) o qual identificou 2405 singlets e 1214 contigs.

Com a conclusão do projeto de sequenciamento do fungo filamentoso *A. nidulans* (GALAGAN et al., 2005, disponível em <<http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/aspergillus/index.html>>), foi possível identificar o número de ORFs que foram obtidas na biblioteca aqui construída. Para tanto, os singlets e um representativo de cada contig foram submetidos a análise de similaridade (BLASTN) (ALTSCHUL et al., 1990) com o banco de ORFs do projeto genoma de *A. nidulans*. Esta análise mostrou que dos 2405 singlets gerados, foram obtidas seqüências parciais de 2099 genes expressos de *A. nidulans* e 306 ESTs que não mostraram similaridade com nenhuma ORF do banco (classificadas como “no hits”). Desse total de 2099 ORFs identificadas, 1804 delas mostravam similaridade com sua ORF correspondente uma única vez e 295 apresentaram similaridade com a ORF correspondente mais de uma vez no banco. Com relação aos contigs, dos 1214 gerados pelo programa CAP3, 1115 apresentaram similaridade com alguma ORF do banco de *A. nidulans* (983 mostraram similaridade com sua ORF correspondente uma única vez e 132 apresentaram similaridade com a ORF correspondente mais de uma vez). Além disso, 99 seqüências foram classificadas como “no hits”. Assim, esta coleção de ESTs corresponde a um total de 2919 genes de *A. nidulans*. Os clusters classificados como “no hits” são certamente seqüências, predominantemente da região 5’ não codificadora, que se encontram

ausentes no banco de dados das ORF de *A. nidulans* e que merecem posterior investigação para estudo de regiões promotoras. A listagem completa das ESTs seqüenciadas, bem como a relação de singlets e contigs está disponível em <<http://143.107.203.68/camptothean/nidulans.html>>.

4.4.2. Uso da técnica de macroarray para identificação de genes diferencialmente expressos em presença de CPT

Utilizando-se os protocolos descritos na seção materiais e métodos foram realizadas hibridizações com sondas de cDNA obtidas a partir das linhagens selvagem e $\Delta uvrsB^{ATR}$ crescidas na ausência e na presença de 25 μ M de CPT por diferentes tempos. Antes das hibridizações serem processadas, os cDNAs obtidos para essa finalidade foram validados por reação de RT-PCR em tempo real para verificar o comportamento da expressão do gene $uvrC^{RAD51}$. O gene $uvrC^{RAD51}$ foi novamente escolhido, pois é induzido transcricionalmente na presença de CPT e outros mutagênicos, além de estar diretamente envolvido no processo de recombinação homóloga. Na linhagem selvagem, como esperado, ocorreu indução do gene $uvrC^{RAD51}$, enquanto na linhagem AAH14 a indução foi cerca de 40% menor (dados não apresentados) refletindo a importância do gene $uvrsB^{ATR}$ na resposta celular ao dano causado por CPT.

Para cada tempo de indução do micélio de *A. nidulans* com CPT (30, 60 e 120 minutos, na presença ou ausência da droga) foram realizadas 4 hibridizações independentes, sendo duas delas para o micélio não tratado, e duas para o micélio exposto à droga. Assim, para cada condição experimental foram realizadas 4 leituras independentes de intensidade do sinal para cada spot, uma vez que cada membrana carrega a mesma EST depositada sobre ela em duplicata, como mostra a Figura 57. As membranas utilizadas nas análises posteriores para a identificação de genes diferencialmente expressos foram aquelas que apresentaram resultados satisfatórios de qualidade uma vez que experimentos de macro/microarray muitas vezes apresentam baixos sinais e/ou “background” elevados além de outros artefatos, o que fez com que alguns experimentos tivessem que ser descartados.

As membranas hibridizadas com [α - 33 P] dCTP foram lidas em aparelho “phosphorimager” para obtenção das imagens. A quantificação dos “spots” foi

realizada com o auxílio do programa ArrayVision (Imaging Research). Os dados brutos foram filtrados, normalizados, transformados e analisados como descrito nos materiais e métodos. A Figura 58 apresenta um sumário das etapas que foram seguidas desde a obtenção dos dados brutos de cada hibridização até a identificação dos genes diferencialmente expressos nos experimentos.

Figura 57: Esquema da matriz dos “spots” depositados nas membranas de nylon do macroarray **(A)**. Foram utilizadas 11 placas de 384 poços para acomodar as 3629 seqüências (2405 singlets, 1214 contigs e 10 “spots” controles) de DNA provenientes da biblioteca de ESTs construída. Os números iguais representam os “spots” duplicados de uma mesma placa de 384 poços nas membranas os quais estão dispostos nesta mesma ordem para cada uma das posições nos filtros. Ao lado esquerdo, está representada uma posição de uma das membranas hibridizadas com cDNA proveniente da linhagem selvagem GR5 tratada com CPT por 60 minutos. A imagem foi obtida durante a quantificação dos “spots” pelo programa Array Vision. **(B)** Visão geral da imagem captada da mesma membrana contendo as 3629 seqüências utilizadas.

Figura 58: Desenho experimental dos experimentos de macroarray. Para cada tempo, dois pares de hibridização foram realizados, onde M indica membrana, gerando 12 hibridizações independentes para cada linhagem. Em cada ponto de tratamento foram gerados dois conjuntos de dados obtidos a partir do cálculo dos valores médios dos “spots” réplicas contidos nas membranas. O conjunto de dados experimentais foi, portanto constituído de 12 conjuntos de dados numéricos originados de 12 hibridizações independentes.

De maneira geral, as membranas utilizadas para os experimentos de hibridização apresentaram uma boa qualidade estrutural no que diz respeito à massa de DNA alvo depositado sobre ela. As análises derivadas das hibridizações com a sonda “overgo” mostraram que apenas 7 a 10% dos “spots” foram descartados em cada membrana devido à falta de homogeneidade na quantidade de DNA dos “spots” réplicas depositados no filtro durante o trabalho do robô Q-bot (dados não apresentados). Além disso, a qualidade e reprodutibilidade das hibridizações sequenciais foram verificadas através do coeficiente de correlação (r^2) obtido entre as duas hibridizações de cada tempo. O valor de r^2 esteve sempre acima de 0.89. Esses valores obtidos estão bem próximos a de outros trabalhos semelhantes que também utilizaram membranas de nylon de alta densidade para experimentos de macroarray (COX et al., 1999; MURAD et al., 2002) (Figura 59).

Figura 59: Gráfico de dispersão das hibridizações de macroarray (duplicatas) para a linhagem selvagem GR5. Cada ponto representa uma EST depositada sobre as membranas. Para cada EST, a média da intensidade dos sinais de cada uma das duas hibridizações está disposta no gráfico. O coeficiente de correlação (r^2) está mostrado para cada conjunto de hibridização.

4.4.2.1. Análise global do perfil transcricional de *A. nidulans* em presença de CPT na linhagem selvagem GR5

Os dados devidamente filtrados e normalizados foram submetidos ao tratamento estatístico utilizando como ferramenta matemática o teste t de Student ($p < 0,05$) para validar os experimentos. Em última instância e através destas análises, das 3629 ESTs depositadas sobre os filtros de nylon, 1512 genes tiveram modulação estatisticamente significativa em pelo menos um ponto de tratamento com 25 μM de CPT quando hibridizados com sonda proveniente da linhagem selvagem. Apenas genes diferencialmente modulados cujo número de vezes de indução foi maior ou igual a 1 ou -1 foram selecionados para as análises posteriores. Os dados referentes a estes 1512 genes foram carregados no programa TMEV (Multi Experiment Viewer, TIGR), para a visualização do perfil de expressão global dos dados obtidos, como mostra a Figura 60. Os dados referentes a experimento completo de macroarray, bem como a listagem completa dos genes esta disponível em <http://143.107.203.68/camptothecin/html_iran_pub/>

Figura 60: Perfil de expressão global dos genes com modulação estatisticamente significativa em pelo menos um ponto experimental nos experimentos de macroarray com a linhagem selvagem GR5. O nível de abundância dos transcritos foi igual maior ou menor que 1,0 (-1,0). A Figura mostra as variações nos valores de logaritmo ($\log_2$) da razão da intensidade dos sinais das membranas tratadas em relação às membranas não tratadas com CPT ao longo dos diferentes tempos de exposição a droga. A intensidade de coloração é proporcional ao nível da indução (para as linhas vermelhas) ou de repressão (linhas verdes) de cada gene, tomando-se como referência seus respectivos níveis de expressão nos tempos 30, 60 e 120 minutos sem tratamento com CPT.

Isoladamente, para o tempo de 30 minutos de tratamento com CPT, foram encontrados 830 genes com modulação estatisticamente significativa, dos quais 263 apresentaram perfil de indução e 567 de repressão. Para o tempo de 60 minutos 826 genes foram diferencialmente expressos sendo que 278 estavam induzidos e 548 reprimidos. O tempo de 120 minutos foi aquele onde ocorreu o menor perfil de indução gênica dentro dos experimentos. Dos 818 genes com modulação diferencial, 638 estavam reprimidos e somente 180 induzidos. Esses resultados indicam que a variação da expressão gênica induzida por CPT parece ocorrer nos tempos mais curtos de tratamento.

A seguir, os dados foram submetidos a clusterização com o auxílio do programa TMEV. Utilizando-se o algoritmo de clusterização “K-means”, foi possível identificar os genes com perfil de indução mais acentuado. Foram produzidos 60 sub clusters de expressão objetivando-se a identificação de genes de maior interesse que poderiam estar envolvidos no reparo ao dano ao DNA. A análise destes dados permitiu selecionar genes envolvidos em vários processos celulares, cuja modulação pode estar relacionada à resposta celular à droga CPT no fungo *A. nidulans* (Figura 61). Dentre os clusters identificados, dois deles mostraram os genes com o maior perfil de expressão em todo o experimento de macroarray. O cluster de número 35 composto de 12 genes, muitos dos quais eram proteínas hipotéticas, mostrou como destaque o gene *fhadA* (AN2893.2) o qual apresentou indução de 1,2, 3,4 e 6,4 vezes respectivamente nos tempos de 30, 60 e 120 minutos de tratamento. Por sua vez, o cluster número 49 que apresentou apenas 3 genes, mostrou como induzidos os genes *tprA* (AN3617.2) com indução de 6,7, 9,7 e 18,8 vezes respectivamente nos tempos de 30, 60 e 120 minutos; o gene da poli (ADP)ribose polimerase (PARP) (*prpA*, AN3129.2) com indução de 2,3, 8,3 e 10,5 vezes. Além destes, um gene que codifica para uma proteína transportadora predita da família “ATP-binding cassette MDR” que esteve induzida 1,2, 3,2 e 13,3 vezes. A Figura 62 mostra o comportamento dos genes nos clusters 35 e 49 obtidos pelo algoritmo “k-means”.

Figura 61: Clusters de expressão gênica gerados pelo algoritmo “K-means” nas hibridizações de macroarray (linhagem selvagem). Os 1512 genes modulados em pelo menos um ponto durante o tratamento com 25 μ M de CPT foram subdivididos em 60 clusters nos quais estão dispostos os grupos de genes com perfil de expressão semelhante. Na Figura, os círculos indicam os clusters de números 35 e 49 respectivamente nos quais os genes mais intensamente modulados (indução) foram agrupados. Os gráficos indicam na ordenada a razão $\log_2$ (tratado CPT/não tratado) e na abscissa os tempos de exposição a CPT.

Figura 62: Padrão de expressão dos clusters 35 e 49 em resposta a CPT na linhagem selvagem GR5. As cores representam a razão $\log_2$ das intensidades dos sinais das membranas hibridizadas com sondas tratadas com CPT em relação às membranas hibridizadas com sondas não tratadas nos diferentes tempos. **(A)** Cluster número 35 que apresenta o gene para a proteína de interação nuclear SMAD (renomeado neste trabalho como *fhdA*) com aumento na expressão de 6,4 vezes no tempo 120 minutos. **(B)** Cluster 49 mostrando os três genes mais altamente induzidos no experimento com respectivamente 18,8, 10,5 e 13,3 vezes mais expressos no tempo 120 minutos. “TPR repeat” renomeado neste trabalho como *tprA*.

Dentre os genes induzidos na presença de CPT, foram encontrados e classificados genes envolvidos no metabolismo de DNA, RNA, em modificação de cromatina e no reparo ao dano ao DNA. Além disso, uma grande quantidade de genes que codificam para proteínas ribossomais e genes envolvidos no processo de proteólise. A Tabela 19 apresenta uma compilação dos principais genes de interesse induzidos na linhagem selvagem bem como o tempo de tratamento com CPT no qual eles tiveram sua indução validada pela análise estatística. Dentre os genes diferencialmente expressos encontrados, aproximadamente 10% codificavam para proteínas de função desconhecida (proteínas hipotéticas) e cerca de 5% se tratavam de proteínas sem identidade com o banco não redundante do NCBI, chamadas de

“no hits”. Esses resultados indicam que o tratamento com CPT proporcionou o desencadeamento de uma extensiva modificação no programa de expressão gênica nas células da linhagem selvagem. De uma maneira geral, a análise de clusterização (Figura 60) mostrou que as mudanças no perfil de expressão gênica se mantiveram durante o curso do experimento refletindo na constante presença dos efeitos da droga no meio de cultura. Do total de genes que apresentaram alteração significativa no padrão de expressão gênica (repressão ou indução), aproximadamente 12% mostraram indução igual ou maior que 2 vezes. A maioria dos genes reprimidos durante o experimento estão presentes nos clusters 16, 53, 54 e 55 e codificam proteínas hipotéticas (<http://143.107.203.68/camptothecin/html_iran_pub/>).

Tabela 19: Genes induzidos em presença de CPT identificados pela análise do macroarray na linhagem selvagem GR5 durante tratamento com CPT por 30, 60 e 120 minutos.

ORF	Homólogo (n° de acesso no NCBI)	BLAST	Linhagem Selvagem (tempo de indução)
		(e-value/ % identidade/ % (similaridade))	
Transcrição e metabolismo de RNA			
AN1949.2	putative ATP-dependent RNA helicase HAS1 (NP014017)	<i>S. cerevisiae</i> 0.0/73/85	60
AN7753.2	putative ATP-dependent RNA helicase (NP588445)	<i>S. pombe</i> 1e-78/34/55	60, 120
AN8185.2	exonuclease II, plays a role in cytoplasmic mRNA degradation (NP593482)	<i>S. pombe</i> 0.0/48/64	30, 120
AN8722.2	putative ATP dependent RNA helicase (NP594261)	<i>S. pombe</i> e-168/75/67	30, 60
AN3189.2	related to RNA helicase/RNaseIII CAF (CAB91758)	<i>N. crassa</i> 2e-76/30/46	30, 60, 120
AN3933.2	DNA-directed RNA polymerase I polypeptide 2 (RNA polymerase I subunit 2) (XP329740)	<i>N. crassa</i> 0.0/64/78	30
AN8272.2	DNA directed RNA polymerase III subunit (C74) (NP594129)	<i>S. pombe</i> 6e-49/26/44	60, 120
AN3827.2	Nucleolar protein invovled in mRNA processing (NP011617)	<i>S. cerevisiae</i> e-101/42/56	30, 60, 120
AN5931.2	p68-like protein (NP596523)	<i>S. pombe</i> 0.0/67/78	60, 120
AN4476.2	snRNP (AAM61039)	<i>A. thaliana</i> 6e-23/49/62	30, 120
Cromatina e cromossomo			
AN5102.2	cell division control protein 68 homolog cdc68 (transcriptional activator) (NP596526)	<i>S. pombe</i> 0.0/45/64	30, 60, 120
AN1286.2	putative hira protein; histone transcription regulator (NP596575)	<i>S. pombe</i> e-156/34/51	60,120
AN2770.2	putative histone promoter control protein (NP595268)	<i>S. pombe</i> 1e-18/37/51	120
AN2765.2	Histone H1(AAF16011)	<i>A. immersus</i> 4e-17/55/76	60
AN0734.2	Histone H4 (XP_328073)	<i>N. crassa</i> 6e-44/100/100	30, 60,120

ORF	Homólogo (nº de acesso no NCBI)	BLAST	Linhagem Selvagem (tempo de indução)
		(e-value/ % identidade/ % (similaridade))	
AN3468.2	Histone H2A (CAA75581)	<i>A. niger</i> 3e-48/75/76	30, 60
AN8039.2	Histone H2A variant (NP595630)	<i>S. pombe</i> 7e-43/83/90	30
AN3469.2	Histone H2B (AAP69672)	<i>A. capsulatus</i> 3e-42/98/98	60
AN3071.2	Histone acetyl transferase (AAF72665)	<i>H. sapiens</i> 3e-/42/60	120
AN8863.2	Probable nucleosome assembly protein I (CAD70974)	<i>N. crassa</i> e-124/59/66	30, 120
AN8851.2	centromere/microtubules binding protein CBF5 (NP013276)	<i>S. cerevisiae</i> 1e-71/70/80	30, 60
AN0253.2	topoisomerase I (AAB39507)	<i>C. albicans</i> 0.0/50/65	30
AN2751.2	topoisomerase II-associated protein PAT1 homolog (NP595976)	<i>S. pombe</i> 3e-90/29/45	30
AN6364.2	putative chromosome-associated protein (NP593260)	<i>S. pombe</i> 0.0/46/64	30, 60
AN1698.2	putative involvement in chromatin structure (NP593191)	<i>S. pombe</i> e-180/43/59	30
AN8742.2	Structural maintenance of chromosome protein (AAL82734)	<i>A. fumigatus</i> 0.0/ 57/71	30
Reparo do DNA			
AN3129.2	related to NAD ⁺ ADP-ribosyltransferase (poly(ADP)-ribose polymerase PARP) (CAD21266)	<i>N. crassa</i> 1e-127/43/67	30, 60,120
AN6303.2	related to replication factor C protein (RP-C) (CAB91757)	<i>N. crassa</i> 0.0/46/59	60,120
AN7423.2	replication protein A (RPA) (NP595092)	<i>S. pombe</i> e-150 46/63	60
AN0415.2	proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (NP596504)	<i>S. pombe</i> 1e-92/64/82	120
AN8201.2	DNA helicase, homolog of human XPBC (NP012123)	<i>S. cerevisiae</i> 0.0/64/75	30, 60,120
AN7309.2	Postreplication repair protein uvs-2 (P33288)	<i>N. crassa</i> 1e-75/42/56	120
AN0076.2	putative excision-repair protein (NP593167)	<i>S. pombe</i> 1e-38/25/44	60
AN5344.2	DNA repair protein mus-8 (P52493)	<i>N. crassa</i> 3e-63/79/83	30
AN6044.2	similar to cell division cycle 2 homolog protein kinase (NPKA) (XP235722)	<i>S. pombe</i> 2e-77/58/80	60

ORF	Homólogo (nº de acesso no NCBI)	BLAST	Linhagem Selvagem (tempo de indução)
		(e-value/ % identidade/ % (similaridade))	
AN7103.2	RAD26; uvsD homologue (CAA57290)	<i>S. cerevisiae</i> 0.0/39/54	30, 120
AN1708.2	mutS family DNA mismatch repair protein msh6 (NP588344)	<i>S. pombe</i> 0.0/50/69	30
AN2764.2	DNA repair protein Rad2 (NP594972)	<i>S. pombe</i> e-124/60/75	120
AN4407.2	DNA repair and recombination protein rad22 (radC <i>A. nidulans</i>) (NP593207)	<i>S. pombe</i> 2e-53/33/45	60
AN4365.2	related to DNA mismatch repair homologue (HPMS2) (XP_325240)	<i>N. crassa</i> 4e-86/31/46	120
AN1237.2	uvsC (Rad51 homologue) (EAL90369.1)	<i>A. fumigatus</i> 0.0/98/100	30, 60, 120
Transporte nuclear			
AN5717.2	importin beta subunit (NP588502)	<i>S. pombe</i> 0.0/42/64	30, 60, 120
AN2120.2	putative importin beta-4 subunit (NP596729)	<i>S. pombe</i> 1e-156/30/54	30, 60, 120
AN1379.2	Probable nuclear pore complex protein sonA (CAC18615)	<i>N. crassa</i> 1e-135/63/76	60, 120
AN5627.2	Nucleoporin nup189 (Nuclear pore protein nup189 (SonB) (NP594093)	<i>S. pombe</i> 2e-36/26/43	60
AN4942.2	putative nuclear transport factor 2 (CAD38166)	<i>D. tassiana</i> 5e-42/65/82	60, 120
Metabolism do DNA			
AN0067.2	ribonucleotide reductase small subunit (BAB13815)	<i>L. edodes</i> 1e-138/61/71	30, 60
AN4380.2	ribonucleotide-diphosphate reductase large chain (XP322797)	<i>N. crassa</i> 0.0/80/87	60, 120
AN0687.2	spermidine synthase (XP327013)	<i>N. crassa</i> e-131/76/85	30, 60, 120
AN8216.2	nucleoside diphosphate kinase (AAP85295)	<i>A. fumigatus</i> 1e-67/79/90	30
AN0271.2	deoxyuridine-5'-triphosphate nucleotide (NP593873)	<i>S. pombe</i> 4e-46/69/78	30, 120
AN8185.2	exonuclease II (NP593482)	<i>S. pombe</i> 0.0/48/64	30, 120
AN2868.2	small fragment nuclease (NP077195)	<i>M. musculus</i> 4e-37/48/65	30, 120
AN5932.2	DNA-directed DNA polymerase (CAB57881)	<i>S. pombe</i> 0.0/43/60	30

ORF	Homólogo (n° de acesso no NCBI)	BLAST	Linhagem Selvagem (tempo de indução)
		(e-value/ % identidade/ % (similaridade))	
AN2285.2	DNA helicase (NP594979)	<i>S. pombe</i> e-159/39/52	120
AN2739.2	DNA polymerase theta isoform 2 (NP955452)	<i>H. sapiens</i> e-101/31/48	60, 120
Proteassoma			
AN2761.2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-16 kDa (Ubiquitin-protein ligase)	<i>G. cingulata</i> 6e-82/95/96	30, 120
AN3716.2	19 S proteasome regulatory subunit (NP593594)	<i>S. pombe</i> 9e-91/46/66	30
AN7422.2	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (NP596085)	<i>S. pombe</i> e-130/37/53	120
AN6354.2	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (NP588530)	<i>S. pombe</i> e-118/35/53	30, 120
AN4236.2	probable 26S proteasome subunit and member of the CDC48/PAS1/SEC18 family of ATPases (NP014760)	<i>S. cerevisiae</i> e-168/73/85	60, 120
AN0909.2	hypothetical protein (ubiquitin domain profile) (EAA65938)	<i>A. nidulans</i> 0.0/92/92	30, 120
AN5981.2	hypothetical protein (ubiquitin domain profile) (EAA57730)	<i>A. nidulans</i> 0.0/77/77	60, 120
AN2085.2	putative proteasome subunit PUP1 (NP014800)	<i>S. cerevisiae</i> 7e-93/66/79	60, 120
AN4225.2	26 S proteasome regulatory subunit (NP593111)	<i>S. pombe</i> e-108/50/68	120
AN2000.2	polyubiquitin (AAK19308)	<i>T. borchii</i> e-166/98/100	30, 60, 120
AN7254.2	cdc48 (AAM08677)	<i>A. fumigatus</i> 0.0/90/93	30, 60, 120
AN4236.2	Probable 26S protease subunit and member of the CDC48/PAS1/SEC18 family of ATPases (NP014760)	<i>S. cerevisiae</i> e-168/73/85	60, 120
AN2212.2	ubiquitin conjugating enzyme (NP596239)	<i>S. pombe</i> 1e-34/49/65	30, 120
AN5793.2	20 S proteasome beta-type subunit (NP015007)	<i>S. cerevisiae</i> 1e-75/59/69	30, 60, 120
AN4869.2	20 S proteasome component (NP036098)	<i>M. musculus</i> 7e-79/57/75	60, 120
AN2416.2	ubiquitin-activating enzyme E1C isoform 1; Nedd8-activating enzyme (NP003959)	<i>H. sapiens</i> 4e-81/38/56	120
AN5705.2	ubiquitin carboxyl terminal (T38954)	<i>S. pombe</i> 1e-90/62/90	60, 120

ORF	Homólogo (n° de acesso no NCBI)	BLAST	Linhagem Selvagem (tempo de indução)
		(e-value/ % identidade/ % (similaridade))	
AN1700.2	26 S proteasome regulatory subunit (NP596381)	<i>S. pombe</i> 0.0/43/62	60
AN4872.2	monoubiquitin/carboxy extension protein fusion (AAC24705)	<i>B. fuckeliana</i> 6e-60/73/79	30
AN4016.2	ubiquitin fusion protein (CAB50892)	<i>K. lactis</i> 8e-66/96/100	30, 60, 120
AN2174.2	ubiquitin activating enzyme E1 (O94609)	<i>S. pombe</i> 0.0/58/72	30, 60, 120
AN5783.2	20 S proteasome component (beta 7) (NP595308)	<i>S. pombe</i> 9e-66/51/69	120
AN6988.2	probable 26 S proteasome subunit protein 8 homolog (NP595870)	<i>S. pombe</i> e-165/77/86	120
AN2416.2	ubiquitin activating enzyme E1C isoform 1; Nedd8-activating enzyme (NP003959)	<i>H. sapiens</i> 4e-81/38/56	120
AN1191.2	ubiquitin like modifier (NP596035)	<i>S. pombe</i> 8e-20/50/64	120
Transdução do sinal e ciclo celular			
AN1019.2	putative scf complex protein (CAD28438)	<i>A. fumigatus</i> 0.0/79/85	30, 60, 120
AN5757.2	casein kinase homolog 1 (A53581)	<i>S. pombe</i> e-145/77/87	120
AN6391.2	Serine/threonine protein phosphatase PP2A-2 catalytic subunit (Q8XI78)	<i>B. graminis</i> 0.0/91/94	120
AN4326.2	protein kinase CK2 regulatory subunit CK2B1 (AAG36869)	<i>Z. mays</i> 2e-47/43/59	120
AN5666.2	MAP kinase Mps1 (AAC63682)	<i>M. grisea</i> 3e-99/77/81	120
AN2412.2	Ca/CaM-dependent kinase-1 (AAL14118)	<i>N. crassa</i> 1e-152/71/81	60, 120
AN2265.2	serine/threonine kinase similar to casein kinase II (NP011950)	<i>S. cerevisiae</i> 9e-44/31/52	30, 60
AN6508.2	protein kinase Skp1 (NP593134)	<i>S. pombe</i> e-154/70/84	120
AN4182.2	Cell division control protein 2 CDC2 (cyclin-dependent protein kinase) (XP330428)	<i>N. crassa</i> 1e-140/79/85	30, 120
AN5100.2	similar to yeast cdc50 (NP595126)	<i>S. pombe</i> 9e-82/44/61	30, 60
AN5102.2	Cell division control protein 68 CDC68 gene product (Q00976)	<i>K. lactis</i> 0.0/42/60	30, 60, 120

ORF	Homólogo (n° de acesso no NCBI)	BLAST	Linhagem Selvagem (tempo de indução)
		(e-value/ % identidade/ % (similaridade))	
AN5744.2	14-3-3-like protein (AAP22960)	<i>P. brasiliensis</i> e-124/92/97	30, 120
AN1560.2	polo-like kinase (BAB18588)	<i>H. pulcherrimus</i> 1e-59/42/61	30, 120
AN2047.2	calmodulin (AAC96324)	<i>M. grisea</i> 1e-76/97/100	120
AN4583.2	peptidylprolyl isomerase D (cyclophilin D) (NP080628)	<i>M. musculus</i> 1e-86/48/59	60, 120
Miscelânea			
AN6359.2	sulfur controller-2 (scon2) (XP329608)	<i>N. crassa</i> 0.0/51/65	30, 120
AN6073.2	putative prohibitin (NP588144)	<i>S. pombe</i> 4e-88/68/78	30, 60, 120
AN2893.2	Smad nuclear interacting protein (35.8 kD) (NP451217)	<i>C. elegans</i> 3-29/43/63	120
AN7374.2	Hypothetical protein (EAA61745)	<i>A. nidulans</i> e-119/100/100	30, 60, 120
AN0279.2	Myb-like DNA binding protein myb-1 (O13493)	<i>N. crassa</i> 9e-29/55/71	30
AN2029.2	Hypothetical protein (F-box) (EAA64861)	<i>A. nidulans</i> 0.0/93/93	60, 120
AN0557.2	Hypothetical protein (F-box) (EAA66656)	<i>A. nidulans</i> 0.0/88/88	120
AN3617.2	TPR repeat (ZP00109827)	<i>N. punctiforme</i> 3e-2/43/64	30, 60, 120
AN8562.2	Hypothetical protein (ankirin repeats) (EAA66987)	<i>A. nidulans</i> 0.0/95/95	60, 120
AN1556.2	WD-40 repeat protein family (NP564469)	<i>A. thaliana</i> 4-39/29/48	120
AN7170.2	Hypothetical protein (Myc-type, helix-loop-helix) (EAA61422)	<i>A. nidulans</i> e-101/70/70	30, 60, 120
AN4637.2	RING zinc finger protein (O54965)	<i>M. musculus</i> 2e-10/38/55	120
AN1976.2	Chromo domain protein required for cell polarity (NP593394)	<i>S. pombe</i> 1e-48/34/52	30, 60, 120
AN0268.2	hypothetical protein (required for the stabilization of polarity axes (MesA <i>A. nidulans</i>) (XP322258)	<i>N. crassa</i> 0.0/58/70	30, 120
AN9121.2	Predicted protein (ESDC <i>A. nidulans</i>) (XP322902)	<i>N. crassa</i> 7e-50/42/51	60
AN0641.2	Translationally controlled tumor protein homolog (NP594328)	<i>S. pombe</i> e-26/38/56	30, 120
AN4119.2	Major Facilitator Superfamily (AAO49453)	<i>L. maculans</i> e-133/48/64	120

ORF	Homólogo (n° de acesso no NCBI)	BLAST	Linhagem Selvagem (tempo de indução)
		(e-value/ % identidade/ % (similaridade))	
AN8489.2	ABC transporter PMR5 (BAB59028)	<i>P. digitatum</i> 0.0/71/83	120
AN2210.2	probable ABC-transporter (NP200887)	<i>A. thaliana</i> e-170/55/72	30, 60, 120
AN3148.2	meiosis specific protein of unknown specificity (NP010389)	<i>S. cerevisiae</i> 3e-68/27/45	120
AN8746.2	transcription factor bft3 homolog (NP594757)	<i>S. pombe</i> 4e-37/52/68	60, 120
AN1217.2	LIM/homeobox transcription factor (Q25132)	<i>H. roretzi</i> 3e-07/38/58	30, 60, 120
AN8182.2	probable cell division control protein CDC12 (septin <i>A. nidulans</i>) (XP323096)	<i>N. crassa</i> 0.0/71/83	30
AN2919.2	zinc finger transcription factor ACE I (AAL69549)	<i>T. emersonii</i> e-131/43/56	30, 60, 120
AN0273.2	transcription factor that activates expression of early G1-specific genes (NP013232)	<i>S. cerevisiae</i> 5e-11/28/42	30, 60, 120

4.4.2.2. Confirmação da expressão diferencial dos genes identificados pela técnica de macroarray utilizando a metodologia de RT-PCR em tempo real

A fim de se verificar o grau de confiabilidade dos resultados obtidos com as hibridizações de macroarray, amostras dos mesmos RNAs utilizados nas hibridações das membranas de nylon do macroarray foram submetidos a experimentos de RT-PCR em tempo real. No total, foram selecionados 23 genes que apresentaram modulação positiva durante os tempos de tratamento com CPT (em pelo menos um ponto experimental) para serem submetidos a quantificação por RT-PCR em tempo real. O critério para a escolha dos genes para os quais seriam sintetizadas sondas fluorescentes esteve baseado no alto perfil de expressão mostrado pelo resultado do macroarray e a possível participação destes genes em vias de reparo ao dano ao DNA. Dentre os genes escolhidos, alguns deles tem sido estudados em outros organismos e são sabidamente induzidos na presença de dano ao DNA e quebra de dupla fita, como por exemplo, o gene *uvrC*^{RAD51} e *rad52* (Tabela 19).

A análise comparativa dos resultados obtidos entre as técnicas de macroarray e RT-PCR em tempo real mostrou que todas as sondas testadas para validar a indução observada nas hibridizações confirmaram os resultados esperados (Figura 64), apresentando inclusive perfis de modulação semelhantes aos que foram observados nas análises de macroarray. Embora se tratem de duas metodologias diferentes, quando os dados são analisados qualitativamente pode-se verificar certa semelhança entre os resultados indicando claramente a comprovação do perfil de expressão mostrado na hibridização dos filtros de macroarray. Em linhas gerais, os valores de $\log_2$ obtidos pela metodologia de macroarray tenderam a ser menores que aqueles gerados pela técnica de RT-PCR em tempo real, sendo isso reflexo das diferenças nas duas técnicas. A Figura 63 mostra alguns genes selecionados para os quais foram construídos gráficos mostrando os perfis obtidos pelas duas metodologias. Pode-se verificar que o perfil de expressão foi bastante semelhante entre elas.

Figura 63: Comparação dos padrões de variação de expressão gênica pelas técnicas de macroarray e RT-PCR em tempo real de alguns genes estudados. As linhas tracejadas mostram a variação obtida pela técnica de macroarray, comparados com os dados obtidos através da análise por RT-PCR em tempo real (linhas cheias). Os resultados foram expressos como a razão $\log_2$ do número de transcritos, nos diferentes tempos do tratamento com CPT.

As reações de RT-PCR em tempo real revelaram genes com um alto número de cópias durante os tempos de tratamento da linhagem selvagem com CPT. O gene da poli (ADP) ribose polimerase (*prpA*) e *csH*A apresentaram os maiores valores de indução (22,1 e 20,1 vezes respectivamente, no tempo 30 minutos), seguido dos genes *mshA* (23,5 e 19,7 vezes nos tempos 60 e 120 minutos respectivamente). O gene que codifica para a proteína “Myb-like DNA binding” foi o que apresentou os menores valores de indução, em torno de 2,5 vezes nos tempos 60 e 120 minutos. Por outro lado, quando as mesmas sondas foram testadas para a linhagem $\Delta uvrsB^{ATR}$, houve baixos níveis de indução para os genes analisados indicando uma possível dependência do gene *uvrsB*^{ATR}, como será mostrado adiante.

Figura 64: Variação da expressão de genes induzidos identificados no macroarray por RT-PCR em tempo real. Para a linhagem selvagem tratada com CPT houve o esperado perfil de indução transcricional. Para a linhagem $\Delta uvrB^{ATR}$, de um modo geral houve grande queda da expressão para os genes analisados indicando uma possível dependência de *uvrB*^{ATR}. Os valores representam o número de vezes que o gene foi expresso em comparação com a linhagem selvagem na ausência de CPT, representado como número absoluto 1.

Figura 64: continuação

Figura 64: continuação

4.4.2.3. Análise global do perfil transcricional de *A. nidulans* em presença de CPT no mutante $\Delta uvsB^{ATR}$

Em vários organismos eucariotos, a ativação dos pontos de checagem durante o dano ao DNA é controlada pela família de proteínas quinases conservadas ATR e ATM, o que inclui os homólogos de $uvsB^{ATR}$ e $atmA^{ATM}$ em *A. nidulans*. Além disso, tem sido demonstrado que ATR é também importante na resposta ao dano ao DNA associado a replicação causado por drogas anti topoisomerase (CLIBY et al., 2002). Dessa forma, para identificar genes cuja expressão é dependente de $uvsB^{ATR}$, o perfil transcricional da linhagem $uvsB^{ATR}$ foi verificado na presença e ausência de 25 μ M de CPT. O mesmo desenho experimental utilizado para a linhagem selvagem descrito nas seções anteriores (Figura 58) foi adotado para as novas hibridizações. É importante ressaltar que não foi observado nenhuma alteração no perfil de viabilidade dos conídios da linhagem $\Delta uvsB^{ATR}$ em relação à linhagem selvagem tratados com a mesma concentração de CPT (dados não apresentados). Dessa forma, os dados de expressão diferencial obtidos refletem unicamente a ausência de função do gene $uvsB^{ATR}$.

O tratamento estatístico dos dados gerados indicou que 1700 genes foram modulados em pelo menos um ponto experimental. Esses dados foram comparados com os resultados correspondentes da linhagem selvagem como mostram as Figuras 65 e 66. Conjuntamente foram encontrados, 1124, 820 e 891 genes induzidos e 908, 707 e 550 genes reprimidos quando ambas as linhagens foram expostas a CPT por 30, 60 e 120 minutos respectivamente (Figura 65). Curiosamente, apenas um gene (AN5014.2) que codifica o homólogo da proteína ribossomal L22 apresentou-se induzido na linhagem selvagem e reprimido na linhagem $\Delta uvsB$ nos três tempo de exposição a droga. Diante disso, com o intuito de obter uma melhor visualização dessas alterações de expressão, 84 genes foram manualmente selecionados da lista global de genes significativamente modulados na linhagem selvagem e $\Delta uvsB$ baseados em critérios como a número de vezes de modulação bem como o envolvimento desses genes em alguma via da resposta ao dano ao DNA. A lista completa dos genes diferencialmente expressos em ambas linhagens está disponível em <http://143.107.203.68/camptothean/html_iran_pub/>.

Figura 65: Diagrama de Venn da representação dos transcritos identificados nos experimentos de macroarray durante a exposição a CPT nos tempos 30 (A), 60 (B) e 120 (C) minutos. A linhagem selvagem e a linhagem $\Delta uvrB^{ATR}$ estão representadas por círculos cinzas e brancos respectivamente.

A clusterização hierárquica desses 84 genes permitiu agrupá-los em quatro categorias (I a IV, Figura 66) e alguns genes representativos de cada grupo foram mais detalhadamente caracterizados. Do grupo I, foram escolhidas as ORFs AN2893.2 e AN3617.2, que correspondem respectivamente aos genes que codificam uma proteína que contém o domínio “forkhead-associated” (nomeada *fhdA*) e uma proteína hipotética que contém o motivo “tetra-trico peptide repeat” (nomeada *tprA*). No grupo II, dois genes foram selecionados: AN1708 que correspondem ao gene homólogo de MutS6 de *S. cerevisiae* (nomeado *mshA*) envolvido no reparo por emparelhamento errado de bases e AN6073.2, o homólogo

da prohibitina nomeado *phbA* que codifica uma proteína localizada na mitocôndria, onde desempenha papel na manutenção da função mitocondrial e na proteção contra a senescência celular (MISHRA et al., 2005). No grupo IV, os genes *uvsC*^{RAD51} (AN1237.2), e AN7103.2 que codifica o homólogo de CSB (Cockayne's syndrome protein) envolvido no sistema de reparo por excisão de nucleotídeos (nomeado *cshA*^{CSB}). Adicionalmente, no grupo III estava presente o gene *npkA* (AN6044.2) que codifica uma proteína quinase relacionada a *cdc2* previamente caracterizada em nosso laboratório a qual geneticamente interage com *uvsB*^{ATR} (FAGUNDES et al., 2004, ver anexo B).

Figura 66: Clusterização hierárquica mostrando o perfil de expressão de 84 genes selecionados nos experimentos de macroarray para a linhagem selvagem e $\Delta uvsB^{ATR}$ expostas a CPT. A Figura mostra uma seleção de genes cuja expressão foi menor na ausência de $uvsB^{ATR}$. As cores indicam o $\log_2$ da razão para cada ponto experimental tendo

como valor de referência o mesmo tempo sem tratamento com CPT. Os genes destacados em negrito foram mais bem caracterizados neste trabalho através de construção de linhagens “knock out”.

Inicialmente, foi verificado se a expressão dos genes *phbA*, *mshA*, *csbA*, *fhdA*, *trpA*, e *uvsC* apresentava expressão dependente de *uvsB*^{ATR}. Desta forma, a linhagem $\Delta uvsB^{ATR}$ foi crescida por 30, 60 e 120 minutos na presença e ausência de 25 μ M de CPT. O RNA foi isolado e as reações de RT-PCR em tempo real foram realizadas. Como anteriormente mostrado na Figura 66, todos esses genes apresentaram indução quando a linhagem selvagem é exposta a CPT. Por outro lado, o mesmo tratamento para a linhagem $\Delta uvsB^{ATR}$ mostrou a expressão do mRNA reduzida desses genes. Esses resultados indicam que a indução aumentada de *phbA*, *mshA*, *csbA*, *fhdA*, *trpA*, e *uvsC* na presença de CPT requer a função de *uvsB*^{ATR} (Figura 67).

Figura 67: A expressão dos genes *trpA*, *uvsC*, *csbA*, *mshA*, *fhdA* e *phbA*, é dependente de *uvsB*^{ATR} quando *A. nidulans* é crescida na presença de CPT (25 μ M). Os valores indicam o número de vezes que o gene foi induzido em relação em comparação à linhagem selvagem na ausência de CPT.

4.4.2.4. Caracterização molecular dos genes identificados pela técnica de macroarray

Com o objetivo de melhor caracterizar a reposta celular ao dano ao DNA causada pela droga CPT, foram produzidos mutantes de alguns genes cujo alto perfil de expressão foi identificado nos experimentos de macroarray e validados pela técnica de RT-PCR em tempo real. Foram obtidas as linhagens mutantes para os genes *phbA* (IM70), *mshA* (IM71), *csbA* (IM72-3), *fhbA* (IM73-104) e *tprA* (IM74-10). A linhagem TNO2A3 (NAYAK et al., 2006) foi transformada com os respectivos cassetes de deleção gerados pela técnica “PCR-mediated” (para a seqüência dos primers e tamanhos dos produtos de PCR utilizado para a construção dos cassetes ver Tabela 4). A confirmação das deleções foi comprovada pela técnica de Southern blot (Figura 68). Para todas as linhagens analisadas, verificou-se que ocorreu um único evento de integração do cassete de deleção no locus do gene de interesse e, portanto, a presença de uma única cópia do cassete no genoma das linhagens mutantes. Para a complementação desses estudos, o mutante $\Delta uvrsC^{RAD51}$, (ATr60cd1) foi cedido ao laboratório pelo Dr. Y. Itoh (Faculdade de Ciências, Universidade de Shinshu, Japão), (ICHIOKA; ITOH; ITOH, 2001).

Figura 68: Construção das linhagens inativadas dos genes *mshA*, *phbA*, *csbA*, *fhbA* e *tprA* identificados pela técnica de macroarray.

A. Esquema da estratégia usada para a inativação desses genes mostrando como exemplo a produção do cassete de deleção do gene *phbA* (AN6073.2). Fragmentos de 1973 pb da região “upstream” e de 1383 pb da região “downstream” do gene foram amplificados a partir de duas PCRs primárias. O gene *zeo-pyrG* de *A. fumigatus* foi amplificado a partir do plasmídeo pCDA21. O cassete de deleção foi obtido pela PCR de fusão desses três fragmentos utilizando-se os primers distais PROHIB-1 e PROHIB-4.

B. Análise de Southern blot da linhagem IM70 ($\Delta phbA$). Um fragmento interno do gene *phbA* (770 pb) foi utilizado como sonda produzida a partir da amplificação de um fragmento de 2778 pb utilizando-se os primers PROHIB-1 e PROHIB 0 (5' - GACGTTAGCACCAGAGAC -3') a partir do DNA genômico da linhagem selvagem A4. O fragmento de 2778 pb foi submetido à restrição com a enzima *Bam*HI e o fragmento de 770 pb foi recortado do gel e utilizado como sonda. A Figura mostra dois candidatos cujo gene completo (1123 pb) fora deletado (**B. I**). Marcação da mesma membrana de nylon hibridizada com a sonda *pyrG* de *A. fumigatus* (**B. II**)

indicando que houve somente um ponto de integração do cassete de deleção no genoma da linhagem IM70. O DNA genômico dos mutantes e da linhagem selvagem foi isolado e digerido com a enzima *EcoRI* (não existiam sítios de restrição para *EcoRI* em ambos os genes *phbA* e no marcador *pyrG*).

C. Southern blot para a confirmação da deleção do gene *mshA* (AN1708.2) **(C. I)** O DNA genômico dos mutantes e da linhagem selvagem foi isolado e digerido com a enzima *BamHI* utilizando como sonda um fragmento interno de 505 pb do gene *mshA* produzido a partir da amplificação de um fragmento de 2562 pb utilizando-se os primers MUTS-1 e MUTS 0 (5'-GGCTGTTCTTTTCGAGTAG-3') com DNA genômico da linhagem selvagem A4. O fragmento de 2562 pb foi submetido à restrição com a enzima *EcoRI* e o fragmento de 505 pb correspondente foi recortado do gel, purificado e utilizado como sonda. A Figura mostra dois candidatos cujo gene completo (3842 pb) fora deletado. **(C. II)** Membrana hibridizada com a sonda *pyrG* de *A. fumigatus* indicando que houve apenas um ponto de inserção do cassete de deleção no genoma da linhagem IM71. O gene *pyrG* apresenta um sítio de restrição para a enzima *BamHI*.

D. Southern blot para a confirmação da deleção do gene *cshA* (AN7103.2). A Figura mostra um candidato cujo gene completo foi inativado (4032 pb). Membrana de nylon hibridizada com sonda *cshA* **(D. I)**. A sonda foi produzida a partir da amplificação do fragmento de 4032 pb correspondente a seqüência genômica completa de *cshA* utilizando-se os primers RAD26-ST (5'-ATGCAGGGCGTTGGGCTC-3') e RAD26-SP (5'-CTAAAATGAGTTGTCCCTGGT-3'). **(D. II)** Membrana de nylon hibridizada com a sonda *pyrG* de *A. fumigatus* indicando que houve apenas um ponto de inserção do cassete de deleção no genoma da linhagem IM72-3. Os DNAs genômicos dos candidatos e da linhagem selvagem foram digeridos com *BamHI*. O gene *cshA* não apresenta sítios de restrição para *BamHI* e o gene *pyrG* apresenta um único sítio de restrição para a enzima *BamHI*.

E. Southern blot para a confirmação da deleção do gene *fhdA* (AN2893.2). A Figura mostra três candidatos cujo gene completo fora inativado (1056 pb). **(E. I)** Membrana de nylon hibridizada com sonda *fhdA*. A sonda foi produzida a partir da amplificação do fragmento correspondente à seqüência genômica completa de *fhdA* utilizando-se os primers SMAD-ST (5'-ATGCCTACGCCGAGAGAAG-3') e SMAD-SP (5'-TTATGTGTTCCGCTTGTTCCA-3'). **(E. II)** Membrana de nylon hibridizada com a sonda *pyrG* de *A. fumigatus* indicando que houve apenas um ponto de inserção do cassete de deleção no genoma da linhagem IM73-104. Os DNAs genômicos dos candidatos foram digeridos com *EcoRI*. Os genes *fhdA* e *pyrG* não apresentam sítios de restrição para *EcoRI*.

F. Southern blot para a confirmação da deleção do gene *tprA* (AN3617.1). A Figura mostra um candidato cujo gene completo (7233 pb) foi inativado. **(F. I)** Membrana de nylon hibridizada com sonda *tprA*. A sonda foi produzida a partir da amplificação de um fragmento de 1857 pb a partir do DNA genômico da linhagem selvagem A4 utilizando-se os primers TPR FW4299 (5'-TGCGAGCTCTGTGATCCAAA-3') e TPR REV6156 (5'-TGCACCAAACACCGTTGATCT-3'). **(F. II)** Membrana de nylon hibridizada com a sonda *pyrG* de *A. fumigatus* indicando que houve apenas um ponto de inserção do cassete de deleção no genoma da linhagem IM74-10. Os DNAs genômicos dos candidatos foram digeridos com a enzima *Scal*. Os genes *tprA* e *pyrG* não apresentam sítios de restrição para *Scal*.

As linhagens mutantes foram crescidas na presença de diferentes drogas que causam dano ao DNA e estresse oxidativo. Surpreendentemente, embora os mutantes tenham sido isolados a partir de um "screening" para a identificação dos genes com expressão diferencial na presença de CPT, somente o mutante $\Delta uvsC^{RAD51}$ apresentou sensibilidade a essa droga. Além disso, essa

mesma linhagem também foi sensível a 4NQO, HU, BLEO e PARAQ, mas com sensibilidade semelhante a linhagem selvagem na presença de MENA (Figura 69). Entretanto, todas as linhagens exceto $\Delta tprA$ são sensíveis a BLEO (Figura 69). As linhagens $\Delta phbA$ e $\Delta fhdA$ apresentaram sensibilidade a MENA enquanto as outras linhagens mostraram sensibilidade a PARAQ, excetuando-se $\Delta fhdA$ e $\Delta cshA$ que apresentaram sensibilidade comparável à linhagem selvagem. Além disso, não foram observadas diferenças significativas com relação à sensibilidade destes mutantes à luz UV (dados não apresentados). Conjuntamente, esses resultados indicam que os genes selecionados, quando inativados demonstram fenótipo de sensibilidade complexo e heterogêneo durante o crescimento na presença de agentes que causam dano direta ou indiretamente ao DNA. Além disso, a maioria desses mutantes não é sensível a CPT indicando que a resposta transcricional perante a este agente não necessariamente identifica genes que diretamente protegem a célula contra esse agente genotóxico.

Figura 69: Fenótipo de crescimento radial das linhagens $\Delta phbA$, $\Delta mshA$, $\Delta cshA$, $\Delta fhdA$, $\Delta tprA$ e $\Delta uvsC$ na presença de drogas. As linhagens foram crescidas por 72 horas a 37°C na presença e na ausência de 4NQO, BLEO, HU, MMS, CPT, MENA e PARAQ.

Como primeira abordagem para a verificação da função destes genes, a expressão destes foi avaliada por RT-PCR em tempo real na presença de MMS, 4NQO e BLEO (Figura 70) e MENA e PARAQ (Figura 71). Uma vez que esses genes foram identificados a partir do tratamento com CPT, o seu perfil de expressão perante outras drogas mutagênicas poderia fornecer informações da abrangência desses genes nos sistemas de reparo. De forma geral, parece não ter ocorrido expressão dependente de nenhuma droga isoladamente. As induções transcricionais ocorreram de forma aleatória para cada uma das sondas analisadas ao longo dos tempos de tratamento. Os genes *mshA* e *cshA* apresentaram baixos valores de indução na presença de MMS, BLEO e 4NQO (2 a 3 vezes), enquanto *phbA* apresentou aumento de mRNA (1,2 a 2 vezes) em resposta a MMS e 4NQO. Na presença de BLEO o gene *fhdA* apresentou indução de cerca de 5 vezes no tempo de 60 minutos de crescimento. O gene *uvrC* mostrou aumento dos valores de mRNA de cerca de 6, 17 e 7 vezes durante exposição por 60 minutos a MMS, BLEO e 4NQO e 9 vezes na presença de 4NQO no tempo 120 minutos. O gene *tprA* mostrou os maiores valores de indução (cerca de 80 vezes após 120 de crescimento na presença de MMS). Quando a linhagem selvagem foi exposta a diferentes concentrações de PARAQ e MENA, os genes *mshA* e *phbA* mostraram baixos valores de indução (cerca de 1,2 a 3 vezes) (Figura 70). Por outro lado, os genes *fhdA*, *cshA*, e *uvrC* mostraram aumento da expressão nas diferentes concentrações de PARAQ (cerca de 9 vezes) e MENA (cerca de 10 a 12 vezes) (Figura 71). O gene *tprA* por sua vez apresentou indução apenas na presença de de 1 mM de PARAQ. Esses dados sugerem um perfil transcricional complexo entre esses genes quando *A. nidulans* é exposto a diferentes genotoxinas e agentes que causam estresse oxidativo.

Figura 70: Perfil de expressão dos genes *phbA*, *mshA*, *cshA*, *fhdA*, *tprA* e *uvsC* na presença de MMS, 4NQO e BLEO avaliado por RT PCR em tempo real. De modo geral, a indução desses genes apresentou-se randômica, isto é, sem a dependência de uma droga específica nos diferentes pontos de expressão. Os valores representam o número de vezes que o gene foi expresso em comparação com a linhagem selvagem na ausência de qualquer droga.

Figura 71: Perfil de expressão dos genes *phbA*, *mshA*, *cshA*, *fhdA*, *tprA* e *uvsC* na presença de PARAQ e MENA avaliado por RT PCR em tempo real. Os valores indicam o número de vezes que o gene foi expresso em comparação com a linhagem selvagem na ausência de qualquer droga.

Interessantemente, o mutante $\Delta mshA$ apresentou um alto índice de setorização das colônias quando estas eram crescidas em meio sólido mesmo em condições normais, isto é, na ausência de drogas (Figura 72). A presença de setores durante o crescimento das colônias em fungos filamentosos indica instabilidade genética. A linhagem mutante cresceu cerca de 25% mais rapidamente que a linhagem selvagem na presença ou ausência de CPT, entretanto ela cresceu aproximadamente na mesma proporção que a linhagem selvagem na presença de MENA. O número de setores na linhagem $\Delta mshA$ na ausência de droga foi comparável àquele observado na presença de MENA, entretanto este foi aumentado na presença de CPT, confirmando que $\Delta mshA$ é um importante componente na via de resposta à instabilidade genética em *A. nidulans*.

Figura 72: Instabilidade genética na linhagem $\Delta mshA$ verificada pela presença de setores durante o crescimento. As linhagens foram crescidas em meio completo por 96 horas a 37°C na presença e ausência de CPT e MENA.

A fim de se identificar interações genéticas entre os genes *phbA*, *mshA*, *csbA*, *fhdA*, *tprA* e *uvsC*^{RAD51}, foram construídas as linhagens duplo mutantes desses genes com *uvsB*^{ATR}. Surpreendentemente, na maioria dos casos, as mutações suprimiram o fenótipo do mutante $\Delta uvsB$ ^{ATR} (Figura 73). Por exemplo,

enquanto ambas as linhagens $\Delta uvrsB$ e $\Delta phbA$ apresentavam alta sensibilidade a PARAQ, a respectiva linhagem duplo mutante cresceu de forma quase semelhante à linhagem selvagem. Estas observações sugerem que uma complexa rede de funções controla a resposta ao estresse oxidativo induzido por drogas como PARAQ e MENA. Além disso, a maioria dessas funções parece agir de maneira antagônica à ação de UvsB, o que pode explicar a supressão observada.

Figura 73: As linhagens duplo mutantes com $uvrsB^{ATR}$ suprimem o fenótipo de sensibilidade a drogas que causam estresse oxidativo. As diferentes linhagens foram crescidas em placas de meio YUU acrescido de suplementos e drogas por 72 horas a 37°C. Os painéis foram montados utilizando-se os recursos do programa Adobe Photoshop 6.0.

4.4.3. Discussão - Perfil transcricional em *A. nidulans* após exposição ao dano ao DNA causado por CPT

As topoisomerasas são enzimas que modificam e regulam o estado topológico da molécula de DNA (WANG, 1996). Devido ao fato que estas enzimas são necessárias para os processos de replicação, transcrição, recombinação e segregação cromossômica, elas apresentam um papel importante na manutenção da integridade do genoma (LIU, 1989; BERGER, 1998). Durante a reação de clivagem, as topoisomerasas ligam-se covalentemente a nova fita 5' de DNA recém sintetizada através de uma ligação fosfotirosil (membros da subfamília IA que incluem as topoisomerasas I e III de *E. coli*, a topoisomerase III de eucariotos e a girase de arqueobactérias) ou 3' (membros da subfamília IB que incluem a topoisomerase I de eucariotos, a topoisomerase V de arqueobactérias e a topoisomerase I de poxvírus) através da mesma ligação fosfotirosil (LIU 1989, LIU 1994; GUPTA; FUJIMORI; POMIER, 1995; FROELICH-AMMON; OSHEROFF 1995; WANG 1996). Sob condições normais, estes complexos de clivagem enzima-DNA são intermediários catalíticos presentes em baixas quantidades na célula, transitórios e tolerados por ela. Entretanto, condições que significativamente aumentam o número ou a duração destas quebras, como a exposição à droga anti-topoisomerase I CPT, causam vários danos a célula incluindo mutações, inserções, deleções e aberrações cromossômicas. O mecanismo básico de ação da droga CPT é bem caracterizado (FROELICH-AMMON; OSHEROFF 1995). Resumidamente, a droga CPT gera DSBs durante a replicação através do colapso da forquilha de replicação decorrente da estabilização do complexo clivável. Isso por sua vez acarreta a parada reversível ou permanente do ciclo celular na fase G2/M. O reparo destas lesões causadas por drogas anti-topoisomerase apresenta um problema particular uma vez que a molécula de DNA quebrada encontra-se unida covalentemente a uma cadeia polipeptídica a qual precisa ser removida para restaurar a integridade do genoma. Mutantes defectivos nas funções de reparo do DNA apresentam sensibilidade a essas drogas. Em *S. cerevisiae*, tem sido verificado que múltiplas vias metabólicas reparam o dano causado por drogas anti-topoisomerase (LIU et al., 1989; VANCE; WILSON, 2002). Dessa forma, para verificar a expressão gênica durante o dano ao DNA causado por CPT, foi realizada a hibridização de filtros de macroarray em *A. nidulans* construídos a partir de uma biblioteca de cDNA induzida por esta droga. A análise dos genes diferencialmente

expressos na linhagem selvagem esteve centrada na identificação dos genes transcricionalmente induzidos durante sua exposição ao dano causado por CPT. Os valores da expressão de mRNA para estes genes identificados foram analisados na linhagem mutante $\Delta uvrsB^{ATR}$ a fim de se verificar se estes apresentavam perfil de expressão diferente quando comparados à linhagem selvagem. Alguns destes genes foram investigados em maior detalhe através do isolamento e caracterização de linhagens mutantes e da quantificação da expressão dos seus valores de mRNA nas linhagens selvagem e $\Delta uvrsB^{ATR}$ frente a vários agentes que causam dano ao DNA e indutores de estresse oxidativo. Além disso, foram identificadas possíveis interações genéticas com $uvrsB^{ATR}$ através da construção de linhagens duplo mutante. Esses experimentos identificaram que entre os seis genes aqui caracterizados, os quais apresentaram indução ao nível transcricional causado por CTP, apenas um deles ($uvrsC^{RAD51}$) apresentou sensibilidade a CTP quando inativado. Esses resultados indicam que o papel desses genes no processamento das lesões de DNA não pode ser facilmente inferido unicamente a partir do seu perfil transcricional unicamente. Esses resultados apoiam observações prévias em leveduras. Birrell et al. (2002) demonstraram que a resposta transcricional a agentes que causam dano ao DNA em *S. cerevisiae* não identifica os genes que protegem a célula contra esses mesmos agentes. Entretanto, diferentemente desses autores, foi observado neste trabalho um comportamento mais complexo entre a expressão do mRNA e a proteção contra esses agentes genotóxicos, o qual não se restringiu somente a droga CPT, mas também envolveu outros agentes que causam dano ao DNA e estresse oxidativo em especial. Por exemplo, a maioria dos genes quando inativados apresentaram sensibilidade a bleomicina, entretanto, eles não mostraram aumento da expressão do mRNA ou foram muito pouco induzidos por essa droga. Além disso, $uvrsC^{RAD51}$ foi induzido por menadiona e paraquat embora a linhagem mutante não tenha mostrado sensibilidade a estes agentes.

As mudanças nos perfis transcricionais ou traducionais na célula podem ser efeitos primários da resposta ao dano ou secundários aos processos celulares que respondem ao dano. Existem muitos estudos relacionados à regulação global da transcrição de genes pelo dano ao DNA causado por CPT (ZHOU et al. 2002; DAOUD et al. 2003; MINDERMAN et al. 2005; GUO et al., 2006; MORANDI et al. 2006). A regulação transcricional desses genes pode refletir mecanismos de

resistência contra essa droga. Rasheed e Rubin (2003) sugerem que estes mecanismos de resistência podem ser eventos derivados: (i) de alterações estruturais da topoisomerase I; (ii) do acúmulo celular e transporte de CPT e (iii) de alterações na formação do complexo ternário (DNA-enzima-droga). Assim, diversos transportadores da família ABC (“ATP binding cassette”) e MFS (“Major Facilitatory Superfamily”) foram encontrados como mais expressos nos experimentos de macroarray. Estes genes podem estar envolvidos na detoxificação de CPT pelo bombeamento da droga do citoplasma. Em leveduras, mutações em *Snq*, uma proteína ABC, resulta em resistência a CPT (REID; KAUH; BJORNSTI, 1997). Em células de mamíferos, a superexpressão de MDR1 confere também resistência a CPT (CHEN et al. 1991) enquanto a inibição de MRP2 (“multi drug resistance protein 2”) pode aumentar a sensibilidade celular a derivados de CPT (KOIKE et al., 1997).

Existe relativamente pouco conhecimento acerca das vias que atuam abaixo do complexo ternário CPT-topoisomerase-DNA e que em última instância levam ao reparo do dano ao DNA ou a morte celular. Inúmeras proteínas que atuam na replicação, nos pontos de checagem do ciclo celular e no reparo estão envolvidas nesses sistemas (RASHEED; RUBIN, 2003). Dessa forma, no reparo ao dano induzido por CPT estão envolvidas proteínas das vias de NER e MMR. Conseqüentemente, foram observados vários genes envolvidos nesses sistemas como mais expressos durante a exposição a CPT (Tabela 19). Além dos genes de reparo, foram encontrados também genes envolvidos (i) no metabolismo do DNA e cromatina, como histonas e ambas subunidades da ribonucleotídeo redutase; (ii) na degradação de proteínas, como ubiquitinas e subunidades do proteassoma; e (iii) na transdução de sinal e ciclo celular, como por exemplo, polo-like quinase e calmodulina. Alguns desses genes verificados como mais expressos na presença de CPT neste estudo, foram também mencionados em outros estudos que mostraram a resposta transcricional na presença de dano ao DNA induzido por CPT (ZHOU et al., 2002; DAOUD et al., 2003; MINDERMAN et al., 2005; GUO et al., 2006; MORANDI et al., 2006). Genes que atuam no sistema de degradação dependente de ubiquitina e proteassoma (ZHOU et al., 2002), no reparo ao dano ao DNA como *RAD51* e *PARP* (poli ADP-ribose polimerase) (MORANDI et al., 2006) e na arquitetura cromossômica, como H2A (MINDERMAN et al., 2005) foram também já verificados

como induzidos por CPT. A participação destes genes na regulação da resposta transcricional mediada por CPT ainda precisa ser elucidada em maiores detalhes.

Os genes que codificam para fumarato hidratase, 6 fosfogluconato desidrogenase e poli (ADP-ribose) polimerase são aqueles mais altamente expressos nos experimentos de macroarray (Figuras 62 e 64). A fumarato hidratase é uma proteína mitocondrial codificada no núcleo e uma enzima do ciclo do ácido tricarboxílico que tem sido relacionada a susceptibilidade tumoral (GOTTLIEB; TOMLINSON 2005). Mutações em genes mitocondriais supressores tumorais podem contribuir para a formação de tumores via estresse oxidativo resultante do aumento da produção de espécies reativas do oxigênio na mitocôndria (GOTTLIEB; TOMLINSON 2005). A indução desse gene pode contribuir para evitar o dano ao DNA causado por ROs. A enzima 6-fosfogluconato desidrogenase é uma enzima da via das pentoses a qual produz importantes precursores da biosíntese de DNA. Zhang, Liu e Wong (2003) mostraram que na bactéria altamente resistente ao dano ao DNA, *Deionococcus radiodurans*, a indução da via da pentose fosfato aumentou a eficiência do sistema de NER por prover a célula com metabólitos adequados.

A poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) consome NAD^+ para catalisar a formação de grupos ADP-ribosil em proteínas alvos. A modificação de um alvo pela PARP é uma resposta rápida capaz de alterar a atividade e/ou a estabilidade de uma proteína (para uma revisão ver JAGTAP; SZABO, 2005; KIM; ZHANG; KRAUS, 2005). Dessa forma, a PARP apresenta um papel integral na resposta celular a uma variedade de estresses, de modo especial no dano ao DNA (para uma revisão ver AME et al., 2004). Recentemente o homólogo da PARP, em *A. nidulans*, PrpA foi caracterizado por Semighini et al. (2006). As análises genéticas de *prpA* demonstraram que este é um gene essencial cujo papel na resposta ao dano ao DNA é sensível a superexpressão. Notavelmente, os padrões temporais da expressão de *prpA* e da localização nuclear de PrpA-GFP sugerem que esta proteína atua precocemente na resposta ao dano ao DNA em *A. nidulans*. Da mesma forma, o gene *prpA* é altamente expresso durante todos os tempos de exposição a droga nos experimentos de macroarray evidenciando sua importância na resposta ao dano ao DNA em *A. nidulans*.

O comportamento das linhagens inativadas $\Delta phbA$, $\Delta mshA$, $\Delta tprA$, $\Delta cshA$, $\Delta fhda$, e $\Delta uvsC^{\text{RAD51}}$ foi verificado pelo crescimento destas na presença de

vários agentes causadores de dano ao DNA e estresse oxidativo. Com exceção de $\Delta tprA$, todas as linhagens apresentaram sensibilidade a BLEO em relação a linhagem selvagem correspondente. Além disso, $\Delta phbA$, $\Delta mshA$ e $\Delta cshA$ apresentaram sensibilidade aos agentes de estresse oxidativo MENA e PARAQ. Os genes *phbA*, *mshA* e *cshA* são homólogos da proibitina, MutS e CSB, enquanto *tprA* e *fhdA* codificam proteínas hipotéticas que apresentam respectivamente os domínios “tetra-trico-peptide repeats” e “fork head associated domain”. Duas proibitinas (*PHB* e *PHB2*) conjuntamente podem formar um complexo de alto peso molecular. Esse complexo tem sido identificado tanto nas mitocôndrias quanto na membrana plasmática (MISHRA et al. 2005). O papel mais bem conhecido e melhor descrito das proibitinas é sua função como chaperona na mitocôndria contribuindo na estabilização de subunidades recém sintetizadas de proteínas respiratórias mitocondriais (MISHRA et al. 2005). Entretanto, as proibitinas apresentam funções adicionais na regulação do ciclo celular, na senescência celular e como supressor de tumor e apoptose. Em leveduras a perda de função de Phb1 e/ou Phb2 leva a diminuição do tempo de vida replicativo em *S. cerevisiae* medido como o número de células filhas que brotam de uma mesma célula mãe (JOSHI et al. 2003; JAZWINSKI 2004; MISHRA et al. 2005). Além do gene *phbA* (AN6073.2), *A. nidulans* apresenta também um outro homólogo não caracterizado de proibitina, *phbB*, (AN6861.2); 51% identidade, 72% similaridade com *phbA*, 2e-64). Ainda precisa ser determinado se estas duas proteínas interagem para formar um complexo. Os resultados aqui apresentados enfatizam o papel de *phbA* na resposta ao dano ao DNA e ao estresse oxidativo.

Os mutantes $\Delta mshA$ e $\Delta cshA$ apresentaram maior sensibilidade a 4NQO, MENA e PARAQ. O gene *mshA* é o homólogo de MutS6 de *S. cerevisiae*. Muitos estudos em eucariotos e procariotos com homólogos de MutS também demonstraram seu envolvimento na resposta celular ao dano ao DNA (DE WEESE et al. 1998; EARLEY; CROUSE 1998; NI; MARSISCHKY; KOLODNER, 1999; CHANG et al. 2002; MAZUREK; BERARDINI; FISHEL et al., 2002; BARZILAI; YAMAMOTO, 2004; DZIERZBICKI et al. 2004; WANG et al. 2005). Por exemplo, no patógeno humano *Helicobacter pylori*, a função de um sistema eficiente de detoxificação de ROs é essencial para que este possa lidar com o estresse oxidativo que ele enfrenta durante o processo de colonização que poderia causar dano ao

DNA tanto nas células do hospedeiro quanto do patógeno (WANG et al., 2005). Além disso, tem sido demonstrado que a presença de *H. pylori* no epitélio gástrico pode estar associado a uma diminuição do sistema de MMR durante a infecção o que poderia explicar a carcinogênese gástrica associada à infecção por *H. pylori* (PARK et al., 2005). Interessantemente, foi observado um alto índice de instabilidade genética no mutante $\Delta mshA$ traduzido pela presença de setores na colônia quando esta foi crescida na presença de CPT.

O gene *csbA* é o homólogo de *CSB* envolvido no sistema de NER, mais precisamente na subvia de reparo acoplado a transcrição (“transcription coupled repair - TCR”) que capacita a célula com mecanismos que removem lesões que bloqueiam a transcrição de genes ativos (DE WAARD et al., 2004). Mutações dos genes *CSA* e *CSB* em humanos causam a Síndrome de Cockayne, caracterizada pela sensibilidade a luz UV e severa anormalidade neurológica. De Waard et al. (2003) usando ratos como modelo experimental, mostraram que as células e os animais *CSB* deficientes eram sensíveis ao dano ao DNA causado por estresse oxidativo. Por outro lado, fibroblastos embrionários de ratos *CSA*^{-/-} não eram hipersensíveis a PARAQ, ao contrário do que ocorria com esse mesmo tipo celular *CSB*^{-/-} (DE WAARD et al., 2004). Os dados aqui apresentados indicam que o homólogo de *CSB* em *A. nidulans*, *csbA*, está envolvido no reparo ao dano ao DNA causado por estresse oxidativo. Um homólogo de *CSA* em *A. nidulans* foi identificado (AN5235.2), entretanto suas funções não foram ainda investigadas. Esses resultados conjuntamente indicam que a droga CPT foi capaz de induzir a expressão de várias vias metabólicas, incluindo reparo do dano ao DNA também causado por estresse oxidativo.

Tem sido demonstrado que ATR é importante na resposta ao dano ao DNA associado a replicação causado por CPT (CLIBY et al., 2002; FLATTEN et al., 2005). A diminuição da expressão de *ATR* ou *CHK1* sensibiliza a célula ao agente 7-etil,10-hidróxicamptothecin (SN-38) e camptothecin. Por outro lado, a diminuição da expressão de *ATM* e *CHK2* causa um efeito mínimo na sensibilidade a essas drogas (FLATTEN et al., 2005). De modo interessante, além da conhecida sensibilidade a CPT da linhagem $\Delta uvsB^{ATR}$, esta mostrou também sensibilidade a PARAQ e MENA.

Os valores de expressão de mRNA de vários genes foram afetados pela ausência de *uvsB*^{ATR}. Além disso, não só a expressão de alguns genes foi

dependente de *uvrB*^{ATR}, como também quando inativados, alguns genes como *phbA*, *mshA*, *tprA*, *chsA* e *fhdA* geneticamente interagem com *uvrB*^{ATR}. Curiosamente, todas essas interações genéticas parcialmente suprimem o defeito de crescimento da linhagem Δ *uvrB*^{ATR} na presença de PARAQ e MENA, mas não a drogas que causam dano ao DNA. Tem sido demonstrado que durante o dano causado pelo agente alquilante do DNA *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina, a proteína MSH2 (“MutS homologue 2”) interage com a ATR quinase para formar um módulo de sinalização e regular a fosforilação de CHK1 e SMC1 (“structure maintenance of chromosome 1”) (WANG; QIN, 2003). As interações observadas com *chsA* e *phbA* são novas e enfatizam o papel desempenhado por esses genes na resposta ao dano ao DNA mediado por *uvrB*^{ATR}.

5.0. CONCLUSÕES

A proposta inicial deste trabalho foi verificar a função de vários genes envolvidos na via de resposta ao dano ao DNA que atuam “upstream” ou “downstream” ao complexo Mre11. Com os resultados obtidos foi possível verificar que:

- O isolamento do gene *sld*^{RAD50} através de um “screening” de letais sintéticos na ausência de dineína evidenciou uma ligação ainda não descrita entre o complexo de reparo ao dano ao DNA Mre11 e o o “spindle pole checkpoint”.
- O gene *sld*^{RAD50} apresenta homologia estrutural e funcional com proteínas de outros organismos e funções esperadas no reparo ao dano ao DNA e também na gametogênese em *A. nidulans*.
- A caracterização funcional do gene *atmA*^{ATM} mostrou que este apresenta funções no reparo ao dano ao DNA as quais são compartilhadas com a proteína homóloga em mamíferos sendo inclusive capaz de fosforilar a proteína ScaA^{NBS1} em *A. nidulans* e localizar-se no núcleo após indução do dano ao DNA.
- O gene *atmA*^{ATM} apresentou uma interessante função no estabelecimento e manutenção do eixo de crescimento polarizado e na proliferação celular em *A. nidulans*. A função do gene ATM na polaridade celular não havia sido até então relatada em fungos ou mamíferos.
- AtmA pode regular a localização de proteínas chaves necessáriaa nas áreas de crescimento polarizado.
- A via das pentoses fosfato apresentou um papel importante na proliferação celular aumentada durante o dano endógeno no mutante $\Delta atmA$.

- A AtmA interage geneticamente com proteínas envolvidas na formação do Spitzenkörper e do polarissomo como ModA e SpaA.
- A proteína AtmA pode de alguma maneira controlar a biossíntese de ácido fosfatídico e de esfingolipídios e pode levar a perturbação das vias de sinalização mediadas por diacilglicerol e inositol trifosfato.
- O perfil transcricional da linhagem selvagem e $\Delta uvsB$ em resposta a droga CPT permitiu encontrar genes envolvidos em múltiplas via metabólicas.
- A resposta transcricional a CPT em uma linhagem selvagem de *A. nidulans* não necessariamente identificou genes que protegem a célula especificamente contra esse agente genotóxico.
- UvsB^{ATR} monitora também o reparo causado por estresse oxidativo.

6.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, R. T. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. **Genes Dev.**, v. 15, p. 2177-96, 2001.

AGUIRRE, J.; RÍOS-MOMBERG, M.; HEWITT, D.; HANSBERG, W. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. **Trends Microbiol.**, v. 13, p. 111-118, 2005.

AIST, J. R.; MORRIS, N. R. Mitosis in filamentous fungi: how we got where we are. **Fungal Genet. Biol.**, v. 27, p. 1-25, 1999.

AJIMURA, M.; LEEM, S. H.; OGAWA, H. Identification of new genes required for meiotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 133, p. 51-66, 1993.

ALANI, E.; PADMORE, R.; KLECKNER, N. Analysis of wild-type and rad50 mutants of yeast suggests an intimate relationship between meiotic chromosome synapsis and recombination. **Cell**, v. 61, p. 49-436, 1990.

ALLEN, J. B.; ZHOU, Z.; SIEDE, W.; FRIEBERG E. C.; ELLEDGE, S. J. The Sad1/Rad53 protein kinase controls multiple check- points and DNA damage-induced transcription in yeast. **Genes Dev.**, v. 8, p. 2401-2415, 1994.

ALTSCHUL S. F.; LIPMAN D. J. Protein database searches for multiple alignments. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 87, p. 5509-13, 1990.

ALVAREZ, F.; DOUGLAS, L. M.; KONOPKA, J. B. Sterol-rich plasma membrane domains in fungi. **Euk. Cell.** 2007 (no prelo).

AME, J. C.; SPENLEHAUER, C.; MURCIA, G. The PARP superfamily. **Bioessays**, v. 26, p. 882-893, 2004.

ASSENMACHER, N.; HOPFNER, K. P. MRE11/RAD50/NBS1: complex activities. **Chromosoma**, v. 113, p. 157-166, 2004.

BAKKENIST, C. J.; KASTAN, M. B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. **Nature**, v. 421, p. 499-506, 2003.

BANIN, S.; MOYAL, L.; SHIEH, S.; TAYA, Y.; ANDERSON, C. W.; CHESSA, L.; SMORODINSKY, N.I.; PRIVES, C.; REISS, Y.; SHILOH, Y.; ZIV, Y. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. **Science**, v. 281, p. 1674-1677, 1998.

BARLOW, C.; RIBAUT-BARASSIN, C.; ZWINGMAN, T. A.; POPE, A. J.; BROWN, K. D. ATM is a cytoplasmic protein in mouse brain required to prevent lysosomal accumulation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 871-876, 2000.

BARLOW, C.; HIROTSUNE, S.; PAYLOR, R.; LIYANAGE, M.; ECKHAUS, M.; COLLINS, F.; SHILOH, Y.; CRAWLEY, J. N.; RIED, T.; TAGLE, D.; WYNshaw-Boris, A. Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. **Cell**, v. 86, p. 159-171, 1996.

BARTEK, J.; LUKAS, J. Mammalian G1- and S-phase checkpoint in response to DNA damage. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 13, p. 738-747, 2001.

BARTNICKI-GARCIA, S.; HERGERT, F.; GIERTZ, G. Computer simulation of fungal morphogenesis and the mathematical basis for hyphal tip growth. **Protoplasma**, v. 153, p. 46-57, 1989.

BARZILAI, A.; ROTMAN, G.; SHILOH, Y. ATM deficiency and oxidative stress: a new dimension of defective response to DNA damage. **DNA Repair**, v. 1, p. 3-25, 2002.

BARZILAI, A.; YAMAMOTO, K. I. DNA damage responses to oxidative stress. **DNA Repair**, v. 3, p. 1109-1115, 2004.

BASKARAN, R.; WOOD, L. D.; WHITAKER, L. L.; CANMAN, C. E.; MORGAN, S. E.; XU, Y.; BARLOW, C.; BALTIMORE, D.; WYNshaw-BORIS, A.; KASTAN, M. B.; and WANG, J. Y. Ataxia telangiectasia mutant protein activates c-Abl tyrosine kinase in response to ionizing radiation. **Nature**, v. 387, p. 516-519, 1997.

BASSING, C. H.; ALT, F. W. The cellular response to general and programmed DNA double strand breaks. **DNA Repair**, v. 3, p. 781-96, 2004.

BATEK, J.; LUKAS, J. DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 19, p. 238-245, 2007.

BAUDIN, A.; OZIER-KALOGEROPOULOS, O.; DENOUEL, A.; LACROUTE, F.; CULLIN, C. A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Acids Res.**, v. 21, p. 3329-3330, 1993.

BENDER, C. F.; SIKES, M. L.; SULLIVAN, R.; HUYE, L. E.; LE BEAU, M. M.; ROTH, D. B. Cancer predisposition and hematopoietic failure in RAD50(S/S) mice. **Genes Dev.**, v. 16, p. 2237-2251, 2002.

BERGEN, L. G.; MORRIS, N. R. Kinetics of the nuclear division cycle of *Aspergillus nidulans*. **J. Bacteriol.**, v. 156, p. 155-60, 1983.

BERGER, J. M. Structure of DNA topoisomerases. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1400, p. 3-18, 1998.

BIRRELL, G. W.; BROWN, J. A.; WU, H. I.; GIAEVER, G.; CHU, A. M.; DAVIDS, R. W.; MARTIN BROWN, J. Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to DNA-damaging agents does not identify the genes that protect against these agents. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99, p. 8778-8783, 2002.

BLEUYARD, J. Y.; GALLEGU, M. E.; WHITE, C. I. Meiotic defects in the *Arabidopsis* rad50 mutant point to conservation of the MRX complex function in early stages of meiotic recombination. **Chromosoma**, v. 113, p. 197-203, 2004.

BORDE, V.; LIN, W.; NOVIKOV, E.; PETRINI, J. H.; LICHTEN, M.; NICOLAS, A. Association of Mre11p with double-strand break sites during yeast meiosis. **Mol. Cell**, v. 13, p. 389-401, 2004.

BRODY, S. Correlation between reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate levels and morphological changes in *Neurospora crassa*. **J. Bacteriol.**, v. 101, p. 802-807, 1966.

BRODY, S.; TATUM, E. L. The primary biochemical effect of a morphological mutation in *Neurospora crassa*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 56, p. 1290-1297, 1966.

BROWN K. D.; ZIV, Y.; SADANANDAN, S. N.; CHESSA, L.; COLLINS, F. S.; SHILOH, Y.; TAGLE, D. A. The ataxia-telangiectasia gene product, a constitutively expressed nuclear protein that is not up-regulated following genome damage. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 1840-1845, 1997.

BRUSCHI, G. C. M.; SOUZA, C. C.; FAGUNDES, M. R. V. Z. K.; DANI, M. A. C.; GOLDMAN, M. H. S.; MORRIS, N. R.; LIU, L.; GOLDMAN, G. H. Sensivity to camptothecin in *Aspergillus nidulans* identifies a novel gene, *scaA*⁺, related to the cellular DNA damage response. **Mol. Gen. Genomics**, v. 265, p.264-275, 2001.

BUNDOCK, P.; HOOYKAAS, P. Severe developmental defects, hypersensitivity to DNA-damaging agents, and lengthened telomeres in *Arabidopsis* MRE11 mutants. **Plant Cell**, v. 14, p. 2451-2462, 2002.

CANMAN, C. E.; LIM, D. S. The role of ATM in DNA damage responses and cancer. **Oncogene**, v. 17, p. 3301-3308, 1998.

CAO, L.; ALANI, E.; KLECKNER, N. A pathway for generation and processing of double-strand breaks during meiotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. **Cell**, v. 61, p. 1089-1101, 1990.

CARNEY, J. P. Chromosomal breakage syndromes. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 11, p. 443-7, 1999.

CARNEY, J. P.; MASER, R. S.; OLIVARES, H.; DAVIS, E. M.; LE BEAU, M.; YATES III, JR; HAYS, L.; MORGAN, W. F.; PETRINI, J. H. The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen Breakage Syndrome: linkage of double strand break repair to the cellular DNA damage response. **Cell**, v. 93, p. 477-486, 1998.

CASSELTON, L.; ZOLAN, M. The art and design of genetic screens; filamentous fungi. **Nature Rev.**, v. 3, p. 683-697, 2002.

CEROSALETTI, K.; CONCANNON, P. Independent roles for nibrin and Mre11-Rad50 in the activation and function of ATM. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 38813-38819, 2004.

CHAE, S. K.; KAFER, E. *uvr1* mutants defective in UV mutagenesis define a fourth epistatic group of *uvr* genes in *Aspergillus*. **Curr. Genet.**, v. 24, p. 67-74, 1993.

CHANG, C. L.; MARRA, G.; CHAUHAN, D. P.; HA, H. T.; CHANG, D. K.; RICCIARDIELLO, L.; RANDOLPH, A.; CARETHERS, J. M.; BOLAND, R. Oxidative stress inactivates the human DNA mismatch repair system. **Am. J. Cell Physiol.**, v. 283, p. C148-C154, 2002.

CHARLTON-MENYS, V.; DURRINGTON, P. N. Squalene synthase inhibitors: clinical pharmacology and cholesterol-lowering potential. **Drugs**, v. 67, p. 11-16, 2007.

CHAUVEROCHE, M. K.; GHIGO, J. M.; D'ENFERT, C. A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. **Nucleic Acids Res.**, v. 28, p. e97, 2000.

CHEN, A. Y.; YU, C.; POTMESIL, M.; WALL, M. E.; WANI, M. C.; LIU, L. F. 1991. Camptothecin overcomes MDR1-mediated resistance in human KB carcinoma cells. **Cancer Res.**, v. 51, p. 6039-6044, 1991.

CHENG, J.; PARK, T.; FISCHL, A. S.; YE, X. S. Cell cycle progression and cell polarity require sphingolipid biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. **Mol. Cell Biol.**, v. 21, p. 6198-6209, 2001.

CHIN, G. M.; VILLENEUVE, A. M. C. *elegans* mre-11 is required for meiotic recombination and DNA repair but is dispensable for the meiotic G2 DNA damage checkpoint. **Genes Dev.**, v. 15, p. 522-534, 2001.

CLARKE, D. J.; GIMENEZ-ABIAN J. F. Checkpoints controlling mitosis. **Bioessays**, v. 22, p. 351-363, 2000.

CLIBY, W. A.; LEWIS, K. A.; LILLY, K. K.; KAUFMANN, S. H. S phase and G2 arrests induced by topoisomerase I poisons are dependent on ATR kinase function. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 1599-1606, 2002.

COLON-GONZALEZ, F.; KAZANIETZ, M. G. C1 domains exposed: from diacylglycerol binding to protein-protein interactions. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1761, p. 827-837, 2006.

CONNELY, J. C.; LEACH, D. R. F. Tethering on the brink: the evolutionary conserved Mre11-Rad50 complex. **Trends Biochem. Sci.**, v. 27, p. 410-418, 2002.

COOPER, G. M.; HAUSMAN, R. E. **The cell - a molecular approach**. Washington: ASM Press; 3rd edition, 2004. 713p.

CORTEZ, D.; GUNTUKU, S.; QIN, J.; ELLEDGE, S. J. ATR and ATRIP partners in checkpoint signalling. **Science**, v. 294, p. 1713-1716, 2001.

COSTA, R. M. A.; RIOU, L.; PAQUOLA, A.; MENCK, C. F. M.; SARASIN, A. Transcriptional profiles of unirradiated or UV-irradiated cells expressing either the cancer-prone XBP/CS allele or the noncancer-prone XPB/TTD allele. **Oncogene**, v. 24, p. 1359-1374, 2005.

COVE, D. J. The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 113, p. 51-56, 1966.

COX, K. H.; PINCHAK, A. B.; COOPER, T. G. Genome-wide transcriptional analysis in *S. cerevisiae* by mini-array membrane hybridization. **Yeast**, v. 15, p. 703-713, 1999.

D'AMOURS, D.; JACKSON, S. P. The Mre11 complex: at the crossroads of DNA repair and checkpoint signalling. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 3, p. 317-327, 2002.

DAOUD, S. S.; MUNSON, P. J.; REINHOLD, W.; YOUNG, L.; PRABHU, V. V.; YU, Q.; LAROSE, J.; KOHN, K. W.J.; WEINSTEIN, N.; POMMIER, Y. Impact of p53 and knockout and topotecan treatment on gene expression profiles in human colon carcinoma cells: a pharmacogenomic study. **Cancer Res.**, v. 63, p. 2782-2793, 2003.

DE LA TORRE, C.; PINCHEIRA, J.; LÓPEZ-SÁEZ. Human syndromes with genomic instability and multiprotein machines that repair DNA double-strand breaks. **Histol. Histopathol.**, v. 18, p. 225-243, 2003.

DE SOUZA, C. P.; YE, X. S.; OSMANI, S. A. Checkpoint defects leading to premature mitosis also cause endoreplication of DNA in *Aspergillus nidulans*. **Mol. Biol. Cell**, v. 10, p. 3661-3674, 1999.

DE WAARD, H.; DE WIT, J.; ANDRESSOO, J. O.; VAN OOSTROM, C. T. M.; RIIS, B.; WEIMANN, A.; POULSEN, H. E.; VAN STEEG, H.; HOEIMAKERS, J. H. J.; VAN DER HORST, G. T. J. Different effects of CSA and CSB deficiency on sensitivity to oxidative DNA damage. **Mol. Cell Biol.**, v. 24, p. 7941-7948, 2004.

DE WAARD, H.; DE WIT, J.; GORGELS, T. G.; VAN DEN AARDWEG, G.; ANDRESSOO, J. O.; VEMEIJ, M.; VAN STEEG, H.; HOEIMAKERS, J. H.; VAN DER HORST, G. T. Cell type-specificity hypersensitivity to oxidative damage in CSB and XPA mice. **DNA Repair**, v. 2, p. 13-25, 2003.

DE WEESE, T. L.; SHIPMAN, J. M.; LARRIER, N. A.; BUCKLEY, N. M.; KIDD, L. R.; GROOPMAN, J. D.; CUTLER, R. G.; TE RIELE, H.; NELSON, W. G. Mouse embryonic stem cells carrying one or two defective Mhs2 alleles respond abnormally to oxidative stress inflicted by low-level radiation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 1915-1920, 1998.

DESANY, B. A.; ALCASABAS, A. A.; BACHANT, J. B.; ELLEDGE, S. J. Recovery from DNA replicational stress is the essential function of the S-phase checkpoint pathway. **Genes Dev.**, v. 12, p. 2956-70, 1998.

DESEIVIÈRES, S.; COOKE, F. T.; PARKER, P. J.; HALL, M. N. MSS4, a phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase required for organization of the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Bio. Chem.**, v. 273, p. 15787-15793, 1988.

DOONAN, J. H. Cell division in *Aspergillus*. **J. Cell Sci.**, v. 103, p. 599-611, 1992.

DRISCOLL, M. O.; RUIZ-PEREZ, V. L.; WOODS, C. G.; JEGGO, P. A.; GOODSHIP, J. A. A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. **Nature Genetics**, v. 33, p. 497-501, 2003.

DUDLEY, A.; JANSE, D.; TANAY, A.; SHAMIR, R.; CHURCH, G. A global view of pleiotropy and phenotypically derived gene function in yeast. **Mol. Syst. Biol.**, v. 1, p. 2005.0001, 2005.

DZIERZBICKI, P.; KOPROWSKI, P.; FIKUS, M. U.; MALC, E.; CIESLA, Z. Repair of oxidative damage in mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of the MHS-1 dependent pathway. **DNA repair**, v. 3, p. 403-411, 2004.

EARLEY, M. C.; CROUSE, G. F. The role of mismatch repair in the prevention of base pair mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 15487–15491, 1988.

EDELMANN, L.; EDELMANN, W. Loss of DNA mismatch repair function and cancer predisposition in the mouse: animal models for human hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Am. J. Med. Genetics Part C (Semin. Med. Genet.)**, v. 129C, p. 91-99, 2004.

EFIMOV, V. P.; MORRIS, N. R. A screen for dynein synthetic lethals in *Aspergillus nidulans* identifies spindle assembly checkpoint genes and other genes involved in mitosis. **Genetics**, v. 149, p. 101-116, 1998.

EISEN, M. B.; SPELLMAN, P. T.; BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 95, p. 25, 14863-14868, 1998.

ENGLE, D. B.; OSMANI, S. A.; OSMANI, A. H.; ROSBOROUGH, S.; XIANG, X.; MORRIS, R. N. A negative regulator of mitosis in *Aspergillus* is a putative membrane-spanning protein. **J. Biol. Chem.**, v. 265, p. 16132-16137, 1990.

ENSERINK, J. M.; SMOLKA, M. B.; ZHOU, H.; KOLODNER, R. D. Checkpoint proteins control morphogenetic events during DNA replication stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Cell. Biol.**, v. 175, p. 729-741, 2006.

EWING, B.; GREEN, P. Base calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities. **Genome Res.**, v. 8, p. 196-194, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. **Genome Res.**, v. 8, p. 175-185, 1998.

FAGUNDES, M. R. V. Z. K.; FERNANDES, L.; SAVOLDI, M.; HARRIS, S. D.; GOLDMAN, M. H. S.; GOLDMAN, G. H. Identification of a topoisomerase I mutant, *scsA1*, as an extragenic supressor of a mutation in *scaA^{NBS1}*, the apparent homologue of human nibrin in *Aspergillus nidulans*. **Genetics**, v. 164, p. 935-945, 2003.

FAGUNDES, M. R. V. Z. K.; LIMA J. F.; SAVOLDI, M.; MALAVAZI, I.; LARSON, R. E.; GOLDMAN, M. H.; GOLDMAN G. H. The *Aspergillus nidulans npkA* gene encodes a Cdc2-related kinase that genetically interacts with the UvsB^{ATR} kinase. **Genetics**, v. 167, p. 1629-1641, 2004.

FAGUNDES, M. R. V. Z. K.; SEMIGHINI, C. P.; MALAVAZI, I.; SAVOLDI, M.; LIMA, J. F.; GOLDMAN, M. H. S.; HARRIS, S. D.; GOLDMAN, G. H. *Aspergillus nidulans uvsB^{ATR}* and *scaA^{NBS1}* genes show genetic interactions during recovery from replication stress and DNA damage. **Euk. Cell**, v. 4, p. 239-1252, 2005.

FELIX, J. M.; DRUMMOND R. D.; NOGUEIRA, S. T. S.; ROSA, V. E.; LORGE R. A.; ARRUDA, P.; MENOSSI, M. Uso de arranjos de DNA em náilon para análise da expressão gênica em larga escala. **Biotechnolog. Cienc. Desenvolv.**, v. 24, p. 60-67, 2002.

FERREIRA, M. E. S.; KRESS, M. R.; SAVOLDI, M.; GOLDMAN, M. H.; HARTL, A.; HEINEKAMP, T.; BRAKHAGE, A. A.; GOLDMAN, G. H. The *akuB(KU80)* mutant deficient for nonhomologous end

joining is a powerful tool for analyzing pathogenicity in *Aspergillus fumigatus*. **Euk. Cell**, v. 5, p. 207-211, 2006a.

FERREIRA, M. E. S.; MALAVAZI, I.; SAVOLDI, M.; BRAKHAGE, A. A.; GOLDMAN, M. H. S.; KIM, H. S.; NIEMAN, W. C.; GOLDMAN, G. H. Transcriptome analysis of *Aspergillus fumigatus* exposed to voriconazole. **Curr. Genetics**, v. 50, p. 32-44, 2006b.

FLATTEN, K.; DAI, N. T.; VROMAN, B. T.; LOEGERING, D.; ERLICHMAN, C.; KARNITZ, L. M.; KAUFMANN, S. H. The role of checkpoint kinase 1 in sensitivity to topoisomerase I poisons. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 14349-14355, 2005.

FLORES-ROZAS H.; CLARK, D.; KOLODNAR, R. Proliferating cell nuclear antigen and Msh2p-Msh6p interact to form an active mismatch recognition complex. **Nature Genetics**, v. 26, p.375-378, 2000.

FORTINI, P.; PASCUCCHI, B.; PARLANTI, E.; D'ERRICO, M.; SIMONELLI, V.; DOGLIOTTI, E. The base excision repair: mechanisms and its relevance for cancer susceptibility. **Biochemie**, v. 85, p. 1053-71, 2003.

FRIEDBERG, E. C.; WALKER, G. C. SIEDE, W.; WOOD, R.D.; SCHULTZ, R. A.; ELLENBERGER, T. **DNA repair and mutagenesis**. Washington: American Society of Microbiology Press; 2nd Edition, 2006. 1118 p.

FROELICH-AMMON, S. J.; OSHEROFF, N. Topoisomerase poisons: harnessing the dark side of enzyme mechanism. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 21429-21432, 1995.

GALAGAN, J. E.; CALVO, S. E.; CUOMO, C.; MA L. J.; WORTMAN, J. R.; BATZOGLOU, S.; LEE, S. I.; BASTURKMEN, M.; SPEVAK, C. C.; CLUTTERBUCK, J.; KAPITONOV, V.; JURKA, J.; SCAZZOCCHIO, C.; FARMAN, M.; BUTLER, J.; PURCELL, S.; HARRIS, S.; BRAUS, G. H.; DRAHT, O.; BUSCH, S.; D'ENFERT, C.; BOUCHIER, C.; GOLDMAN, G. H.; BELL-PEDERSEN, D.; GRIFFITHS-JONES, S.; DOONAN, J. H.; YU, J.; VIENKEN, K.; PAIN, A.; FREITAG, M.; SELKER, E. U.; ARCHER, D. B.; PENALVA, M. A.; OAKLEY, B. R.; MOMANY, M.; TANAKA, T.; KUMAGAI, T.; ASAI, K.; MACHIDA, M.; NIEMAN, W. C.; DENNING, D. W.; CADDICK, M.; HYNES, M.; PAOLETTI, M.; FISCHER, R.; MILLER, B.; DYER, P.; SACHS, M. S.; OSMANI, S. A.; BIRREN, B. W. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. **Nature**, v. 438, p. 1105-1115, 2005.

GALIGNIANA, M. D.; HARRELL, J. M.; O'HAGEN, H. M.; LJUNGMAN, M.; PRATT, W. B. Pifithrin- α inhibits p53 signaling after interaction of the tumor suppressor protein with hsp90 and its nuclear translocation. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 2483-22489, 2004.

GALLEGO, M. E.; JEANNEAU, M.; GRANIER, F.; BOUCHEZ, D.; BECHTOLD, N.; White, C. I. Disruption of the *Arabidopsis* RAD50 gene leads to plant sterility and MMS sensitivity. **Plant J.** v. 25, p. 31-41, 2001.

GARCIA, V.; BRUCHET, H.; CAMESCASSE, D.; GRANIER, F.; BOUCHEZ, D.; Tissier, A. AtATM is essential for meiosis and the somatic response to DNA damage in plants. **Plant Cell**, v. 5, p. 119-32, 2003.

GATEI, M.; YOUNG, D.; CEROSALETI, K. M.; DESAI-MEHTA, A.; SPRING, K.; KOZLOV, S.; LAVIN, M. F.; GATTI, R. A.; CONCANNON, P.; KHANNA, K. ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure. **Nat. Genet.**, v. 25, p. 115-119, 2000.

GATTI, R. A. The inherited basis of human radiosensitivity. **Acta Oncol.**, v. 40, p. 702-11, 2001.

GAVRIELI, Y.; SHERMAN, Y.; BEN-SASSON, S. A. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **J. Cell Biol.**, v. 119, p. 493-501, 1992.

GEMS, D.; JOHNSTONE, I. L.; CLUTTERBUCK, A. J. An autonomously replicating plasmid transforms *Aspergillus nidulans* at high frequency. **Gene**, v. 98, p. 61-67, 1991.

GERECKE, E. E.; ZOLAN, M. E. An mre11 mutant of *Coprinus cinereus* has defects in meiotic chromosome pairing, condensation and synapsis. **Genetics**, v. 154, p. 1125-1139, 2000.

GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, p. 501-517, 1999.

GIANNAKAKOU P.; SACKETT, D. L., Ward, Y.; WEBSTER, K. R.; BLAGOSKLONNY, M. V.; FOJO, T. p53 is associated with cellular microtubules and is transported to the nucleus by dynein. **Nat. Cell Biol.**, v. 2, p. 709-717, 2000.

GIANNAKAKOU, P.; NAKANO, M.; NICOLAOU, K. C.; O'BRATE, A.; YU, J.; BLAGOSKLONNY, M. V.; GREBER, U. F.; FOJO, T. Enhanced microtubule-dependent trafficking and p53 nuclear accumulation by suppression of microtubule dynamics. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99, p. 10855-10860, 2002.

GOLDMAN G. H.; MCGUIRE S. L.; HARRIS S. D. The DNA damage response in filamentous fungi. **Fungal Genet. Biol.**, v.35, p.183-95, 2002.

GOLDMAN, G. H.; KAUFER, E. *Aspergillus nidulans* as a model system to characterize the DNA damage response in eukaryotes. **Fungal Genet. Biol.**, v. 41, p. 428-42, 2004.

GORCZYCA, W.; GONG, J.; DARZYNKIEWICZ, Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the *in situ* terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. **Cancer Res.**, v. 53, p. 1945-1951, 1993.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v.8, p. 195-202, 1998.

GORSKI, M. M.; ROMEIJN, R. J.; ECKEN, J. C.; De JONG, A. W.; VAN VEEN, B. L.; SZUHAI, K. Disruption of *Drosophila* RAD50 causes pupal lethality, the accumulation of DNA double-strand breaks and the induction of apoptosis in third instar larvae. **DNA Repair**, v. 3, p. 603-615, 2004.

GOTTLIEB, E.; TOMLINSON, P. M. Mitochondrial tumour suppressors: a genetic and biochemical update. **Nature Rev. Cancer**, v. 5, p. 857-866, 2005.

GUO, X. Q.; ZHANG, J.; FU, X.; WEI, Q.; LU, Y.; LI, Y.; YIN, G.; MAO, Y.; XIE, Y.; RUI, Y.; YING, K. Analysis of common gene expression patterns in four human tumor cell lines exposed to camptothecin using cDNA microarray: identification of topoisomerase-mediated DNA damage response pathways. **Front. Biosc.**, v. 11, p. 1924-1931, 2006.

GUPTA M.; FUJIMORI, A.; POMMIER, Y. Eukaryotic DNA topoisomerases I. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1262, p. 1-14, 1995.

HAERING, C. H.; NASMYTH, K. Building and breaking bridges between sister chromatids. **BioEssays**, v. 25, p. 1178-1191, 2003.

HANKINSON, O. Mutants of the pentose phosphate pathway in *Aspergillus nidulans*. **J. Bacteriol.**, v. 117, p. 1121-1130, 1974.

HANKINSON, O.; COVE, D. J. Regulation of the pentose phosphate pathway in the fungus *Aspergillus nidulans*. **J. Biol. Chem.**, v. 249, p. 2344-2353, 1974.

HARRIS, S. D. Cell polarity in filamentous fungi. **Int. Rev. Cytol.**, v. 251, p. 41-77, 2006.

HARRIS, S. D. The duplication cycle in *Aspergillus nidulans*. **Fungal Genet. Biol.**, v. 22, p. 1-12, 1997.

HARRIS, S. D.; MOMANY, M. Polarity in filamentous fungi: moving beyond the yeast paradigm. **Fungal Genet. Biol.**, v. 41, p. 391-400, 2004.

HARRIS, S. D.; MORRELL, J. L.; HAMER, J. E. Identification and characterization of *Aspergillus nidulans* mutants defective in cytokinesis. **Genetics**, v. 136, p. 517-532, 1994.

HARRIS, S. D.; READ, N. D.; ROBERSON, R. W.; SHAW, B.; SEILER, S.; PLAMANN, M.; MOMANY, M. Polarisome meets Spitzenkorper: microscopy, genetics, and genomics converge. **Euk. Cell**, v. 4, p. 225-229, 2005.

HARRIS, S., D. Morphogenesis is coordinated with nuclear division in germinating *Aspergillus nidulans* conidiospores. **Microbiology**, v. 145, p. 2747-2756, 1999.

HARRIS, S. D.; KRAUS, P. R. Regulation of septum formation in *Aspergillus nidulans* by a DNA damage checkpoint pathway. **Genetics**, p. 148, v. 1055-1067, 1998.

HARTSUIKER, E.; VAESSEN, E.; CARR, A. M.; KOHLI, J. Fission yeast Rad50 stimulates sister chromatid recombination and links cohesion with repair. **EMBO J.**, v. 20, p. 6660-6671, 2001.

HARTWELL, L. H.; WEINERT, T. A. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. **Science**, v. 246, p. 629-634, 1989.

HE, X.; ZHANG, J. Toward a molecular understanding of pleiotropy. **Genetics**, v. 173, p. 1885-1891, 2006.

HELLEDAY, T.; LOC, J.; VAN GENT, D. C.; ENGELWARD, B. P. DNA double-strand break repair: From mechanistic understanding to cancer treatment. **DNA Repair**. (no prelo).

HERMANN, M.; SPROTE, P.; BRAKHAGE, A. A. Protein kinase C (PkcA) of *Aspergillus nidulans* is involved in penicillin production. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, p. 2957-2970, 2006.

HOFMANN, A. F.; HARRIS, S. D. The *Aspergillus nidulans* *uvsB* gene encodes an ATM-related kinase required for multiple facets of the DNA damage response. **Genetics**, v. 154, p. 1577-1586, 2000.

HOPFNER, K. P.; CRAIG, L.; MONCALIAN, G.; ZINKEL, R. A.; USUI, T.; OWEN, B. A. L.; KARCHER, A.; HENDERSON, B.; BODMER, J. L.; MCMURRAY, C. T.; CARNEY, J. P.; PETRINI, J. H.; TAINER, J. A. The Rad50 zinc-hook is a structure joining Mre11 complexes in DNA recombination and repair. **Nature**, v. 418, p. 562-566, 2002.

HOPFNER, K. P.; KARCHER, A.; CRAIG, L.; WOO, T. T.; CARNEY, J. P.; TAINER, J. A. Structural biochemistry and interaction architecture of the DNA double strand break repair Mre11 nuclease and Rad50-ATPase. **Cell**, v. 105, p. 473-485, 2001.

HOPFNER, K. P.; PUTNAM, C. D.; TAINER, J. A. DNA double-strand break repair from head to tail. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 12, p. 115-122, 2002.

HOPFNER, K. P.; TAINER, J. A. Rad50/SMC proteins and ABC transporters: unifying concepts from high-resolution structures. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 13, p. 249-255, 2003.

HORIO, T.; OAKLEY, B. R. The role of microtubules in rapid hyphal tip growth of *Aspergillus nidulans*. **Mol. Biol. Cell**, v. 16, p. 918-926, 2005.

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Res.**, v. 9, p. 868-877, 1999.

HURLEY, P. J.; BUNZ, F. ATM and ATR. Components of an integrated circuit. **Cell Cycle**, v. 6, p. e1-e4, 2007.

ICHIOKA, D.; ITOH, T.; ITOH, Y. An *Aspergillus nidulans* *uvsC* null mutant is deficient in homologous DNA integration. **Mol. Gen. Genet.**, v. 264, p. 709-715, 2001.

INOUE, H. DNA repair and specific-locus mutagenesis in *Neurospora crassa*. **Mutat. Res.**, v. 437, p. 121-133, 1999.

IVANOV, E. L.; KOROLEV, V. G.; FABRE, F. XRS2, a DNA repair gene of *Saccharomyces cerevisiae*, is needed for meiotic recombination. **Genetics**, v. 132, p. 651-664, 1992.

JAGER, M.; KANAAR, R. Genome instability and Rad50^(S): subtle yet severe. **Genes Dev.**, v. 16, p. 2173-2178, 2002.

JAGTAP, P.; SZABO, C. Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. **Nat. Rev. Drug. Discov.**, v. 4, p. 421-440, 2005.

JANG, E. R.; LEE, J. H.; LIM, D. S.; LEE, J. S. Analysis of ataxia-telangiectasia mutated (ATM)- and Nijmegen breakage (NBS)-regulated gene expression patterns. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 130, p. 225-234, 2004.

JAZWINSKI, S. M.; Yeast replicative life span - the mitochondrial connection. **FEMS Yeast Res.**, v. 5, p. 119-125, 2004.

JOHZUKA, K.; OGAWA, H. Interaction of the Mre11 and Rad50: two proteins required for DNA repair and meiosis-specific double-strand break formation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 139, p. 1521-1532, 1995.

JOSHI, B.; KO, D.; ORDONEZ-ERCAN, D.; CHELLAPPAN, S. P. A putative coiled-coil domain of prohibitin is sufficient to repress E2F1-mediated transcription and induce apoptosis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 312, p. 459-466, 2003.

JUHNKE, H.; KREMS, B.; KOTTER, P.; ENTIAN, K. D. Mutants that show increased sensitivity to hydrogen peroxide reveal an important role for the pentose phosphate pathway in protection of yeast against oxidative stress. **Mol Gen Genet.**, v. 25, p. 456-464, 1996.

KAFER, E. Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and its chromosomal aberrations. **Adv. Genet.** v. 19, p. 33-131, 1977.

KAFER, E.; MAYOR, O. Genetic analysis of DNA repair in *Aspergillus*: evidence for different types of MMS-sensitive hyperrec mutants. **Mutation Research.**, v. 161, p. 119-34, 1986.

KAFER, E.; MAY, G. S. Toward repair pathways in *Aspergillus nidulans*. In: NICKOLOFF, A.; HOEKSTRA, M. F. (Ed.) **DNA Damage and Repair**. Totowa: Humana Press, 1998. v. 1, cap 21, p. 477-501.

KASTAN, M. B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, v. 432, p. 316-323, 2004.

KASTAN, M. B.; LIM, D. S. The many substrates and functions of ATM. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 1, p. 179-186, 2000.

KEENEY, S.; GIROUX, C.N.; KLECKNER, N. Meiosis specific DNA double strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. **Cell**, v. 88, p. 375-384, 1997.

KIM, M. Y.; ZHANG T.; KRAUS, W. L. Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1: 'PAR-laying' NAD⁺ into a nuclear signal. **Genes Dev.**, v. 19, p. 1951-1967, 2005.

KOBAYASHI, T.; TAKEMATSU, H.; YAMAJI, T.; HIRAMOTO, S.; KOZUTSUMI, Y. Disturbance of sphingolipid biosynthesis abrogates the signaling of Mss4, phosphatidyl-4-phosphate 5-kinase, in yeast. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 18087-18094, 2005.

KONZACK, S.; RISCHITOR, P. E.; ENKE, C.; FISCHER, R. The role of the kinesin motor KipA in microtubule organization and polarized growth in *Aspergillus nidulans*. **Mol. Biol. Cell**, v. 16, p. 497-506, 2005.

KRAUS, P. R.; HARRIS, S. D. The *Aspergillus nidulans* *snt* genes are required for the regulation of septum formation and cell cycle checkpoints. **Genetics**, v. 159, p. 557-569, 2001.

KULJIS, R. O.; CHEN, G.; LEE, E. Y. H. P.; AGUILLA, M. C.; XU, Y. ATM immunolocalization in mouse neuronal endosomes: implications for ataxia-telangiectasia. **Brain Res.**, v. 842, p. 351-358, 1999.

KUWAYAMA, H.; OBARA, S.; MORIO, T.; KATOH, M.; URUSHIHARA, H.; TANAKA, Y. PCR-mediated generation of a gene disruption construct without the use of DNA ligase and plasmid vectors. **Nucleic Acid Res.**, v. 30, p. E2, 2002.

LAKIN, N. D.; WEBER, P.; STANKOVIC, T.; ROTTINGHAUS, S. T.; Taylor, A. M.; JACKSON, S. P. Analysis of the ATM protein in wild-type and ataxia telangiectasia cells. **Oncogene**, v. 13, p. 2707-2716, 1996.

LARA-ORTIZ, T.; RIVEROS-ROSAS, H.; AGUIRRE, J. Reactive oxygen species generated by microbial NAPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*. **Mol. Microbiol.**, v. 50, p. 1241-1255, 2003.

LAVIN, M. F.; SHILOH, Y. The genetic defect in ataxia-telangiectasia. **Annu. Rev. Immunol**, p. 15, v. 177-202, 1997.

LIM, D. S.; KIM, S. T.; XU, B.; MASER, R. S.; LIN, J.; PETRINI, J. H.; KASTAN, M. B. ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. **Nature**, v. 404, p. 613-617, 2000.

LIM, D. S.; KIRSCH, D. G.; CANMAN, C. E.; AHN, J. H.; ZIV, Y.; NEWMAN, L. S.; DARNELL, R. B.; SHILOH, Y.; KASTAN, M. B. ATM binds to β -adaptin in cytoplasmic vesicles. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 1046-10151, 1998.

LISBY, M.; BARLOW, J. H.; BURGESS, R. C.; ROTHSTEIN, R. Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. **Cell**, v. 18, p.699-713, 2004.

LISBY, M.; ROTHSTEIN, R. DNA damage checkpoint and repair centers. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 16, p. 328-334, 2004.

LIU, L. F. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 58, p. 351-375, 1989.

LIU, L. F. **DNA topoisomerases**. Topoisomerase-targeting drugs. Advances in Pharmacology, Academic Press, California. 1994 v. 29B, 315p.

LO, K. W. H.; KAN, H. M.; CHAN, L. N.; Xu, W. G.; WANG, K. P.; WU, Z. The 8 KDa dynein light chain binds to 53BP1 and mediates DNA damage-induced p53 nuclear accumulation. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 8172-8179, 2004.

LOBACHEV, K.; VITRIOL, E.; STEMPLE, J.; RESNICK, M. A.; BLOOM, K. Chromosome fragmentation after induction of a double-strand break is an active process prevented by the RMX repair complex. **Curr. Biol.**, v. 14, p. 2107-2112, 2004.

LUKAS, J.; LUKAS, C.; BARTEK, J. Mammalian cell cycle checkpoint: signaling pathways and their organization in space and time. **DNA Repair**, v. 3, p. 997-1007, 2004.

LUO, G.; YAO, M. S.; BENDER, C. F.; MILLS, M.; BLADL, A. R.; BRADLEY, A.; PETRINI, J. H. Disruption of mRAD50, causes embryonic stem cell lethality, abnormal embryonic development, and sensitivity to ionizing radiation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 7376-7381, 1999.

MADEO, F.; FRÖHLICH, E.; FRÖHLICH, K. U. A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. **J. Cell Biol.**, v. 139, p. 729-734, 1997.

MAGNALDO, T.; SARASIN, A. Xeroderma pigmentosum: From symptoms and genetics to gene-based skin therapy. **Cells Tissues Organs**, v. 177, p. 189-98, 2004.

MALONE, R. E.; ESPOSITO, R. E. Recombinationless meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.**, v. 1, p. 891-901, 1981.

MARQUES, E. R.; FERREIRA, M. E.; DRUMMOND, R. D.; FELIX, J. M.; MENOSSI, M.; SAVOLDI, M.; TRAVASSOS, L. R.; PUCCIA, R.; BATISTA, W. L.; CARVALHO, K. C.; GOLDMAN, M. H.; GOLDMAN, G.H. Identification of genes preferentially expressed in the pathogenic yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis*, using suppression subtraction hybridization and differential macroarray analysis. **Mol. Genet. Genomics**, v. 271, p. 667-677, 2004.

MARTI, T. M.; KUNZ, C.; FLECK, O. DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways. **J. Cell. Physiol.**, v. 191, p. 28-41, 2002.

MARTIN, S. W.; KONOPKA, J. B. Lipid raft polarization contributes to hyphal growth in *Candida albicans*. **Euk. Cell**, v. 3, p. 675-684, 2004.

MATSUOKA, S.; BALLIF, B. A.; SMOGORZEWSKA, A.; MCDONALD, E. R.; HUROV, K. E.; LUO, J.; BAKALARSKI, C. E.; ZHAO, Z.; SOLIMINI, N.; LERENTHAL, Y.; SHILOH, Y.; GYGI, S. P.; ELLEDGE, S. J. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to dna damage. **Science**, v. 316, p. 1160-1166, 2007.

MATSUURA, K.; BALMUKHANOV, T.; TAUCHI, H.; WEEMAES, C.; SMETS, D.; CHRZANOWSKA, K. Radiation induction of p53 in cells from Nijmegen breakage syndrome is defective but not similar to ataxia-telangiectasia. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 242, p. 602-607, 1998.

MAUDE S. L; ENDERS, G. H. Cdk inhibition in human cells compromises chk1 function and activates a DNA damage response. **Cancer Res.**, v. 65, p. 780-786, 2005.

MAZUREK, A.; BERARDINI, M.; FISHEL, R. 2002. Activation of human MutS homologs by 8-oxo-guanine DNA damage. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 8260-8266, 2002.

McGOLDRICK C. A.; GRUVER C.; MAY, G. S. myoA of *Aspergillus nidulans* encodes an essential myosin I required for secretion and polarized growth. **J. Cell Biol.**, v. 128, p. 577-587, 1995.

MCKINNON, P. J. ATM and ataxia telangiectasia. **EMBO Reports**, v. 5, p. 772-776, 2004.

MERRILL, B. J.; HOLM, C. A requirement for recombinational repair in *Saccharomyces cerevisiae* is caused by DNA replication defects of mec1 mutants. **Genetics**, v. 153, p. 595-605, 1999.

MINDERMAN, H.; CONROY, J. M.; O'LOUGHLIN, K. L.; MCQUAID, D.; QUINN, P.; LI, S.; PENDYALA, L.; NOWAK, N. J.; BAER, M. R. In vitro and in vivo irinotecan-induced changes in expression profiles of cell cycle and apoptosis-associated genes in acute myeloid leukemia cells. **Mol. Cancer Ther.**, v. 4, p. 885-900, 2005.

MISHRA, S.; MURPHY, L. C.; GREGOIRE NYOMBA, B. L.; MURPHY, L. J. Prohibitin: a potential target for new therapeutics. **Trends Mol. Med.**, v. 11, p. 192-197, 2005.

MOMANY, M. Polarity in filamentous fungi: establishment, maintenance and new axes. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 5, p. 580-585, 2002.

MOMANY, M.; TAYLOR, I. Landmarks in the early duplication cycles of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus nidulans*: polarity, germ tube emergence and septation. **Microbiology**, v.146 p. 3279-84, 2000.

MOORE, D. P.; ORR-WEAVER, T. L. Chromosome segregation during meiosis: building an umbivalent bivalent. **Curr. Top. Dev. Biol.**, v. 16, p. 2164-2173, 1998.

MORANDI, E.; ZINGARETTI, C.; CHIOZZOTTO, D.; SEVERINI, C.; SEMERIA, A.; HORN, W.; VACCARI, M.; SERRA, R.; SILINGARDI, P.; COLACCI, A. A cDNA-microarray analysis of camptothecin resistance in glioblastoma cell lines. **Cancer Letters**, v. 231, p. 74-86, 2006.

MURAD, A. M. A.; D'ENFERT, C.; GAILLARDIN, C./ TOURNU, H.; TEKAIA, F.; TALIBI, D.; MARECHAL, D.; MARCHAIS, V.; COTTIN, J.; BROWN, J. P. A. Transcript profiling in *Candida albicans* reveals new cellular functions for transcriptional repressors CaTup1, CaMig1 and CaNrg1. **Mol. Microbiol.**, v. 42, n. 4, p. 981-993, 2002.

NAIRZ, K.; KLEIN, F. mre11S – a yeast mutation that blocks double-strand break processing and permits nonhomologous synapsis in meiosis. **Genes Dev.**, v. 11, p. 2272-2290, 1997.

NAKADA, D.; HIRANO, Y.; SUGIMOTO, K. Requirement of the Mre11 complex and exonuclease 1 for activation of the Mec1 signaling pathway. **Mol. Cell Biol.**, v. 24, p. 10016-10025, 2004.

NAYAK, T.; SZEWCZYK, E.; OAKLEY, C. E.; OSMANI, A.; UKIL, L.; MURRAY, S. L.; HYNES, M. J.; OSMANI, S. A.; OAKLEY, B. R. A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. **Genetics**, v. 172, p. 1557-1566, 2006.

NELSON D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4th edition. New York: W. H. Freeman and Company, 2005. 1119p.

NETO, L. E. S.; MENCK, C. F. M. Estabilidade do material genético: mutagênese e reparo. In: MATIOLI, S. R. (Ed.) **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos; 2001, p. 40-51.

NI, T. T.; MARSISCHKY, G. T.; KOLODNER, R. D. MSH2 ad MSH6 are required for removal of adenine misincorporated opposite to 8-oxo-guanine in *S. cerevisiae*. **Mol. Cell**, v. 4, p. 439-444, 1999.

NIIDA, H.; NAKANISHI, M. DNA damage checkpoint in mammals. **Mutagenesis**, v. 21, p. 3-9, 2006.

NINOMIYA, Y.; SUZKI, K.; ISHII, C.; INOUE, H. highly efficient gene replacements in *Neurospora crassa* strains deficient for nonhomologous end-joining. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 101, p. 12248-12253, 2004.

NOGUEIRA, F. T. S.; DE ROSA Jr., V. E.; MENOSSI, M.; ULIAN, E. C.; ARRUDA, P. RNA expression profiles and data mining of sugarcane response to low temperature. **Plant Physiology**, v. 132, p. 1811-1824, 2002.

NORBURY, C.; HICKSON, I. D. Cellular response to DNA damage. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.** v. 41, p. 367-401, 2001.

NOVENTA-JORDÃO, M. A.; do NASCIMENTO, A. M.; GOLDMAN, M. H.; TERENCE, H. F.; GOLDMAN, G. H. Molecular characterization of ubiquitin genes from *Aspergillus nidulans*: mRNA expression on different stress and growth conditions. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1490, p. 237-244, 1999.

NYBERG, K. A.; MICHELSON, R. J.; PUTNAM, C. W.; WEINERT, T. A. Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. **Annu. Rev. Genet.**, v. 36, p. 617-56, 2002.

O'NEILL, T.; DWYER, A. J.; ZIV, Y.; CHAN, D. W.; LEES-MILLER, S. P.; ABRAHAM, R. H.; LAI, J. H.; Hill, D.; SHILOH, Y.; CANTLEY, L.; RATHBUN, G. A. Utilization of oriented peptide libraries to identify substrate motifs selected by ATM. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 22719-22727, 2000.

OKA, A.; TAKASHIMA, S. Expression of the ataxia-telangiectasia gene (ATM) product in human cerebellar neurons during development. **Neurosci Lett.**, v. 252, p. 195-198, 1998.

OLIVEIRA, M. C.; MENCK, C. F. M. O mundo de RNA e a origem da complexidade da vida. In: MATIOLI, S. R. (Ed.) **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos; 2001. Cap 2, p. 15-26.

OSBORN, A. J.; ELLEDGE, S. J.; ZOU, L. Checking on the fork: the DNA-replication stress-response pathway. **Trends Cell Biol.**, v. 12, p. 509-516, 2002.

OSMANI S. A.; MIRABITO, P. M. The early impact of genetics on our understanding of cell cycle regulation in *Aspergillus nidulans*. **Fungal Genet. Biol.**, v. 41, p. 401-410, 2004.

OSMANI, S. A.; MAY, G. S.; MORRIS, N. R. Regulation of the mRNA levels of *nimA*, a gene required for the G2-M transition in *Aspergillus nidulans*. **J. Cell Biol.**, v. 104, p. 1495–1504, 1987.

OSMANI, S. A.; PU, R.; MORRIS, N. R. Mitotic induction and maintenance by overexpression of a G2-specific gene that encodes a potential protein kinase. **Cell**, v. 53, p. 237–244, 1988.

OSMANI, S. A.; YE, X. S. Cell cycle regulation in *Aspergillus nidulans* by two protein kinases. **Biochem. J.**, v. 317, p. 633–641, 1996.

OSMANI, S. A.; YE, X. S. Targets of checkpoints controlling mitosis: lessons from lower eukaryotes. **Trends Cell Biol.**, v. 7, p. 283–288, 1997.

PAINTER, R. B. Radioresistant DNA synthesis: an intrinsic feature of ataxia telangiectasia. **Mutat. Res.**, v. 84, p. 183–190, 1981.

PARAG, Y.; PARAG, G. Mutations affecting mitotic recombination frequency in haploids and diploids of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 137, p. 109–123, 1975.

PARK D. I.; PARK S. H.; KIM S. H.; KIM J. W.; CHO Y. K.; KIM H. J.; SOHN C. I.; JEON W. K.; KIM B. I.; CHO E. Y.; KIM E. J.; CHAE S. W.; SOHN J. H.; SUNG I. K.; SEPULVEDA A. R.; KIM J. J. Effect of *Helicobacter pylori* infection on the expression of DNA mismatch repair protein. **Helicobacter**, v. 10, p. 179–184, 2005.

PAULL, T. T.; LEE, J. H. The Mre11/Rad50/Nbs1 complex and its role as a DNA double-strand break sensor for ATM. **Cell Cycle**, v. 4, p. e55–e58, 2005.

PEARSON, C. L.; XU, X.; SHARPLESS, K. E.; HARRIS, S. D. MesA, a novel fungal protein required for the stabilization of polarity axes in *Aspergillus nidulans*. **Mol. Biol. Cell**, v. 15, p. 3658–3672, 2004.

PEÑALVA, M. Tracing the endocytic pathway of *Aspergillus nidulans* with FM4-64. **Fungal Genet. Biol.**, v. 42, p. 963–975, 2005.

PETERS, J. M. The anaphase promoting complex. Proteolysis in mitosis and beyond. **Mol. Cell**, v. 9, p. 931–943, 2002.

PETRINI J. H.; STRACKER, T. H. The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators. **Trends Cell Biol.**, v. 13, p. 458–462, 2003.

PETRINI, H. J.; BRESSAN, D. A.; YAO, M. The *RAD52* epistasis group in mammalian double strand break repair. **Semin. Immunol.**, v. 19, p. 181–188, 1997.

PINES, J. Four-dimensional control of the cell cycle. **Nature Cell Biol.** v. 1, p. E73–E79, 1999.

PONTECORVO, G.; ROPER, JA; HEMMONS, LM; MACDONALD, KD; BUFTON, AWJ. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Adv. Genet.**, v. 5, p. 141–238, 1953.

POTOCHÝ, M.; ELIÁS, M.; PROFOTOVÁ, B.; NOVOTNÁ, Z.; VALENTOVÁ, O.; ZÁRSKÝ, V. Phosphatidic acid produced by phospholipase D is required for tobacco pollen tube growth. **Planta**, v. 217, p. 122-130, 2003.

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

PRUYNE, D.; BRETSCHER, A. Polarization of cell growth in yeast. I. Establishment and maintenance of polarity states. **J. Cell Sci.**, v. 113, p. 365-375, 2000.

RASHEED, Z. A.; RUBIN, E. H. Mechanisms of resistance to topoisomerase I-targeting drugs. **Oncogene**, v. 22, p. 7296-7304, 2003.

REICHENBACH, J.; SCHUBERT, R.; SCHWAN, C.; MULLER, K.; BOHLES, H. J.; ZIELEN, S. Anti-oxidative capacity in patients with ataxia-telangiectasia. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 117, p. 535-539, 1999.

REID, R. J.; KAUH, E. A.; BJORNSTI, M. A. Camptothecin sensitivity is mediated by the pleiotropic drug resistance network in yeast. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 12091-12099, 1997.

RITCHIE, S. M.; SWANSON, S. J.; GILROY, S. From common signalling components to cell specific responses: insights from the cereal aleurone. **Physiol. Plantarum**, v. 115, p. 342-351, 2002.

SAEED, A. I.; SHAROV, V.; WHITE, J.; LI, J.; LIANG, W.; BHAGABATI, N.; BRAISTED, J.; KLAPA, M.; CURRIER, T.; THIAGARAJAN, M.; STURN, A.; SNUFFIN, M.; REZANTSEV, A. POPOV, D. RYLTSOV, A.; KOSTUKOVICH, E.; BORISOVSKY, I.; LIU, Z.; VINSAVICH, A.; TRUSH, V.; Quackenbush, J. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. **BioTechniques**, v. 34, p. 374-378, 2003.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001.

SANCAR, A.; LINDSEY-BOLTZ, L. A.; UNSAL-KAÇMAZ, K.; LINN, S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 73, p. 39-85, 2004.

SAVITSKY, K.; BAR-SHIRA, A.; GILAD, S.; ROTMAN, G.; ZIV, Y.; VANAGAITE, L.; TAGLE, D. A.; SMITH, S.; UZIEL, T.; SFEZ, S.; ASHKENAZI, M.; PECKER, I.; FRYDMAN, M.; HARNIK, R.; PATANJALI, S. R.; SIMMONS, A.; CLINES, G. A.; SARTIEL, A.; GATTI, R. A.; CHESSA, L.; SANAL, O.; LAVIN, M. F.; JASPERS, N. G. J.; TAYLOR, A. M. R.; ARLETT, C. F.; MIKI, T.; WEISSMAN, S. M.; LOVETT, M.; COLLINS, F. S.; SHILOH, Y. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. **Science**, v. 268, p. 1749-1753, 1995.

SCHECHTER, D.; CONSTANZO, V.; GAUTIER, J. Regulation of DNA replication by ATR: signaling in response to DNA intermediates. **DNA Repair**, v. 3, p. 901-908, 2004.

SCHUCHARDT, I.; ASSMANN, D.; THINES, E.; SCHUBERTH, C.; STEINBERG, G. Myosin-V, Kinesin-1, and Kinesin-3 cooperate in hyphal growth of the fungus *Ustilago maydis*. **Mol. Biol. Cell.**, v. 16, p. 5191-5201, 2005.

SCHUMMER, M., NG, W.V.; BUMGARNER, R.E.; NELSON, P.S.; SCHUMMER, B.; BEDNARSKI, D.W.; HASSELL, L.; BALDWIN, R.L.; KARLAN, B.Y.; HOOD, L. Comparative hybridization of an array of 21,500 ovarian cDNAs for the discovery of genes overexpressed in ovarian carcinomas. **Gene**, v. 238, p. 375-385, 1999.

SEILER, S.; PLAMANN, M. The genetic basis of cellular morphogenesis in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. **Mol. Biol. Cell.**, v. 14, p. 4352-4364, 2003.

SEMIGHINI, C. P.; GOLDMAN, G. H.; HARRIS, S. D. Characterization of AtmA and PrpA reveals a correlation between ROS and apical dominance in *Aspergillus nidulans*. **Fungal Genet. Newsl.**, v. 54 (Suppl), p. 41, 2007.

SEMIGHINI, C. P.; GOLDMAN, G. H.; HARRIS, S. D. The DNA damage response of filamentous fungi: novel features associated with a multicellular lifestyle. In ARORA, D. K.; BERKA, R. (Ed) **Genes and genomics- Applied Mycology and Biotechnology**. Amsterdam: Elsevier Science & Technology, 2005. v. 5, cap. 5, p. 117-139.

SEMIGHINI, C. P.; MARINS, M.; GOLDMAN, M. H. S.; GOLDMAN, G. H. Quantitative analysis of the relative transcript levels of ABC transporter Atr genes in *Aspergillus nidulans* by real-time reverse transcription-PCR assay. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 1351-1357, 2002.

SEMIGHINI, C. P.; SAVOLDI, M.; GOLDMAN, G. H.; HARRIS, S. D. Functional characterization of the putative *Aspergillus nidulans* poly(ADPribose) polymerase homologue, PrpA. **Genetics**, v. 173, p. 87-98, 2006.

SEMIGHINI, C. P.; KRESS-FAGUNDES, M. R. V. Z.; FERREIRA, J. C.; PASCON, R. C.; GOLDMAN, M. H. S.; GOLDMAN, G. H. Different roles of the Mre11 complex in the DNA damage response in *Aspergillus nidulans*. **Mol. Microbiol.**, v. 48, p. 1693-1709, 2003.

SHAFMAN, T.; KHANNA, K. K.; KEDAR, P.; SPRING, K.; KOZLOV, S.; YEN, T.; HOBSON, K.; Gatei, M.; ZHANG, N.; WATTERS, D.; EGERTON, M.; SHILOH, Y.; KHARBANDA, S.; KUFE, D.; LAVIN, M. F. Interaction between ATM protein and c-Abl in response to DNA damage. **Nature**, v. 387, p. 520-3, 1997.

SHARPLESS, K. E.; HARRIS, S. D. Functional characterization and localization of the *Aspergillus nidulans* formin *sepA*. **Mol. Biol. Cell**, v. 13, p. 469-479, 2002.

SHEA, J. M.; DEL POETA, M. Lipid signaling in pathogenic fungi. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 9, p. 352-358, 2006.

SHECHTER, D.; COSTANZO, V.; GAUTIER, J. ATR and ATM regulate the timing of DNA replication origin firing. **Nat. Cell Biol.**, v. 6, p. 648-655, 2004.

SHECHTER, D.; GAUTIER, J. ATM and ATR check in origins; a dynamic model for origin selection and activation. **Cell Cycle**, v. 4, p. 235-238, 2005.

SHI, Q. M.; WANG, Y. M.; ZHENG, X. D.; LEE, R. T. H.; WANG, Y. Critical role of DNA checkpoints in mediating genotoxic-stress-induced filamentous growth. **Mol. Biol. Cell**, v. 18, p. 815-826, 2007.

SHILOH, Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. **Nat. Rev. Cancer**, v. 3, p. 155-168, 2003.

SHILOH, Y. The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. **Trends Biochem. Sci.**, p. 31, p. 402-410, 2006.

SHILOH, Y.; KASTAN, M. B. ATM: genome stability, neuronal development, and cancer cross paths. **Adv. Cancer Res.**, v. 83, p. 209-254, 2001.

SIA, E. A.; KIRKPATRICK, D. T. The yeast MSH1 gene is not involved in DNA repair or recombination during meiosis. **DNA Repair**, v. 4, p. 253-261, 2005.

STEINBERG, G. Hyphal growth: a tale of motors, lipids, and Spitzenkörper. **Euk. Cell**, v. 6, p. 351-360, 2007.

STEINBERG, G. The cellular roles of molecular motors in fungi. **Trends Microbiol.**, v. 8, p. 162-168, 2000.

STERN, N.; HOCHMAN, A.; ZEMACH, N.; WEIZMAN, N.; HAMMEL, N.; HAMMEL, I.; SHILOH, Y.; ROTMAN, G.; BARZILAI, A. Accumulation of DNA damage and reduced levels of nicotine adenine dinucleotide in the brains of Atm-deficient mice. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 602-608, 2002.

STEWART, G. S.; MASER, R. S.; STANKOVIC, T.; BRESSAN, D. A.; KAPLAN, M. I.; JASPERS, N. G. The DNA doublestrand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. **Cell**, v. 99, p. 577-587, 1999.

TAKEMOTO, D.; TANAKA, A.; SCOTT, B. A p67Phox-like regulator is recruited to control hyphal branching in a fungal-grass mutualistic symbiosis. **The Plant Cell**, v. 18, p. 2807-2821, 2006.

TEEPE, A. G.; LOPRETE D. M.; He, Z.; HOGGARD T. A.; HILL, T. W. The protein kinase C orthologue PkcA plays a role in cell wall integrity and polarized growth in *Aspergillus nidulans*. **Fungal Genet Biol.**, 2006 (no prelo).

THROWER, D. A.; STEMPLE, J.; YEH, E.; BLOOM, K. Nuclear oscillations and nuclear filament formation accompany single-strand annealing repair of a dicentric chromosome in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Cell. Sci.** v. 116, p. 561-569, 2003.

TIMBERLAKE, W. E. Molecular genetics of *Aspergillus* development. **Annu. Rev. Genet.**, v.24, p.5-36, 1990.

TRAVASSOLI, M.; SHAYEGHI, M.; NASIM, A.; WATTZ, F. Z. Cloning and characterization of the *Schizosaccharomyces pombe* rad32 gene: a gene required for repair of double strand breaks and recombination. **Nucleic Acids Res.**, v. 23, p. 383 -388, 1995.

TRITARELLI A.; ORICCHIO, E.; CICIARELLO, M.; MANGIACASALE, R.; PALENA, A.; LAVIA, P.; SODDU, S.; CUNDARI, E. p53 localization at centrosomes during mitosis and postmitotic checkpoint are ATM-dependent and require serine 15 phosphorylation. **Mol. Biol. Cell.**; v. 15, p. 3751-3757, 2004.

UHLMANN, F. The mechanism of sister chromatid cohesion. **Exp. Cell Res.**, v. 296, p. 80-85, 2004.

USUI, T.; OHTA, T.; OSHIUMI, H.; TOMIZAWA, J.; OGAWA, H.; OGAWA, T. Complex formation and functional versatility of Mre11 of budding yeast in recombination. **Cell**, v. 95, p. 705-716, 1998.

UZIEL, T.; LERENTHAL, Y.; MOYAL L.; ANDEGEKO, Y.; MITTELMAN, L.; SHILOH, Y. Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. **EMBO J.**, v. 22, p. 5612-5621, 2003.

VALLEE, R.; WILLIAMS, J. C.; VARMA, D.; BARNHART, L. E. Dynein: and ancient motor involved in multiple modes of transport. **J. Neurobiol.**, v. 58, p. 189-200, 2004.

VAN DE PEPPEL, J.; HOLSTEGE, F. C. Multifunctional genes. **Mol. Syst. Biol.**, v. 1, p. 2005.0003, 2005.

VAN DEN BOSCH, M.; BREE, R. T.; LOWNDES, N. F. The MRN complex: coordinating and mediating the response to broken chromosomes. **EMBO Rep.**, v. 4, p. 844-849, 2003.

VAN DEN BOSCH, M.; LOHMAN, P. H.; PASTINK, A. A double-strand break repair by homologous recombination. **Biol. Chem.**, v. 383, p. 873-892, 2002.

VANCE, J. R.; WILSON, T. E. Yeast Tdp1 and Rad1-Rad10 function as redundant pathways for repairing Top1 replicative damage. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, v. 99, p. 13669-13674, 2002.

VARON, R.; VISSINGA, C.; PLATZER, M.; CEROSALETTI, K. M.; CHRZANOWSKA, K. H.; SAAR, K. Nibrin, a novel DNA doublestrand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. **Cell**, v. 93, p. 467-476, 1998.

VIDA, T. A.; ERM, S. D. A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. **J. Cell Biol.**, v. 128, p. 779-792, 1995.

VIRAG, A.; HARRIS, S. D. Functional characterization of *Aspergillus nidulans* homologues of *Saccharomyces cerevisiae* Spa2 and Bud6. **Euk. Cell**, v. 5, p. 881-895, 2006a.

VIRAG, A.; HARRIS, S. D. The Spitzenkorper: a molecular perspective. **Mycol. Res.**, v. 110, p. 4-13, 2006b.

VIRAG, A.; LEE, M. P.; SI, H.; HARRIS, S. D. Regulation of hyphal morphogenesis by Cdc42 and Rac1 homologues in *Aspergillus nidulans*. **Mol. Microbiol.** (submitted), 2007.

WANG, G.; ALAMURI, P.; ZAFRI HUMAYUN, M.; TAYLOR, D. E.; MALER, R. J. The *Helicobacter pylori* MutS protein confers protection from oxidative DNA damage. **Mol. Microbiol.**, v. 58, p. 166-176, 2005.

WANG, J. C. 1996. DNA topoisomerases. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 65, p. 635-692, 1996.

WANG, X.; DEVAIAH, S. P.; ZHANG, W.; WELTI, R. Signaling functions of phosphatidic acid. **Prog. Lipid Res.**, v. 45, p. 250-278, 2006.

WANG, Y.; QIN, J. MSH2 and ATR form a signaling module and regulate two branches of the damage response to DNA methylation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 100, p. 15387–15392, 2003.

WARD, M. *Aspergillus nidulans* and other filamentous fungi as genetic systems In: STREIPS, U. N.; YASBIN, R. E. (Ed.) **Modern Microbial Genetics**. New York: Wiley-Liss Inc, 1991, p. 355-496.

WARING, R. B.; MAY, G. S.; MORRIS, N. R. Characterization of an inducible expression system in *Aspergillus nidulans* using *alcA* and tubulin coding genes. **Gene**, v. 79, p. 119-130, 1989.

WATTERS, D.; KHANNA, K. K.; BEAMISH, H.; BIRRELL, G.; SPRING, K.; KEDAR, P.; GATEI, M.; STENZEL, D.; HOBSON, K.; KOZLOV, S.; ZHANG, N.; FARRELL, A.; RAMSAY, J.; GATTI, R.; LAVIN, M. Cellular localisation of the ataxia-telangiectasia (ATM) gene product and discrimination between mutated and normal forms. **Oncogene**, v. 14, p. 1911-1921, 1997.

WILLIAMS, B. R.; MIRZOEVA, O. K.; MORGAN, W. F.; LIN, J.; DUNNICK, W.; PETRINI, J. H. A murine model of Nijmegen Breakage Syndrome. **Curr. Biol.**, v. 12, p. 648-653, 2002.

WOLKOW, T. D.; HARRIS, S. D.; HAMER, J. E. Cytokinesis in *Aspergillus nidulans* is controlled by cell size, nuclear positioning and mitosis. **J. Cell Science**, v. 109, p. 2179-2188, 1996.

WU, X.; RANGANATHAN, V.; WEISMAN, D. S.; HEINE, W. F.; CICCONE, D. N.; O'NEILL, T. B.; CRICK, K. E.; PIERCE, K. A.; LANE, W. S.; RATHBUN, G.; LIVINGSTON, D. M.; WEAVER, D.T. ATM phosphorylation of Nijmegen breakage syndrome protein is required in a DNA damage response. **Nature**, v. 405, p. 477-482, 2000.

XIANG, X.; BECKWITH, S. M.; MORRIS, N. R. Cytoplasmic dynein is involved in nuclear migration in *Aspergillus nidulans*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 2100-2104, 1994.

XU, Y.; ASHLEY, T.; BRAINERD, E. E.; BRONSON, R. T.; MEYN, M. S.; BALTIMORE, D. Targeted disruption of ATM leads to growth retardation, chromosomal fragmentation during meiosis, immune defects, and thymic lymphoma. **Genes Dev.**, v. 10, p. 2411-2422, 1996.

YAMAGUCHI-IWAI, Y.; SONODA, E.; SAZAKI, M. S.; MORRISON, C.; HARAGUCHI, T.; HIRAOKA, Y. Mre11 is essential for the maintenance of chromosomal DNA in vertebrate cells. **EMBO J.**, v. 18, p. 6619-6629, 1999.

YAMAMOTO, A.; WEST, R. R.; MCINTOSH, J. R.; HIRAOKA, Y. A cytoplasmic dynein heavy chain is required for oscillatory movement of meiotic prophase and efficient meiotic recombination in yeast. **J. Cell Biol.**, v. 145, p. 1233-1249, 1999.

YANG, L.; UKIL, L.; OSMANI, A.; NAHM, F.; DAVIES, J.; DE SOUZA, C. P. C.; DOU, A.; PEREZ-BALAGUER, A.; OSMANI, S. A. Rapid production of gene replacement constructs and generation of a green fluorescent protein-tagged centromeric marker in *Aspergillus nidulans*. **Euk. Cell**, v. 3, p. 1359-1362, 2004.

YOREK, M. A.; DUNLAP, J. A.; MANZO-FONTES, A.; BIANCHI, R.; BERRY, G. T.; EICHBERG, J. Abnormal myo-inositol and phospholipid metabolism in cultured fibroblasts from patients with ataxia telangiectasia. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1437, p. 287-300, 1999.

YU, H. Regulation of APC-Cdc20 by the spindle checkpoint. **Curr. Opin. Cell Biol.** v. 14, p. 706-714, 2002.

ZHANG, Y. M.; LIU, J. K.; WONG, T. Y. The DNA excision repair system of the highly radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* is facilitated by the pentose phosphate pathway. **Mol. Microbiol.**, v. 48, p. 1317-1323, 2003.

ZHAO, S.; WENG, Y. C.; YUAN, S. S.; LIN, Y. T.; HSU, H. C.; LIN, S. C.; GERBINO, E.; SONG, M. H.; ZDZIENICKA, M. Z.; GATTI, R. A.; SHAY, J. W.; ZIV, Y.; SHILOH, Y.; LEE, E. Y. Functional link between ataxia-telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome gene products. **Nature**, v. 405, p. 473-477, 2000.

ZHOU Y.; GWADRY, F. G.; REINHOLD, W. C.; MILLER, L. D.; SMITH, L. H.; SCHERF, U.; LIU, E. T.; KOHN, K. H.; POMMIER, Y.; WEINSTEIN, J. N. Transcriptional regulation of mitotic genes by camptothecin-induced DNA damage: microarray analysis of dose- and time-dependent effects. **Cancer Res.**, v. 62, p. 1688-95, 2002.

ZHOU, B. B.; ELLEDGE, S. J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. **Nature**, v. 408, p. 433-439, 2000.

ZHU, J.; PETERSEN, S.; TESSAROLLO, L.; NUSSENZWEIG, A. Targeted disruption of the Nijmegen Breakage Syndrome gene NBS1 leads to early embryonic lethality in mice. **Curr. Biol.**, v. 11, p. 105-109, 2001.

ZOU, L.; CORTEZ, D. ELLEDGE, S. J. Regulation of ATR substrate selection by Rad17-dependent loading of Rad9 complexes onto chromatin. **Genes Dev.**, v. 16, p. 198-208, 2002.

ZOU, L.; ELLEDGE, S. J. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. **Science**, v. 300, p. 1542-48, 2003.