



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação Farmácia-Bioquímica

MARIANA SOUSA DE PAULA

Caracterização funcional da proteína TMP-1 do fungo *Neurospora crassa*

Araraquara, SP

2022

MARIANA SOUSA DE PAULA

Caracterização funcional da proteína TMP-1 do fungo *Neurospora crassa*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Farmacêutica Bioquímica

Orientadora: Profa. Dr. Maria Celia Bertolini

Coorientador: Dr. Rodrigo Duarte Gonçalves

Araraquara, SP

2022

P324c Paula, Mariana Sousa de.
Caracterização funcional da proteína TMP-1 do fungo *Neurospora crassa* / Mariana Sousa de Paula. – Araraquara: [S.n.], 2022.
47 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Farmácia Bioquímica.

Orientadora: Maria Celia Bertolini.
Coorientador: Rodrigo Duarte Gonçalves.

1. *Neurospora crassa*. 2. Proteína TMP-1. 3. Localização celular.
4. Desenvolvimento assexual. I. Bertolini, Maria Celia, orient. II.
Gonçalves, Rodrigo Duarte, coorient. III. Título.

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus, meu alicerce, por toda a boa preparação em minha vida. Agradeço pela paz, pela misericórdia, amor e por ser minha constante companhia em todos os momentos.

Agradeço aos meus pais, meus confidentes, minha base, pela oportunidade que me deram de viver esse grande desafio. Obrigada por acreditarem e confiarem em mim. Sem o apoio de vocês, nada do que eu vivi seria possível. Que Deus abençoe vocês grandemente e que nosso companheirismo permaneça.

Agradeço a Yasmin, Isabella e Livia pela irmandade. Sou incapaz de imaginar minha vivência em Araraquara sem ter conhecido vocês. Obrigada por estarem comigo nas risadas, nos estudos, quando tudo estava ótimo e quando nem tudo ocorria como planejado. Agradeço a Stéfany, minha grande amiga, pela troca, conversas, pela paciência e compreensão durante nossa vivência juntas. Sua amizade foi essencial durante todo esse período. Júlia, minha companheira de laboratório, minha amiga, obrigada por tudo. Seu apoio durante a realização deste trabalho foi imprescindível e me deu a honra de conhecer essa pessoa incrível que você é. Sou extremamente grata pelo presente que é ter vocês em minha vida.

Agradeço à minha orientadora, meu coorientador e colegas de laboratório. Obrigada por me ensinarem e me permitirem aprender com vocês. Agradeço muito pela oportunidade de ter realizado Iniciação Científica. Minha gratidão também ao CNPQ e à FAPESP, pelo apoio financeiro, o qual possibilitaram a realização deste trabalho.

À UNESP, à educação superior pública, minha total gratidão por tudo que pude aprender e viver. Meu crescimento pessoal e profissional durante a graduação foram imensuráveis e com certeza valeram muito a pena.

RESUMO

Neurospora crassa é um organismo pertencente ao Reino dos Fungos e tem desempenhado um papel muito importante no conhecimento de mecanismos celulares em eucariotos, devido ao seu genoma já sequenciado e sua fácil manipulação. Entretanto, cerca de 60% das proteínas de *N. crassa* não foram caracterizadas funcionalmente. Dentre tais proteínas, destaca-se o objeto deste estudo, a proteína transmembrana TMP-1, a qual foi revelada ser regulada pelo fator de transcrição FLB-3. Em *Aspergillus nidulans*, a proteína TmpA, ortóloga a TMP-1 de *N. crassa*, foi descrita como participante na regulação do desenvolvimento assexual. O objetivo deste trabalho foi caracterizar funcionalmente a proteína TMP-1. Para tanto, foi realizada a avaliação fenotípica da linhagem $\Delta tmp-1$ em diferentes condições de estresse e em comparação à linhagem selvagem pela avaliação do crescimento em placa e análises macro e microscópica. Para os estudos de localização celular foi construída uma linhagem produzindo a proteína TMP-1 fusionada ao *tag GFP* (TMP-1-GFP). Os resultados obtidos sugerem que não houve diferença fenotípica entre os micélios das linhagens *WT* e $\Delta tmp-1$, porém houve uma diminuição na produção de microconídeos, em comparação à linhagem selvagem. Nas condições de estresse, houve diferença relevante quando a linhagem foi exposta ao *Congo Red*, agente que altera a integridade da membrana e ao meio sem carbono, sugerindo que esta proteína possa estar envolvida com estresse de parede celular e metabolismo de carboidratos. Quanto à sua localização, os resultados mostraram que a proteína TMP-1 está localizada na membrana e intracelularmente de forma pontual, mas parece não estar relacionada ao processo de germinação de *N. crassa*. Novos estudos são necessários para melhor compreensão do papel funcional desta proteína no fungo *N. crassa*, bem como quais vias metabólicas a proteína está envolvida.

Palavras-chave: *Neurospora crassa*, proteína TMP-1, localização celular, desenvolvimento assexual.

ABSTRACT

Neurospora crassa is an organism belonging to the Kingdom of Fungi and has played a very important role in the knowledge of the cellular mechanisms in eukaryotes due to its sequenced genome and its easy manipulation. However, about 60% of the *N. crassa* proteins have not been functionally characterized. Among such proteins, we highlight the object of this study, the transmembrane protein TMP-1, previously described as regulated by the transcription factor FLB-3. In *Aspergillus nidulans*, the TmpA protein, ortholog of the *N. crassa* TMP-1, was described to participate in the regulation of the asexual development. The objective of this work is to functionally characterize the TMP-1 protein and to evaluate its potential influence on the asexual development of the fungus and its localization. For this, we performed a phenotypic evaluation of the $\Delta tmp-1$ strain and compared to the wild-type (WT) strain by plaque growth assay and macro and microscopic analysis. For cellular localization studies, a strain producing the TMP-1 protein fused to the GFP tag (TMP-1-GFP) was constructed. The results showed that there was no phenotypic difference between mycelia of the WT and $\Delta tmp-1$ strains; however, there was a decrease in the production of microconidia compared to the WT strain. Under stress conditions, we observed a relevant difference when the mutant strain was exposed to Congo Red, an agent that affects the membrane integrity, and to a medium without carbon, suggesting that this protein may be involved in cell wall stress and carbohydrate metabolism. Regarding cellular localization, the results showed that the TMP-1 protein is localized in the membrane and intracellularly in a punctual way, and it is not related to the germination process of *N. crassa*. Further studies are needed to better understand the functional role of the protein, as well as which metabolic pathways the protein is involved.

Keywords: *Neurospora crassa*, TMP-1 protein, cellular location, asexual development

Lista de Ilustrações e figuras

- Figura 1 - Mapa físico do plasmídeo pZErOR-2 GFP loxP-hph-loxP gerado pelo software *SnapGene Viewer* v. 5.2.2 (<https://www.snapgene.com/snapgene-viewer/>).....22
- Figura 2 - Representação esquemática do processo de construção da linhagem produzindo TMP-1-GFP utilizando *splitmarkers*. Os oligonucleotídeos 0848GLY-R e 0848LOX-F foram desenhados contendo uma sequência adicional de 30 pb nas extremidades 5' para permitir a sobreposição do cassette GFP-*hph*..... 23
- Figura 3 - (A) Sequência nucleotídica do gene *tmp-1* de *N. crassa*. O start codon ATG está representado em verde e stop codon está representado em vermelho. (B) Sequência da proteína TMP-1. Em vermelho está representado o domínio de ligação a FAD, em azul o domínio de ligação a NAD(P) e em verde os domínios transmembrana..... 27
- Figura 4 - Amostras de DNA das linhagens WT 2489 e $\Delta tmp-1$ submetidas a PCR e analisadas por eletroforese em gel de agarose a 0,8%. L -1kb DNA ladder (*Invitrogen*); 1 - WT 2489 e 2 - $\Delta tmp-1$, evidenciando a ausência da banda de 1.737 pb na linhagem $\Delta tmp-1$, correspondente ao gene *tmp-1*, confirmando o nocaute.....28
- Figura 5 - Comparação fenotípica entre as linhagens selvagem (1) e mutante (2) em meio sólido. Ambas foram crescidas em Erlenmeyer contendo 50 mL de meio sólido VM 2% sacarose, por 10 dias, exposta à luz e à temperatura de 30°C... .. 29
- Figura 6 - Análise do crescimento em placa da linhagem selvagem e mutante $\Delta tmp-1$ após 24h em meios VM, C-free e N-free 30
- Figura 7 - Comparação do crescimento radial em placa das linhagens selvagem e mutante $\Delta tmp-1$ após 24h em meio VM contendo diferentes fontes decarbono 30

Figura 8 - Comparação do crescimento radial em placa das linhagens selvagem e mutante <i>Δtmp-1</i> após 24h em meio <i>N-free</i> contendo diferentes fontes de carbono	31
Figura 9 - Comparação do crescimento radial em placa das linhagens selvagem e mutante <i>Δtmp-1</i> após 24h em meios VM ácido ealcalino	32
Figura 10 - Crescimento radial das linhagens selvagem e mutante <i>Δtmp-1</i> , após 24h na presença de diferentes concentrações de <i>Congo Red</i> (CR)	33
Figura 11 - Crescimento radial das linhagens selvagem e mutante <i>Δtmp-1</i> , após 24h na presença de diferentes concentrações de SDS... ..	33
Figura 12 - Crescimento radial das linhagens selvagem e mutante <i>Δtmp-1</i> , após 24h na presença de sorbitol (1M) e cloreto de sódio (1 M)	34
Figura 13 - Crescimento radial das linhagens selvagem e mutante <i>Δtmp-1</i> após 24h na presença dos agentes H ₂ O ₂ e menadiona	34
Figura 14 - Fragmentos de DNA correspondentes às regiões de homologia 5' e 3' amplificadas por PCR. A - Região de homologia 5' (1) com tamanho de 1.108 pb. B - Regiões de homologia 3' amplificadas utilizando os oligonucleotídeos Lox F' e Lox R1' (3) com tamanho de 1.281 pb e os oligonucleotídeos Lox F' e Lox R2' (4) com tamanho de 1.184 pb. Eletroforese em gel de agarose 0,85%. L - 1 kb DNA <i>ladder</i> (<i>Invitrogen</i>).	36
Figura 15 - Fragmento de DNA correspondente à sequência da proteína GFP amplificado por PCR 1 - Fragmento de DNA com tamanho de 3000 pb L – 1 kb DNA <i>ladder</i> (<i>Invitrogen</i>). Eletroforese em gel de agarose0,8%.	36

Figura 16 - Obtenção dos *splitmarkers* após PCR de fusão 3 - *Splitmarker* 5' com 3.360 pb de tamanho. 4 - *Splitmarker* 3' com 2.271 pb. Ambos os fragmentos foram sintetizados por PCR de fusão e submetidos à análise por eletroforese em gel de agarose 0,8%. L - 1 kb DNA *ladder* (*Invitrogen*).

..... 37

Figura 17 - Amostras de DNA das linhagens WT 2489 (selvagem) e *tmp-1-gfp* amplificadas por PCR. 1 – DNA genômico da linhagem WT 2489, utilizado como controle; 2 e 3 - DNA genômico da linhagem *tmp-1-gfp* mostrando a presença da banda de 1.138 pb. Eletroforese em gel de agarose a 0,8%. L -1 kb DNA *ladder* (*Invitrogen*)

38

Figura 18 - *Western blot* da proteína TMP-1-GFP. Proteínas totais foram fracionadas por eletroforese *SDS-PAGE* e transferidas para membrana de nitrocelulose. Após bloqueio com leite, a membrana foi incubada com o anticorpo anti-GFP (*Sigma*). L - *Prestained Protein Ladder* (*Thermo Scientific*). Amostras: C+ - controle positivo; 1 e 2 - amostras de proteínas da linhagem produzindo TMP-1-GFP

39

Figura 19 - Microscopia de fluorescência dos conídios durante a germinação da linhagem *tmp-1-gfp* nos tempos de leitura 2, 4, 6 e 8 h. A direita da figura algumas imagens foram amplificadas e são mostradas. A fluorescência foi analisada utilizando o microscópio *Axio Imager A2* (*Zeiss*), com magnificação de 63 X.....

42

Figura 20 - Avaliação macroscópica das linhagens WT 2489 e Δ *ttmp-1* em meios VM contendo *Congo Red* e meio VM sem carbono

..... 43

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Oligonucleotídeos utilizados para a síntese dos <i>splitmarkers</i> . As sequências adicionadas aos oligonucleotídeos 0848GLY-R e 0848LOX-F estão destacadas em negrito	23
Tabela 2 - Contagem de conídeos totais das linhagens selvagem e mutante $\Delta tmp-1$	29
Tabela 3 - Contagem de microconídeos das linhagens selvagem e mutante $\Delta tmp-1$	29
Tabela 4 - Contagem de conídeos totais das linhagens selvagem (WT) e mutante ($\Delta tmp-1$) em diferentes condições... ..	44
Tabela 5 - Contagem de microconídeos das linhagens selvagem (WT) e mutante ($\Delta tmp-1$) na presença de <i>Congo Red</i>	44

Lista de Abreviaturas e Siglas

CR - Congo Red

FGSC - Fungal Genetics Stock Center

GFP – Green Fluorescent Protein

KO – Knockout

PCR - Reação da Polimerase em Cadeia

ORF- Open Reading Frame

VM - Meio mínimo de Vogel

WT - Wild type

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.2 Justificativa	14
1.3 Objetivos	16
2 MATERIAIS E MÉTODOS	17
2.1 Obtenção das linhagens	17
2.2 Meio de cultivo para o crescimento e manutenção das linhagens: Mínimo de Vogel (VM)	17
2.3 Extração de DNA genômico	17
2.4 Eletroforese em gel de agarose	18
2.5 Confirmação do nocaute da linhagem mutante $\Delta tmp-1$	19
2.6 Crescimento das linhagens selvagem e mutante $\Delta tmp-1$ em diferentes condições e crescimento	19
2.6.1 Avaliação do crescimento radial em placa na presença de diferentes agentes estressantes	19
2.6.2 Avaliação macroscópica do crescimento e contagem de conídeos	20
2.7 Ensaio de germinação de conídeos da linhagem $\Delta tmp-1$	20
2.8 Construção da linhagem produzindo a proteína TMP-1-GFP	20
2.9 Transformação de <i>N. crassa</i> por eletroporação	22
2.10 Confirmação da linhagem <i>tmp-1-gfp</i>	23
2.10.1 Confirmação por PCR	23
2.10.2 Confirmação pela análise da proteína TMP-1-GFP. Extração de proteínas	24
2.10.3 SDS-PAGE e <i>Western blot</i>	24
2.11 Análises por microscopia de fluorescência. Ensaio de germinação de conídeos da linhagem <i>tmp-1-gfp</i>	24
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
3.1 Características do gene <i>tmp-1</i> e da proteína TMP-1	26
3.2 Confirmação do nocaute da linhagem mutante $\Delta tmp-1$	26
3.3 Análise macroscópica da linhagem mutante $\Delta tmp-1$	26

SUMÁRIO

3.5 Análises do crescimento em placa em diferentes condições de cultivo	30
3.6 Construção da linhagem produzindo TMP-1-GFP	35
3.6.1 Confirmação da linhagem produzindo a proteína TMP-1 fusionada a GFP (<i>tmp-1-gfp</i>)	38
3.7 Análises da linhagem <i>tmp-1-gfp</i> por microscopia de fluorescência	40
3.8 Efeito do estresse na produção de conídeos	41
4. CONCLUSÃO	45
5 REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

Neurospora crassa é um microrganismo que pertence ao Reino dos Fungos e possui um papel histórico e atual muito importante na compreensão acerca dos mecanismos celulares em eucariotos. Inicialmente, *N. crassa* foi estudado na primeira metade do século XIX, quando houve uma infestação deste fungo nas padarias de Paris (MONTAGNE *et al.*, 1843) e desde então, tornou-se um organismo modelo para estudos de mecanismos celulares, como ritmo circadiano, diferenciação celular, defesa do genoma, expressão gênica e desenvolvimento (PERKINS *et al.*, 2000), devido a sua fácil manipulação e conhecimento das características que envolvem sua genética e bioquímica. *N. crassa* é caracterizado por ser multicelular, filamentoso e possuir hifas ramificadas, tubulares e septadas, de maneira a permitirem a migração de núcleos e outras organelas entre os septos da hifa. Quando ocorre o fenômeno de fusão de hifas, estas formam os micélios, os quais possuem células multinucleadas. Sua reprodução se dá de forma sexuada e assexuada com produção de macro e microconídeos e é altamente regulada em função dos fatores ambientais, como luz, temperatura e nutrientes. Quanto ao genoma, *N. crassa* possui sete cromossomos que variam de 4 a 10 Mb (SCHULTE *et al.*, 2002).

Com o desenvolvimento tecnológico, tornou-se possível o surgimento e progresso de metodologias envolvidas na inativação genética (NINOMIYA *et al.*, 2004), permitindo que estudos voltados para a genômica funcional fossem realizados, originando uma coleção de linhagens construídas com genes inativados (COLOT *et al.*, 2006) e que estão disponibilizadas no *Fungal Genetics Stock Center* (FGSC, Kansas City, Missouri, USA).

1.2 Justificativa

Neurospora crassa é um organismo muito promissor enquanto modelo para estudos de novos mecanismos genéticos e bioquímicos. Vale ressaltar que esta espécie possui 10.082 genes codificadores de proteínas, equivalente a 44% do genoma (GALAGAN *et al.*, 2003). Entretanto, somente 40% das proteínas foram registradas funcionalmente em banco de dados (WANG *et al.*, 2011), ou seja, boa parte de seu genoma ainda possui funções desconhecidas.

O laboratório onde este trabalho de conclusão de curso foi desenvolvido tem como objetivo estudar os mecanismos de regulação de alguns processos celulares, como a regulação do metabolismo dos carboidratos de reserva de glicogênio e trealose, resposta a estresse, entre outros (GONÇALVES *et al.*, 2011; CUPERTINO *et al.*, 2011; CUPERTINO *et al.*, 2015; VIRGILIO *et al.*, 2017) e, nos estudos realizados até o momento, foram identificados diferentes fatores de transcrição e proteínas regulatórias envolvidos na regulação do metabolismo de carboidratos de reserva (GONÇALVES *et al.*, 2011; CUPERTINO *et al.*, 2011; CUPERTINO *et al.*, 2015; VIRGILIO *et al.*, 2017), do processo de conidiação (BONI *et al.*, 2018) e de resposta a estresse (FREITAS *et al.*, 2016).

Dentre os fatores de transcrição identificados, ressalta-se o FLB-3 (nomeado de acordo com a nomenclatura de *N. crassa*), uma proteína homóloga a FlbC e FLE1 de *A. nidulans* e *Podospora anserina*, respectivamente, descritas como reguladoras do processo de desenvolvimento assexual e regulação de genes envolvidos na conidiação (BONI *et al.*, 2018). Estudos de análise transcriptômica previamente realizados no laboratório onde este projeto foi desenvolvido demonstraram que vários genes são regulados pelo fator de transcrição FLB-3 e entre esses genes está o que codifica a proteína ortóloga a TmpA (*trans-membrane protein A*) de *A. nidulans*, a qual demonstrou ser altamente regulada pelo fator de transcrição FLB-3. Esta proteína está presente em plantas e outros fungos e foi descrita como uma proteína transmembrana que regula o desenvolvimento assexual no fungo *A. nidulans* (SOID-RAGGI *et al.*, 2006). A proteína ortóloga a TmpA em *N. crassa* é a proteína TMP-1, sendo codificada pela ORF NCU00848 e descrita como uma proteína de membrana integral no banco de dados do fungo. Essa proteína ainda não foi caracterizada funcionalmente em *N. crassa* e o presente projeto buscou contribuir com estudos para melhor compreensão do papel funcional desta proteína.

1.3 Objetivos

Este projeto teve como objetivo iniciar os estudos com a proteína TMP-1 de *N. crassa* com o objetivo de caracterizar alguns aspectos funcionais da mesma. Para tanto, foram propostos os seguintes objetivos:

- Realizar análise do *fitness* da linhagem mutante $\Delta tmp-1$ em meio sólido em diferentes condições de crescimento e comparar à linhagem selvagem (WT). O crescimento será avaliado nas seguintes condições: pH ácido e alcalino, ausência de carbono e nitrogênio e crescimento na presença de diferentes fontes de carbono, situações de estresse osmótico, como NaCl e sorbitol, estresse oxidativo, como peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e menadiona, além da presença de agentes que alteram a integridade da membrana, como SDS (dodecil sulfato de sódio) e *Congo Red* (CR).
- Construir uma linhagem do fungo sintetizando a proteína TMP-1 fusionada à proteína verde fluorescente *Green Fluorescent Protein* (GFP) a fim de possibilitar estudos de localização celular da proteína através da microscopia de fluorescência.
- Analisar a produção de conídios e de microconídios em condições normais de crescimento e em diferentes condições de estresse.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção das linhagens

As linhagens mutante FGSC#14453 ($\Delta tmp-1$, NCU00848), selvagem (*wild-type*) FGSC#2489 e FGSC#9718 (*mus52::bar*) foram obtidas através do *Fungal Genetics Stock Center* (FGSC), em Kansas city, MO, USA.

2.2 Meio de cultivo para o crescimento e manutenção das linhagens: Mínimo de Vogel (VM)

Para o crescimento e manutenção das linhagens, utilizou-se o meio de cultivo Mínimo de Vogel (VM) (VOGEL, 1956). Com este meio, as diferentes linhagens foram crescidas em Erlenmeyers contendo 30 mL de meio VM sólido e sacarose a 2%, a 30°C, durante período de 48 h, seguido de crescimento a 25°C, na presença de luz, por mais sete dias. Em seguida, os conídeos foram coletados, adicionando-se 10 mL de água destilada estéril, seguido de filtração em gaze estéril para retenção de hifas, agitação em *Vortex* e centrifugação a 4.000 rpm. O sobrenadante foi retirado e o processo acima citado foi repetido por mais três vezes. A suspensão de conídeos totais foi contada na câmara de Neubauer e utilizada como inóculo nos experimentos. Para a obtenção de microconídeos realizou-se a filtração da suspensão em membrana Millex de 5 μ m.

Realizada a contagem, o seguinte cálculo foi aplicado:

$$N^{\circ} \text{ total de células/ml} = N^{\circ} \text{ de células contadas} \times 10^4 \times \text{fator de diluição}$$

2.3 Extração de DNA genômico

Para a extração de DNA genômico, os conídeos foram inoculados em frascos contendo meio VM líquido e crescidos a 30°C durante a noite, sob agitação a 180 rpm. Após o crescimento, o micélio foi coletado por filtração a vácuo e utilizado para a extração de DNA genômico. Inicialmente, o micélio foi pulverizado em gral de porcelana contendo nitrogênio líquido. O pulverizado foi transferido para tubos de polipropileno de 1,5 mL contendo 500 μ L de tampão de extração (100 mM TRIS-HCl, pH 8,0, 50 mM EDTA e 1% SDS). Adicionou-se então 500 μ L de fenol, clorofórmio e álcool isoamílico nas proporções 25:24:1, respectivamente, e os tubos foram

colocados em gelo. O conteúdo do tubo foi agitado em *Vortex* e, em seguida, centrifugado a 13.000 rpm a 4°C, por 10 min em centrífuga de mesa. Em seguida, a fase aquosa foi transferida para novo tubo, onde foi adicionado 50 µL de acetato de sódio 3 M, pH 5,2 e 500 µL de isopropanol gelado. Os tubos foram colocados a -80°C, por 15 min e, em seguida, centrifugados a 13.000 rpm a 4°C por 10 min em centrífuga de mesa. O sobrenadante foi descartado, o precipitado foi ressuscitado em 100 µL de água destilada e foram adicionados 200 µg/mL de RNase A, seguido de incubação a 37°C, por 30 min. Uma nova extração foi feita, adicionando 100 µL de fenol saturado, clorofórmio e álcool isoamílico, seguido de uma centrifugação a 13.000 rpm a 4°C, 5 min em centrífuga de mesa. A fase aquosa foi transferida para novo tubo e uma precipitação foi realizada com 40 µL de acetato de amônio 7,5 M e 300 µL de etanol absoluto. Os tubos foram colocados a -80°C por 15 min e centrifugados a 13.000 rpm a 4°C, por 10 min em centrífuga de mesa. O precipitado resultante foi lavado com 500 µL de etanol 70% por duas vezes e ressuscitado em 150 µL de água. A determinação da concentração de DNA foi feita em espectrofotômetro *NanoVue Plus™* a 260 nm.

2.4 Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese foi realizada com o objetivo de analisar os produtos da PCR por meio da separação das moléculas de DNA de acordo com seu tamanho. O gel de agarose utilizado foi preparado com 0,8% de agarose contendo 5 µL de *sybr safe* para a visualização dos fragmentos de DNA. No gel, foram aplicados 20 µL da amostra, acrescida de 4 µL de DNA *loading buffer* 10x (3,9 mL glicerol, 500 µL 10% (w/v) SDS, 200 µL 0,5 M EDTA, 0,025 g bromofenol azul, 0,025 g xileno cianol) e o padrão de peso molecular *Ladder* 1 kb (Invitrogen) também foi aplicado no gel. A eletroforese foi realizada nas condições de 80 V por 40 min, aproximadamente. O gel foi posteriormente visualizado no *ChemiDoc™ Touch Imaging System* (Bio-Rad).

Para a purificação de fragmentos de DNA, após eletroforese as bandas correspondentes ao material de interesse foram visualizadas em um transluminador, em seguida, foram excisadas e purificadas através da utilização do kit *illustra GFX™ PCR DNA e Band Purification* (GE HealthCare). Os fragmentos obtidos foram acrescidos de 300 µL de *Capture Buffer III* e fundidos em banho seco a 55°C por cerca de 15 min. Em seguida, o produto fundido foi filtrado em membrana de sílica e

centrifugada por 1 min a 13.000 rpm. A membrana contendo o material de interesse foi transferida para um outro tubo onde foi lavada e centrifugada 2 X com 500 µL de *Wash Buffer Type I*. A membrana foi novamente transferida para um novo tubo e lavada com 30 µL de água Mili-Q e os fragmentos de DNA foram eluídos. Uma alíquota da solução contendo os ácidos nucleicos foi retirada para ser submetida à eletroforese em gel de agarose 0,8% e confirmar a purificação.

2.5 Confirmação do nocaute da linhagem mutante $\Delta tmp-1$

Para confirmar se a linhagem recebida do FGSC era realmente mutante, ou seja, para confirmar que o gene *tmp-1* havia sido inativado na linhagem, a mesma foi cultivada em meio VM líquido, o micélio resultante foi submetido à extração de DNA genômico e a confirmação foi realizada por PCR utilizando os oligonucleotídeos:

TmpA F: 5'-ATCTAGAATGTATGGATCCAGGGACG-3'

TmpA R: 5'-CTTAATTAAACTGTCAAAGATGGGGCCATAG-3'.

O tamanho do fragmento de DNA correspondente ao gene *tmp-1* possui 1.737pb. As condições de amplificação por PCR foram: estágio I - desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguida do início do ciclo; estágio II – desnaturação a 94°C por 45 s e anelamento dos primers a 65°C por 30 segundos e extensão da fita por 2 min a 72°C; estágio III – 72°C por 5 min. A PCR foi realizada em 35 ciclos utilizando o termociclador *Applied Biosystems™ Veriti™ Thermal Cycler*. O DNA genômico da linhagem selvagem foi utilizado como controle.

2.6 Crescimento das linhagens selvagem e mutante $\Delta tmp-1$ em diferentes condições e crescimento

2.6.1 Avaliação do crescimento radial em placa na presença de diferentes agentes estressantes

As linhagens selvagem e mutante foram submetidas à avaliação de crescimento radial em placa. Para tanto, uma alíquota de 10µL (10^7 conídeos/mL) foi depositada no centro das placas e o crescimento radial foi avaliado após 24 h em meio VM contendo 2% sacarose, pH 4,2. As seguintes condições de estresse foram avaliadas:

- Estresse alcalino de pH 7,8.
- Meio sem nitrogênio no qual foi utilizado o meio Vogel *N-free*.
- Meio sem carbono e meios contendo diferentes fontes de carbono, tais como sacarose, maltose, xilose, glicerol, galactose, glicose, trealose e lactose.
- Meios contendo agentes indutores de estresse osmótico (NaCl e sorbitol), estresse oxidativo (H₂O₂ e menadiona) e agentes que alteram a integridade da membrana citoplasmática (SDS) e integridade de parede (*Congo Red*). Tais reagentes foram preparados em diferentes concentrações e adicionados em meio Mínimo de Vogel.

2.6.2 Avaliação macroscópica do crescimento e contagem de conídeos

A contagem de conídeos e microconídeos produzidos pela linhagem mutante também foi realizada nas condições de meio sem carbono e contendo *Congo Red* na concentração de 400 µg/ml.

2.7 Ensaio de germinação de conídeos da linhagem $\Delta tmp-1$

Para o ensaio de germinação foram utilizadas placas de Petri pequenas, contendo uma lamínula em cada placa devidamente esterilizada. Inoculou-se 3 mL de VM líquido contendo 2% sacarose e, em seguida, 100 µL da suspensão de conídeos da linhagem de interesse a 10⁷ conídeos/mL. A linhagem selvagem foi também analisada como controle do experimento. As placas foram agitadas suavemente e incubadas a 30°C nos tempos de 2, 4, 6 e 8 h. Passado o tempo pré-determinado, o meio foi aspirado e uma solução do corante *Hoechst* 1:100 foi adicionada sob a lamínula, na ausência de luz. Em seguida, a lamínula foi lavada com PBS 1X e analisada por microscopia de fluorescência utilizando o microscópio *Axio Imager A2* (*Zeiss*) na objetiva de 63 X. O filtro DIC foi utilizado para observar os conídeos e hifas por contraste de fase. O filtro DAPI, por sua vez, foi utilizado para analisar os núcleos. As imagens foram capturadas utilizando a câmera acoplada ao microscópio *AxioCam MRm* e processadas utilizando o *software AxioVision*, versão 4.8.2.

2.8 Construção da linhagem produzindo a proteína TMP-1-GFP

Para construir a linhagem produzindo a proteína TMP-1 fusionada a GFP (TMP-1-GFP) foi utilizado o plasmídeo pZErOR-2 GFP loxP-hph-loxP, o qual foi gentilmente cedido pelo professor Dr. Michael Freitag da Oregon State University, OR, USA. O procedimento foi realizado sob orientação do Dr. Rodrigo D. Gonçalves, Pós-

Doutorando no laboratório onde este projeto foi desenvolvido. Resumidamente, o procedimento se baseia na troca da sequência codificadora do gene *tmp-1* pela sequência do gene *hph* (resistência a higromicina) para ser utilizada como marca de seleção. A utilização deste plasmídeo é essencial, pois permite a expressão da proteína TMP-1 fusionada a proteína fluorescente GFP pela inserção do tag GFP na região 3' utr do gene e um gene de resistência à higromicina, possibilitando a seleção de transformantes expressando a proteína TMP1 fusionada na região C-terminal com a proteína verde florescente GFP, viabilizando, portanto, a construção da linhagem TMP-1-GFP. O mapa físico do plasmídeo está mostrado na Figura 1.

Para a construção desta linhagem, um cassete de DNA contendo a sequência nucleotídica da GFP, um stop códon e a sequência do gene *hph* foi amplificada por PCR a partir do vetor pZErOR-2 GFP loxP-hph-loxP, o qual contém a sequência do tag GFP. O cassete de DNA em questão foi amplificado por PCR utilizando *Phusion Master mix Buffer (2x)* e os oligonucleotídeos utilizados foram TmpAGly-F' e hph_SmR', cujas sequências estão mostradas na Tabela 1. O procedimento de amplificação por PCR foi realizado nas seguintes condições: desnaturação inicial a 98°C por 30 s, seguida do início do ciclo, desnaturação a 98°C por 10 s e anelamento dos primers a 60°C por 30 s e extensão da fita a ser formada por 2 min a 72°C. A PCR foi feita em 35 ciclos. Oligonucleotídeos primers foram sintetizados com o objetivo de amplificar fragmentos do gene *tmp-1* correspondentes às regiões *upstream* e *downstream* ao *stop codon* do gene com cerca de 1 kb cada. Para a amplificação da região *upstream* (nas mesmas condições acima mencionadas) foram utilizados os oligonucleotídeos TmpAGLY-F e 0848GLY-R e para a região *downstream* os oligonucleotídeos 0848LOX-F e 0848LOX-R. Na região 5' dos oligos 0848LOX-F e 0848GLY-R foram adicionadas sequências nucleotídicas (mostrado na Tabela 1, em negrito) com o objetivo de viabilizar a construção posterior dos *splitmarkers* por PCR de fusão, realizado nas mesmas condições descritas acima.

Para a síntese do *splitmarker* 5' foram utilizados os oligonucleotídeos TmpAGLY-F e loxP-R e para a síntese do *splitmarker* 3' foram usados os oligonucleotídeos hph_SmF' e 0848loxR2'. Obtidos os *splitmarkers*, aproximadamente 400 ng de cada um foram utilizados para a transformação de conídios da linhagem selvagem competente FGSC#9718 (*mus52::bar*).

2.9 Transformação de *N. crassa* por eletroporação

A transformação da linhagem competente FGSC#9718 (*mus52::bar*) foi realizada por eletroporação. Uma suspensão concentrada (50µL) de conídeos competentes foi eletroporada com aproximadamente 400 µg de cada *splitmarker* em uma cubeta de eletroporação estéril no eletroporador *Gene Pulser II (BioRad)*, nas seguintes condições: 1500 V, 600 Ω, 25 µF. Após a eletroporação, foi adicionado 1 mL de sorbitol 1 M gelado, a suspensão foi misturada a 10 mL da solução *top agar* [1,5% agar, 2 M sorbitol, FGS 2X (solução estoque 10X: 0,5% glicose, 0,5% frutose, 20% sorbose)] e vertida em placas contendo *bottom agar* (VM 1X, 1,5% agar, FGS 1X, 2 M sorbitol) contendo higromicina (200 µg/ml). Após resfriamento, as placas foram incubadas a 30°C até o aparecimento de colônias. A presença de sorbose no meio promove o crescimento colonial. As colônias formadas foram individualmente selecionadas com agulha estéril e colocadas para crescer em VM na presença de higromicina.

A representação esquemática da construção da linhagem produzindo a proteína TMP-1-GFP está representada na figura 2.

Figura 1. Mapa físico do plasmídeo pZErOR-2 GFP loxP-hph-loxP gerado pelo software *SnapGene Viewer v. 5.2.2* (<https://www.snapgene.com/snapgene-viewer/>).

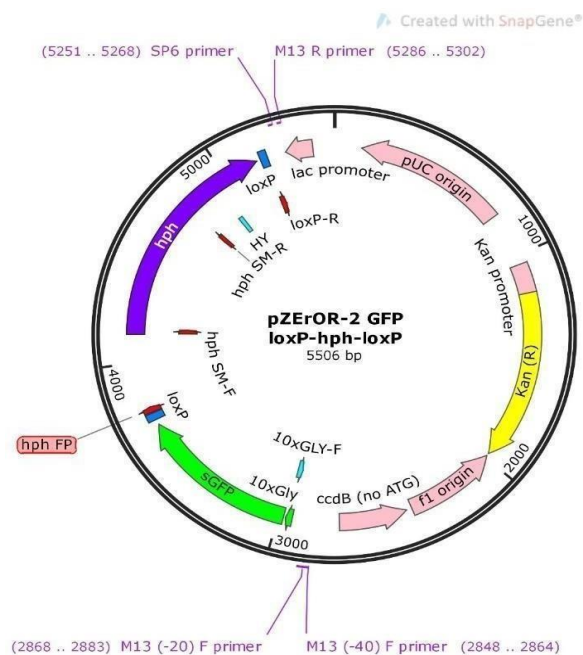


Figura 2. Representação esquemática do processo de construção da linhagem produzindo TMP-1-GFP utilizando *splitmarkers*. Os oligonucleotídeos 0848GLY-R e 0848LOX-F foram desenhados contendo uma sequência adicional de 30 pb nas extremidades 5' para permitir a sobreposição do cassete GFP-*hph*.

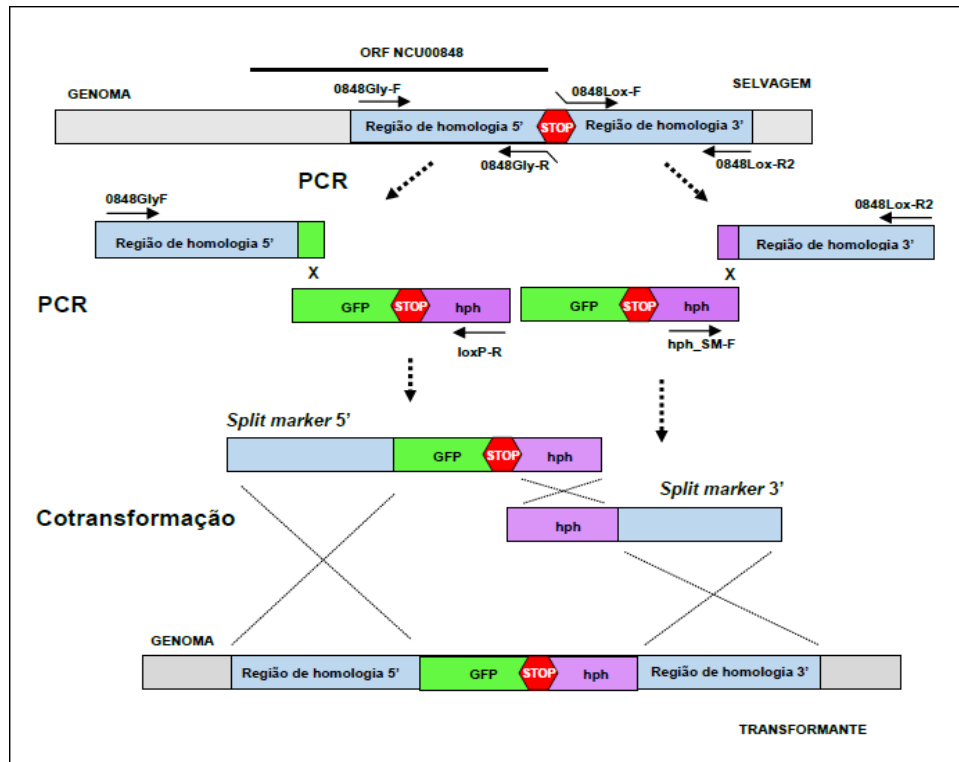


Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para a síntese dos *splitmarkers*. As sequências adicionadas aos oligonucleotídeos 0848GLY-R e 0848LOX-F estão destacadas em negrito.

Oligonucleotídeo	Sequências (5→3')
TmpAGLY-F	TCAACGCCCTCTTCCTCATC
0848GLY-R	CCTCCGCCTCCGCCTCCGCCGCCTCCGCC ACTGTCAAAGATGGGGCCAT
0848LOX-F	TGCTATACGAAGTTATGGATCCGAGCTCGGCTGGCTCTTTC ACTGTCTT
0848LOX-R1	CTCCGAGTCTCGAATGTGCTG
0848LOX-R2	CTCTCCACTACACTACGGTCC
10XGly-F	GGCGGAGGCGGCGGAGGCGGAGGCGGAGG
loxP-R	CGAGCTCGGATCCATAACTTCGTATAGCA
hph_SM-R	TCGCCTCGCTCCAGTCAATGACC
hph_SM-F	AAAAAGCCTGAACTCACCGCGACG

2.10 Confirmação da linhagem *tmp-1-gfp*

Para a confirmação da linhagem produzindo a proteína TMP-1-GFP a linhagem foi rejuvenescida em meio VM sólido contendo higromicina (100 µg/ml). Após crescimento, a linhagem foi inoculada em meio VM líquido e crescida sob agitação durante a noite. Os micélios foram coletados por filtração a vácuo e utilizados para extração de DNA genômico e de proteínas.

2.10.1 Confirmação por PCR

A confirmação da linhagem *tmp-1-gfp* foi feita por PCR utilizando os oligonucleotídeos:

TmpA GLY-F: 5'-TCAACGCCCTCTTCCTCATC-3'

GFP-R: 5'-CTTGTACAGCTCGTCCATGCCG-3'

O produto da amplificação utilizando este par de nucleotídeos apresenta um tamanho de 1.138 pb para as amostras positivas. As condições de amplificação foram: estágio I - desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguida do início do ciclo; estágio II – desnaturação a 94°C por 30 s e anelamento dos oligonucleotídeos a 61°C por 30 s e extensão da fita a ser formada por 2 min a 68°C; estágio III – 72°C por 5 min. A reação foi realizada em 35 ciclos. DNA genômico da linhagem selvagem foi utilizado como controle. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose.

2.10.2 Confirmação pela análise da proteína TMP-1-GFP. Extração de proteínas

Para a extração de proteínas, os micélios foram crescidos em Erlenmeyers de 125 mL, contendo 30 mL de VM líquido, a 30°C, sob agitação durante a noite. Os micélios foram coletados, pulverizados em nitrogênio líquido e adicionados em tubos contendo tampão de extração (50 mM Hepes KOH pH 7,5, 6,5 mM CHAPS, 127 mM NaCl e 5% glicerol) contendo os inibidores de protease: 1 µg/mL antipaína, 1 mM DTT, 1 mM benzamidina, 1 µg/mL pepstatina e 1 mM PMSF, mantendo-os em gelo. Em seguida, os tubos foram homogeneizados em *Vortex* e centrifugados durante 10 min a 13.000 rpm em centrífuga de mesa. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e mantido em gelo. Ao extrato proteico foi adicionado tampão Laemmli (LAEMMLI,

1970) e as amostras foram fervidas em banho-maria por 5 min antes de serem analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida.

2.10.3 SDS-PAGE e Western blot

As proteínas totais obtidas a partir da extração foram inicialmente separadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 10% a 80 V durante empacotamento do gel e a 150 V por mais 40 min. Em seguida, as proteínas foram eletro transferidas para uma membrana de nitrocelulose, a qual foi bloqueada com leite desnatado a 8%. Em seguida, a membrana foi lavada com TBST 1X e incubada com o anticorpo monoclonal anti-GFP (Sigma) na diluição de 1:10.000 em leite desnatado sob lenta agitação durante a noite e sob refrigeração. Após incubação com o anticorpo, a membrana foi lavada com TBST 1X e incubada com o anticorpo secundário anti-IgG mouse 1:10.000 (Invitrogen) a 25°C por 2 h. Após lavagens, a membrana foi revelada pela adição da solução reveladora Clarity™ Western ECL Substrate (Bio Rad) e visualizada *no ChemiDoc™ Touch Imaging System (Bio-Rad)*.

2.11 Análises por microscopia de fluorescência. Ensaio de germinação de conídeos da linhagem *tmp-1-gfp*

Para este ensaio, o procedimento utilizado foi o mesmo relatado no item 2.8. O filtro DAPI foi utilizado para observar os núcleos marcados por *Hoechst* em azul, o filtro FITC para observar a proteína de interesse marcada por GFP em verde e o filtro DIC para observar os conídeos e hifas por contraste de fase. As imagens foram capturadas utilizando a câmera acoplada ao microscópio AxioCam MRm e processadas utilizando o software *AxioVision*, versão 4.8.2. Nos experimentos nos quais a germinação da linhagem $\Delta tmp-1$ foi avaliada, apenas a análise no filtro DIC foi realizada.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Características do gene *tmp-1* e da proteína TMP-1

O gene *tmp-1* (ORF NCU00848) está anotado no banco de dados do fungo *N. crassa* como *integral membrane protein TmpA*, possui 1.737 pb, não apresenta *íntrons* e sua sequência nucleotídica está descrita na Figura 3A. Em *N. crassa* o gene foi denominado como *tmp-1* e a proteína como TMP-1, obedecendo a regra de nomenclatura específica para o fungo. Codifica uma proteína de 578 resíduos de aminoácidos, conforme representado na Figura 2B. Em *A. nidulans*, a proteína TmpA foi descrita como uma proteína transmembrana, a qual contém domínios de ligação aos nucleotídeos FAD e NAD(P) (SOID-RAGGI *et al.*, 2006). A proteína de *N. crassa* também apresenta os domínios de ligação a nucleotídeos e seis domínios transmembrana foram identificados na sequência polipeptídica utilizando o servidor TMHMM 2.0 (Figura 3B).

3.2 Confirmação do nocaute da linhagem mutante $\Delta tmp-1$

A confirmação do nocaute é importante para garantir que a linhagem realmente sofreu a mutação da maneira desejada, ou seja, o gene *tmp-1* foi retirado do organismo estudado, a fim de compreender e caracterizar a proteína TMP-1 em *N. crassa*. Através da amplificação por PCR do DNA genômico extraído do fungo e posterior revelação por eletroforese em gel de agarose, o nocaute foi confirmado pela ausência de banda em 1.700 pb na linhagem mutante ($\Delta tmp-1$), confirmando a ausência deste gene no genoma de *N. crassa*, conforme apresentado na Figura 4.

3.3 Análise macroscópica da linhagem mutante $\Delta tmp-1$

Esta análise foi realizada para verificar se a linhagem apresenta alterações morfológicas no crescimento, tais como extensão das hifas e pigmentação. Pela avaliação macroscópica da linhagem mutante em comparação à linhagem selvagem não observamos diferenças morfológicas entre as linhagens, uma vez que o micélio da linhagem $\Delta tmp-1$ não apresenta fenótipo distinto da linhagem selvagem (Figura 5).

Figura 3. (A) Sequência nucleotídica do *gene tmp-1* de *N. crassa*. O *start codon* ATG está representado em verde e *stop codon* está representado em vermelho. **(B)** Sequência da proteína TMP-1. Em vermelho está representado o domínio de ligação a FAD, em azul o domínio de ligação a NAD(P) e em verde os domínios transmembrana.

(A)

ATG TATGGATCCAGGGACGACGGACTTTTCGATGCTGATATATCATGGTACCATC
 CCGTTCTCCTCTGCCCGTCCCAAGTCCAAGTTGATCTCAATCTCTTCCATCACA
 TATTCCAACGACCAAGTCCGAAACTTCACCCTTCGGAATCTGTAGTCGAAATTAC
 CATCAGACATCCCATCATGGCGGACAAACCACACACATCTCCTGTAGAGGAGAA
 GCCCTCGCCGGCAGGGATCACAGTTACGATTGAGACCACAACCACACCAAACG
 ATCCCAATGGGAAGAAGTTCGGCCATACCAGGCAGAACGACTCCGTCTCATCCA
 CCTTCTCCCAAGCTTCCGCCATCTCCACATCATCGACCAACTCAGAAAAGCCCC
 TCATCGTCAACGAGAAGCGTCTCACTTACCAGTCGACATGTCCGACCATCGTTG
 ACCTTGAGGCCCAGACCCGAGGAGGATGAATACAAGCAGAAGCCCCTGGGCCGT
 ATCCGATACGCGATCCTCACCATCTACCGCCGGCTCTTCACTGTAGCCTTTATG
 GGCAATGCCATTGCTTTTATCATCATGATGATCAAGGGTGCCGCTCCCATGGAC
 CTGGTCAACGCTGCTGCTGTCAATATCGCTGTCTGCGGTCTGTGCCGTCAGCC
 CCTTGTCATCAACGCCCTCTTCCATCTTCGGATCCATCCCCAGATCTGCCCC
 CATTAGGATCCGCCGCTTGGCGTGCAAGATCTTCCATTTTGGCGGGCGTCCACAG
 CGGGACAGGTGTGGCATCGGTCATTTGGTACATTGGCTTCGCCGCCGTCTTCA
 CGTACAACACTACACGCCATCCGTCATCAACACCACCGTCCTGACCTTTGTCTGGC
 TTGTA CTGGGCTTCCTCCTCTCCATCGTCATTGTGCGCTACCCACGTTCCGCA
 TGAGGTTGCACGACTACTTTGAGCTGACCCACCGCTTCGCAAACCTGGATTATCC
 TCGTCCTATTTTGGATCCTGCTCATCTTGTTGGGCAAGCAGGAGGCCAATCTGG
 GTCACCTTTCTCCTTCATCTCCCCGCCTTCTGGATCATCATCGTCCTCACGCTTGC
 CACCATCCACCCGTGGCTGCTGCTCCGCAAGATCCCCGTCAAGCCCGAGCCTC
 TCTCCGCCACGCCATCCGTCTTCACTTCAGCCACACCGAAGTCGTCTTTGGCC
 AGGGCATCTCGGTGCCAAGCACCCCTCTCAAGGACTGGCACAGCTTCGCCTGC
 TTCACGGACAAGTTGACACCCCCGACGCCAAGTTCTCGTGCATTGTCTCCAAG
 GTCGGCGACTGGACCAAGTCCACCATCAACGACCAGCCCACCCACCTCTGGAA
 GCGCGGGCTCCCCACTTACGGCTTCGGCTACGTGCTTCGCATGTTCCCAAGA
 TCATCGTCGTCACCACCGGCTCCGGCATTGGCCCCTGCCTCTCCTTCATCGAG
 GATGCCAACAGGCCCGATATGCGCGTCATCTGGCAGACCAAGTCTCCCCTCAA

GACTTATGGCCAGCGCACCCCTGGACCTCGTTCACAGGATGGATAGCAACCCCG
 TCATTCTTGACACCTCCATCACCGGTCGCGTGGACATGCTGCCTATCGTTCTCC
 GGCTCTTCAAGGAGTTCAACGCCGAGGCAGTGTGCTGCATCAGCAACCCCATG
 ATGACCAAGAAAATCGTGCATGGGTGCGAGATGCGAGGCATTCCGGCCTATGG
 CCCCATCTTTGACAGTTGA

(B)

MYGSRDDGLSMLIYHGTIPFSSAPSQVQVDLNLFHIFQRPSPKLHPSESVVEITIRH
 PIMADKPHTSPVEEKPSAGITVTIETTTTPNDPNGKFGHTRQNDVSSTFSQASAI
 STSSTNSEKPLIVNEKRLTYQSTCPTIVDLEAQTEEDEYKQKPLGRIRYAILTIYRRLF
 TVAFMGNAIAFIIMMIKGAAPMDLVNAAVNVIAVCGLCRQPLVINALFLIFGSIPRSAPI
 RIRRLACKIFHFGGVHSGTGVASVIWYIGFAAVFTYNYTPSVINTTVLTFVWLVLGFL
 SIVIVAYPTFRMRLHDYFELTHRANWIIWLVFWILLILGKQEANLGHFLLHLPWFIII
 VLTLATIHPWLLLKIPVKPEPLSAHAIRLHFSHTEVVFGQGISVAKHPLKDWHSFAC
 FTDKFDTPDAKFSCIVSKVGDWTKSTINDQPHTLWKRGVPTYGFGYVLRMFPKIIVV
 TTGSGIGPCLSFIEDANRPDMRVIWQTKSPLKTYGQRTLVLVHRMDSNPVILDTSIT
 GRVDMLPIVLRFLKFNAAEAVCCISNPMMTKKIVHGCEMRGIPAYGPIFDS

Figura 4. Amostras de DNA das linhagens WT 2489 e $\Delta tmp-1$ submetidas a PCR e analisadas por eletroforese em gel de agarose a 0,8%. L -1kb DNA ladder (*Invitrogen*); 1 - WT 2489 e 2 - $\Delta tmp-1$, evidenciando a ausência da banda de 1.737 pb na linhagem $\Delta tmp-1$, correspondente ao gene *tmp-1*, confirmando o nocaute.

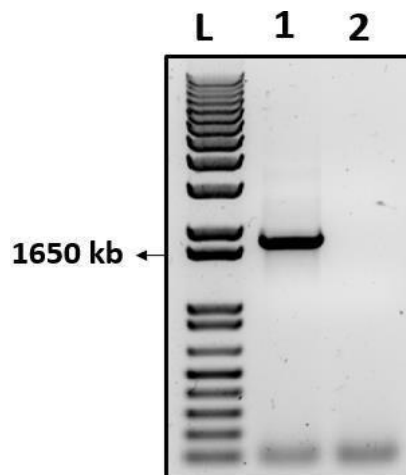
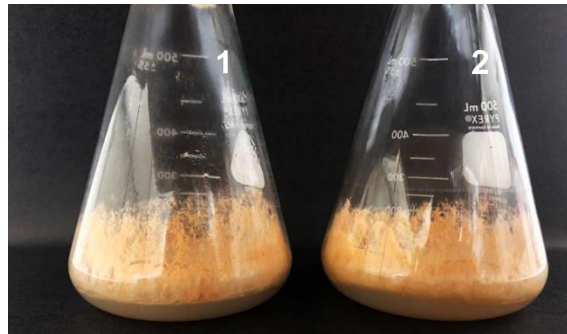


Figura 5. Comparação fenotípica entre as linhagens selvagem (1) e mutante (2) em meio sólido. Ambas foram crescidas em Erlenmeyer contendo 50 mL de meio sólido VM 2% sacarose, por 10 dias, exposta à luz e à temperatura de 30°C.



A linhagem mutante em *tmpA* de *A. nidulans* apresenta um fenótipo descrito como *fluffy*, caracterizada por um aspecto semelhante a algodão (SOID-RAGGI *et al.*, 2006).

3.4 Quantificação de conídeos e microconídeos

Conídeos e microconídeos são estruturas celulares de propagação do fungo e alterações na produção destas estruturas evidenciam alterações no desenvolvimento assexual do fungo. As Tabelas 2 e 3 apresentam as médias com desvio padrão das contagens de conídeos e microconídeos das linhagens selvagem e mutante crescidas em meio VM sólido a 30°C.

Tabela 2. Contagem de conídeos totais das linhagens selvagem e mutante $\Delta tmp-1$.

WT (células/mL)	$\Delta tmp-1$ (células/mL)
$2,37.10^8 \pm 0,63.10^8$	$2,46.10^8 \pm 1,32.10^8$

Tabela 3. Contagem de microconídeos das linhagens selvagem e mutante $\Delta tmp-1$.

WT (células/mL)	$\Delta tmp-1$ (células/mL)
$1,36.10^6 \pm 0,23. 10^6$	$0,80.10^6 \pm 0,52.10^6$

Como pode ser observado, a linhagem mutante não apresenta alterações na produção de conídeos totais, entretanto, apresenta redução na produção de microconídeos. Como ambas as estruturas são produzidas assexuadamente, a reduzida produção pela linhagem mutante mostra que a proteína TMP-1 está

envolvida no desenvolvimento assexual de *N. crassa*, assim como descrito para *A. nidulans* (SOID-RAGGI *et al.*, 2006).

3.5 Análises do crescimento em placa em diferentes condições de cultivo

Com o propósito de avaliar a possível influência da proteína TMP-1 no metabolismo de carboidratos no fungo *N. crassa*, assim como descrito para a proteína de *A. nidulans*, foi realizada a avaliação do crescimento em diferentes fontes de carbono, conforme representado nas Figuras 6, 7, 8 e 9. Em todos os ensaios foram utilizados 10 μ L de inóculo na concentração de 10^7 células/mL, o qual foi colocado no centro das placas de Petri. O meio VM foi utilizado como controle para as avaliações nas diferentes fontes de carbono. Nos meios preparados com o meio *N-free* apenas a fonte de carbono foi alterada e o *N-free* foi considerado como controle.

Figura 6. Análise do crescimento em placa da linhagem selvagem e mutante $\Delta tmp-1$ após 24 h em meios VM, *C-free* e *N-free*.

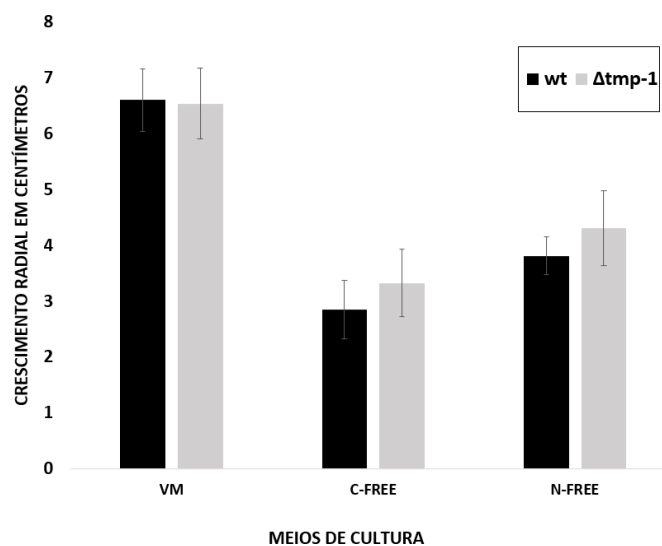


Figura 7. Comparação do crescimento radial em placa das linhagens selvagem e mutante $\Delta tmp-1$ após 24 h em meio VM contendo diferentes fontes de carbono.

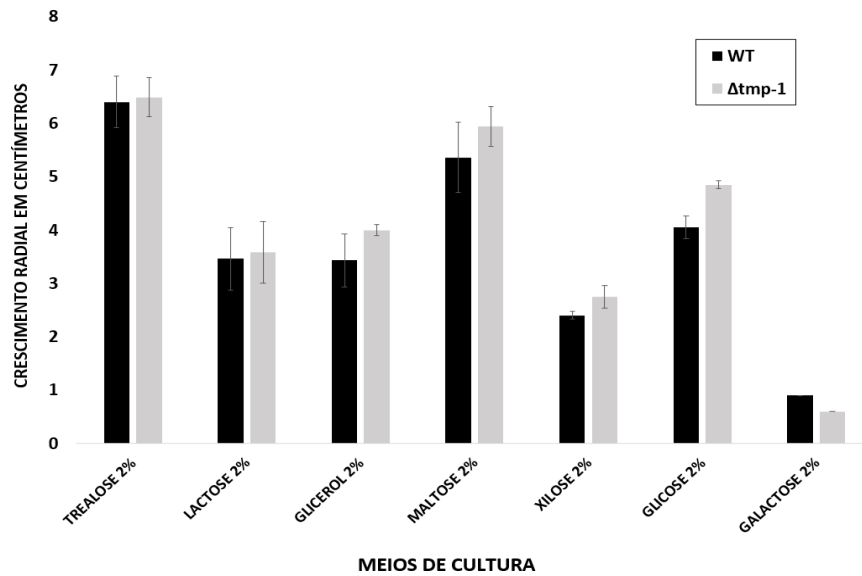
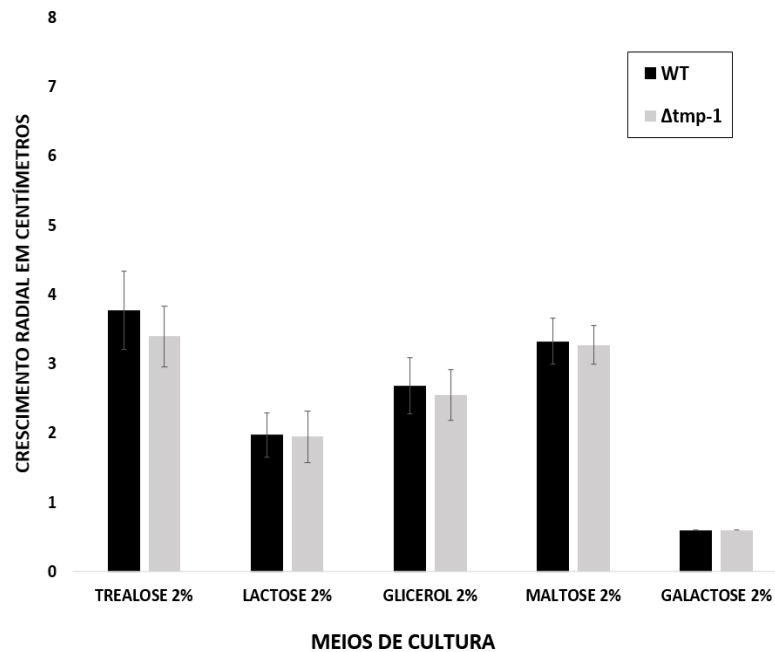


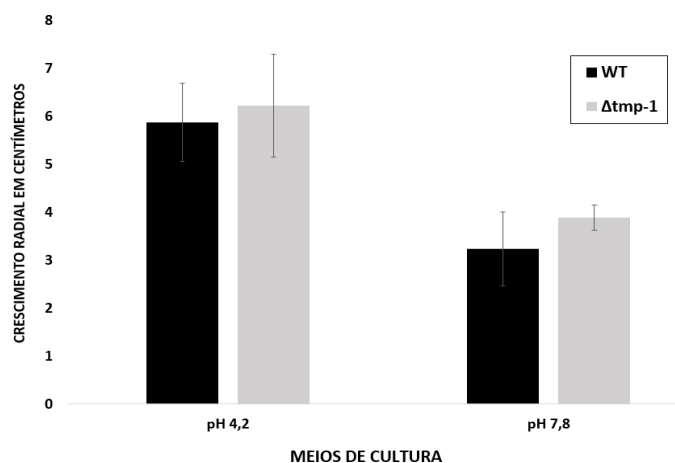
Figura 8. Comparação do crescimento radial em placa das linhagens selvagem e mutante $\Delta tmp-1$ após 24 h em meio *N-free* contendo diferentes fontes de carbono.



Como pode ser observado nas Figuras 6 e 7, a linhagem mutante não apresentou diferenças em relação à linhagem selvagem quanto ao crescimento em todas as fontes de carbono testadas. Para avaliar se a ausência de nitrogênio poderia interferir na utilização de carbono, diferentes açúcares foram testados em meio *N-free*, e mesmo nestas condições não foram observadas alterações no crescimento (Figura 8).

O envolvimento da proteína na resposta a estresse induzido por diferentes agentes indutores de estresse foi avaliado pelo crescimento em meios contendo diferentes agentes indutores de estresse. Inicialmente o estresse de pH, ácido (4,2) e alcalino (7,8), foi avaliado. Como pode ser observado pela Figura 9, a proteína não está envolvida na resposta a este tipo de estresse.

Figura 9. Comparação do crescimento radial em placa das linhagens selvagem e mutante $\Delta tmp-1$ após 24 h em meios VM ácido e alcalino.



Em seguida, outros agentes estressantes foram avaliados. A Figura 10 mostra o crescimento observado na presença de concentrações crescentes de *Congo Red* (CR), um agente que altera a integridade da membrana citoplasmática. Nestas condições, a linhagem mutante mostrou sensibilidade a CR em concentrações acima de 50 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 10). De igual modo, para análise da linhagem mutante sob estresse de parede celular, as linhagens foram cultivadas em SDS, nas concentrações de 0,005%, 0,01% e 0,02%. Os resultados estão presentes na figura 11. Na presença de SDS, outro agente que altera a integridade da membrana citoplasmática, não observamos diferenças entre a linhagem mutante e selvagem (Figura 11).

Figura 10. Crescimento radial das linhagens selvagem e mutante $\Delta tmp-1$, após 24 h na presença de diferentes concentrações de *Congo Red* (CR).

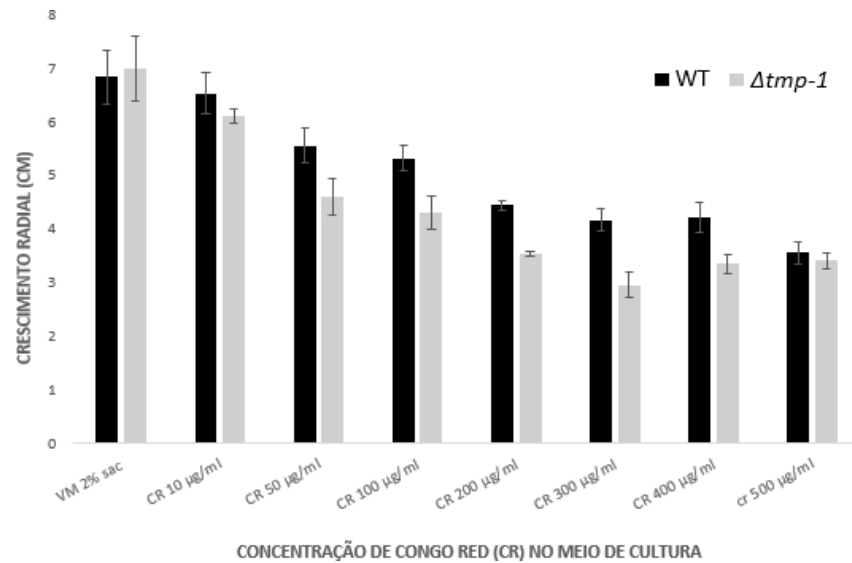
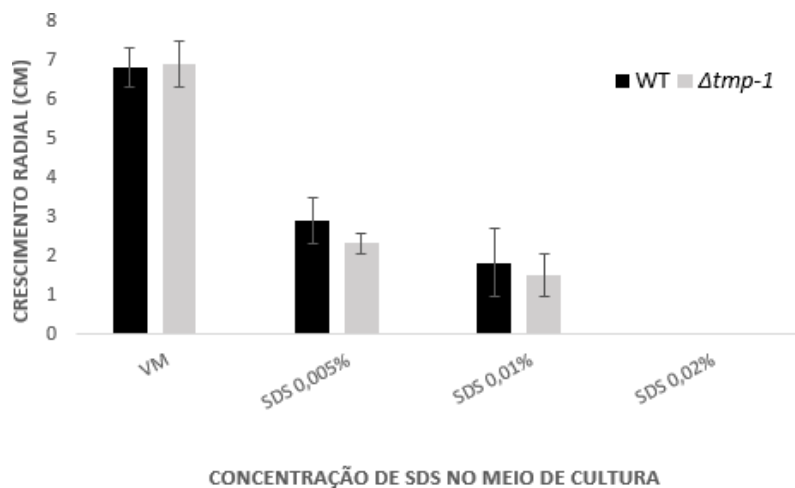


Figura 11. Crescimento radial das linhagens selvagem e mutante $\Delta tmp-1$, após 24 h na presença de diferentes concentrações de SDS.



Para avaliar a influência de estresse osmótico na linhagem $\Delta tmp-1$, as linhagens selvagem e mutante foram cultivadas em meio VM contendo sorbitol e NaCl. Os resultados estão mostrados na Figura 12. O envolvimento da proteína TMP-1 na resposta a estresse oxidativo foi avaliado pelo crescimento das linhagens selvagem e $\Delta tmp-1$ na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 0,5 mM, 1 mM, 2 mM e 5 mM e na presença de menadiona na concentração de 100 μM . O resultado está mostrado na Figura 13.

Figura 12. Crescimento radial das linhagens selvagem e mutante $\Delta tmp-1$, após 24 h na presença de sorbitol (1M) e cloreto de sódio (1M).

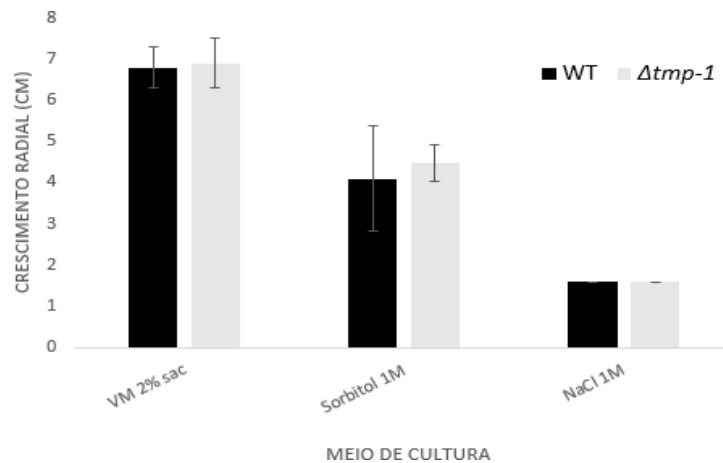
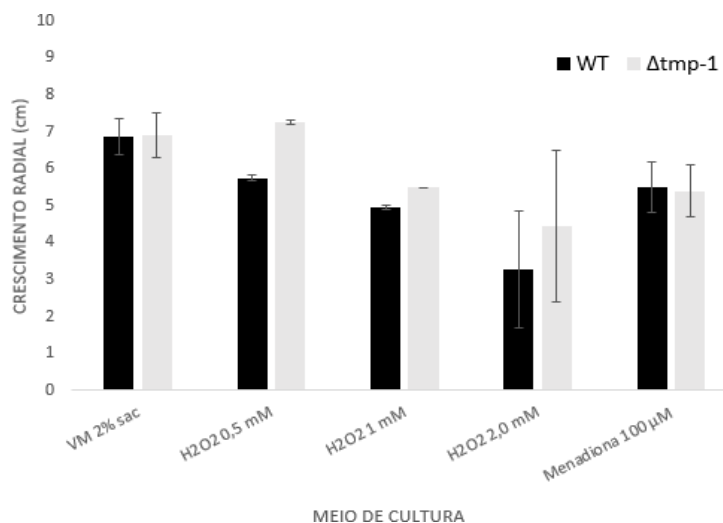


Figura 13. Crescimento radial das linhagens selvagem e mutante $\Delta tmp-1$ após 24h na presença dos agentes H_2O_2 e menadiona.



Com os resultados obtidos foi possível observar que apenas na presença de *Congo Red* houve um crescimento reduzido da linhagem $\Delta tmp-1$ em relação à linhagem selvagem. Esse resultado sugere a possível participação da proteína TMP-1 na resposta ao estresse de parede celular. Para as demais condições de estresse não foram observadas diferenças significativas entre as duas linhagens, portanto o não envolvimento da proteína na resposta aos agentes estressantes avaliados. A

proteína TmpA de *A. nidulans* foi demonstrada ter localização na membrana plasmática (SOID-RAGGI *et al.*, 2006), portanto o provável envolvimento da proteína TMP-1 de *N. crassa* na resposta ao estresse de parede celular pode ter alguma conexão. Portanto, decidimos analisar a localização celular da proteína de *N. crassa*.

3.6 Construção da linhagem produzindo TMP-1-GFP

Para a realização de futuros experimentos de estudo de localização da proteína TMP-1 em *N. crassa* por microscopia de fluorescência, foi necessária a construção da linhagem TMP-1-GFP pela inserção de um *tag* de GFP na região C-terminal da proteína TMP-1, conforme descrito em Materiais e Métodos. O esquema do procedimento utilizado está representado na Figura 2. O primeiro passo foi amplificar um fragmento de DNA genômico correspondente à região *upstream* ao stop códon (região de homologia 5') com 1.108 pb de tamanho e um fragmento correspondente a região *downstream* ao stop códon (região de homologia 3') com 1.184 pb de tamanho (Figura 14). Para a amplificação da região de homologia 5' foram utilizados os oligonucleotídeos TmpAGLY-F e 0848GLY-R e para a amplificação da região de homologia 3' os oligonucleotídeos Lox F' e Lox R2'. Vale ressaltar que foram acrescentadas sequências nucleotídicas na extremidade 5' do oligonucleotídeos 0848GLY-R e 0848LOX-F para a construção de *splitmarkers* por PCR de fusão, pois essas sequências nucleotídicas adicionais são complementares a cada uma das extremidades do cassete de GFP-*hph*. As bases adicionadas ao oligonucleotídeo 0848GLY-R se sobrepõem ao *stop códon* do gene e são complementares à região codificadora do *linker* codificador de Gly entre a proteína e a sequência codificadora de GFP. Já a sequência acrescentada ao oligonucleotídeo 0848LOX-F é complementar a uma região do gene *hph* presente no cassete GFP-*hph*. Esta abordagem permitiu que as regiões acrescentadas nos oligonucleotídeos fossem capazes de se sobreporem em uma reação de PCR de fusão, gerando os *splitmarkers* 5' e 3', os quais foram utilizados para a transformação de conídios do fungo *N. crassa*.

O cassete de DNA que contém a sequência que codifica a proteína GFP e a sequência do gene *hph* foi amplificada utilizando os oligonucleotídeos 10XGLY-F e LOXP-R a partir do plasmídeo pZErOR-2 GFP loxP-*hph*-loxP como molde (Figura 15).

Figura 14. Fragmentos de DNA correspondentes às regiões de homologia 5' e 3' amplificadas por PCR. **A** - Região de homologia 5' (1) com tamanho de 1.108 pb. **B** - Regiões de homologia 3' amplificadas utilizando os oligonucleotídeos Lox F' e Lox R1' (3) com tamanho de 1.281 pb e os oligonucleotídeos Lox F' e Lox R2' (4) com tamanho de 1.184 pb. Eletroforese em gel de agarose 0,85%. L - 1 kb DNA ladder (*Invitrogen*).

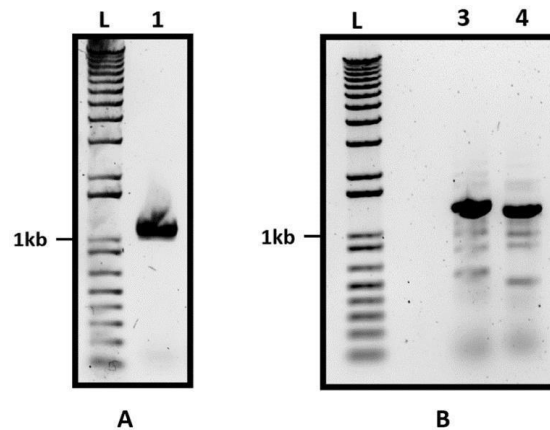
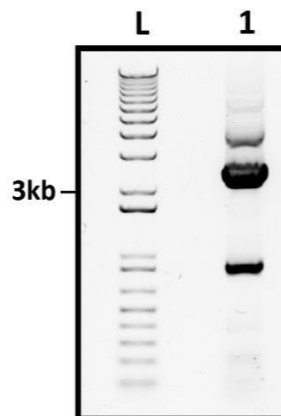
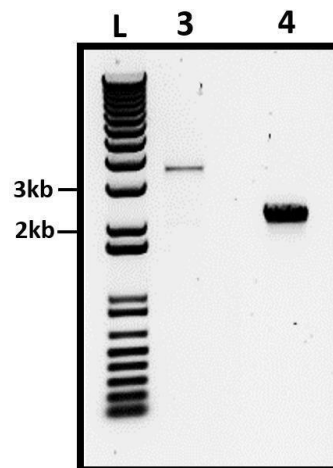


Figura 15. Fragmento de DNA correspondente à sequência da proteína GFP amplificado por PCR 1 - Fragmento de DNA com tamanho de 3000 pb L – 1 kb DNA ladder (*Invitrogen*). Eletroforese em gel de agarose 0,8%.



Tanto o cassete GFP como as regiões de homologia 5' e 3' foram excisadas do gel de agarose, purificadas, quantificadas pelo espectrofotômetro para serem utilizadas na síntese dos *splitmarkers* 5' e 3' por PCR de fusão. Para a síntese do *splitmarker* 5' com 3.360 pb de tamanho foram utilizados os oligonucleotídeos TmpAGLY-F e loxP-R, a região de homologia 5' e o cassete GFP. O *splitmarker* 3' foi amplificado com tamanho de 2.271 pb utilizando o cassete GFP, região de homologia 3' e os oligonucleotídeos

Figura 16. Obtenção dos *splitmarkers* após PCR de fusão **3** - *Splitmarker 5'* com 3.360 pb de tamanho. **4** - *Splitmarker 3'* com 2.271 pb. Ambos os fragmentos foram sintetizados por PCR de fusão e submetidos à análise por eletroforese em gel de agarose 0,8%. **L** - 1 kb DNA ladder (*Invitrogen*).



hph_SmF' e 0848loxR2'. A Figura 16 mostra os fragmentos correspondentes aos *splitmarkers* 5' e 3'. Os fragmentos de interesse foram excisados do gel de agarose, purificados e quantificados para serem utilizados na transformação de conídeos competentes da linhagem selvagem FGSC#9718 (*mus52::bar*).

3.6.1 Confirmação da linhagem produzindo a proteína TMP-1 fusionada a GFP (*tmp-1-gfp*)

O procedimento utilizado permite a inserção do fragmento de DNA *tmp-1-gfp* no locus *tmp-1*, portanto a proteína será produzida fusionada a GFP sob controle do promotor *tmp-1*. Para a confirmação da linhagem expressando a proteína fluorescente, a linhagem transformada foi crescida em meio VM contendo higromicina, pois após transformação a linhagem adquire resistência ao antibiótico higromicina. Dois procedimentos foram utilizados para a confirmação da linhagem: PCR e *Westernblot*.

Após a extração de DNA genômico, a sequência de interesse foi amplificada por PCR utilizando um par de oligonucleotídeos que anela na região de homologia 5' do gene *tmp-1* e na sequência da GFP, gerando um fragmento de DNA de 1.138 pb (Figura 17). Na figura, é possível observar a presença do fragmento mencionado nas

amostras correspondentes a dois transformantes (canaletas 2 e 3) e ausência do fragmento na amostra de DNA da linhagem selvagem (canaleta 1).

Após confirmação por PCR, os mesmos transformantes foram também analisados através da produção da proteína TMP-1-GFP. As proteínas totais dos dois transformantes foram extraídas e analisadas por *Western blot* utilizando anticorpo anti-GFP. O resultado está mostrado na Figura 18. Como pode ser observado, um controle positivo, extrato proteico de uma linhagem do laboratório expressando uma proteína fusionada a GFP foi utilizado, o qual mostra que o produto da hibridização observado corresponde à hibridização com o anticorpo anti-GFP.

A proteína TMP-1 apresenta uma Massa Molecular (MM) teórica de 61,4 kDa e quando fusionada a GFP sua MM passa para 91,4 kDa. É possível observar que nas amostras analisadas a banda de hibridização está acima deste valor, o que pode ser explicado pela migração alterada das amostras proteicas, neste experimento. É possível observar que a análise não mostra bandas de hibridização definidas, como seria esperado em uma análise bem controlada. Nossa interpretação é que os defeitos na separação das proteínas seja consequência de alterações introduzidas no protocolo de extração proteica realizado que permitissem uma boa solubilização das proteínas. Como a proteína TMP-1 é muito provavelmente uma proteína de membrana, nossa interpretação é que a adição de um detergente (CHAPS) ao tampão de extração proteica para facilitar a solubilização da proteína possa ter levado a alterações no padrão de migração proteica.

Figura 17. Amostras de DNA das linhagens WT 2489 (selvagem) e *tmp-1-gfp* amplificadas por PCR. 1 – DNA genômico da linhagem WT 2489, utilizado como controle; 2 e 3 - DNA genômico da linhagem *tmp-1-gfp* mostrando a presença da banda de 1.138 pb. Eletroforese em gel de agarose a 0,8%. L -1 kb DNA ladder (*Invitrogen*).

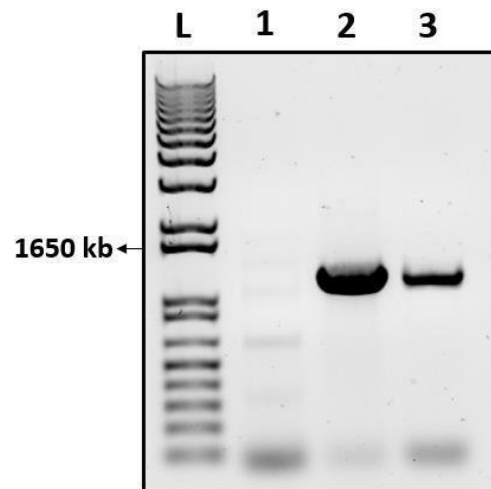
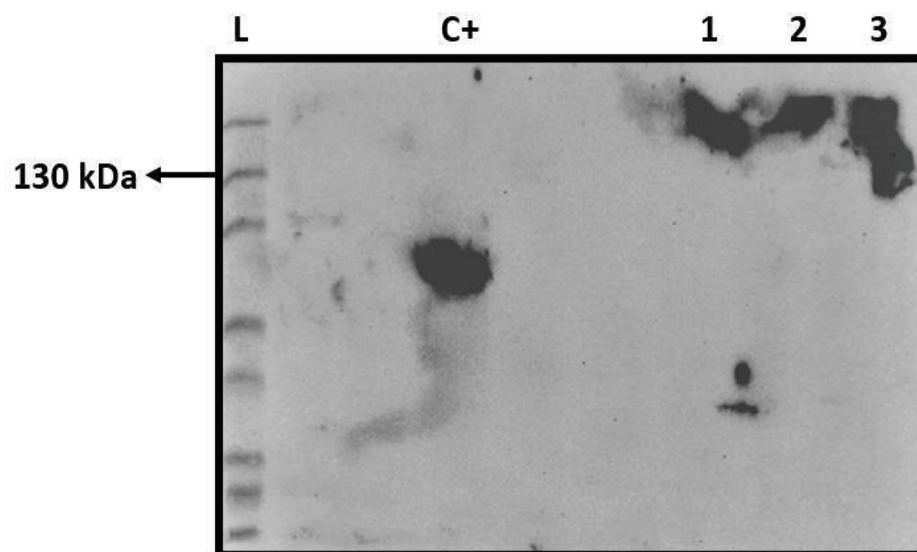


Figura 18. *Western blot* da proteína TMP-1-GFP. Proteínas totais foram fracionadas por eletroforese SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose. Após bloqueio com leite, a membrana foi incubada com o anticorpo anti-GFP (*Sigma*). L - *Prestained Protein Ladder* (*Thermo Scientific*). Amostras: C+ - controle positivo (proteína RVB-1-GFP); 1, 2 e 3 - amostras de proteínas da linhagem produzindo TMP-1-GFP.



Várias tentativas foram realizadas com o objetivo de um bom resultado, tais como: diferentes métodos de extração das proteínas, quantidade de extrato proteico, porcentagem do gel de SDS-PAGE, tempo de transferência do gel para a membrana de nitrocelulose, tempo de solução de bloqueio em contato com a membrana, quantidade de anticorpos primário e secundário e tempo de hibridização. Entretanto, não foi possível obter um *Western* com boa resolução. Decidimos dar continuidade à análise de localização celular da proteína com a linhagem transformada.

3.7 Análises da linhagem *tmp-1-gfp* por microscopia de fluorescência

Com a confirmação da linhagem *tmp-1-gfp*, foi possível realizar o ensaio de germinação utilizando microscopia de fluorescência para analisar a localização da proteína. A proteína TmpA de *Aspergillus* foi mostrada ser localizada na membrana plasmática (SOID-RAGGI *et al.*, 2006) e a análise da proteína TMP-1 mostrou a presença de seis domínios transmembrana, o que sugere fortemente que a localização celular desta proteína seja na membrana.

Antes de iniciarmos as análises da germinação por microscopia de fluorescência, a germinação das linhagens WT e $\Delta tmp-1$ foi analisada por microscopia óptica nos tempos de 2, 4, 6 e 8 h para verificar se a linhagem *tmp-1-gfp* apresentava algum defeito na germinação. Foi possível observar que no tempo de 2 h os conídeos de ambas as linhagens germinaram de forma similar, apresentando mesma morfologia. Nos tempos tardios, o processo germinativo da linhagem $\Delta tmp-1$ evoluiu de maneira semelhante ao da linhagem selvagem (resultados não mostrados), portanto, as análises de microscopia de fluorescência foram iniciadas.

Por meio deste experimento (Figura 19), foi possível observar a presença da proteína TMP-1 tanto em conídeos (Figura 19, 2 h) como em hifas (Figura 19, 4, 6 e 8 h de germinação) e a não localização no núcleo celular. Além disso, a proteína parece estar localizada na membrana, visto que é possível observar na figura a localização da proteína na periferia da célula, principalmente no tempo de 2 h de germinação. Quando se observa tempos tardios na germinação, como 6 e 8 h, a imagem amplificada de algumas partes da hifa mostra a presença da proteína de maneira pontual ao longo da hifa, entretanto, sem uma definição clara de sua exata localização celular.

Os resultados obtidos, até o momento, são interessantes, pois mostra que em *N. crassa*, esta proteína parece ser mais amplamente distribuída na célula, entretanto análises de microscopia mais detalhadas, tal como microscopia confocal, são requeridas para um resultado mais conclusivo.

3.8 Efeito do estresse na produção de conídeos

Considerando que os experimentos anteriores com a linhagem $\Delta tmp-1$ mostraram uma redução na produção de microconídeos e que a linhagem mutante mostrou um crescimento reduzido quando cultivada na presença de *Congo Red* decidimos investigar se ambos os fenótipos poderiam estar conectados. Neste experimento, a contagem de microconídeos foi realizada após crescimento na presença de CR na concentração de 400 $\mu\text{g/ml}$. Além disso, a contagem de microconídeos também foi realizada sob estresse de carbono, uma condição que afeta o crescimento da linhagem mutante de *A. nidulans*, mas que mostrou não afetar o crescimento da linhagem mutante de *N. crassa*.

Inicialmente analisamos se as condições afetam o crescimento das linhagens mutante e selvagem. A Figura 20 mostra que o crescimento da linhagem mutante não foi afetado na presença de CR, mas foi fortemente afetado em meio sem carbono. O crescimento de ambas as linhagens foi muito afetado em meio sem fonte de carbono, como esperado, entretanto, o crescimento da linhagem mutante foi muito reduzido comparado ao da linhagem selvagem.

Figura 19. Microscopia de fluorescência dos conídios durante a germinação da linhagem *tmp-1-gfp* nos tempos de leitura 2, 4, 6 e 8h. A direita da figura algumas imagens foram amplificadas e são mostradas. A fluorescência foi analisada utilizando o microscópio *Axio Imager A2 (Zeiss)*, com magnificação de 63 X.

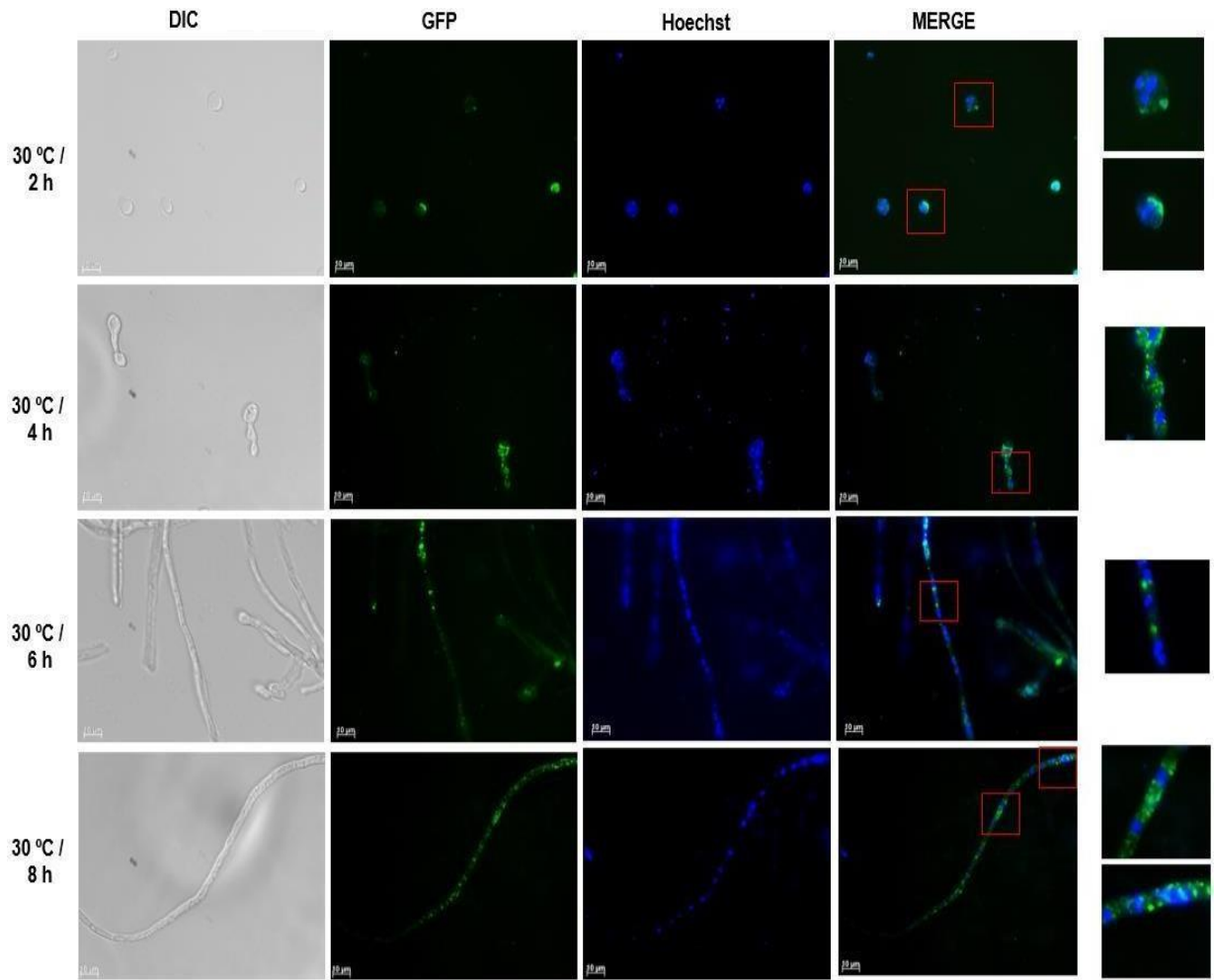
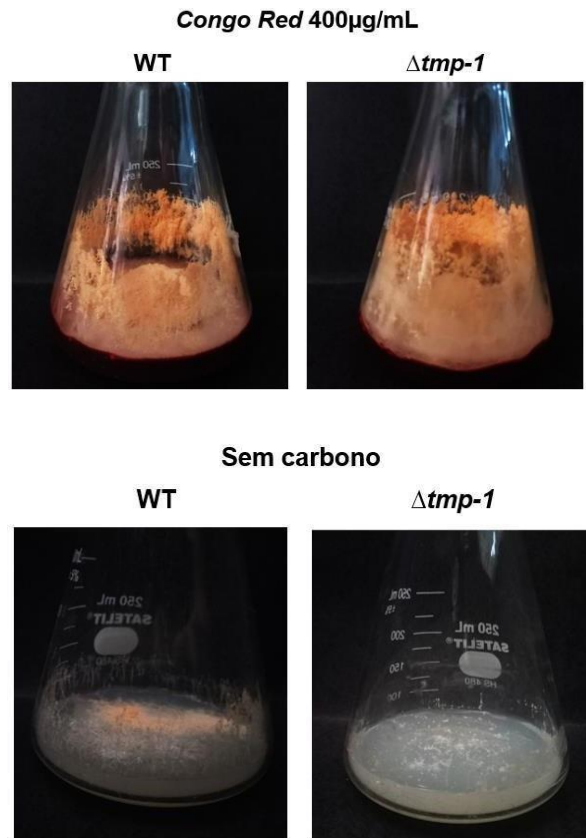


Figura 20. Avaliação macroscópica das linhagens WT 2489 e $\Delta tmp-1$ em meios VM contendo *Congo Red* e meio VM sem carbono.



As Tabelas 1 e 2 apresentam os valores das contagens de conídeos totais e microconídeos das linhagens *WT* e $\Delta tmp-1$ crescidas nas duas condições. Em relação ao meio contendo CR, não se observou diferença na contagem de conídeos totais entre as linhagens, entretanto a linhagem mutante produz uma quantidade de microconídeos reduzida quando comparada à linhagem selvagem. Por outro lado, o crescimento em meio sem carbono afetou largamente a produção de conídeos totais pela linhagem mutante, mostrando uma produção muito reduzida quando comparada à linhagem selvagem. Esta redução na quantidade de conídeos totais impossibilitou a contagem de microconídeos na linhagem mutante em meio sem carbono, portanto não foi possível realizar a contagem.

Estes resultados fortemente indicam que a proteína TMP-1 de *N. crassa* é uma proteína envolvida na regulação do desenvolvimento celular, regulando também o desenvolvimento em determinadas condições de estresse.

Tabela 4. Contagem de conídeos totais das linhagens selvagem (WT) e mutante ($\Delta tmp-1$) em diferentes condições.

	WT (células/mL)	$\Delta tmp-1$ (células/mL)
Congo Red 400 $\mu\text{g/mL}$	$6,75 \cdot 10^7 \pm 1,4 \cdot 10^7$	$6,80 \cdot 10^7 \pm 1,4 \cdot 10^7$
Meio sem carbono	$2,56 \cdot 10^7 \pm 1,4 \cdot 10^7$	$0,60 \cdot 10^7 \pm 1,4 \cdot 10^7$

Tabela 5. Contagem de microconídeos das linhagens selvagem (WT) e mutante ($\Delta tmp-1$) na presença de *Congo Red*.

	WT (células/mL)	$\Delta tmp-1$ (células/mL)
Congo Red 400 $\mu\text{g/mL}$	$3,9 \cdot 10^5 \pm 1,4 \cdot 10^7$	$2,3 \cdot 10^5 \pm 0,7 \cdot 10^7$

4. CONCLUSÕES

A proteína TMP-1, objeto de estudo deste trabalho, é codificada pela ORF NCU00848 e descrita como sendo uma proteína de membrana integral, ortóloga à proteína TmpA em *Aspergillus nidulans*, a qual foi descrita estar envolvida no desenvolvimento assexual. Os experimentos realizados objetivaram caracterizar funcionalmente a proteína de *N. crassa*, bem como analisar sua localização. Com os resultados obtidos, pode-se concluir que o gene *tmp-1* não esteja diretamente envolvido na produção de conídeos totais, diferentemente de *A. nidulans*, mas tem influência na produção de microconídeos, portanto exerce um papel regulatório no desenvolvimento assexual de *Neurospora crassa*. Pela avaliação macroscópica dos micélios, não foram observadas diferenças fenotípicas.

No que se refere aos experimentos em placa, cujo objetivo foi avaliar se a proteína TMP-1 estava relacionada com resposta a metabolização de carboidrato e/ou nitrogênio e a agentes estressantes, observamos que apenas na presença de *Congo Red* houve redução no crescimento em placa e na produção de microconídeos em relação à linhagem selvagem, sugerindo envolvimento da proteína na resposta a estresse de parede celular. Além disso, em meio sem carbono a produção de conídeos totais foi drasticamente reduzida na linhagem mutante, confirmando o seu papel regulatório no desenvolvimento assexual, tanto em condições normais de crescimento como sob estresse.

Em relação aos ensaios de localização celular, a microscopia de fluorescência permitiu verificar que a proteína se localiza na membrana da célula, como esperado pela existência dos domínios transmembrana existentes na sequência primária, mas também mostrou estar localizada em outros compartimentos celulares.

Novos estudos se fazem necessários para melhor entendimento acerca de quais condições influenciam a função da proteína, bem como em quais vias regulatórias a proteína pode estar envolvida.

5 REFERÊNCIAS

BONI, A. C., *et al.* *Neurospora crassa* developmental control mediated by the FLB-3 transcription factor. **Fungal Biol.** v. 122, n. 6, p. 570-582, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.01.004>.

COLOT, H. V., *et al.* A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 27, p. 10352–7, 2006. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601456103>.

CUPERTINO, F. B., *et al.* Regulation of glycogen metabolism by the CRE-1, RCO-1 and RCM-1 proteins in *Neurospora crassa*. The role of CRE-1 as the central transcriptional regulator. **Fungal Genet. Biol.** v. 77, p. 82-94, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.03.011>.

GALAGAN, J., *et al.* The genome sequence of the 516 filamentous fungus *Neurospora crassa*. **Nature**, v. 422, p. 859–868, 2003. <https://doi.org/10.1038/nature01554>.

GONÇALVES, R.D., *et al.* A genome-wide screen for *Neurospora crassa* transcription factors regulating glycogen metabolism. **Mol. Cell. Proteomics** v. 10, n. 11, p. 13, 2011. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.007963-2>.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–5, 1970. <https://doi.org/10.1038/227680a0>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/227680a0#citeas> Acesso em: 01/04/2022.

MONTAGNE, C. Quatrieme centurie de plantes cellulaires exotiques nouvelles. **Ann. Sci. Nat. Bot.**, v. 20, n. 2, p. 352-379, 1843.

NINOMIYA, Y. *et al.* Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 33, p. 12248–53, 2004. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402780101>.

PERKINS, D. D., *et al.* *Neurospora* at the millennium. **Fungal Genet. Biol.**, v. 31, n. 3, p. 153-167, 2000.

SAMBROOK, J., *et al.* **Molecular Cloning**. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001.

SOID-RAGGI, G., *et al.* TmpA, a member of a novel family of putative membrane flavoproteins, regulates asexual development in *Aspergillus nidulans*. **Mol. Microbiol.** v. 59, p. 854–869, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04996.x>.

SCHULTE, U., *et al.* Large scale analysis of sequences from *Neurospora crassa*. **J. Biotechnol.**, v. 94, p. 3-13, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00415-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00415-1).

VIRGILIO, S., *et al.* Regulation of the reserve carbohydrate metabolism by alkaline pH and calcium in *Neurospora crassa* reveals a possible cross-regulation of both signaling pathways. **BMC Genomics** 18, n. 457, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3832-1>.

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

WANG T. Y., *et al.* A predicted protein-protein interaction network of the 632 filamentous fungus *Neurospora crassa*. **Mol Biosyst**, v.7, p. 2278–2285, 2011. <https://doi.org/10.1039/C1MB05028A>.