

WAGNER LUIZ BATISTA

**Dupla localização da proteína de choque térmico Mdj1
em *Paracoccidioides brasiliensis*, identificação de
elementos de transcrição na região 5' intergênica
compartilhada pelos genes *MDJ1/LON* e avaliação da sua
expressão gênica**

**Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina, para obtenção do Título de
Doutor em Ciências.**

**São Paulo
2006**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

WAGNER LUIZ BATISTA

Dupla localização da proteína de choque térmico Mdj1 em *Paracoccidioides brasiliensis*, identificação de elementos de transcrição na região 5' intergênica compartilhada pelos genes *MDJ1/LON* e avaliação da sua expressão gênica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosana Puccia

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

**São Paulo
2006**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA
DISCIPLINA DE BIOLOGIA CELULAR

Chefe de Departamento:

Prof. Dr. Sérgio Schenkman

Coordenador do Curso de Pós-Graduação:

Prof. Dr. José Daniel Lopes

Ficha Catalográfica

Batista, Wagner Luiz

Dupla localização da proteína de choque térmico Mdj1 em *Paracoccidioides brasiliensis*, identificação de elementos de transcrição na região 5' intergênica compartilhada pelos genes *MDJ1/LON* e avaliação da expressão gênica./ Wagner Luiz Batista – São Paulo, 2006.

xvi, 180f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Microbiologia e Imunologia.

Título em inglês; Dual localization of the heat shock protein Mdj1 in *Paracoccidioides brasiliensis*, identification of transcriptional elements in the 5' region shared by the genes *MDJ1/LON* and expression evaluation.

1. *MDJ1* homologa 2. *Paracoccidioides brasiliensis* 3. *PbMDJ1/PbLON*. 4. regulação da expressão. 5. elementos de transcrição HSE e AP-1

***Ao Deus criador da vida, das alegrias, da luta, da
finalização e do prazer da realização. Por estar
sempre ao meu lado a cada passo desta jornada.***

*A minha querida esposa **Patricia**, a quem devo grandes momentos de felicidade. Amiga e companheira de todas as horas, repartiu comigo as alegrias e deu-me a força necessária nas horas difíceis.*

*Aos meus amados pais **João e Maria de Lourdes**, que com humildade e dignidade, me ensinaram o significado do respeito e amor ao próximo, fazendo que muitos sonhos se realizassem.*

*A toda a minha família, em especial aos meus irmãos **Marcelo e Everton**, as minhas cunhadas **Micheli e Andréia** e aos meus queridos **avós**, por constituírem minha base, meu farol e meu porto seguro.*

AGRADECIMENTOS

Registro meu agradecimento especial a minha orientadora Profa. Dra. **Rosana Puccia** (Chefe), pela amizade, confiança e sensibilidade que me acolheu e acompanhou durante todo o período de orientação. Minha admiração e reconhecimento.

A Profa. Dra. **Tânia F. Barros**, que foi quem me “adotou” no laboratório, quero guardar para sempre o carinho com que me ajudou no início de minha caminhada na pós-graduação.

A Profa. Dra. **Terezinha Inez Estivalet Svidzinski**, grande amiga, que com seu entusiasmo despertou em mim o espírito científico e o gosto pela pesquisa, muito obrigado.

Ao Prof. Dr. **Luiz R. Travassos**, ilustre cientista, por seu exemplo de dedicação à ciência e pelas prestimosas sugestões dadas ao trabalho.

A todos os professores do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (UNIFESP), pelo muito que contribuíram à minha formação.

Aos meus amigos de laboratório:

Kátia pela amizade especial, carinho, disponibilidade em ajudar e bom humor em todos os momentos, inclusive nos mais difíceis.

Alisson, amigo fiel e sincero, obrigado pelo apoio e por suas palavras assertivas e bem humoradas.

Antonio, companheiro nos experimentos mais difíceis, agradeço pela grande amizade e convivência alegre (principalmente durante os jogos do Fluminense).

Luiz (Luizão), pela amizade, companherismo e pelo apoio constante.

Luciane (Lú), pela amizade, atenção e por sua ajuda incondicional em todos os momentos.

Milene, pela amizade, compreensão e atenção.

Lívia, caçula da turma, gostaria de agradecer pela paciência que teve nestes últimos dias da finalização da tese, pela alegre convivência e pela nova amizade.

Thiago, pelas palavras de incentivo e por sempre apresentar uma perspectiva otimista de tudo.

Flávia por sua ajuda inestimável na solução das dificuldades metodológicas.

As secretárias Márcia (Biologia Celular) e Mércia (Pós-graduação) pela amizade, pelo apoio e por me darem suporte para a conclusão deste trabalho, muito obrigado.

Aos amigos Rodrigo, Andrey, Thaysa, Flávia Hebler, Alexandre pelo apoio, estímulo, compreensão e, sobretudo pela amizade consolidada nestes anos.

A todos os colegas da Disciplina de Biologia celular (UNIFESP) em especial a Geisa, Cristiane, Isabel, Rafael, Ellen, Bianca e Marcelo pelo agradável convívio e disposição para me ajudar nos momentos de necessidade.

Ao prof. Dr. Gustavo H Goldman (USP - Ribeirão Preto) pela ajuda com os ensaios de RT-PCR quantitativo (real time) e pela colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Bosco Pesqueiro pelo uso do aparelho de RT-PCR quantitativo. E ao Marcelo (Biofísica), Marcos (Nefro), a Marcela Savoldi e Everaldo Marques (USP - Ribeirão Preto) pela ajuda com os experimentos de RT-PCR quantitativo (real time).

A Profa. Dra. Edna Freymüller (CEME), a Profa. Dra. Soraia S. Smali (INFAR) e aos técnicos Márcia, André, Carol e Beth pela valorosa ajuda com os experimentos de microscopia.

Ao Ronni R. Novaes Brito pela inestimável ajuda com os ensaios de FACS.

A todos os funcionários da Disciplina de Biologia Celular, em especial a Maria, Américo, Antonio e Sebastiana, pelo suporte e auxílio constante.

À **FAPESP** – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – ao **CNPq** que financiaram este trabalho

ABREVIATURAS

Amp	ampicilina
APS	persulfato de amônio
ATP	adenosina-trifosfato
BSA	soro albumina bovina
bp	pares de base
cDNA	DNA complementar
cpm	contagem por minuto
DAB	diaminobenzidina
D.O.	densidade óptica
dATP	desoxiadenosina-trifosfato
dCTP	desoxicitidina-trifosfato
ddATP	di-desoxiadenina-trifosfato
ddCTP	di-desoxicitidina-trifosfato
ddGTP	di-desoxiguanosina-trifosfato
ddTTP	di-desoxitimidina-trifosfato
dGTP	desoxiguanosina-trifosfato
dTTP	desoxitimidina-trifosfato
DNAse	desoxirribonuclease
dNTP	desoxiribonucleotídeo-trifosfato
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
GFP	"Green fluorescence protein"
h	hora
IPTG	isopropil-tiol-galactopironosídeo
<i>LacZ</i>	β -galactosidase
min	minuto
mM	milimolar
MOPS	ácido 3-N-Morpholino propanesulfônico
mRNA	RNA mensageiro
nt	nucleotídeo
ORF	fase aberta de leitura
PBS	Tampão salino fosfato
PCM	paracoccidiodomicose
PCR	reação da polimerização em cadeia

PMSF	fluoreto de fenilmetanosulfonato
RNA	ácido ribonucleico
RNase	ribonuclease
rpm	rotação por minuto
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS
sec	segundos
SSC	Tampão salina citrato de sódio
SSPE	Tampão salina fosfato de sódio-EDTA
TBE	tampão tris-borato-EDTA
TE	tampão tris-EDTA
TEMED	<i>N,N,N,N'</i> - tetrametilenodiamina
Tris	tris-hidroximetil-aminometano
U	unidade enzimática
UTR	região não-traduzida
UV	ultravioleta
V	Volts
v/v	volume a volume
W	watts
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo

ÍNDICE

Dedicatória	5
Agradecimentos	6
Abreviaturas	9
Lista de Figuras	14
Resumo	16
1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Paracoccidioides brasiliensis e paracoccidioidomicose	19
1.1.1. Aspectos gerais	19
1.1.2. Infecção e relação parasito-hospedeiro	20
1.1.3. Variabilidade do <i>P. brasiliensis</i>	24
1.1.4. Dimorfismo	26
1.2. Proteínas de choque térmico Mdj1 e Lon	30
1.2.1. Proteínas de choque térmico (Hsps)	30
1.2.2. Mdj1 e a família DnaJ das Hsp40	31
1.2.3. Proteinase Lon	33
2. OBJETIVOS	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1. Soluções tampões	39
3.2. Meios de cultura e crescimento de microorganismos	40
3.3. Microorganismos	41
3.4. Isolados de <i>P. brasiliensis</i>	41
3.5. Extração de DNA	41
3.6. Extração de RNA	42
3.7. Oligonucleotídeos iniciadores	43
3.7.1. utilizados nas reações de PCR, sequenciamento de DNA, 3’ e 5’ RACE, RT-PCR	43
3.7.2. utilizados nas reações de RT-PCR em tempo real	44
3.7.3. utilizados em EMSA	45
3.8. Clonagem e transformação	45
3.9. Mini-preparação plasmidial por fervura	46

3.10. Mini-preparação plasmidial por lise alcalina	46
3.11. Digestão de DNA com enzimas de restrição	46
3.12. Sequenciamento manual de DNA	47
3.13. Sequenciamento automático	48
3.14. Tratamento do RNA com DNase I	48
3.15. 3' RACE e RT-PCR	48
3.16. "Southern blot"	49
3.17. "Northern Blot"	50
3.18. Subclonagem do cDNA (parcial) de <i>PbMDJ1</i> em vetor de expressão	50
3.19. Expressão e purificação de <i>PbMdj1</i> recombinante	51
3.20. Obtenção e purificação de anticorpos policlonais anti- <i>PbMdj1r</i>	52
3.21. Purificação de anticorpo policlonal monoespecífico anti- <i>PbMdj1r</i>	52
3.22. Acoplamento de IgG policlonal de coelho em Affi-Gel 10	53
3.23. Purificação de proteína nativa	53
3.24. Extração de proteínas totais da fase leveduriforme de <i>P. brasiliensis</i>	53
3.25. Extração de proteínas mitocondriais de <i>P. brasiliensis</i>	54
3.26. Preparação do extrato de parede de <i>P. brasiliensis</i> com β -ME	54
3.27. "Immunoblotting"	55
3.28. Imunolocalização da <i>PbMdj1</i> por microscopia de fluorescência e de confocal	55
3.29. Microscopia eletrônica de transmissão	56
3.29.1. Preparação de leveduras de <i>P. brasiliensis</i> para ultra-microtomia	56
3.29.2. Ensaios de imunocitoquímica para localização ultra-estrutural de <i>PbMdj1</i> em <i>P. brasiliensis</i>	57
3.30. Citometria de Fluxo (FACS)	58
3.31. Ensaios do efeito de anticorpos anti- <i>PbMdj1r</i> sobre o crescimento fúngico	58

3.32. Ensaio de proteção contra DNase I "Footprinting"	59
3.32.1 Defosforilação e marcação do fragmento com [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP	59
3.32.2 Ensaio de proteção ("footprinting")	60
3.33. Ensaio de retardo da mobilidade eletroforética (EMSA)	60
3.33.1. Anelamento	60
3.33.2. Marcação dos oligonucleotídeos	60
3.33.3. Ensaio de retardo da mobilidade	61
3.34. RT-PCR quantitativo ("Real Time")	61
4. RESULTADOS	63
4.1. Clonagem e caracterização de Pb <i>MDJ1</i>	64
4.2. Expressão da PbMdj1 truncada	73
4.3. Detecção da proteína PbMdj1 nativa	79
4.4. Purificação de PbMdj1 nativa a partir de extrato total de mitocôndrias de <i>P. brasiliensis</i>	81
4.5. Localização de PbMdj1 em <i>P. brasiliensis</i>	83
4.6. Efeito de anticorpos policlonais anti-PbMdj1 no crescimento de <i>P. brasiliensis</i>	92
4.7. Reatividade de PbMdj1 recombinante com soro de pacientes com paracoccidiodomicose (PCM)	93
4.8. PbMdj1 é secretada no sobrenadante de cultura de <i>P. brasiliensis</i> ?	93
4.9. Caracterização dos elementos de transcrição da região promotora dos genes Pb <i>MDJ1</i> /Pb <i>LON</i>	96
4.10. Expressão de Pb <i>MDJ1</i> e Pb <i>LON</i>	108
4.11. Construções para o estudo da funcionalidade da região promotora ML	113
5. DISCUSSÃO	117
6. CONCLUSÕES	129
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131
8. ABSTRACT	148
9. ANEXOS	151

Lista de Figuras

Figura 1 – Desenho esquemático da região PbLON/PbMDJ1 de <i>P. brasiliensis</i>	65
Figura 2 – Análise por “Southern blot” do produto da reação de 3’ RACE	65
Figura 3 – Gel de sequenciamento da região 3’ do gene PbMDJ1	68
Figura 4 – Gel de agarose dos produtos de RT-PCR	68
Figura 5 – Sequência de nucleotídeos do PbMDJ1 e da sequência deduzida de aminoácidos	69
Figura 6 – Representação esquemática da PbMdj1 e análise da sequência deduzida de aminoácidos	70
Figura 7 – “Plot” de hidrofiliçidade Kite-Doolittle de diferentes sequências Mdj1-like	71
Figura 8 – Árvore filogenética de sequências fúngicas de Mdj1	72
Figura 9 – Expressão PbMDJ1 truncado em pHIS3	74
Figura 10 – Gel de poliacrilamida apresentando o perfil dos lisados de bactérias	75
Figura 11 – Purificação da PbMdj1 recombinante em coluna Ni-NTA	75
Figura 12 – “Immunoblotting” mostrando a reatividade do soro policlonal anti-PbMdj1	77
Figura 13 – Purificação de IgG de soro de coelho hiperimune anti-PbMdj1r	78
Figura 14 – Reconhecimento da PbMdj1 nativa pelo anticorpo anti-PbMdj1	80
Figura 15 – Análise por “Northern blot” de RNA total de <i>P. brasiliensis</i> hibridado com a sonda <i>PbMDJ1</i>	80
Figura 16 – Purificação de PbMdj1 nativa	82
Figura 17 – Imunolocalização da PbMdj1 em <i>P. brasiliensis</i>	85
Figura 18 – Marcação de <i>P. brasiliensis</i> com Mitotracker Texas Red	86
Figura 19 – Localização de PbMdj1 em <i>P. brasiliensis</i> por microscopia confocal	87
Figura 20 – Localização ultraestrutural de PbMdj1 em <i>P. brasiliensis</i>	88
Figura 21 – Ensaio de citometria fluxo (FACS) com células de <i>P. brasiliensis</i>	90
Figura 22 – Localização de PbMdj1 na parede celular de <i>P. brasiliensis</i>	91
Figura 23 – Reconhecimento por “immunoblotting” da proteína recombinante PbMdj1 soros de pacientes	94
Figura 24 – Curva de crescimento do isolado Pb18 de <i>P. brasiliensis</i>	95
Figura 25 – Representação esquemática do fragmento ML e gel de SDS-PAGE do extrato total de <i>P. brasiliensis</i>	98
Figura 26 – Estratégia de marcação radioativa da região ML para ensaios de DNase I “footprinting”	99
Figura 27 – Ensaio de proteção por DNaseI “footprinting” do isolado Pb18	100
Figura 28 – Ensaio de proteção por DNaseI “footprinting” do isolado Pb3	101

Figura 29 – Análise da região promotora de <i>PbLON/PbMDJ1</i> (ML) de <i>P. brasiliensis</i> pelo programa TFSEARCH	102
Figura 30 – Análise comparativa das sequências da região intergênica de ML de Pb18 e Pb3	105
Figura 31 – EMSA com os extratos totais da fase leveduriforme dos isolados Pb18 e Pb3	106
Figura 32 – Apresentação esquemática da região promotora ML com a localização dos elementos de transcrição	107
Figura 33 – Padrão de amplificação e curvas padrão representativas dos genes <i>PbMDJ1</i> , <i>PbLON</i> e β -tubulina de <i>P. brasiliensis</i>	110
Figura 34 – RT-PCR em tempo real dos genes <i>PbMDJ1</i> e <i>PbLON</i> dos isolados Pb18 e Pb3 de <i>P. brasiliensis</i> durante um choque térmico a 42 °C	111
Figura 35 – RT-PCR em tempo real dos genes <i>PbMDJ1</i> , <i>PbLON</i> , <i>UBI</i> , <i>HSP104</i> , <i>HSP82</i> e <i>HSP70</i> do isolado Pb18 de <i>P. brasiliensis</i>	111
Figura 36 – RT-PCR em tempo real dos genes <i>PbMDJ1</i> e <i>PbLON</i> dos isolados Pb18 e Pb3 de <i>P. brasiliensis</i> durante a transição dimórfica	112
Figura 37 – Apresentação esquemática da construção para o estudo da funcionalidade	115
Figura 38 – Apresentação esquemática da geração de fragmentos mutantes	116

RESUMO

Paracoccidioides brasiliensis é o fungo dimórfico responsável pela paracoccidioidomicose (PCM). A diferenciação celular do *P. brasiliensis* de micélio para levedura nos pulmões é essencial para a ocorrência da PCM e é dependente de temperatura. Parte das alterações sofridas pelo fungo está provavelmente relacionada com a expressão de proteínas de estresse (Hsp), pouco conhecidas no *P. brasiliensis*. Em nosso laboratório foram clonados os genes de *P. brasiliensis* homólogos aos de duas proteínas mitocondriais de choque térmico: o PbLON, da proteinase Lon, e a porção 5' do PbMDJ1, da chaperone Hsp40/Mdj1. Estes genes estão ligados por uma região 5' intergênica comum (ML), o que pode ser relevante em relação à regulação transcricional não apenas porque ambos respondem ao estresse, mas também pela relação funcional. Mdj1p é o membro da família DnaJ localizado na matriz mitocondrial, o qual é essencial na digestão de proteínas desnaturadas pela Lon.

Neste trabalho o gene PbMDJ1 de *P. brasiliensis* foi totalmente caracterizado. Sua sequência apresenta uma ORF de 1659pb, organizada em três exons interrompidos por dois introns. PbMdj1 apresenta 551 aminoácidos com alta similaridade com as homólogas de *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum* e *Coccidioides immitis*. O alinhamento destas sequências permitiu mapear todos os domínios que caracterizam a família da DnaJ, a saber, um domínio J, um domínio rico em G/F e um domínio ligante de zinco organizado em quatro repetições de CXXCXGXG. Para a expressão de PbMdj1 recombinante em bactéria, um fragmento de cDNA de 757pb da região 5' foi subclonado no vetor pHIS3. A proteína PbMdj1r foi purificada e utilizada na obtenção de anticorpos policlonais de coelho. Em microscopia eletrônica e confocal, os anticorpos anti-PbMdj1r localizaram a molécula na mitocôndria de leveduras de *P. brasiliensis* Pb18, mas também abundantemente na parede celular e região de brotamento. Em ensaios de "imunoblotting", os anticorpos revelaram uma proteína nativa de 55 kDa tanto em extratos mitocondriais, com significativo aumento da expressão em condições de estresse térmico, como em uma fração de parede. Sua localização extramitocondrial foi confirmada ainda por citometria de fluxo (FACS). Alguns soros de pacientes com PCM reagiram com a PbMdj1r em "immunoblotting", sugerindo que os pacientes reconhecem essa proteína durante a infecção.

Observamos que locus cromossômico dos genes MDJ1/LON é comum entre fungos dimórficos e *Aspergillus*. Na região intergênica 5' compartilhada pelos genes MDJ1/LON de *P. brasiliensis* Pb18 e Pb3 foram mapeados e validados 4 elementos de transcrição usando o ensaio de proteção contra DNase I "footprinting" e em experimentos de retardo da mobilidade eletroforética (EMSA). Essas regiões abrigam um elemento de choque térmico convencional, dois não-convencionais e outro ligante de AP-1 (ARE), associado ao estresse oxidativo. Foram

encontrados motivos similares nos locus correspondente de *B. dermatitidis* e *H. capsulatum*. O Pb3, que pertence a uma espécie críptica filogeneticamente distinta, apresentou polimorfismo na região ML. As análises comparativas entre Pb18 e Pb3 mostraram diferenças no número de elementos de transcrição no padrão da regulação transcripcional de Pb*LON* e Pb*MDJ1* durante a transição de fase. Em Pb18, Pb*MDJ1* parece ser preferencialmente expresso na fase leveduriforme. Ambos os genes apresentaram aumento nos níveis de transcrição após choque térmico a 42 °C, porém em Pb3 esse efeito foi mais lento.

Este é o primeiro trabalho que detecta elementos de transcrição em *P. brasiliensis* e pode contribuir significativamente para entendimento da regulação de genes de estresse em fungos dimórficos. As diferenças detectadas em Pb18 e Pb3 quanto à regulação transcripcional dos genes aqui estudados e eventualmente outros poderá explicar a distinta relação parasita-hospedeiro que os isolados apresentam em camundongos B10.A.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Paracoccidioides brasiliensis* e paracoccidioidomicose

1.1.1 Aspectos gerais

Paracoccidioides brasiliensis é o fungo dimórfico responsável pela paracoccidioidomicose (PCM), a qual causa no homem uma micose sistêmica que pode ser letal se não tratada. Foi originalmente descrita em 1908 por Lutz, que observou o fungo em material de lesões orais e de linfadenopatia cervical de dois pacientes. A PCM é uma das quatro micoses granulomatosas causadas por fungos termo-dimórficos, que incluem o *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* e *Coccidioides immitis*. Estes fungos, juntamente com *P. brasiliensis*, estão relacionados filogeneticamente como membros da mesma família, conforme as análises de sequências do gene do RNA ribossomal (Bialek et al., 2000; Peterson et al., 1998). *P. brasiliensis* recebeu várias denominações ao longo do tempo (revisão em Lacaz et al., 1994) e atualmente é taxonomicamente classificado como Eukaryota do reino Fungi, filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotina, classe Eurotyomicetes, ordem Onygenales, família Onygenaceae, gênero *Paracoccidioides* e espécie *brasiliensis* (Taxonomy ID: 121759, NCBI/ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html/>).

A forma teleomórfica ou sexuada do *P. brasiliensis* ainda não é conhecida (Lacaz, 1994). As células leveduriformes do fungo variam entre 4 – 30 μm , apresentam multibrotamentos, são multinucleadas e os isolados são haplóides ou aneuplóides, de acordo com análises recentes (Almeida et al., 2006). A forma miceliana apresenta longos filamentos septados com conídeos terminais e/ou intercalares (Lacaz et al., 1992; San-Blas e San-Blas, 1982). Os conídeos são uninucleares, mas quando incubados a 37 °C transformam-se em células multinucleares (McEwen et al., 1987). O exato local e condições nas quais o fungo encontra-se na natureza não foram determinados, porém evidências indiretas indicam que a forma saprofítica pode ocorrer no solo, produzindo propágulos infectantes tais como artroconídeos e aleuroconídeos (Restrepo, 1985; Restrepo-Moreno, 1994).

Infecções naturais foram descritas em alguns animais selvagens e domésticos (Grose e Tramsitt, 1965; Johson e Lang, 1977; Garcia et al., 1992) e o fungo foi isolado de duas espécies de tatu, *Dasyus novemcinctus* (Bagagli et al., 1998; Bagagli, et al., 2003; Restrepo et al., 2000) e *Cabassou centralis* (Corredor et al., 2005). Estes dados sugerem que o tatu pode ser um reservatório natural importante de *P. brasiliensis*. Algumas manifestações da doença foram recentemente observadas em cachorros (Ricci et al., 2004; Farias et al., 2005).

A PCM encontra-se geograficamente limitada aos países da América Latina, sendo prevalente no Brasil, Argentina, Venezuela e Colômbia, onde é endêmica em áreas rurais. Aparentemente, a micose tem sua maior incidência no Brasil, onde é diagnosticada com maior frequência em estados das regiões Sudeste e Sul, especificamente em São Paulo, Paraná, Minas Gerais e Rio Grande do Sul (Coutinho et al., 2002). Não há referências da doença na Guiana, Guiana Francesa, Suriname, Chile e Nicarágua (Londero, 1994). Alguns casos de PCM foram diagnosticados nos Estados Unidos, Europa, África e Ásia, porém os pacientes, em alguma época de suas vidas, residiram ou trabalharam em países endêmicos, onde supostamente foram infectados (revisão em Lacaz et al., 1994). As características dos locais com alta endemicidade da PCM são temperaturas discretas em torno de 18 a 24 °C, chuvas abundantes com índice pluviométrico de 800 a 2000 mm por ano, altitude média de 47 – 1300 m, predomínio de florestas e árvores nativas, além de invernos curtos e verões ensolarados (Bagagli et al., 1998). Estima-se que a incidência anual da doença ativa seja de 1 a 3 indivíduos por 100.000 habitantes em áreas endêmicas (San-Blas et al., 2002).

1.1.2. Infecção e relação parasito-hospedeiro

A infecção pelo *P. brasiliensis* ocorre por inalação de conídeos. Para o desenvolvimento da doença, é imprescindível que os conídeos alojados nos alvéolos pulmonares passem para a fase leveduriforme. A mudança da fase infectante para a patogênica depende do aumento de temperatura (revisão em Lacaz et al., 1994). Após instalação do fungo no pulmão, ocorre a formação de lesões que podem: (I) regredir com destruição do fungo, (II) regredir com fungo latente ou quiescente, o qual pode desenvolver PCM ativa posteriormente, (III) progredir imediatamente com o desenvolvimento dos sinais e sintomas da PCM.

A doença ativa tem caracter granulomatoso e manifesta-se nas formas aguda (juvenil ou linfática) ou crônica (adulta ou pulmonar). A PCM aguda progride rapidamente através do sistema retículo-endotelial de adultos jovens e crianças de ambos os sexos, sendo responsável por cerca de 3 a 5 % dos casos de PCM descritos. A forma crônica é a mais comum, prevalece em homens de 30 – 60 anos e tem progressão lenta, geralmente após longo período de latência de focos quiescentes. Esta forma acomete principalmente os pulmões, mas pode ser multifocal, disseminando-se para qualquer órgão, especialmente para tecidos mucocutâneos. A disseminação ocorre pela via hematogênica e/ou linfática. Apesar da PCM-infecção ocorrer igualmente entre os sexos, a doença ativa é detectada com frequência 13 vezes superior no sexo masculino (revisão em Brummer et al., 1993). Esse fato está possivelmente relacionado à proteção por hormônios femininos, uma vez que a transformação

de micélio em levedura "in vitro" é inibida pelo 17 β -estradiol, mas não pela testosterona (Clemons et al., 1989).

A principal defesa do hospedeiro contra o *P. brasiliensis* é a resposta mediada por células, evidenciada pela formação de granulomas. O granuloma típico da PCM é composto de células gigantes e epitelióides, podendo ser observados polimorfonucleares (PMN) próximos aos fungos. Ao redor das células epitelióides há um halo de células mononucleares (Franco et al., 1987; Londero et al., 1990). Em pacientes com formas menos graves da doença, a resposta imune induz à formação de granulomas compactos contendo número reduzido de células fúngicas. Pacientes com formas mais graves da doença frequentemente apresentam granuloma "frouxo", na verdade um influxo celular com capacidade reduzida de combater o fungo, que tende a se desenvolver em grande número. Entre os dois extremos ocorre amplo espectro de manifestações clínicas e imunológicas (Benard et al., 1994).

A ocorrência de quadros clínicos diversos de gravidade variada deve estar relacionada à existência de isolados apresentando diferentes graus de virulência (Kashino et al., 1985) e de sua relação com fatores inerentes ao hospedeiro, como idade, sexo, genética e nutrição (revisão em Franco, 1987). As diferenças de susceptibilidade à PCM foram parcialmente mimetizadas em modelo experimental de camundongos geneticamente selecionados (revisado em Calich et al., 1998). Desta forma, animais da linhagem A/Sn são mais resistentes à infecção intraperitoneal e intratraqueal com o isolado Pb18 de *P. brasiliensis*, enquanto camundongos B10.A são mais susceptíveis e Balb/C são intermediários (Calich et al., 1985; Calich et al., 1994; Cano et al., 1995). Camundongos B10.A infectados com Pb18 tendem a manter altos títulos de anticorpos e imunidade celular baixa, com produção insuficiente de IFN- γ (Th2-orientada), ao contrário do A/Sn, cuja imunidade anti-*P. brasiliensis* é preferencialmente do tipo Th-1.

O macrófago é considerado a principal célula de defesa contra o fungo. Estudos "in vitro" mostraram que o *P. brasiliensis* é capaz de se multiplicar dentro de macrófagos peritoneais e pulmonares (Brummer et al., 1989). Entretanto, macrófagos ativados por IFN- γ são fungicidas (Brummer et al., 1988). PMNs humanos ou murinos exercem efeito fungistático e fungicida contra o *P. brasiliensis*, os quais aumentam sob ativação do IFN- γ e GM-CSF ("granulocyte macrophage colony stimulating factor") (Kurita et al., 2000). O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma citocina produzida por monócitos ou macrófagos envolvida no recrutamento e ativação de células inflamatórias e na formação do granuloma (Kindler et al., 1989). INF- γ ativa macrófagos a secretar TNF- α , o qual inibe a replicação do fungo (Souto et al., 2000). Recentemente, Carmo e colaboradores (2006) demonstraram que H₂O₂ liberada por

monócitos ativados por TNF- α teve efeito fungicida sobre *P. brasiliensis*. Outro mecanismo efetor é o óxido nítrico (NO) liberado por macrófagos ativados, que leva à morte do fungo. A indução da NO sintetase é dependente do sinergismo de ação entre IFN- γ e TNF- α e de fatores produzidos pelo próprio fungo (Nascimento et al., 2002).

O desenvolvimento da PCM depende de interações entre componentes do fungo e do hospedeiro. O principal componente antigênico descrito em *P. brasiliensis* é a gp43, uma glicoproteína de 43 kDa reconhecida por anticorpos de praticamente todos os pacientes com a doença ativa (Puccia et al., 1986; Puccia e Travassos, 1991; Camargo et al., 1994). Esta molécula possui uma única cadeia oligossacarídica "high mannose" N-ligada (Almeida et al., 1996; Cisalpino et al., 1996), que permite sua ligação em receptores para manose de macrófagos (Almeida et al., 1996), e auxilia na proteção contra proteólise "in vitro" (Puccia e Travassos 1991). A molécula suscita tanto imunidade humoral, permitindo o diagnóstico sorológico da PCM, quanto o celular, protetora em camundongos (revisão em Travassos et al., 2004). O gene *PbGP43* foi o primeiro caracterizado em *P. brasiliensis* e sua sequência apresenta grande similaridade com exo-1,3- β -glucanases fúngicas. Contudo, um dos sítios catalíticos conservados de atividade de glucanase foi substituído de NEP para NKP, o que provavelmente induziu a perda da atividade enzimática na gp43 (Cisalpio et al 1996).

Esta glicoproteína é considerada um potencial fator de virulência uma vez que liga-se à laminina e com isso aumenta a capacidade do fungo de invadir e destruir tecidos (Vicentini et al., 1994) no modelo intratesicular, ainda que aparentemente esse efeito possa não ocorrer no modelo pulmonar (Andre et al., 2004). "In vivo", anticorpos monoclonais anti-gp43 foram capazes de modular a infecção experimental exacerbada do *P. brasiliensis* recoberto com laminina (Gesztezi et al., 1996). Além disso, aderência de *P. brasiliensis* em células epiteliais do hospedeiro é substancialmente reduzida na presença de anti-gp43, mostrando que gp43 possivelmente age como adesina (Hanna et al., 2000). Recentemente foi demonstrada a interação de gp43 com outro componente de matriz extracelular, a fibronectina (Mendes-Giannini et al., 2006).

Além de induzir resposta imune humoral, a gp43 suscita resposta imune celular em humanos (Benard et al., 1997) e animais infectados experimentalmente (Rodrigues e Travassos, 1994). Tabora e colaboradores (1998) mostraram que um peptídeo de 15 aminoácidos da gp43 (P10) é o responsável pela ativação de célula T CD4⁺ em animais imunizados. Camundongos BALB/c imunizados com a gp43, P10 ou com o gene da gp43 Pinto et al., 2000) e infectados com *P. brasiliensis* apresentaram granulomas pulmonares epitelióides em pequeno número, com poucas células viáveis no seu interior e ausência de lesões no

fígado e baço. Os camundongos apresentaram uma resposta imunológica humoral e celular específica e duradoura, e a proteção foi mediada pela produção de IFN- γ . O gene *PbGP43* apresenta um importante polimorfismo no exon 2, porém é conservado na região que codifica o P10 (Morais et al., 2000).

Outros antígenos *do P. brasiliensis* têm sido descritos, entretanto poucos foram purificados e caracterizados. A gp70 destaca-se por ser uma glicoproteína reconhecida por 96% dos soros de pacientes com PCM (Salina et al., 1998), induzir resposta linfoproliferativa quando testada com linfócitos de indivíduos com a doença (Benard et al., 1997) e ser capaz de modular as funções de macrófagos peritoneais murinos (Grosso et al., 2003). Além da gp70, um antígeno de 87 kDa, detectado no soro de pacientes (Gómez et al., 1997), foi purificado e a sequência N-terminal obtida mostrou homologia com Hsp70 de *P. brasiliensis* e de outros fungos (Díez, et al., 2002). Uma proteína antigênica de 27 kDa e outra de 58 kDa também foram caracterizadas. (McEwen et al., 1996; Figueroa et al., 1995).

Outros antígenos preferenciais da levedura do Pb01 foram identificados por Fonseca e colaboradores (2001), a saber, catalase, aldolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GADPH), malato desidrogenase e triosefosfato isomerase, cujos genes foram posteriormente caracterizados como diferencialmente expressos na levedura (Moreira et al., 2004; Barbosa et al., 2004; Pareira et al., 2004; Carneiro et al., 2004). Destaca-se a GADPH que em *C. albicans* e no próprio *P. brasiliensis* foram vistos como sendo adesinas de parede celular (Gil-Navarro et al., 1997; Barbosa et al., 2006). A catalase, por sua vez, apresentou aumento da expressão após estresse oxidativo com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Moreira et al., 2004), sugerindo seu efeito protetor contra as defesas do hospedeiro.

O diagnóstico confirmatório da PCM depende da demonstração do agente etiológico em materiais biológicos como: pus de linfonodos, escarros, aspirado brônquico ou lavado broncoalveolar, material granulomatoso da base de úlceras, líquido céfalo-raquidiano, medula óssea, além de amostras de biópsias. Na maioria dos casos, as células leveduriformes de *P. brasiliensis* são visualizadas em microscópio ótico levando ao diagnóstico micológico direto (revisão em Lacaz, 1994). Os testes sorológicos têm valor diagnóstico em associação ao micológico, e, principalmente, valor prognóstico no acompanhamento dos pacientes. Além disso, atualmente diversos métodos que utilizam técnicas de PCR têm sido propostos visando à identificação do fungo em material biológico (Sandhu et al., 1997; Goldani e Sugar 1998; Díez et al., 1999; Gomes et al., 2000).

O tratamento da PCM é usualmente longo, ocorrendo em muitos casos de um a dois anos de terapia. Atualmente o cetoconazol e o itraconazol são os anti-fúngicos de escolha, além de sulfonamidas e anfotericina B (Mendes et al., 1994). A doença pode ser fatal se o paciente não fizer uso da medicação apropriada ou não seguir corretamente a terapia medicamentosa. A ausência de anticorpos circulantes contra antígenos de *P. brasiliensis* é um importante critério de cura da PCM. A manutenção do tratamento deve se estender por um ano após a negatificação dos testes sorológicos e o paciente deve ser reavaliado constantemente. A remissão e as sequelas de fibrose pulmonar são frequentes na PCM (revisão em Brummer et al., 1993).

1.1.3. A variabilidade do *P. brasiliensis*

É consenso que *P. brasiliensis* apresenta heterogeneidade entre os diferentes isolados. Quanto à morfologia encontrada nos tecidos do hospedeiro Lacaz (revisão de 1994) descreve amplo espectro de formas compatíveis com o fungo. Em estudo detalhado, Svidzinski e colaboradores (1999) avaliaram o comportamento de 30 amostras de *P. brasiliensis* de pacientes portadores de diferentes formas clínicas de PCM e observaram variabilidade fenotípica quanto na morfometria, número de brotamentos, capacidade de conversão de micélio (M) para levedura (L) e velocidade de crescimento. Estudando o perfil de isoenzimas de 10 isolados de *P. brasiliensis*, pelo menos sete enzimas exibiram padrões eletroforéticos capazes de diferenciar amostras do fungo (Svidzinski e Camargo 1995). Isolados foram também agrupados de acordo com o perfil de proteínas secretadas, que aparentemente foi mais homogêneo na forma patogênica do fungo (Salem-Izacc et al., 1997).

Isolados de *P. brasiliensis* também apresentam diferenças quanto a sua patogenicidade (Zacharias et al., 1986; Burger, 1996). Usando modelo animal, Singer-Vermes e colaboradores (1989) agruparam, de acordo com o perfil de virulência, sete isolados analisados. De acordo com o trabalho, Pb18 foi considerado altamente virulento, e Pb265 e PbIVI267 pouco virulentos.

O trabalho que originalmente associou polimorfismo genético em *P. brasiliensis* com perfil de RAPD ("random amplified polymorphic DNA analysis") foi conduzido por Soares e colaboradores (1995). Usando essa estratégia, Sano e colaboradores (1999a) demonstraram que isolados de pacientes e tatus agrupavam de acordo com seu polimorfismo genético, porém indistintamente em relação à sua origem. Os autores propuseram que os animais podem ser reservatórios do fungo na natureza e que o tatu pode se infectar por diferentes isolados genotipicamente distintos. Esta observação foi feita a partir de diferenças nos

padrões de RAPD de isolados provenientes de diferentes órgãos de um mesmo animal (Sano et al., 1999b). Outras publicações utilizando RAPD relacionam o polimorfismo genético do fungo com seu poder patogênico (Molinari-Madlum, 1999; Hebeler-Barbosa et al., 2003) ou, mais consistentemente, conforme suas origens geográficas (Calcagno et al., 1995), sugerindo que o fungo pode estar sob baixa pressão genética no ambiente. Esta distribuição foi posteriormente confirmada por "Restricted Fragment Length Polymorphism" (Nino-Vega et al., 2000).

Morais e colaboradores (2000) observaram polimorfismo genético no gene que codifica a gp43 em 17 isolados de *P. brasiliensis*. Neste trabalho os autores conseguiram distinguir genótipos típicos de grupos distintos de isolados, nos quais as substituições ocorreram principalmente no exon 2 e na região promotora. As sequências dos isolados Pb2, Pb3 e Pb4 apresentaram o maior número de substituições, formando um grupo distante filogeneticamente dos demais. Um estudo amplo de multilocus foi realizado por Matute e colaboradores (2005), onde os autores conseguiram agrupar 65 isolados de *P. brasiliensis* representantes de várias áreas endêmicas da América Latina em três grupos distintos: S1, PS2 e PS3. As análises de sequências de oito regiões de cinco locos diferentes do genoma, incluindo o PbGP43, demonstraram a presença de um grupo críptico (PS2), do qual fazem parte os isolados Pb2, Pb3, Pb4 e outros três. PS3 é composto somente por amostras colombianas.

Em trabalho recente do laboratório, que contou com a nossa colaboração na análise transcricional do PbGP43 (anexo), foi demonstrado que o isolado Pb3 foi menos virulento quando inoculado em camundongos B10.A pelas vias intraperitoneal, intratraqueal e endovenosa (Carvalho et al., 2005). Além disso, nestes animais, Pb3 provocou doença regressiva com padrão de resposta do tipo Th1, enquanto Pb18 (grupo S1) induziu resposta do tipo Th2 com doença progressiva e letal (Carvalho e Puccia dados não publicados). O Pb18 e o Pb3, além do Pb01, foram recentemente incluídas em uma proposta internacional de sequenciamento do genoma de isolados representativos de fungos dimórficos térmicos patogênicos.

O polimorfismo cromossômico em isolados clínicos, de solo e de animais de *P. brasiliensis* foi demonstrado por PFGE ("pulsed field gel electrophoresis") originalmente por Montoya e colaboradores (1997) e posteriormente em outros trabalhos (Montoya et al., 1999; Cano et al., 1998; Feitosa et al., 2003). De forma geral, os resultados concordam que os isolados apresentam de 4 a 5 bandas cromossômicas, cujos tamanhos variam entre 2 a 10 Mb. O número de núcleos também variou com o isolado.

1.1.4. Dimorfismo

A diferenciação celular do *P. brasiliensis* de micélio (25 °C) para levedura (36 °C) depende da temperatura e é essencial para a ocorrência da PCM (Restrepo e Jiménez, 1980; San Blas, 1982), uma vez que isolados incapazes de se diferenciarem em leveduras não são capazes de causar a doença (Moraes Borba e Shaffer, 2002). Porém alguns fatores nutricionais podem ser essenciais neste processo, como por exemplo, os aminoácidos cisteína e metionina (Paris et al., 1985).

As alterações morfológicas que o fungo sofre no hospedeiro são a consequência de modificações bioquímicas e fisiológicas impostas pelas novas condições ambientais que, em última análise, estimulam uma adaptação no padrão transcricional e/ou regulatório de genes e proteínas. Os fatores que afetam de fato a transição dimórfica no nível molecular são pouco conhecidos, principalmente devido à dificuldade de aperfeiçoar um sistema de transformação para *P. brasiliensis*, o qual tende a produzir transformantes instáveis até o momento (Leal et al., 2004; Soares et al., 2005). Entretanto, esse assunto tem sido alvo de vários trabalhos, alguns dos quais beneficiados pelo conhecimento de sequências do fungo. Atualmente dois bancos de sequências expressas (EST) pelo *P. brasiliensis* estão disponíveis. O primeiro foi fruto do trabalho de grupos paulistas liderados por Goldman e colaboradores (2003), que identificaram 4.692 genes do isolado Pb18 recém-isolado de baço de camundongo infectado. Nossa participação nesse trabalho (anexo) foi a preparação de todo material genético analisado não só no sequenciamento, mas também na expressão de genes durante a transição de fases. O segundo banco, que foi o resultado do trabalho de pesquisadores do Centro-Oeste brasileiro, contém 6.022 genes expressos na fase leveduriforme e miceliana do Pb01, os quais representam possivelmente 80 % dos genes expressos pelo fungo (Felipe et al., 2003; Felipe et al., 2005).

A parede celular do *P. brasiliensis* é composta de proteínas, glicoproteínas e lipídeos, porém os componentes majoritários são polissacarídicos, especificamente quitinas e glucanas, as quais desempenham um papel importante no dimorfismo, atuando na definição da morfologia celular. Sabe-se, por exemplo, que glucanas da parede fúngica sofrem alteração da conformação β , na fase miceliana, para α , na levedura. Evidências experimentais sugerem, inclusive, que a presença de glucanas α -1,3 na superfície da levedura favoreça sua virulência (revisão em San-Blas et al., 1994). A mudança na composição da parede celular durante a infecção, como a que ocorre em *P. brasiliensis*, pode ser considerada um mecanismo de escape da resposta imune inata, a qual é essencial para o controle de infecções fúngicas. Receptores para β -glucanas, tais como, CR3, lactosilceramida e dectina-1 contribuem para o

reconhecimento e fagocitose destes organismos (Brown e Gordon 2003). Na fase leveduriforme, as formas β da glucana aparecem em pequena proporção (ao redor de 5%) e são protegidas pela α -glucana. Em *H. capsulatum*, foi comprovado geneticamente que a α -1,3-glucana é essencial na virulência do fungo (Rappleye et al., 2005), já que cepas contendo o gene deletado ou sob interferência de RNA foram recuperadas em número significativamente inferior do pulmão de camundongos infectados em comparação à cepa selvagem. Em *P. brasiliensis*, Marques e colaboradores (2004) utilizaram a técnica de SSH ("suppression subtraction hybridization") e análises de "macroarrays" para identificar genes diferencialmente expressos na levedura. Foram identificados 20 genes principais, entre os quais *AGS1* (α -1,3 glucana sintase) e *TSI1* (antioxidante tiol-específico) foram os mais abundantes na levedura quando comparados ao micélio. Esse trabalho, que está anexo, contou com a nossa colaboração na preparação de todo material genético analisado. O *TSI1*, por sua vez, é um fator de virulência conhecido em *Cryptococcus neoformans* (Missall et al., 2004), onde atua na proteção ao estresse oxidativo.

A variação morfológica de micélio para levedura em *P. brasiliensis* também é acompanhada por aumento dos níveis de quitina sintase que estaria envolvida no processo de expansão da parede celular (Fores-Carreon et al., 1979; Kanetsuna, 1981). A quitina é um componente estrutural importante da parede celular de fungos filamentosos e no *P. brasiliensis* encontra-se três vezes mais abundante na fase leveduriforme que no micélio. Entretanto, o estudo de "northern blot" da expressão dos genes *PbrCHS1*, *2*, *4* e *5*, que codificam quitinas sintases, mostrou que eles são expressos em níveis comparáveis durante a transição de micélio para levedura, com expressão preferencial na forma miceliana (Niño-Vega et al., 2000). Análises recentes do perfil de expressão de genes diferencialmente expressos durante a transição dimórfica do Pb18 por "microarray" mostrou que os genes *PbrCHS4* e *PbrCHS5* não apresentaram significância estatística na modulação dimórfica (Nunes et al., 2005). Esses resultados conflitantes podem refletir uma diferença de expressão relacionada aos isolados analisados ou às condições de cultura. Recentemente foi caracterizado o gene da quitinase (*PbCTS1*) em *P. brasiliensis* e sua expressão foi observada em ambas as fases do fungo e durante a transição dimórfica de micélio para levedura (Bonfim et al., 2006).

É interessante reassaltar que fomos colaboradores do trabalho de Nunes et al. (2005), anexo, novamente no preparo do material genético analisado. Esse trabalho estabeleceu um "bioship" contendo ao redor de 4.700 genes resultantes da análise de ESTs do Pb18 (Goldman et al., 2003). Alguns genes estavam abundantemente expressos ao final da transição para a

levedura, entre os quais o gene da *METR*, que codifica um fator de transcrição que ativa genes envolvidos na assimilação de sulfato, o gene da álcool desidrogenase III e o gene da 4-hidroxifenil-piruvato desidrogenase (4-HPPD), que está envolvido no catabolismo de aminoácidos. A inibição de 4-HPPD pela droga NTBC (2-2-nitro-4-trifluorometilbenzoil-ciclohexano-1,3-diona) teve efeito fungistático e inibiu a diferenciação do fungo para a fase leveduriforme "in vitro".

Nesse trabalho, ao lado do *TSA1* citado anteriormente, o *GST1* (glutathione S transferase), também relacionado com estresse oxidativo, apresentou expressão específica na fase leveduriforme (Nunes et al., 2005). Além destes, o gene *PbY20* teve expressão aumentada 20 vezes ao final da transição dimórfica para levedura do Pb18 (Nunes et al., 2005) e foi preferencialmente expresso na fase leveduriforme do Pb01 (Felipe et al., 2005). A *PbY20* é uma proteína específica de levedura e recentemente foi identificada como membro da família flavina mononucleotídeo flavodoxina, envolvida em processos de choque térmico e oxidativo em sistemas biológicos (Daher et al., 2005).

Em *P. brasiliensis* pouco se conhece sobre sinalização no controle das mudanças morfológicas, mas provavelmente a sinalização via AMP cíclico (cAMP) exerce um importante papel neste processo, uma vez que cAMP exógeno inibiu o processo de filamentação no fungo (Paris et al., 1985b; Borges-Walmsley e Walmsley, 2000). Elementos da cascata de sinalização do cAMP foram identificados em *P. brasiliensis* (Borges-Walmsley et al., 2002; Goldman et al., 2003; Felipe et al., 2005) e carecem de experimentos futuros que estabeleçam o teor do seu papel na transição.

Parte das alterações sofridas pelo fungo na mudança de fase está provavelmente relacionada com a expressão de proteínas de estresse (Hsp), que são primordiais na manutenção dos organismos em geral (Lindquist e Craig, 1988). A indução de Hsps pode ter papel não somente em resposta à termo-adaptação mas também durante transição de fase de fungos dimórficos (Goldani et al., 1994). Em *P. brasiliensis*, alguns genes de estresse já caracterizados incluem *HSP70* (Silva et al., 1999), *HSP60* (Izaac et al., 2001), *CLPB* (Jesuino et al., 2002), *PbLON* (Barros e Puccia, 2001), *PbMDJ1* (Batista et al., 2006). Outras sequências de genes que potencialmente codificam Hsp foram encontradas, as quais estão depositadas nos bancos de genoma deste fungo.

A *Hsp70* de *P. brasiliensis* é diferencialmente expressa durante a transição dimórfica, apresentando super-expressão na forma de levedura. Durante o processo de diferenciação celular de micélio para levedura ocorreu o acúmulo de mRNA do *HSP70* não-processado ("splicing alternativo"), fenômeno este não observado nas células leveduriformes crescidas a

36 °C e submetidas a choque térmico (42 °C) (Silva et al., 1999). Provavelmente a Hsp70 seria requerida para estabilizar as proteínas necessárias para transição morfológica (Borges-Walmsley et al., 2002).

O gene da proteína mitocondrial Hsp60 de *P. brasiliensis* foi clonada e caracterizada e a proteína recombinante foi reativa com soro de pacientes com PCM (Izaac et al., 2001, Cunha et al., 2002). Esta proteína foi identificada em diversas localidades extramitocondriais, inclusive na parede celular (Passos et al., 2003). Recentemente foi visto que esta molécula pode ter papel protetor em modelo de PCM experimental (Soares et al., 2005).

A expressão de alguns genes durante a transição dimórfica do Pb18 foi verificada através de RT-PCR quantitativo (Goldman et al., 2003, anexo). Os genes putativos da hidrofobina, isocitrato liase, malato desidrogenase, entre outros, aparecem altamente expressos na fase miceliana, enquanto os genes da *HSP70*, *HSP82*, *HSP104*, ubiquitina (*UBI*) e delta-9-desaturase (*OLE1*) apareceram preferencialmente na fase leveduriforme. Durante a transição de micélio para levedura os genes de estresse apresentaram aumento de 5 vezes nas primeiras 5 horas, seguido por níveis constantes de expressão e diminuição após 48 horas.

Na análise *in silico* feita por Felipe et al. (2003), os genes que codificam Hsp70, Hsp60 e Hsp104 foram encontrados significativamente aumentados na fase leveduriforme do Pb01, enquanto os homólogos que codificam Hsp82, Hsp10, Hsp30 e Hsp88 foram preferenciais na forma miceliana. É curioso que *HSP82* tem regulação oposta nas análises de Goldman et al. (2003) e Felipe et al. (2003), o que poderia ser explicado por um comportamento distinto dos isolados analisados (Pb18 x Pb01). O *PbGP43*, por exemplo, parece ser reprimido durante o choque térmico no Pb3, enquanto não sofre alteração significativa no Pb18, segundo nossos ensaios de RT-PCR em tempo real na publicação de Carvalho et al. (2005, anexa).

No trabalho de Nunes e colaboradores (2005), usando a técnica de "microarray", os autores observaram que entre 25 genes *HSPs*, 22 tiveram seu perfil de expressão alterados durante a transição para levedura. Entre eles, aproximadamente 70 % foram claramente induzidos após mudança de temperatura (primeiras 5 h). Destacam-se *HSP60* e *HSP10*, cujos transcritos mantiveram-se elevados ao final da transição. No trabalho de Felipe e colaboradores (2005), entre 48 sequências que codificam *HSPs* encontradas no banco de EST (Felipe et al., 2003) três apresentaram expressão diferencial na forma de micélio, sendo a calnexina, *CCT7* (*HSP60* citoplasmática) e *SBA1* (*HSP90* "co-chaperone" da *HSP70*) e outras cinco na forma de levedura, *HSP42*, *HSP60*, *SSC1* (*HSP70* mitocondrial) e *HSP90*.

1.2. As proteínas de choque térmico Mdj1 e Lon

1.2.1. Proteínas de choque térmico (Hsps)

Proteínas de choque incluem uma grande classe de moléculas que foram originalmente chamadas de proteínas de choque térmico (Hsp) por terem sido detectadas em tecidos expostos a temperaturas elevadas (revisão em Walter e Buchner, 2002). Todavia as Hsps são induzidas por uma variedade de outras espécies de estresse, incluindo nutricional, osmótico, oxidativo e também por várias substâncias tóxicas. O calor e outros tipos de estresse podem desnaturar as proteínas celulares, que nessa forma passam a exhibir sítios hidrofóbicos normalmente crípticos, os quais levam à interação intra-molecular e consequente agregação. As proteínas de estresse têm a função de proteger a célula de proteínas danificadas (revisão em Walter e Buchner, 2002). Sua indução tem caráter de resposta de emergência, com início rápido e muito intenso. Porém muitas Hsps desenvolvem tarefas essenciais na manutenção das células e são expressas constitutivamente. Nesses casos, sua super-expressão frente ao estresse normalmente tem caráter transitório.

Muitas proteínas de choque térmico são “chaperones” ou “co-chaperones”. Estas moléculas estão envolvidas em processos de várias naturezas, como dobramento de proteínas recém-sintetizadas, passagem de proteínas através da membrana, formação de complexos oligoméricos e facilitação da degradação de proteínas instáveis ou desnaturadas (Feder et al., 1999; Lindquist e Craig, 1988; Lindquist, 1981). Geralmente a interação entre “chaperones” e substrato ocorre em segmentos hidrofóbicos da proteína recém-sintetizada que estão expostos antes da molécula adquirir a conformação final.

Embora a reatividade básica de todos os tipos de “chaperones” seja parecida, suas características estruturais são diversas, assim como sua participação em processos celulares distintos (revisão em Voos et al., 2002). As Hsps foram agrupadas com base na massa molecular e na homologia funcional em: pequenas Hsps, Hsp10s, Hsp40s, Hsp60s, Hsp70s, Hsp90s, Hsp100s e Hsp110s, as quais formam famílias multigênicas (Sghaier et al., 2004). Em eucariotos, muitas destas famílias compreendem múltiplos membros que diferem no padrão de indução, na localização celular e função.

Em leveduras, a indução da expressão de genes *HSP* depende dos fatores Msn2 e Msn4, juntamente com o fator de transcrição de choque térmico (Hsf). Msn2/4 ligam-se a sequências do promotor denominadas elementos de resposta a estresse (STRE), enquanto Hsf liga-se a uma sequência do promotor conhecida como elemento de choque térmico (HSE) (Estruch, 2000).

1.2.2. Mdj1 e a família DnaJ das Hsp40

DnaJ é a denominação dada a um grupo de proteínas de estrutura modular que compartilham similaridades entre 35 e 59 % (revisão em Cry, 1997). Atualmente chamadas de proteínas com domínio J ("J-domain proteins"), estão localizadas em vários compartimentos celulares, onde seu papel primário é regular a atividade da Hsp70 cognata (revisão em Walsh et al., 2004). Foi demonstrado que a DnaJ de *Escherichia coli* é uma proteína de choque térmico (Lidquist e Craig, 1988), cuja síntese encontra-se dez vezes aumentada após indução a 43 °C (Bardwell et al., 1986). Além disso, a DnaJ de bactéria apresenta atividade de tiol-dissulfeto oxidoreductase (Crouy-Chanel et al., 1995; Tang et al., 2001).

Tipicamente, a molécula DnaJ de *E. coli* possui um segmento de 70 aminoácidos próximos ao N-terminal chamado de domínio J, seguido de um segmento rico em glicina e fenilalanina (G/F). Ocupando localização mais central, estão quatro repetições do domínio CxxCxGxG, ligante de Zn⁺⁺, seguido de uma região C-terminal menos conservada. O domínio J e o segmento G/F são suficientes para interação e estimulação da atividade de ATPase das DnaK (Hsp70). A DnaJ também é capaz de se ligar a substratos não dobrados ou agregados, o que a qualifica como uma "chaperone" propriamente dita. Esta interação requer o domínio ligante de zinco e a região C-terminal da molécula (Szabo et al., 1996). O domínio ligante de zinco também funciona como sítio ativo para a atividade redutase de DnaJ em bactérias (Tang et al., 2001). Recentemente foi demonstrado que o domínio C-terminal está diretamente envolvido na dimerização de DnaJ, a qual é necessária para exercer a atividade de chaperone autônoma (Shi et al., 2005).

O domínio J é a região que caracteriza a família. Sua estrutura secundária é formada por 4 α -hélices, sendo que a região da segunda é formada por vários resíduos básicos. Entre a hélice II e III é encontrado um tripeptídeo HPD (histidina-prolina-ácido aspártico) essencial para interação da proteína com Hsp70. Além disso, nas hélices II e III existem resíduos hidrofóbicos em posições conservados da molécula (revisão em Walsh et al., 2004). O motivo HPD está presente em todos os domínios J conhecidos.

A ligação da DnaJ estimula a atividade ATPase da DnaK, que passa a apresentar um ADP no sítio, o qual leva à mudança conformacional da proteína. Nessa forma, a DnaK consegue reter a proteína alvo no seu sítio ligante de peptídeo. A DnaJ abandona o complexo DnaK-proteína alvo e a GrpE (fator de troca de nucleotídeo) estimula a dissociação do ADP do domínio de ATPase, permitindo a substituição por ATP e o retorno ao estado inicial. Este processo pode levar ao reinício do ciclo ou pode ocorrer a associação da proteína alvo com

outro sistema de "chaperones" como, por exemplo, o sistema GroEL/ES. Um ciclo similar ocorre com Hsp70 de eucariotos na presença de Hsp40 e do fator de troca de nucleotídeo. Aparentemente o homólogo de GrpE não está presente no citosol de eucariotos, embora tenha sido detectado na mitocôndria (Hennessy et al., 2005). As chaperones da família Hsp70/DnaK estão envolvidas em inúmeros processos celulares, entre os quais dobramento de proteínas recém-sintetizadas, passagem através da membrana, formação de complexos oligoméricos e facilitação da degradação de proteínas instáveis ou desnaturadas.

Com base na constituição da DnaJ de *E. coli* e de sua homóloga em humanos Hdj1, a família das Hsp40 foi dividida em três categorias, nas quais o tipo I contém todos os domínios conservados da DnaJ de *E. coli*, o tipo II não contém a região ligadora de zinco e o tipo III apresenta apenas um domínio J que pode estar localizado em qualquer parte do polipeptídeo (Fliss et al., 1999). Aparentemente as proteínas do tipo I são aquelas responsáveis pelo dobramento de proteínas (Terada et al., 1997; Lu & Cyr, 1998).

Atualmente são conhecidas vinte e duas ORFs no genoma de *S. cerevisiae* que codificam proteínas com domínio J conservado, entre as quais 5 pertencem ao tipo I (Ydj1, Apj1, Xdj1, Mdj1 e Scj1), 4 ao tipo II (Sis1, Djp1, Caj1 e Hlj1) e a grande maioria ao tipo III (Zuo1, Swa2, Jjj1, Jjj2, Jjj3, Cwc23, Mdj2, Pam18, Jac1, Jid1, Jem1, Sec63 e Erj5). Apenas 5 delas apresentam localização mitocondrial, a saber: Mdj1, Mdj2, Pam18, Jid1 e Jac1. A Mdj2 e a Pam18 auxiliam a translocação de proteínas para a matriz mitocondrial, Jac1 está envolvida na biosíntese de "clusters" de Fe/S enquanto que a função de Jid1 ainda não está clara (Walsh, et al., 2004; Voos et al., 2002).

Em levedura, a Mdj1 é a única DnaJ mitocondrial do tipo I e é essencial na biogênese da mitocôndria funcional (Rowley et al., 1994). A proteína é composta de 511 aminoácidos e apresenta uma massa molecular de 49 kDa na sua forma madura. Mutantes *mdj1*, apesar de não serem letais a 30 °C mostraram-se inviáveis a 37 °C. Estes mutantes somente cresceram em meio contendo fonte de carbono não fermentável (glicerol) a 24 °C, apresentando um fenótipo frágil com defeito no processo de respiração celular. A proteína Mdj1 não está envolvida no processo de importe mitocondrial, mas sim com o dobramento correto de proteínas mal formadas evitando a formação de agregados proteicos na matriz mitocondrial (Westermann et al., 1997; Prip-Buus et al., 1996). Além do seu papel na biogênese das proteínas mitocondriais, Mdj1 também participa da manutenção da integridade do DNA mitocondrial (mtDNA). Os mutantes *mdj1* apresentaram diminuição na atividade da DNA polimerase mitocondrial em condições de temperatura mais elevada, resultando em perda rápida do mtDNA. Aparentemente a DNA polimerase mitocondrial seria um alvo de Mdj1

nestas condições (Duchniewicz et al., 1999). O domínio J e o segmento G/F são suficientes para interação e estímulo da atividade de ATPase da Hsp70 e para a manutenção da integridade do DNA mitocondrial (Lisse & Schwarz, 2000). A função da região C-terminal de Mdj1 não é totalmente conhecida.

Em levedura, o sistema da Ssc1 (mtHsp70)/Mdj1 (mtHsp40) está envolvido na manutenção da configuração correta das proteínas mitocondriais, mas também tem a função de manter sua solubilidade em estado desnaturado para degradação pela proteinase Lon e outras proteinases ATP-dependentes induzíveis pelo choque térmico (Wagner et al., 1994; Savel'ev et al., 1998).

A importância da DnaJ mitocondrial foi explorada também em organismos superiores. Em *Drosophila melanogaster* foi identificado um gene supressor de tumor que codifica uma DnaJ da matriz mitocondrial do tipo I de 56 kDa, denominada Tid56, para a qual os mutantes exibiram um fenótipo letal (Kurzik-Dumke et al., 1995). O homólogo humano é o hTid-1, cujo gene sofre processamento diferencial possivelmente por "splicing" alternativo que leva à formação de duas proteínas, uma com 43 kDa e outra com 40 kDa (respectivamente hTid-1_L e hTid-1_S), ambas capazes de interagir com Ssc1 (Syken et al., 1999). A expressão de cada uma das duas variantes provocou efeitos opostos na habilidade da célula responder a um estímulo apoptótico exógeno: enquanto a expressão de hTid-1_L aumentou a apoptose desencadeada por TNF α e por mitomicina c, hTid-1_S foi capaz de suprimi-la. Ambos os efeitos foram revertidos por mutação nos respectivos domínios J. Desta forma, o produto do gene *TID1* modularia o sinal transducional de apoptose (Syken et al., 1999).

1.2.3. Proteinase Lon

Em bactéria, um grupo de proteinases ATP-dependente é super-expressado durante o choque térmico. Entre elas encontra-se a proteinase Lon, uma serino proteinase homooligomérica, cujo gene foi originalmente caracterizado em *E. coli* (Chin et al., 1988). Em eucariotos, o gene *LON* (ou *PIM1*) foi inicialmente caracterizado em *Saccharomyces cerevisiae* (Suzuki et al., 1994; van Dyck et al., 1994) e em humanos (Wang et al., 1993), onde a proteína é sintetizada no citoplasma, mas é importada para a matriz mitocondrial.

Lon é uma proteína multifuncional: participa de processos de degradação rápida de proteínas anormais, degradação de proteínas mitocondriais regulatórias de meia-vida curta, pode estar envolvida com regulação gênica (Langer e Neupert, 1996; Fu et al., 1997) e virulência (Robertson et al., 2000, Boddicker e Jones, 2002) em bactéria. A ausência do gene

LON gera leveduras deficientes em atividades proteolíticas ATP-dependente na matriz mitocondrial, com acúmulo de partículas eletrondensas. As mutantes são incapazes de crescer em meios contendo carbono não-fermentáveis (como única fonte de carbono), em consequência das deleções no genoma mitocondrial (Van Dyck et al., 1994; Suzuki et al., 1994). A base molecular deste fenótipo não está muito clara, mas a propriedade peculiar da Lon de bactérias e humanos de se ligar em DNA simples fita em um sítio específico sugere um papel direto desta protease no metabolismo do DNA mitocondrial (Fu et al., 1997; Fu et al., 1998).

Em *S. cerevisiae*, a proteinase Lon, ou PIM1, é um heptâmero com unidades de 117 kDa (Stahlberg et al., 1999). É expressa constitutivamente, porém sua expressão aumenta transitoriamente após choque térmico (van Dick et al., 1994). A proteinase Lon é capaz de clivar ligações peptídicas de uma grande variedade de proteínas, especialmente quando desnaturadas, e de alguns peptídeos (revisão em Goldberg et al., 1994). A degradação rápida de proteínas, mas não de peptídeos sintéticos, é dependente de ATP.

“In vivo”, a atividade de Lon em bactéria depende da presença de proteínas de estresse do tipo DnaK (Hsp70), GrpE e DnaJ (Hsp40), o mesmo ocorrendo na mitocôndria de leveduras, onde o complexo é formado pelas correspondentes mitocondriais SSc1, Mge1 e Mdj1 (Wagner et al., 1994). Resultados prévios sugerem que os substratos a serem digeridos pela Lon são selecionados na bactéria pela DnaJ (Huang et al., 2001). Foi demonstrado experimentalmente que essa molécula é essencial na formação do complexo Lon/substrato, do qual a Ssc1 parece fazer parte. Foi verificado também que o tempo de interação entre as proteínas desnaturadas e DnaJ é mais longo quando estão condenadas à clivagem proteolítica. Desta forma, as proteínas mal-formadas são impedidas de agregar (ou seja, são mantidas em estado solúvel), facilitando o ataque hidrolítico. Ao mesmo tempo, estão sendo expostos sítios proteolíticos hidrofóbicos naturalmente críticos em conformação correta. Ainda não está esclarecido se DnaJ e DnaK influenciam na degradação independentemente ou em conjunto (Huang et al., 2001).

Em *P. brasiliensis*, um gene homólogo ao da proteinase Lon (*PbLON*) foi clonado e sequenciado pelo nosso grupo (Barros e Puccia, 2001). Esse gene foi fortuitamente detectado por PCR com oligonucleotídeos destinados a sintetizar um fragmento da serino-tiol extracelular (Puccia et al., 1999). *PbLON* é constituído de 3.369 pb interrompidos por dois introns localizados na região 3' do gene, e origina uma proteína de 1.063 aminoácidos com alta identidade com Lon de *S. cerevisiae* (73%) e de *Schizosaccharomyces pombe* (71%). A proteinase Lon homóloga de *P. brasiliensis* (*PbLon*) possui regiões conservadas de ligação

com ATP e sítio catalítico de serina a Cys656, e a região conhecida como SSD ("sensor-and-substrate-discrimination"). Na região 5' flanqueadora do gene há vários elementos semelhantes aos de ligação de fatores de transcrição para resposta ao estresse e controle do metabolismo do nitrogênio. A exemplo das homólogas de eucariotos, a sequência deduzida de *P. brasiliensis* possui na porção N-terminal elementos de direcionamento mitocondrial.

Em *P. brasiliensis*, um gene homólogo ao *MDJ1* de *S. cerevisiae* foi parcialmente sequenciado (*PbMDJ1*) adjacente ao *PbLON*, em direção oposta, e provavelmente compartilhando elementos de transcrição (Barros e Puccia, 2001). A porção 5' do *PbMDJ1* foi encontrada em um fragmento genômico *Sma*I contendo *PbLON* completo. Essa organização cromossomal pode ser relevante, já que Mdj1p é essencial na degradação de substratos pela Lon em *S. cerevisiae* (Rowley et al., 1994; Lisse et al., 2000). A região do *PbMDJ1* presente no fragmento *Sma*I possui uma ORF onde foram encontradas a região conservada do domínio J, seguida de um segmento rico em G/F e três repetições do domínio CxxCxGxG. O fragmento *Sma*I abriga cerca de 50% do gene total.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram:

- 2.1. Clonar e caracterizar o gene *PbMDJ1* de *P. brasiliensis*;
- 2.2. Expressar gene *PbMDJ1*, purificar a proteína recombinante e obter anticorpos policlonais;
- 2.3. Analisar a localização celular da *PbMdj1* em *P. brasiliensis*;
- 2.4. Mapear os elementos de transcrição contidos na região 5' intergênica comum entre os genes *PbMDJ1* e *PbLON* (região ML);
- 2.5. Analisar a expressão dos genes *PbMDJ1* e *PbLON* no *P. brasiliensis* em situação de choque térmico e durante transição de fase.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Soluções e tampões

Todas as soluções eram preparadas com água bidestilada e deionizada, autoclavadas a 120 °C por 20 min ou filtradas em sistema Millipore, e armazenadas apropriadamente.

- **Solução de acrilamida-uréia 6 %** - 81 mL de acrilamida/bis 40 % (38 % de acrilamida/ 2 % de bis-acrilamida), 252 g de uréia e água autoclavada até completar 540 mL. Após filtração em sistema Millipore (0,45 µm), a solução era armazenada a 4 °C, em frasco escuro.
- **Solução de acrilamida-uréia para gel de sequenciamento** - 90 mL de solução de acrilamida-uréia 6 % e 10 mL de TBE 10x. Depois de deaerada por 5 min, a solução era adicionada de 267 µL de APS 10 % e 100 µL de TEMED.
- **Solução estoque de acrilamida/bis 30 % para gel de proteína** – 30 % de acrilamida, 0,8 % de bis-acrilamida e água bidestilada 100 mL q.s.p.
- **Tampão para gel de proteína (separação) desnaturante** - Tris-HCl 0,75 M, pH 8,8, contendo 0,2 % de SDS (p/v).
- **Solução estoque de acrilamida/bis 12 % para gel de proteína** – 12 % de acrilamida, 1,2 % de bis-acrilamida e água bidestilada 100 mL q.s.p.
- **Tampão para gel de proteína (empacotamento) desnaturante** - Tris-HCl 0,25M, pH 6,8, contendo 0,2 % de SDS.
- **Tampão de corrida para SDS-PAGE** - Tris 25 mM, glicina 190 mM, pH 8,3, e 0,1% de SDS (p/v).
- **Tampão de transferência** - Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e 20 % de metanol.
- **STET** - 50 mM de Tris-HCl pH 8,0, 50 mM de EDTA, 8 % de sacarose, 5 % de Triton X-100.
- **TBE 10x** - 108 g/L de Tris-base, 55 g/L de ácido bórico, 3,72 g/L de EDTA e água, pH 8,3.
- **TE** - 10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, pH 8,0.
- **SSC 20x** - 0,15 M de cloreto de sódio, 0,015 M de citrato de sódio, pH 7,0-8,0.
- **Solução de pré-hibridização para hibridização de DNA** - 5 % de dextran sulfato, líquido de bloqueio 1:20 (Gene Image - Amersham), SDS 0,1 %, SSC 5x.

- **Solução de denaturação** - 1,5 M de cloreto de sódio e 0,5 de M hidróxido de sódio.
- **Solução de depuração** - 250 mM de ácido clorídrico.
- **Solução de neutralização** - 1,5 M de cloreto de sódio, 0,5 M de Tris-HCl, pH 7,0.
- **Denharts** - Ficoll (Tipo 400) 1 %, polivinilpirrolidona 1 % e BSA 1 %.
- **PBS** – 1,15 g de Na₂HPO₄, 8 g de NaCl, 0,2 g de KH₂PO₄ e água para 1000 mL.

3.2. Meios de cultura e crescimento de microorganismos

3.2.1. Meio LB: Para crescimento e manutenção de bactérias. Composto de 1 % de triptona (BioBrás), 0,5 % de extrato de levedura (BioBrás) e 1 % de NaCl, pH 7,3.

3.2.2. Meio LB Amp: Meio LB acrescido de 100 µg/mL de ampicilina no momento do uso. Em meio LB sólido, os antibióticos eram adicionados quando a temperatura estava menor que 60 °C.

3.2.3. Meio YPD modificado (YPDmod): Para crescimento e manutenção de culturas *P. brasiliensis* na forma leveduriforme. Composto de 0,5 % de extrato de levedura (BioBrás), 1 % de peptona de caseína (BioBrás) e 0,5 % de dextrose (Sigma).

3.2.4. Meio SOC: 20 g/L de bacto-triptona (BioBrás), 5 g/L de extrato de levedura (Difco), 0,5 g/L de cloreto de sódio, 20 mL de glicose 1 M, 10 mL de cloreto de potássio 250 mM, 5 mL de MgCl₂ 2 M e H₂O até 1000 mL.

Os meios de cultura eram preparados com água bidestilada e esterilizados por autoclavagem a 120 °C, por 15 min. As formulações abaixo eram seguidas na preparação dos meios líquidos. Para a preparação de meios sólidos, eram adicionados 1,8 % de ágar (BioBrás). Para a manutenção de linhagens de bactérias a -70 °C, era adicionado 20 % de glicerol (v/v) ao meio líquido.

As culturas bacterianas eram crescidas em meio líquido a 37 °C, com agitação de 150 a 200 rpm.

3.3. Microorganismos

As cepas bacterianas selvagens e recombinantes eram mantidas em meio LB com repiques regulares ou congeladas a -70 °C na presença de glicerol (20 %).

Os plasmídios eram mantidos na bactéria *Escherichia coli* DH5 α , genótipo F, ϕ 80d *lacZ*- Δ M15, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17* (r_k^- , m_k^+), *supE44*, *relA1*, *deoR*, Δ -(*lac ZYA-arg F*) U169, *phoA* (Hanahan, 1985).

A expressão de proteína recombinante era feita em *E. coli* BL21pLysS, genótipo F *ompT*, *hsdS_B* (r_B^- , m_B^-), *gal*, *dcm*, λ (DE3), pLysS (Cm^r) (Studier e Moffatt, 1986).

3.4. Isolados de *Paracoccidioides brasiliensis*

Os isolados de *P. brasiliensis* utilizados neste trabalho eram crescidos em meio YPDmod líquido, a 37 °C (levedura) ou 26 °C (micélio) sob agitação de 100 – 150 rpm. Foram utilizados os isolados Pb339, Pb18, Pb5, Pb12 e Pb3 (descritos em Morais et al., 2000). Experimentos de imunolocalização utilizaram a Pb18, experimentos de mapeamento de elementos de transcrição utilizaram Pb18, Pb3 e Pb339 e todas foram comparadas em sequenciamento de região promotora.

3.5. Extração de DNA

Para a extração de DNA de *P. brasiliensis*, células fúngicas leveduriformes com 5 dias de crescimento em YPD sólido eram utilizadas na obtenção de um pré-inóculo com 4 a 7 dias de crescimento em 100 mL de meio YPDmod líquido. Este era transferido para 900 mL de meio fresco e cultivado por mais 7 – 10 dias. A cultura era filtrada em filtro de papel comum (duas camadas) para separar as células do sobrenadante. A extração de DNA era feita segundo o método descrito por Cisalpino et al. (1994), com modificações. As células do fungo, aproximadamente 10 mL, eram lisadas mecanicamente por trituração em gral, na presença de nitrogênio líquido, até a formação de um pó. Este era ressuscitado em 25 mL de uma solução 50 mM de Tris, 100 mM de EDTA, 5 % de sarcosil, 500 μ g/mL de proteinase K e lisado por 15 min em Potter-Elvehjen. A suspensão era incubada por 2 h a 56 °C e centrifugada para deposição de debris celulares. O DNA do sobrenadante era semi-purificado com 2 extrações de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (50:49:1). À fase orgânica da segunda extração, era adicionado o mesmo volume de 100 mM de Tris-HCl pH 9,0, 100 mM de EDTA. Um volume de isopropanol era adicionado ao sobrenadante e mantido durante a noite a –20 °C, para facilitar a precipitação do DNA. O precipitado seco era ressuscitado em 0,5 mL de tampão Tris/EDTA (TE), dissolvido a 65 °C por 10 min, e tratado com RNase (100 μ g/mL) por 1 h a 37 °C. O produto final da extração era dosado por espectrofotometria no aparelho Gene Quant (Pharmacia) e analisado em gel de agarose. As alíquotas eram armazenadas a –20 °C.

3.6. Extração de RNA

As amostras de *P. brasiliensis* utilizadas para a extração de RNA total eram crescidas em 50 mL de meio YPD modificado a 36 °C ou a 25 °C, sob agitação, por 4 – 7 dias. Para o estudo de transição de levedura para micélio (L - M), alíquotas iguais das células crescidas a 36 °C eram transferidas para frascos contendo 120 mL de meio fresco, crescidas por 4 dias e então transferidas para 25 °C para ocorrer a transição de fase. As culturas eram recolhidas em tempos de 0, 5, 10, 24, 48 e 120 h após a mudança de temperatura. Para o estudo da transição de micélio para levedura (M - L), um pré-inóculo de células leveduriformes era cultivado por 9 dias a 25 °C para ocorrer a filamentação total antes de distribuir em frascos com meio fresco. A partir daí, seguiu-se o procedimento anterior, porém as temperaturas de crescimento foram inversas (25 ° → 36 °C).

Para a extração do RNA nas condições de estresse térmico, era feito um pré-inóculo em 100 mL crescido por 4 -7 dias a 36 °C, o qual era transferido para 500 mL de meio fresco e cultivado por outros 6 -7 dias. Essas células eram colocadas sob estresse térmico a 42 °C (30 e 60 min) ou 45 °C (15, 30, 60 e 120 min) após o recolhimento de uma alíquota (tempo zero).

O RNA total era obtido pelo método do Trizol (Invitrogen), com modificações. Para o estudo da transição M-L, aproximadamente 1,5 mL de *P. brasiliensis* eram congelados em nitrogênio líquido, transferidos para um gral (previamente gelado) e triturados até a obtenção de um pó fino. Este era ressuscitado em 4 mL de Trizol e novamente triturado em nitrogênio líquido até a formação de um pó de aspecto róseo. Após o descongelamento, este material era distribuído em vários tubos de 1,5 mL (Eppendorf). No estudo da transição L-M e estresse térmico, aproximadamente 1,5 - 2,0 mL de células fúngicas eram lisadas mecanicamente por agitação com pérolas de vidro durante 10 min na presença de 3,5 a 4 mL de Trizol . A partir deste ponto, o procedimento de extração era igual para todas as fases de transição e estresse térmico. Após 10 min de repouso à temperatura ambiente, a mistura era centrifugada (1800 x *g*, por 10 min a 4 °C) para remoção dos fragmentos celulares. Para cada 0,75 mL do sobrenadante eram acrescentados 0,2 mL de clorofórmio e a mistura agitada vigorosamente. Após 10 min de repouso à temperatura ambiente, as fases eram separadas por centrifugação (1800 x *g*, por 10 min a 4 °C) e a fase superior aquosa extraída com igual volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (50:49:1, v:v:v), como descrito anteriormente.

À fase aquosa final era adicionado um volume de isopropanol e acrescentado citrato de sódio 1,2 N / cloreto de sódio 0,8 N (0,25 mL de solução para cada 0,75 mL de Trizol inicial) para precipitação do RNA a -20 °C por toda a noite. O precipitado era recolhido por centrifugação (1800 x *g*, por 10 min a 4 °C), lavado com etanol 75 %, seco e ressuscitado

em água esterilizada. O RNA era quantificado por espectrofotometria (GeneQuant), analisado em gel de formaldeído para verificar a integridade do material extraído, aliquotado e armazenado a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.7. Oligonucleotídeos iniciadores

3.7.1 Oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR, sequenciamento de DNA, 3' e 5' RACE, RT-PCR.

Oligos	Direção	Sequências
511	anti-senso	5' GACTCGAGTCGACATCGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3'
512	anti-senso	5' GACTCGAGTCGACATCG 3'
A7	anti-senso	5' CCG CTT TGT ACC CTG TTT 3'
2A7	anti-senso	5' TACCATTTTTTGCCTGCC 3'
2A9	anti-senso	5' CTAGAGGCAGATGGTAAG 3'
D4	senso	5' CGTGAGCAAAGACCACT 3'
2B3	senso	5' CACAATAACGGCAACAAG 3'
2B4	anti-senso	5' GTTGTGTTATTGCCGTTG 3'
2B5	senso	5' ATTCAGCAGGTCTGGTTC 3'
2B7	senso	5' GAGTCAACTAGATGCCTA 3'
B2	anti-senso	5' CGT GAC GTA TGG AGG AGA 3'
B3	senso	5' CTC CCG GCT CGT CTC CTC 3'
B4	anti-senso	5' TGG TGG TGG GTT CTC TGC 3'
D10	anti-senso	5' GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC 3'
E4	anti-senso	5' GCC GCA CGA GGA ACA GG 3'
E5	anti-senso	5' CTT TCA CGC ATC TTC TCC 3'
E8	senso	5' TGTAGCTTGGGAGGGAGAA 3'
G5	senso	5' TGCCTTTGCGGGTGGTTC 3'
SP6	anti-senso	5' ATT TAG GTG ACA CTA TAG AA 3'
T7	senso	5' TAATACGACTCACTATAGGGCGA 3'

3.7.2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de RT-PCR quantitativo em tempo real.

Com o sistema TaqMan (Applied Biosystems)

Oligos	Direção	Sequência
PbLON	senso	5' CCC TAC TCT CAC TTG CCC TCA 3'
	anti-senso	5' CCG TCA CAG TAA GTT CGC CA 3'
PbMDJ1	senso	5' GGC ATT CGA CCA AAA TGG C 3'
	anti-senso	5' CCG GAG AAT GGA CCA G 3'
HSP70	senso	5' GACCACACCCTCGTTCGTTG 3'
	anti-senso	5' ACTTGATTTTTGGCGGCATC 3'
HSP82	senso	5' ACCGCTGGTGCCGATATTT 3'
	anti-senso	5' GGCCACGAGGTAGGCAGAG 3'
HSP104	senso	5' CGAAATCCATGCTCTGGCTC 3'
	anti-senso	5' TGTTTGGCAGCCTCGAGTC 3'
UBI	senso	5' TCCTCCTGACCAGCAACGTC 3'
	anti-senso	5' ATCAGAAAGGGTGCGACCG 3'
β-TUB	senso	5' TGG CCA CTT TCT CTG TCG TTC 3'
	anti-senso	5' CAG GGT GGC ATT GTA GTA TGG CT 3'
Sondas	Sequência	
PbMDJ1	5' 6FAM TTC AAT CCT GGC GCC CAT GAC G- TAMRA 3'	
PbLON	5' VIC TCC CAT CGA CCC TAC AAT TGC CAT GA- TAMRA 3'	
HSP70	5' 6FAM - CTTACAGACACCGAGCGTCTGATCGT- TAMRA 3'	
HSP82	5' TET -TGATTGGTCAGTTTGGTGTCGGCTTCT- TAMRA 3'	
HSP104	5' TET -AAAAGGATGCGGCGTCGAAGGC- TAMRA 3'	
UBI	5' VIC -TTTTCGCCGCAAGCAGTTGGAG- TAMRA 3'	
β-TUB	5' VIC TTC GCC CAA AGT CTC CGA CAC CG- TAMRA 3'	

Abreviatura dos fluoróforos: VIC – patentiado por Applied Biosystems

6FAM – 6-carboxifluoresceína

TAMRA – 6-carboxi-*N,N,N',N'*-tetramethylrhodamine

TET – 6-carboxi-4,7,2',7'-tetraclorofluoresceína

Estes oligonucleotídeos e sondas utilizados nos ensaios RT-PCR quantitativo em tempo real foram desenhados a partir de sequências obtidas do banco de EST (<http://143.107.203.68/pbver2/default.html>).

Com o sistema Syber Green (Applied Biosystems)

Oligos	Direção	Sequência
PbMDJ1	senso	5' CGGCACATAAAGATCACCAACGC 3'
	anti-senso	5' CGAGTGCCTGGAGAGGGAGAT 3'
PbLON	senso	5' CGGCCTATCACATCTCTATCCGC 3'
	anti-senso	5' GCAGCCATACAGGAAATGATGAA 3'
α-TUB	senso	5' CGGCTAATGGAAAATACATGGC 3'
	anti-senso	5' GTCTTGGCCTTGAGAGATGCAA 3'

3.7.3. Oligonucleotídeos utilizados em EMSA

Oligos	Sequência (5' → 3')
AP1	ATCTTAGTCATCCAACGCCC
	TAGAATCAGTAGGTTGCGGG
HSE1	CTTTGTTCCACGAAAAATGGCATCTT
	GAAACAAGGTGCTTTTTACCGTAGAA
HSE2	TACTTGATCAACTCGGAGAACCTCGTCAATAG
	ATGAACTAGTTGAGCCACTTGGAGCAGCTTATC
HSE3	AGAAGAAGGGAATTTGCCGAGTGA
	TCTTCTCCCTTAAACGGCTCACT
BS10*	TGTATAAATATCTGCTGTCA
	ACATATTTATAGACGACAGT

* oligonucleotídeo utilizado como controle negativo das reações (Morais, 2003).

3.8. Clonagem e Transformação

Os produtos de PCR eram purificados a partir do gel de agarose através dos kits de isolamento de ácidos nucléicos "Concert Gel Extraction Systems" (GibcoBRL) e "Perfectprep Gel Cleanup" (Eppendorf). O material resultante era estimado de acordo com a intensidade da banda do padrão de peso molecular.

A clonagem do produto de PCR era feita em vetor pGEM-T (Promega) com a enzima T4 DNA ligase de acordo com as especificações do fabricante e usando os reagentes fornecidos pelo kit pGEM-T easy (Promega). A razão molar de vetor : inserto era de 1:3.

O produto de ligação era utilizado para transformar bactérias competentes *E. coli* DH5 α . 0,1 mL de bactérias competentes descongeladas em gelo eram transferidas para tubos de microcentrífuga esterilizados e incubados em gelo por 30 min com o produto de ligação. O

produto era submetido a um choque de 42 °C por 90 seg, imediatamente colocado no gelo por 2 min e diluído com 0,4 mL de meio SOC. As bactérias eram incubadas a 37 °C sob agitação por 1 h e semeadas em meio seletivo LB/amp impregnado com 87,5 µg/mL de X-Gal e 0,1 mM de IPTG, para a seleção de colônias transformadas com plasmídeo (colônias brancas) ou sem inserto (colônias azuis).

3.9. Mini-preparação plasmidial por fervura

As colônias isoladas eram cultivadas em meio líquido LB/amp por 18h a 37 °C, sob agitação. As bactérias transformadas (2 mL) eram centrifugadas em microcentrífuga, as células precipitadas eram ressuspensas em 360 µL de STET, aos quais eram adicionados 40 µL de lisozima (10 mg/mL) preparada na hora do uso. A suspensão era fervida por 1 min e imediatamente centrifugada por 15 min. O precipitado era descartado e o DNA do sobrenadante precipitado com um volume de isopropanol, por 15 min a -70 °C (para aumentar o rendimento). O precipitado obtido por centrifugação era seco e ressuspendido em 50 µL de H₂O contendo RNase/EDTA (50 µg/mL e 1 mM respectivamente). A dissolução era feita a 65 °C por 10 min, seguida de incubação por 3 h a 37 °C, para a digestão do RNA.

3.10. Mini-preparação plasmidial por lise alcalina

As preparações de plasmídeos pelo método da lise alcalina eram realizadas a partir de colônias removidas de placas contendo meio seletivo, semeadas em LB/amp líquido e incubadas a 37 °C por 18 h, sob agitação. As bactérias eram precipitadas por centrifugação (10.000 x *g*) a partir de 2 mL de cultura e ressuspensas por agitação vigorosa em 200 µL de uma solução contendo 50 mM de glicose, 25 mM de Tris-HCl, pH 8,0 e 10 mM de EDTA, pH 8,0 (solução 1). Eram adicionados 400 µL de solução 2 (NaOH 0,2 M e SDS 1 %), a mistura era homogeneizada levemente e acrescida de 300 µL de solução 3 (acetato de potássio 3 M e ácido acético 5 M). O material era centrifugado por 15 min a 10.000 x *g* e o DNA plasmidial do sobrenadante era precipitado em 1 volume de isopropanol, seguido de centrifugação. O DNA plasmidial era seco e ressuspendido em uma solução contendo RNase 50 µg/mL.

3.11. Digestão de DNA com enzimas de restrição

Os plasmídeos resultantes de mini-preparações eram digeridos com endonucleases de restrição para a verificação da presença do inserto e/ou da natureza da construção dos

plasmídeos de expressão e para o estudo de funcionalidade da região promotora. As condições de restrição eram as mesmas para todas as enzimas, a saber, 5 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM de NaCl, 1 mM de MgCl₂ e 0,01 mg/mL de BSA. As digestões eram feitas por 1 h (no mínimo), seguindo a concentração de enzima sugerida pelo fabricante (Fermentas) a 37 °C.

A análise do material digerido pelas enzimas de restrição era feita por eletroforese horizontal em gel de agarose impregnado de brometo de etídeo (1 µg/mL), usando TBE como tampão em corrida, a qual era realizada a 5 V/cm. Como padrão de peso molecular, eram utilizados o DNA de fago λ digerido com *Hind*III (Fermentas) e de φX-174 RF digerido com *Hae*II (Amersham Pharmacia).

3.12. Sequenciamento manual de DNA

O método de sequenciamento de DNA utilizado era o de terminação de cadeia por dideoxynucleotídeos (Sanger et al., 1977).

Em um tubo Eppendorf, 32 µL da solução contendo DNA plasmidial fita dupla (1,5 a 2,0 µg) era desnaturado com hidróxido de sódio 2 M (8 µL) por 20 min, após vigorosa agitação, e precipitado com a adição de 7 µL de acetato de sódio (pH 5,2), 4 µL de água e 120 µL de etanol gelado. A mistura era incubada a -70 °C por 15 min e centrifugada por 15 min. O precipitado era lavado com etanol 70 %, seco e ressuspendido em 10 µL de água bidestilada, aos quais era adicionados 1 µL de oligonucleotídeo iniciador (10 µM) e 2 µL do tampão concentrado Tris-HCl 1 M (pH 7,6), cloreto de magnésio 1 M, DTT 160 mM. Após agitação e rápida centrifugação, a mistura era incubada por 5 min a 65 °C, 10 min a 37 °C e 5 min à temperatura ambiente.

A marcação era imediatamente iniciada através da adição de 3 µL da mistura de marcação (1,375 µM de cada dNTP não radioativo e 333,5 mM de cloreto de sódio), 1 µL de [α 35S] dATP (10 µCi), 160 mM e 2 µL de T7 DNA polimerase (1,6 U). A mistura era incubada por 5 min à temperatura ambiente e 5 min a 37 °C e transferida (4,5 µL/tudo) para cada uma das quatro (A,T,G,C) misturas de terminação (2,5 µL) pré-aquecidas. Estas eram compostas de Tris-HCl 40 mM (pH 7,6), cloreto de sódio 50 mM, 93,5 µM do respectivo dideoxynucleotídeo. Os componentes eram cuidadosamente misturados, incubados por 5 min a 37 °C e a reação era interrompida pela adição de 5 µL de solução contendo formamida deionizada 97,5 %/ azul de bromofenol 0,3 % / xileno-cianol 0,3 % / EDTA 10 mM (pH 7,5). As reações de sequenciamento eram fervidas e imediatamente resolvidas em gel de poliacrilamida ou armazenadas a -20 °C.

A eletroforese para sequenciamento era feita no "Sequencing System Model AS" (Gibco, BRL), segundo as instruções do fabricante, em géis de poliacrilamida-uréia (6 %) em TBE. As corridas eletroforéticas eram realizadas a 45 °C, por 1 – 5 h, a 2100 V, 40 W, 400 mA. As amostras eram previamente desnaturadas por fervura (10 min) e aplicadas no gel após uma pré-corrída. Os géis eram secos e expostos a um filme de raios-X (X-Omat, Kodak) a -70 °C.

As análises dos dados de sequenciamento eram feitas com o programa Lasergene (DNASTar Inc).

3.13. Sequenciamento automático

As reações para o sequenciamento automático eram realizadas no Centro de Estudos do Genoma Humano na USP, no aparelho MegaBACE 1000, utilizando o DYEnamic ET Dye Terminator Kit (com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase), tendo como molde o DNA plasmidial dupla fita preparado pelo método da lise alcalina.

3.14. Tratamento do RNA com DNase I

A reação para eliminação de DNA das prerarações de RNA era feita em um volume final de 10 µL, onde 2-5 µg de RNA total, 1.1 – 3 U de DNase I (Pharmacia) e 1 µL de tampão (200 mM de Tris, pH 8,3, 500 mM de KCl e 20 mM de MgCl₂) eram incubados à temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, era adicionado 1 µL de EDTA (25 mM) e o material incubado por 10 min a 65° C. Algumas modificações foram necessárias para o tratamento das amostras de RNA de transição de micélio → levedura (M-L), onde eram utilizados 5 U da enzima DNase I (Promega) e 2 h de incubação a 37 °C.

3.15. 3' RACE e RT-PCR

O DNA complementar era feito com o "ThermoScript™ RT-PCR System" (Invitrogen). A primeira fita era sintetizada em volume final de 20 µL, a partir de RNA total livre de DNA (2.5 µg) e com 1 µM do oligonucleotídeo iniciador (511, para a estratégia do 3' RACE) ou internos da sequência de *PbMDJ1* (E4 ou 2A7), incubados a 65 °C por 5 min e 1 min no gelo. Em seguida, era adicionado o tampão de síntese do cDNA (0,05 M Tris-HCl, pH 8,3, 0,075 M KCl, 3 mM MgCl₂, 0,01 M DTT, 1 mM dNTP, 2 U/mL de RNaseOUT e 10 U da transcriptase reversaThermoScript) e a mistura incubada a 55 °C por 50 min e 85 °C por 5 min. Após a síntese de cDNA, o RNA era removido com 0,1 U/mL RNase por 20 min a 37 °C. A primeira fita

de cDNA servia como molde em reações de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores interno senso do gene (B4) e um anti-senso correspondente à sequência cassete (512). As reações (25 µL) eram feitas em 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 10 mM de Tris-HCl, pH 9,0, 200 µM de cada dNTP, 1 µM de cada iniciador e 5 U de *Taq* Platinum polimerase (Invitrogen). As amplificações eram feitas em termociclador (PTC-200/ MJ Research), por 5 min a 94 °C, seguidos de 35 ciclos a 94 °C por 1 min, 52 °C por 1 min e 72 °C por 3 min e finalizados por uma extensão por 7 min. A reação do controle negativo (para verificar se o tratamento com DNase I foi eficiente) era realizada na ausência da enzima transcriptase reversa. A partir do produto desta amplificação uma segunda reação de PCR era feita utilizando um segundo oligonucleotídeo senso específico da sequência de *PbMDJ1* e o anti-senso 512. Como controle positivo, era utilizado o vetor pUC18 *Sma*I contendo o inserto *PbLON/PbMDJ1* de *P. brasiliensis* (Barros e Puccia, 2001), utilizando os iniciadores B3/E4.

3.16. "Southern blot"

As análises de "Southern blot" eram realizadas com o "Gene Images CDP-Star detection module" seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. Para analisar os produtos de PCR do 3' RACE, as amostras eram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1 %). Após a separação das bandas, o gel era tratado com tampão de depuração por 20 min, tampão de desnaturação por 30 min, tampão de neutralização por 30 min. O produto de PCR era transferido por capilaridade para a membrana de náilon (Hybond N+ Amersham) em tampão SSC 20x por toda a noite. O DNA era fixado na membrana sob a luz UV no aparelho "GS Gene linker" (BioRad).

As membranas eram colocadas em solução de pré-hibridização por 4 h a 60 °C. A sonda (25-50 ng/µL) era marcada com [α^{32} P] dCTP segundo instruções do fabricante do kit "Gene Images Random Prime Labelling Module" (Amersham), desnaturada por fervura por 10 min e adicionada à solução de pré-hibridização. Após incubação por toda a noite, as membranas eram lavadas em condições de alta estringência com SSC 1x / SDS 0,1 % a 60 °C por 15 min e SSC 0,5x / SDS 0,1 % a 60 °C por 15 min. Em seguida, a membrana era equilibrada sob agitação por 1 h em uma solução com líquido de bloqueio diluído 1:10 em tampão A (100 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 9,5). Seguiu-se uma incubação em BSA 0,5 % (em tampão A) com o anticorpo anti-fluoresceína diluído 5.000 vezes, por 1 h sob agitação. Uma terceira etapa constava de três lavagens de 10 min com tampão A acrescido de Tween 20 0,3 %. Por fim, era adicionada uma solução de revelação sobre a membrana, que era exposta

em um filme de raios-X (X-Omat Kodak) em cassete com tela intensificadora por alguns minutos e revelada.

3.17. "Northern Blot"

A análise por "Northern blot" era realizada utilizando 25 µg do RNA total de *P. brasiliensis*, o qual era separado através de eletroforese horizontal em gel de 1 % de agarose contendo formaldeído, na ausência de brometo de etídeo. Após a corrida eletroforética, o gel era lavado com água bidestilada esterilizada e o RNA transferido para a membrana de náilon Hybond-N (Amersham) por capilaridade, com tampão de transferência SSC 10x, por toda a noite. O RNA era fixado na membrana sob luz UV no aparelho "GS Genelinker" Bio Rad.

As membranas eram pré-hibridizadas por 2 h a 42 °C em 50 % de formamida, SSC 6x, solução de Denhardt 2x e SDS 0,1 %. A marcação com [α^{32} P] dCTP do fragmento B3/2A7 do gene de *PbMDJ1* era feita com o kit "RadPrime DNA Labeling System" (Invitrogen), segundo as especificações do fabricante. A sonda marcada radioativamente era desnaturada por fervura e adicionada à solução de pré-hibridização (1×10^6 cpm/mL). Após a incubação por toda a noite, as membranas eram tratadas sob condições de alta stringência de lavagem: SSC 1x, SDS 0,1 % a 42 °C duas vezes de 20 min e SSC 0,2x, SDS 0,1 % três vezes a 68 °C por 20 min. As membranas processadas eram cobertas com papel-filme de PVC (Vitafilme-Goodyear) e expostas ao filme de raios-X (X-Omat-Kodak) a -70 °C em cassete com tela intensificadora.

3.18. Subclonagem do cDNA (parcial) de *PbMDJ1* em vetor de expressão

Um segmento de cDNA de 757 pb correspondente à região 5' da sequência de *PbMDJ1* foi obtido por RT-PCR (oligonucleotídeos iniciadores B3 e A7) e clonado no vetor pGEM-T "easy" (Promega). Para expressão em bactérias, o fragmento do cDNA de *PbMDJ1* foi subclonado no vetor pHIS3 (Sheffield et al., 1999). Este vetor contém o promotor T7, uma sequência de seis histidinas que é transcrita no início da proteína e o gene que confere resistência à ampicilina.

O inserto de cDNA do *PbMDJ1* foi clonado nos sítios *EcoRI* e *SpeI* de pHIS3, e a ligação foi feita na presença de T4 ligase na proporção 1:2 (vetor:inserto). O produto de ligação foi usado para transformar bactérias competentes *E. coli* DH5 α , as quais foram selecionadas pela resistência à ampicilina. Algumas colônias recombinantes foram selecionadas, o DNA plasmidial purificado em pequena escala pelo método de fervura, e os plasmídeos testados para a

presença de inserto por restrição com as enzimas *EcoRI* e *SpeI*. Um clone contendo o fragmento de *PbMDJ1* (pHIS3Mdj1) foi selecionado para as análises posteriores.

3.19. Expressão e purificação de PbMdj1 recombinante

Para a expressão de PbMdj1 recombinante, o plasmídeo pHIS3Mdj1 foi introduzido em bactérias *E. coli* BL21 pLysS e algumas colônias recombinantes pHIS3Mdj1 eram induzidas para a verificação da presença da proteína de *P. brasiliensis*. Para tal, colônias isoladas eram incubadas a 37 °C em meio LB/amp-cloranfenicol, sob agitação, por 18 h. Esse pré-inóculo era diluído 100 vezes em LB/amp-cloranfenicol e cultivado sob agitação até atingir A_{600} de 0.6, quando era adicionado IPTG (0,5 mM) para a indução da expressão por 1 e 3 h. Alíquotas das culturas eram recolhidas e centrifugadas (10.000 x *g*, 1 min), as células ressuspendidas em tampão de amostra (Tris 0,065 M, pH 6,8, glicerol 10 %, SDS 2 %, β -mercaptoetanol 5 % e 0,002 % de azul de bromofenol) e fervidas por 5 min. A análise eletroforética das proteínas era feita em géis de 12 % de poli(acrilamida) com SDS (Laemmli, 1970), no aparato MiniProtean (BIO RAD). Os géis eram corados pelo Coomassie "brilant blue" (Laemmli, 1970) ou transferidos para membrana de nitrocelulose.

A confirmação da expressão da proteína recombinante era feita por análise de Western blot. Após SDS-PAGE, os componentes proteicos individualizados no gel eram submetidos à transferência para a membrana de nitrocelulose 0,45 μ m em tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM e metanol 20 % v/v, pH 8,6) por 1 h e 30 min, a 130 V (aparato Protean III, BioRad). A eficácia da transferência era verificada pela coloração reversível de Ponceau S (0,5 % p/v em ácido acético 5 %), por 5 min. Após observação das bandas transferidas, os padrões de peso molecular eram evidenciados com caneta e a membrana descorada com água destilada. A membrana era incubada com TBS (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4) acrescido de 3 % de BSA por 1 h à temperatura ambiente. A membrana era lavada três vezes com 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl acrescido de 0,05 % de Tween 20, por 10 min cada lavagem. Seguiam-se incubação com TBS acrescido do conjugado Ni-NTA (1/1000) por 1h à temperatura ambiente e três lavagens com TBS acrescido de 0,05 % Tween. A reação era revelada com DAB (diaminobenzidina, Sigma) e/ou por quimioluminescência.

Para análise da solubilidade das proteínas recombinantes em SDS-PAGE, as bactérias induzidas com IPTG eram precipitadas a 10.000 x *g* por 5 min e ressuspendidas em 50 mM de Tris-HCl (pH 7,0), 0.2 M de NaCl e 10 % de sacarose. Em pequena escala, as bactérias eram lisadas com lisozima (300 μ g/mL) por 1 h no gelo e 5 - 15 min a 37 °C. A lise era feita na

presença de 1 mM de PMSF (phenyl methyl-sulphonyl fluoride). A mistura era centrifugada por 5 min a 10.000 x *g* e tanto o sobrenadante, como o precipitado eram analisados em géis de SDS-PAGE 12 %. As bactérias transformantes contendo o gene para expressão de PbMdj1 recombinante eram crescidas em larga escala, induzidas com IPTG por 3 h, centrifugadas e lisadas por sonicação. O precipitado era ressuspenso em tampão (100 mM de NaH₂PO₄, 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0) contendo 8 M de uréia, centrifugado e o sobrenadante era submetido a cromatografia de afinidade em coluna de Ni-NTA (Qiagen), que suporta altas concentrações do sal. As proteínas ligadas eram eluídas com tampões de pH ácido (6,4; 5,9; 4,5). Os protocolos seguidos para purificação da proteína recombinante eram os sugeridos pelo fabricante (Qiagen). O teor proteico da preparação era estimado em gel de SDS-PAGE corado pelo "Coomassie blue" em comparação com quantidades conhecidas de BSA aplicadas no mesmo gel.

3.20. Obtenção e purificação de anticorpos policlonais anti-PbMdj1r

Aproximadamente 300 µg da proteína PbMdj1r purificada foi fracionada em gel de SDS-PAGE 12 %. O gel foi corado com "Coomassie blue" e a banda de ~32 kDa, referente à proteína purificada, foi cortada, macerada e homogenizada em PBS. O homogenizado de gel foi inoculado por via subcutânea em vários pontos no dorso de um coelho, o qual foi previamente sangrado para obtenção de soro controle pré-imune. Após 40 dias o soro do animal foi recolhido, testado e um reforço foi realizado como descrito. Depois de 25 dias foi realizada nova sangria no animal. O soro resultante foi usado nos experimentos subsequentes.

Para preparação da fração IgG, soro de coelho era purificado em coluna de Sepharose-Proteína A (Pharmacia). Para tanto, o soro era diluído 1:5 (v/v) em tampão PBS pH 7,4 e aplicado na coluna. Após lavagem com 10 volumes de tampão PBS, o material era eluído da coluna com 50 mM de glicina pH 3,0. Os eluatos eram imediatamente neutralizados com 50 µL de Tris-HCl 1 M, pH 9,0. Os tubos contendo anticorpos eram dializados em PBS e a concentração em mg/mL estimada pelo valor do comprimento de onda a 280 nm X 0,72.

3.21. Purificação de anticorpo policlonal mono específico anti-PbMdj1r

Aproximadamente 150 µg da PbMdj1r purificada de bactéria era imobilizada em membrana de nitrocelulose 0,45 µm (Amersham) ao longo de uma área de 12 cm² e incubada com solução de bloqueio (PBS contendo 5 % de leite Molico, Nestlé) por 16 h a 4 °C. A membrana era lavada com PBS por 10 min e incubada em gelo por 1 h com soro total anti-

PbMdj1r e/ou IgG purificada diluídos em PBS na proporção de 1:1 (v/v). Após várias lavagens com PBS, os anticorpos eram eluídos com 500 µL de uma solução contendo 50 mM de glicina pH 3,0 e imediatamente neutralizada com 1 M Tris, pH 9,0. A pureza do material eluído era observada em gel de SDS-PAGE 10 % corado pela prata.

3.22. Acoplamento de IgG policlonal de coelho em Affi-Gel 10

O processo de acoplamento de anticorpos em Affigel 10 (BioRad) foi realizado seguindo as instruções do fabricante com algumas modificações. O volume desejado de resina foi lavado 3 vezes com H₂O gelada e uma vez com tampão carbonato de sódio 0,1 M, pH 8,0 (tampão de acoplamento). Anticorpos purificados (20mg totais em 4ml) dialisados em tampão de acoplamento foram adicionados a 1 mL de resina lavada em um tubo de 15 mL e incubados sob agitação leve a 4 °C por toda a noite. Após este período, a resina era incubada, sob agitação em temperatura ambiente por 2 h, com 600 µL de etanolamina 1 M, pH 8,0 para bloqueio dos sítios ativos remanescentes. A resina era empacotada em coluna e lavada com 20 mL de PBS antes do uso.

3.23. Purificação de proteína nativa

A proteína PbMdj1 era purificada a partir de extrato enriquecido de mitocôndrias de *P. brasiliensis* do isolado Pb18 por cromatografia de afinidade em coluna de Affi-Gel 10 (BioRad) acoplada a IgG anti-PbMdj1r, obtida conforme descrita no item 3.25. O extrato de mitocôndria era diluído a 1:10, aplicado em fluxo lento na coluna de afinidade e esta exaustivamente lavada com PBS contendo NaCl 0,5 M, em fluxo rápido, para remoção de proteínas ligadas hidrofobicamente. A proteína era eluída com tampão de ácido cítrico 50 mM, pH 3,0. Frações de 1,5 mL eram coletadas em tudo contendo 130 µL de tampão Tris-HCl 1 M, pH 9,0. O eluato da coluna era dialisado em água destilada e liofilizado, para a redução do volume. A pureza do material concentrado era analisado em SDS-PAGE.

3.24. Extração de proteínas totais da fase leveduriforme de *P. brasiliensis*

O extrato proteico total de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb3) foi obtido a partir de modificações nos protocolos de Srikantha et al. (1995) e Tosco et al. (1997). Células leveduriformes crescidas em meio YPDmod líquido por cerca de 7 dias eram recolhidas e lavadas 3 vezes em PBS. Para cada 1 mL de células eram adicionados 2 mL de uma solução

contendo 200 mM de Tris-HCl, pH 8,0, 400 mM de $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$, 10 mM de MgCl_2 , 1 mM de EDTA, 10 % de glicerol, 1 mM de PMSF, 1 mM de *orto*-fenantrolina e 7 mM de β -mercaptoetanol. As células eram lisadas pela adição de pérolas de vidro e agitação vigorosa em vórtex (10 ciclos, 30 seg intercalados com 30 seg de incubação em gelo). Os "debris" celulares eram separados por centrifugação ($3.000 \times g$ por 15 min) e o sobrenadante submetido a uma ultracentrifugação de $100.000 \times g$ por 3 h (rotor SW55Ti). O sobrenadante era dialisado em uma solução contendo 20 mM de HEPES, pH 8,0, 5 mM de EDTA, 10 % de glicerol, 1 mM de PMSF, 1 mM de *orto*-fenantrolina e 7mM de β -mercaptoetanol e armazenado a -20 ou -70 °C para posterior utilização nos experimentos. A estimativa do teor de proteína do extrato proteico era realizada segundo o método de Bradford adaptado em aparelho MkII - Titertek Multiskan® MCC/340 (Bradford, 1976), que utiliza "Coomassie brilliant blue" G-250 como reativo e albumina bovina (BSA) como padrão.

3.25. Extração de proteínas mitocondriais de *P. brasiliensis*

Este protocolo é uma adaptação do método proposto por Susuki et al. (1995). Células de *P. brasiliensis* congeladas em nitrogênio líquido eram submetidas à lise mecânica, inicialmente em gral, para fragilizar a parede celular. Este material era descongelado em tampão BB (0,6 M de sorbitol, 20 mM de HEPES, pH 7,4) e sonicado por 5 min (alterando 15 seg de sonicação e 15 seg no gelo) para completar a lise celular. A suspensão era centrifugada a $1.500 \times g$ por 5 min e o sobrenadante mantido em gelo. Para extração da fração mitocondrial, o sobrenadante era centrifugado a $12.000 \times g$ por 10 min, o que resultava em um precipitado marrom, característico de mitocôndria. Este era ressuscitado em tampão BB e centrifugado a $1.500 \times g$ por 5 min para a retirada de eventuais "debris". O sobrenadante era novamente centrifugado a $12.000 \times g$ por 10 min e o precipitado lavado duas vezes. O precipitado de mitocôndrias era ressuscitado em 0,2 mL de tampão BB acrescido de 1 mM de PMSF, 1 mM de EDTA e SDS 0,6 %. A concentração de proteínas era dosada em espectrofotômetro e estimada como sugerido em Susuki et al. (1995), ou seja, A_{280} de 0,2 corresponde a 10 mg/mL de proteínas mitocondriais. A fração mitocondrial era mantida a -70 °C.

3.26. Preparação do extrato de parede de *P. brasiliensis* com β -mercaptoetanol

O extrato de parede de *P. brasiliensis* (Pb18) foi obtido a partir de modificações do protocolo de Casanova et al. (1991). Este método propicia a extração de proteínas presentes

na parede celular mantendo a célula intacta. As células leveduriformes crescidas por 10 dias em cultura líquida (YPDmod) foram recolhidas por centrifugação (1.500 x *g* por 15 min) e lavadas 3 vezes em PBS. O precipitado foi ressuscitado em 20 mM de carbonato de amônio, pH 8,64, 1 % de β-mercaptoetanol e 1 mM de PMSF. Para cada 10 mL de células eram utilizados 60 mL da solução. A suspensão era incubada a 36 °C por 1 h sob agitação. As células eram centrifugadas a 1.500 x *g* por 15 min e o sobrenadante recolhido, dialisado em água e liofilizado para a redução do volume. O estado intacto das células fúngicas era confirmado por microscopia óptica.

3.27. "Immunoblotting"

A preparações a serem analisadas eram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (10 ou 12 %) contendo SDS (Laemmli, 1970). Após a eletroforese, era feita a transferência das moléculas para membrana de nitrocelulose (Amersham) 0,45 μm (Towbin et al., 1979). A transferência era feita em tampão de transferência (25 mM de Tris, 192 mM de glicina e 20 % de metanol, pH 8,3), por 1 h, com voltagem constante de 100 V, em aparelho Mini-Trans Blot (BIO RAD). A eficácia da transferência era verificada pela coloração reversível com Ponceau S (0,5 %, p/v, em ácido acético 5 %, v/v) para visualização das bandas. As membranas eram mergulhadas, por 1 h, em solução de PBS contendo leite Mólico (Nestlé) 5 %, para bloqueio de sítios inespecíficos, depois incubadas com soro de coelho anti-PbMdj1r por 1 h, sob agitação. Reações inespecíficas eram monitoradas com soro de coelho pré-imune. Após 3 lavagens de 15 min com PBS-Tween 20 0,1 %, era feita incubação com o anticorpo secundário conjugado à peroxidase (IgG de cabra anti-Ig de coelho conjugada à peroxidase, Sigma), durante 1 h, sob agitação. A revelação era feita com DAB (diaminobenzidina, Sigma) e/ou quimioluminescência Kit ECL (Amersham Pharmacia).

3.28. Imunolocalização da PbMdj1 por microscopia de fluorescência e de confocal

Leveduras de *P. brasiliensis* crescidas em meio YPDmod líquido por 3 - 5 dias (fase logarítima), com pH do sobrenadante de cultura entre 6 - 7, eram lavadas em PBS estéril. Após 10 min de descanso, a suspensão de leveduras era coletada e submetida à quantificação em câmara de Neubauer (viabilidade > 90 %). Para fixação dos fungos em suspensão, 3×10^6 - 1×10^7 células eram distribuídas em tubos de 1,5 mL, centrifugadas a 5.600 x *g* por 1 min. As células precipitadas eram cuidadosamente ressuscitadas em 1 mL de metanol (Merck) gelado, agitados lentamente por 30 min e lavados em PBS.

Para bloqueio de interações inespecíficas, os fungos eram incubados em PBS contendo 3 % de BSA (Sigma) (tampão de bloqueio) por 16 h a 4 °C, sob agitação constante. As células fúngicas eram centrifugadas em microcentrífuga a 5.600 x *g* por 1 min, o tampão de bloqueio era descartado e os fungos incubados com soro (1/200) ou IgG (60 µg/mL) de coelho hiperimune anti-PbMdj1r. Soro de coelho pré-imune diluído 1/200 em tampão de bloqueio foi utilizado como controle negativo. Após incubação por 4 h à temperatura ambiente, as células eram lavadas 5 vezes de 6 min em PBS. Posteriormente, eram incubadas com conjugado marcado com fluoresceína (FITC-polyclonal "anti-mouse" Ig, Pharmigen Becton Dickinson) diluído 1/50 em tampão de bloqueio, por 2 h à temperatura ambiente, protegidas da luz. O precipitado de células era ressuspensionado em 100 µl de PBS e um volume de 10 µl da suspensão era adicionado sobre lâmina para microscopia. As lâminas eram montadas em meio "anti-fading" Vectashield (VECTOR Laboratorios) e seladas. A marcação era analisada por microscopia de fluorescência (microscópio NIKON Eclipse E800, Japan) utilizando objetivas de 40x e 100x. A dupla marcação era analisada por microscopia confocal, LSM-510 NLO (microscópio Zeiss, Germany). Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Multiusuários – INFAR com a ajuda da Dra. Soraia S. Smali.

A marcação com Mitotracker Red (Molecular Probes, Inc, Eugene, OR, USA) era feita com células vivas, para a incorporação do marcador fluorescente de mitocôndria. Este corante é sequestrado e retido seletivamente por mitocôndrias ativas. As células em YPDmod eram incubadas com 20 nM do corante por 20 min a 36 °C sob agitação e lavadas 3 vezes com PBS. Uma pequena alíquota era analisada em microscópio de fluorescência, em comprimento de onda de 581 nm, após o que as células fúngicas eram fixadas com metanol. Seguiu-se, então, o protocolo de marcação descrito acima.

3.29. Microscopia eletrônica de transmissão

Os procedimentos de ultramicrotomia e reações de imunocitoquímica em leveduras de *P. brasiliensis* foram realizados no Centro de Microscopia Eletrônica (UNIFESP).

3.29.1. Preparação de leveduras de *P. brasiliensis* para ultra-microtomia

Leveduras (isolado Pb18) obtidas de culturas em fase logarítmica de crescimento eram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7,2 (TC) e fixadas em Karnovsky modificado (glutaraldeído 2.5 %, v/v, e paraformaldeído 2 %, p/v, em TC) durante 3½ h, à temperatura ambiente, sob agitação constante. As células permaneciam no fixador a 4 °C até o momento do processamento. O precipitado de leveduras era lavado em TC e incluído em ágar 2.5 %

(p/v) para obtenção de fragmentos de 1 - 2 mm de largura. A etapa de pós-fixação era feita com solução de tetróxido de ósmio 1 % (v/v) em TC durante 1 h à temperatura ambiente, sob agitação constante. Alternativamente, as preparações eram pós-fixadas na presença de ferricianeto de potássio 1 % (v/v) para melhor preservação e evidência dos sistemas de membranas (Forbes et al., 1977; White et al., 1979; Wright et al., 1988). Parte das amostras eram lavadas em água ultra-pura (2x, 10 min) para contrastação "in bloc" com acetato de uranila 1 % (w/v) durante 1 h, protegidas da luz. As amostras não contrastadas com acetato de uranila eram lavadas em TC (2x 10 min).

As amostras eram, então, desidratadas em concentrações crescentes de etanol (Merck) 70, 90 e 100 % durante 30 min cada e transferidas para óxido de propileno (EMS), com 2 trocas de 30 min. Os fragmentos celulares eram infiltrados com resina Epon (EMS) ou Spurr (EMS), com aumento progressivo da razão de resina para óxido de propileno (1:1 durante 2 h, 2:1 durante 16 h). Para infiltração com resina pura, eram realizadas 2 trocas de 2 - 3 h e, posteriormente, os fragmentos eram transferidos para cápsulas contendo resina. As cápsulas permaneciam na estufa a 65 °C durante 48 h para polimerização da resina. As amostras infiltradas com Epon eram pós-fixadas em tetróxido de ósmio sem ferricianeto de potássio.

Seções ultrafinas (70–120 nm) obtidas no ultramicrotomo Leica (Germany) eram coletadas em grades de níquel revestidas com formvar e carbono.

3.29.2. Ensaio de imunocitoquímica para localização ultra-estrutural de PbMdj1 em *P. brasiliensis*

As seções ultrafinas eram tratadas com solução saturada de *meta*-periodato de sódio durante 15 min (para seções embebidas em Spurr) ou 1 h (Epon). Em seguida, eram lavadas extensivamente em água ultra-pura (MilliQ) e os grupos aldeídos livres eram bloqueados com tampão glicina 50 mM, pH 7,4 durante 30 min à temperatura ambiente. As interações inespecíficas eram bloqueadas com 5 % (v/v) de BSA acetilada (Aurion, cBSA), em PBS por 30 min. Após lavagens das seções com PBS contendo cBSA 1% (cBSA-PBS), as grades eram incubadas com 60-100 µg/ml de IgG de coelho anti-PbMdj1r diluído em cBSA-PBS durante 16 h a 4 °C em câmara úmida ou 3 h à temperatura ambiente. Como controle, seções eram incubadas com soro (1/50) ou IgG de coelho pré-imune (60 µg/mL). Após 6 lavagens com cBSA-PBS, 5 min cada, com cBSA-PBS, seguiu-se incubação com conjugado anti-IgG coelho (partículas de ouro coloidal de 12 nm, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc) por 1 h à

temperatura ambiente. Em algumas reações, as lavagens eram feitas com cBSA-PBS contendo 0.1-0.5 % de Tween 20.

As seções eram então lavadas, fixadas com glutaraldeído 2,5 % (v/v) e lavadas em água ultra-pura (MilliQ). A contrastação era feita com acetato de uranila 2 % e citrato de chumbo 1 % (1-5 min, cada). As análises foram feitas em microscópio eletrônico Jeol JEM 1200EX model II.

3.30. Citometria de Fluxo (FACS)

Os experimentos de citometria de fluxo (FACS) com células leveduriformes de *P. brasiliensis* eram realizados a partir de modificações do protocolo de Soares e colaboradores (1998).

As células de *P. brasiliensis* de 4 – 5 dias de crescimento em YPDmod líquido eram lavadas em PBS e deixadas em repouso por 3 min. A suspensão de células era recolhida e aproximadamente 1×10^6 células/mL eram fixadas com 1 mL de paraformaldeído 4 % (v/v), pH 7,2, por 1 h à temperatura ambiente. As células eram lavadas 3 vezes em PBS filtrado e incubadas por 30 min em tampão contendo 150 mM de NH_4Cl , para bloqueio das aminas livres.

Para inibição de interações inespecíficas, os fungos eram incubados em PBS contendo 1 % de BSA (tampão de bloqueio) por 1 h, sob agitação constante. Após centrifugação em microcentrífuga ($5.600 \times g$ por 1 min), o tampão de bloqueio era descartado e as células eram incubadas com IgG de coelho hiperimune anti-PbMdj1r (50 -200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou IgG de coelho pré-imune (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 16 h a 4 °C. As células fúngicas eram lavadas 5 vezes em PBS. Posteriormente, eram incubadas por 1 h à temperatura ambiente com conjugado marcado com fluoresceína (FITC-polyclonal anti-rabbit Ig, Jackson ImmunoResearch) diluído 1/100 (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em tampão de bloqueio, protegidas da luz. Eram feitas 4 lavagens em PBS, o precipitado de células era ressuspenso em 1 mL de PBS e 10.000 células fúngicas eram analisadas em um citômetro de fluxo FACS Calibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA). A fluorescência do FITC era medida em 492 – 520 nm. As células controle, sem marcação, eram primeiro analisadas para determinar sua auto-fluorescência, tamanho relativo e granulosidade.

3.31. Ensaios do efeito de anticorpos anti-PbMdj1r sobre o crescimento fúngico

O efeito direto de anticorpos anti-PbMdj1r no crescimento de leveduras de *P. brasiliensis* foi avaliado através da quantificação do número de grumos e da viabilidade de fungos tratados com IgG policlonal anti-PbMdj1.

Leveduras (isolado Pb18) crescidas em meio YPDmod líquido com 5 - 8 dias de crescimento eram coletadas e lavadas em meio de cultura. Os fungos eram separados em seringa de 25 mm. Após 10 min de descanso para depósito dos grumos maiores, a suspensão de leveduras do sobrenadante era coletada e o número de fungos viáveis era determinado em câmara de Neubauer utilizando o corante de exclusão Trypan "blue" (Svidzinski et al., 1999).

Uma suspensão contendo $1 - 5 \times 10^2$ fungos viáveis (viabilidade > 90 %) era adicionada por poço de microplacas de cultura (96-wells, Costar) contendo YPDmod com ampicilina (0,5 mg/mL), na ausência ou presença de IgG anti-PbMdj1r (25-200 µg/mL) e IgG de coelho pré-imune. Após 48-72 h de incubação a 36 °C era realizada contagem do número de grumos e feita a avaliação comparativa do seu tamanho em microscopia invertida (Olympus CK40).

3.32. Ensaios de proteção contra DNase I "Footprinting"

Os ensaios de "footprinting" eram realizados com o kit "Core Footprinting System" (Promega). Aproximadamente 1 µg do fragmento de 434pb correspondente à intergênica de *PbMDJ1* e *PbLON* era utilizada na reação.

3.32.1 Defosforilação e marcação do fragmento com [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP

Inicialmente o DNA era tratado com a enzima fosfatase CIAP (Promega) para a remoção dos grupamentos fosfato 5' terminais. A quantidade de enzima, de tampão e o tempo de incubação foram definidos segundo as especificações do fabricante.

Em tubo de 1,5 mL eram adicionados: 50 µL da solução contendo ~1 µg de DNA, 10 µL de tampão CIAP (50 mM de Tris-HCL, pH 9.3, 1 mM de MgCl₂, 0.1 mM de ZnCl₂ e 1 mM de espermidina), 8 µL da enzima CIAP diluída 100x (0,08 U) e água até 100 µL. A reação era incubada a 37 °C por 30 min, adicionada de 4 µL da CIAP diluída (0,04 U) e incubada por outros 30 min à mesma temperatura. A reação era interrompida pela adição de 2 µL de EDTA 0.5 M e aquecimento a 65 °C por 20 min. O DNA era extraído com fenol e precipitado da fase aquosa com 2 volumes de etanol 100 % a -20 °C por 1 h. A solução era centrifugada a 14.000 x *g* por 15 min, o precipitado seco e ressuspenso em 20 µL de água.

A partir do DNA defosforilado era feita a incorporação de fosfato radioativo [γ - ^{32}P] ATP. Em um tubo de 1,5 mL eram adicionados 15 μL da solução de DNA defosforilado, 2 μL de tampão kinase (70 mM Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM MgCl_2 e 5 mM DTT), 2 μL da enzima T4 polinucleotídeo kinase (Promega) e 1 μL de [γ - ^{32}P] ATP (10 mCi/ml, Amersham Biosciences). A reação era incubada a 37 °C por 30 min, adicionada de 2 μL da enzima e incubada por outros 30 min à mesma temperatura.

O fragmento marcado era digerido com 40 U de *SpeI* (Fermentas) para a retirada de um dos lados marcados e dessa forma somente a região 5' do fragmento apresentava marcação. Em seguida, era feita uma extração fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e a fase aquosa era precipitada com 2,5 volumes de etanol 100 %. O precipitado era seco à temperatura ambiente, ressuspendido em 100 μL de tampão TE e mantido a 4 °C.

3.32.2 Ensaio de proteção ("footprinting")

A sonda marcada era incubada por 10 a 40 min com o extrato total do fungo em tampão de ligação (50 mM Tris-HCl, pH8, 100 mM KCl, 12,5 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 1 mM DTT e 20 % de glicerol). Em seguida, era feita a digestão das amostras na presença ou ausência do extrato por 1 min com Dnase I diluída (0,01 U/ μL), para que a clivagem ocorresse em poucos pontos do DNA. Novamente era feita uma extração fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, precipitação de DNA da fase aquosa e secagem do precipitado. O material final era ressuspendido em tampão contendo 1:2 de 0,1 M de NaOH:formamida (v/v), 0,1 % de xileno cianol e 0,1 % de azul de bromofenol.

As corridas eletroforéticas eram feitas em gel de poliacrilamida-uréia (6 %) em TBE. As amostras com ou sem extrato eram aplicadas em paralelo. O gel era seco e exposto em filme de raios-X (X-Omat, Kodak) a -70 °C.

3.33. Ensaio de retardo da mobilidade eletroforética (EMSA)

3.33.1. Anelamento

Quantidades equimolares (10 ou 20 μM) de cada oligonucleotídeo (senso e anti-senso) eram adicionadas e homogeneizadas em tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, aquecidos por 10 min a 95 °C e mantidas à temperatura ambiente para o anelamento dos oligonucleotídeos. O pareamento dos oligonucleotídeos era confirmado por corrida eletroforética em condições não desnaturantes em gel de poliacrilamida 6 % (37,5:1 acrilamida/bis-acrilamida). O gel era corado rapidamente com brometo de etídio diluído em água, lavado e visualizado sob luz UV.

3.33.2. Marcação dos oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos dupla fita eram marcados radioativamente com [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP. Em um tubo de 1,5 mL eram adicionados 2 μL do oligonucleotídeo dupla fita (1,75 pmol/ μL), 1 μL de tampão da T4 polinucleotideo kinase 10x (700 mM de Tris-HCl, pH 7,6, 100 mM de MgCl_2 e 50 mM de DTT), 1 μL [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP e 10 U de T4 polinucleotideo kinase. A reação era cuidadosamente misturada, incubada por 10 min a 37 °C e interrompida pela a adição de 500 mM de EDTA. Eram adicionados 25 μL de TE e todo o volume era fracionado em coluna Sephadex G-50 (Amersham), a qual era centrifugada por 1 min a 10.000 x *g*. A incorporação do fosfato (^{32}P) à sonda era quantificada em contador de radioatividade beta e o resultado expresso em cpm ("counts per min").

3.33.3. Ensaio de retardo da mobilidade

Em tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, eram adicionados 3 a 5 μg do extrato total de *P. brasiliensis* (isolados Pb18 e Pb03), 1 μL de poly dI-dC (25 U/mL), 1 μL de BSA (10 mg/mL) e 2 μL de uma solução contendo 125 mM de HEPES, pH 7,5, 5 mM de EDTA, 5 mM de DTT e 50 % de glicerol para incubação por 15 min no gelo. A esta mistura era adicionado o oligonucleotídeo dupla fita marcado e/ou não-marcado. Os competidores específico e não específico eram adicionados em excesso molar de 250 a 500x. A reação era incubada por 15 min a 37 °C. A mistura era, então, submetida à eletroforese sob condições não desnaturantes em gel de poliacrilamida 6 % (37,5:1 acrilamida/bis-acrilamida) em tampão TBE 0,5x, a 100 V por 45 min. Os géis eram secos em papel de filtro e expostos em filme de raios-X (X-Omat, Kodak) a -70 °C.

3.34. RT-PCR quantitativo ("Real Time")

Dois kits comercialmente disponíveis foram utilizados nos estudos de quantificação da expressão gênica. O primeiro é o sistema *Taq* Man EZ RT-PCR (Applied Biosystems), o qual foi utilizado em uma fase inicial do trabalho, e o segundo é o Sistema Sybr Green (Applied Biosystems).

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados no sistema *Taq* Man EZ RT-PCR (Applied Biosystems) foram desenhados pelo Dr. Gustavo Henrique Goldman USP/Ribeirão Preto, com base em regiões específicas dos genes *PbMDJ1* e *PbLON* de *P. brasiliensis*. O gene da β -tubulina foi utilizado como normatizador (referência interna) das análises, pois é expresso constitutivamente. As moléculas de cDNA eram sintetizadas a partir de 200 ng de RNA total livre de DNA, 10 pmoles de cada oligonucleotídeo iniciadore específico para cada gene (senso

e anti-senso), 5 pmoles da sonda específica, tampão *Taq* Man 1x concentrado (250 mM de bicina, 575 mM de acetato de potássio, 0,05 mM de EDTA, 40 % de glicerol, pH 8.2), 3 mM de acetato de manganês, 300 μ M de dNTPs, 0,1 U/ μ L *rTth* DNA polimerase e 0,01 U/ μ L *AmpErase*. O programa de RT-PCR utilizado consistiu de uma etapa inicial de 50 °C por 2 min e 60 °C por 30 min, uma segunda etapa de um ciclo de 95 °C por 5 min e por fim 40 ciclos alternados de 94 °C por 20 seg e 60 °C por 1 min, em aparelho ABI Prim 7700 Sequence Detector System.

A segunda parte dos resultados de quantificação da expressão dos genes *PbMDJ1* e *PbLON* foi realizada com o protocolo de detecção do sistema Syber Green (Applied Biosystems), seguindo as instruções do fabricante. Este sistema utiliza um fluoróforo que se intercala nas moléculas de cDNA dupla fita no momento da polimerização. Para a síntese de cDNA eram utilizados 10 μ g de RNA total (livre de DNA), 100 μ M de oligodT e 200 U de transcriptase reversa (SuperScript – Invitrogen), para um volume final de 20 μ L, os quais eram diluídos para 50 μ L ao final da reação. Para cada reação de quantificação eram adicionados 2 μ M de cada oligocleotídeo específico, 5 μ L da Master Mix do sistema Sybr Green (Applied Biosystems) e 1 μ L de cDNA. As condições de ciclagem eram: um ciclo de 50 °C por 2 min, outro de 95 °C por 1 min e 40 ciclos alternados de 95 °C por 15 seg e 60 °C por 1 min em aparelho ABI Prim 7000 “Sequence Detector System”. O normatizador utilizado nestas análises foi o gene da α -tubulina de *P. brasiliensis*. Ao final da reação era realizado um ciclo adicional de 95 °C por 15 seg, 60 °C por 20 seg e 95 °C por 15 seg, para a determinação da curva de dissociação. A fluorescência dos dois sistemas era monitorada durante as etapas de anelamento a 60 °C e analisadas com relação aos seus correspondentes ciclos. Reações paralelas eram feitas para o conjunto de oligonucleotídeos iniciadores e suas respectivas sondas, usando quantidades decrescentes do número de cópias de cada gene (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 e 10^7 cópias teóricas), obtidas através de diluições seriadas do DNA genômico de *P. brasiliensis*, para a obtenção das curvas padrão de cada sonda.

Os resultados eram visualizados utilizando o programa “Sequence Detector Software” e então exportados para o programa Microsoft Excel, onde os ciclos lineares (Ct) eram analisados em relação ao logaritmo da quantidade inicial de moléculas alvos. A equação da reta era determinada através de análise de regressão linear. O valor do R^2 para cada conjunto dos oligonucleotídeos e suas respectivas sondas era também calculado.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

No processo de caracterização do gene *PbLON* (3.369 pb) de *P. brasiliensis* (Barros e Puccia, 2001) foi sequenciado um fragmento genômico *Sma*I de aproximadamente 6,5 kb (pUCSma) contendo a ORF desse gene (Figura 1). Na sua porção 5', detectou-se a presença de ORFs com homologia com a porção 5' do gene de choque térmico *MDJ1* de *S. cerevisiae*. Neste trabalho, o gene *MDJ1* foi completamente caracterizado (Figura 1), parte dele foi expressa em bactéria, anticorpos gerados contra a proteína recombinante e estes usados na caracterização da proteína *PbMdj1*.

4.1. Clonagem e caracterização de *PbMDJ1*

A clonagem da porção 3' do gene *PbMDJ1* seguiu a estratégia do 3' RACE. Esta técnica utiliza um oligonucleotídeo iniciador contendo uma cauda de poli-timidina e uma sequência cassete (oligonucleotídeo 511) para sintetizar a primeira fita por transcrição reversa. Para essa reação, foi utilizado como molde o RNA total de células leveduriformes de *P. brasiliensis* (isolado Pb18) que receberam choque térmico de 30 min a 42 °C, na tentativa de aumentar o número de cópias do transcrito. Para a reação de PCR, foi utilizado o oligonucleotídeo interno B4 (senso) e uma segunda amplificação com os oligonucleotídeos G5/512 ("nested" PCR), a qual resultou na visualização de 2 bandas que foram marcadas em "Southern blot" (Figura 2) com uma sonda específica (G5/E4 – Figura 1). Ambos os fragmentos foram clonados no vetor pGEM-T (Promega) e sequenciados a partir de oligonucleotídeos flanqueadores do vetor (Universal e sp6) e internos do inserto através da estratégia de "primer walking" (Figura 1). Eles corresponderam à amplificação com os oligonucleotídeos G5/512 e B4/512 (Figura 2).

A estratégia de sequenciamento possibilitou identificar o sítio de poliadenilação do gene (Figura 3) e determinar a extensão da cauda de poli A, que estava em torno de 60 adeninas nos dois clones analisados. Esta observação é interessante uma vez que a cauda de poli A do mRNA do *PbGP43* foi de aproximadamente 20 nt, de acordo com um estudo de 80 clones da região 3' de 10 isolados diferentes de *P. brasiliensis* (Morais, 2003). Isto sugere que o transcrito de *PbMDJ1* é mais estável do que aquele do *PbGP43*.

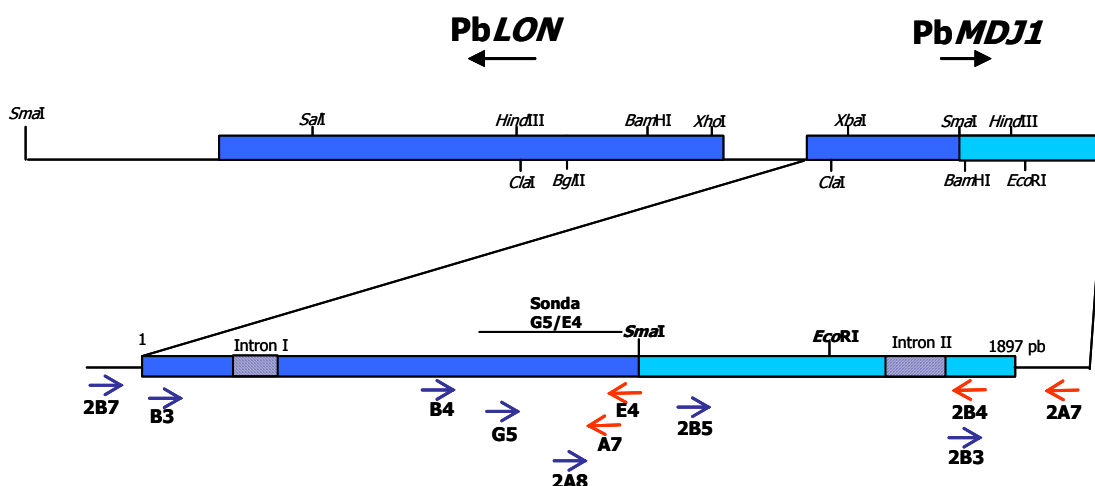


Figura 1 - Desenho esquemático da região PbLON/PbMDJ1 de *P. brasiliensis* caracterizada por Barros et al. (2001) (azul escuro) e do gene PbMDJ1 (2.015pb), mostrando a localização e direção dos oligonucleotídeos usados no sequenciamento por "primer walking", a região obtida pelo experimento de 3' RACE (azul claro) e os dois introns identificados na sequência.

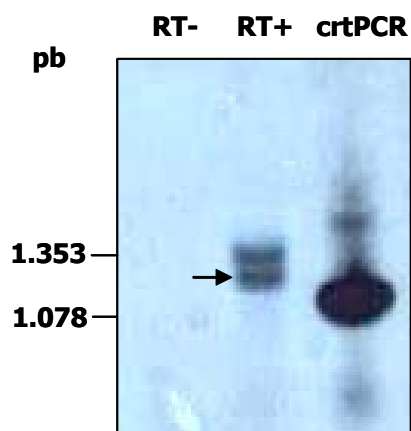


Figura 2 - Análise por "Southern blot" do produto da reação de 3' RACE e a sonda G5/E4 do PbMDJ1. A reação foi realizada na presença (+) ou ausência (-, controle negativo) de transcriptase reversa (RT). O controle (crt) da reação de PCR usou como molde o plasmídeo pUC.Sma e os oligonucleotídeos B3-E4. Os dois fragmentos positivos em RT+ foram clonados em pGEM-T e sequenciados. A seta indica o fragmento correspondente ao produto de PCR (G5/512) da região 3' do gene PbMDJ1. A banda superior corresponde ao produto de PCR dos oligonucleotídeos B4/512. Valores de marcadores de DNA estão indicados à esquerda em pb.

O próximo passo foi obter e clonar em pGEM-T a sequência completa tanto do DNA genômico como do cDNA do gene *PbMDJ1* (Figura 4). Para tanto, os oligonucleotídeos 2B7 (próximo ao ATG inicial) e o 2A7 (próximo ao sítio de poliadenilação) foram utilizados em reação de PCR com DNA total de *P. brasiliensis* como molde, resultando em um produto da amplificação de 2.112 pb. O cDNA foi obtido por RT-PCR usando os mesmos oligonucleotídeos e RNA total do fungo, resultando em um "amplicom" de 1.872 pb, desprovido de 2 introns confirmados por sequenciamento. Em resumo, a sequência do *PbMDJ1* apresenta uma ORF de 1.897 pb, organizada em três exons interrompidos por dois pequenos introns localizados nas regiões 5' e 3' do gene, o primeiro entre os nt 206 e 315 (109pb) e o outro entre nt 1.552 e 1.683 (131 pb). Ambos os introns são flanqueados pelos sítios GT/AG os quais são sequências consenso de "splicing" e contém várias repetições de TA, TTA e/ou TTAA (Figura 5).

A análise da região 5' não-traduzida do *PbMDJ1* mostrou a presença de várias seqüências de elementos putativos de promotor de eucariotos, os quais serão melhor detalhados na segunda parte deste trabalho. A região 3' não-traduzida do transcrito de *PbMDJ1* também contém alguns motivos putativos de poliadenilação (Figura 5), como os elementos de eficiência (EE) TTATTT (nt 1.924 – 1.929) e TTTTT (nt 1.953 – 1.957), além de AAAAAA (nt 1.979 – 1.984), possível elemento de posicionamento (EP) (Zhao et al., 1999).

A sequência deduzida do *PbMdj1* apresentou 551 aminoácidos, uma massa molecular deduzida de 58,7 kDa e um ponto isoelétrico básico de 8,9 (Figura 5 e 6). A partir da sequência deduzida da molécula foi possível mapear todos os domínios que caracterizam a família da chaperone DnaJ (Rowley et al., 1994). Foram identificados o domínio J (68 aminoácidos), a região rica em glicina/fenilalanina (G/F) e os quatro domínios ligantes de zinco (CXXCXGXG). Esta apresentação faz com que *PbMdj1* esteja classificada no tipo I da família DnaJ (Lee et al, 2002 e Fliss et al.,1999). Os membros deste grupo utilizam o domínio ligante de zinco e uma parte do C-terminal para se ligar às proteínas não nativas (Szabo et al.,1996; Lu et al., 1998) para facilitar seu dobramento correto.

A partir de análises feitas pelo programa de computador TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) (Nielsen et al., 1997; Emanuelsson et al., 2000), foi possível identificar o sítio putativo de clivagem do peptídeo de direcionamento mitocondrial, do qual são liberados os 28 primeiros resíduos de aminoácido (2,94 kDa) (Figura 6 e 7A). A análise comparativa com outras *Mdj1* fúngicas indicou alta porcentagem de identidade, principalmente com seqüências dos fungos dimórficos *B. dermatitidis* e *H. capsulatum* (cerca de 85%), as quais apresentam alta similaridade no padrão de hidrofiliidade (Figura 7B). O

domínio J foi a região que apresentou maior grau de conservação, cuja identidade com PbMdj1 ficou entre 92 % (*H. capsulatum*) e 55 % (*C. albicans*). Este domínio contém quatro hélices (Kelley, 1998) e o tripeptído HPD conservado entre as hélices II e III, o qual é essencial para sua interação com a Hsp70 (Pellicchia et al., 1996). A região rica em G/F variou consideravelmente entre a sequência de Mdj1 de *P. brasiliensis* e os membros agrupados na clade I da árvore filogenética mostrada na Figura 8 e a porcentagem de identidade ficou entre 30 e 19 %. Estas porcentagens são menores que as encontradas na porção C-terminal (36 – 29 %), que é a região menos conservada entre os membros da família DnaJ em levedura (Rowley et al., 1994).

A análise da sequência deduzida de PbMdj1 (Figura 6 e 7B) mostrou a prevalência de segmentos hidrofílicos e vários com alta probabilidade de expressão na superfície, principalmente nas porções N e C-terminal da molécula. Essas regiões têm maior probabilidade de contêr epítomos para células B. Nesta análise também foi possível identificar uma região peptídica de 13 aminoácidos (LYTAQIPLTTALL) entre os aminoácidos 379 e 391, que têm as características de epítomo para células T murinas (apresentada pelo MHC tipo II), ou seja, deve apresentar pelo menos 12 aminoácidos, os quais são compostos por um segmento hidrofóbico localizado entre duas regiões hidrofílicas. Este epítomo é conservado entre os homólogos de *B. dermatitidis* e *H. capsulatum*. Esta análise foi feita através do módulo Protean do programa Lasergene (DNASTAR Inc.). Foram encontrados epítomos similares na Mdj1 de *C. immitis* (ADVLYTASIPPLTTALL), *A. nidulans* e *A. fumigatus* (ILYTASIPPLTTALL), e *Neurospora crassa* (ILYTATIPLTTAIL). Em *S. cerevisiae* (ITTAALGGTVTIPTV) e *C. glabrata* (ITTAALGGTVSIPTI), um epítomo putativo de célula T de camundongo somente foi encontrado na porção N-terminal da molécula.

A Figura 8 mostra que a organização gênica de *MDJ1* e *LON* é extremamente conservada entre membros da classe dos *Eurotiomycetes*, principalmente *P. brasiliensis*, *B. dermatitidis*, *H. capsulatum*, *C. immitis*, *A. nidulans* e *A. fumigatus*. O número e a posição dos introns estão conservados, porém seu tamanho e sua sequência variam. O gene *MDJ1* de *Neurospora crassa* e *Fusarium graminearum* tem o mesmo número de introns que se encontram na mesma posição em relação a *P. brasiliensis*, entretanto o gene *LON* destes organismos apresentaram somente um intron na posição 3' do gene. Em *Cryptococcus neoformans* ambos os genes foram encontrados com vários pequenos introns distribuídos por toda a sequência. Nesta análise comparativa observou-se que o locus *MDJ1/LON* é conservado entre os *Eurotiomycetes*. Os genes estão adjacentes, inversamente orientados e separados por uma região 5' comum variando entre de 400 a 485 pb (Figura 8). Nestas

espécies, foi encontrado um gene adjacente (na mesma direção) a *MDJ1* e homólogo a *BROA* (*Bro1*). Em *S. cerevisiae*, *BROA* codifica uma proteína citoplasmática envolvida no "sorting" de proteínas de membrana para dentro de corpos multivesiculares de endossomo (Odorizzi et al., 2003).

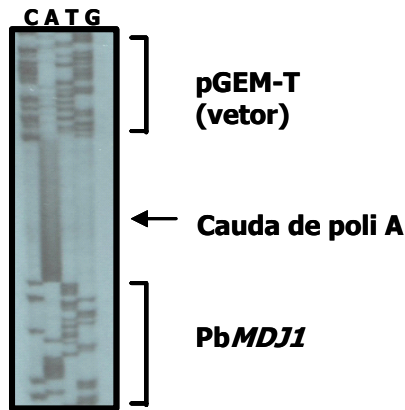


Figura 3 - Gel desnaturante de poliacrilamida-urea 6% mostrando a corrida eletroforética de sequenciamento da região 3' do gene *PbMDJ1* iniciado pelo oligonucleotídeo 2B3. As regiões referentes à cauda de poli A, a sequência final do transcrito do *PbMDJ1* e o vetor pGEM-T estão indicadas.

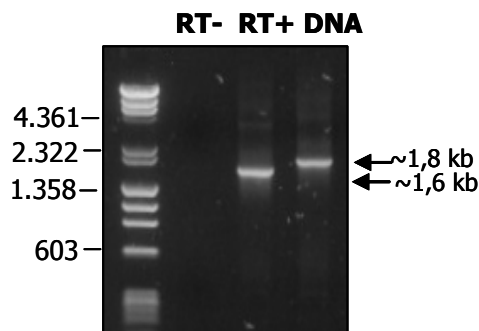


Figura 4 - Gel de agarose 1%, impregnado com brometo de etídeo, mostrando os produtos de RT-PCR com RNA total ou PCR com DNA total (DNA) e os oligoiniciadores B3 (sense) e 2A7 (anti-sense) do gene *PbMDJ1* de *P. brasiliensis*. A reação foi realizada na presença (+) ou ausência (-, controle negativo) de transcriptase reversa (RT). Valores de marcadores de DNA estão indicados à esquerda em pb.

```

AGTTCGGGGTAGTCAAATGCGTGAGCAAAAGACCAGTAGTTATACACACAAGCTGCGCATCCACTATCTCCAGCAGAATGCAGAAGAGCGTTAA
CCCAGAGATGGCCCAGGCAGAGCAGGCAAGAAGAAGGGAATTTGCCGAGTGAGTTGTTATCTCTTTGTTGTTGCTAACAAAGAACAGTGTGCTGC
TTACTTGATCAACTCGGAGAACCCTCGTCAATAGCAGCGTGTGCGCTAAACTTTGTTCCAGAAAAATGGCATCTTAGTCATCCAACGCCCAAAAGA
ATCTTTTTTTTTTTTCTTTGCCTTGACGATGATGAACGTGATTGATAGAGGATGAAGATGATATGCCAACTCCGAGTCAACTAGATGCTAGATAGTAT
ATCCCACCGTCCCCTTTGGCTGTGAACACTGTGTGCAGTCCAGCTTGCTTACCATCTGCCCTCTAGCATTGGTGCACTGCTGCGTGTGCTCAGAAG
1  ATG  AGT  GCG  GGT  GCT  CCA  AGC  ATA  CCC  AAG  GTG  GCC  CTG  CTC  CCG  GCT  CGT  CTC  CTC  CAT  ACG  TCA
1  M  S  A  G  A  P  S  I  P  K  V  A  L  L  P  A  R  L  L  H  T  S
67  CGA  CAC  TGC  TCC  ACG  CAA  TGT  GCT  GTG  ATA  CGC  CCT  CAG  ATT  CAG  CCA  AAA  TTC  TTC  CAG  AAT  GAC
23  R  H  C  S  T  Q  C  A  V  I  R  P  Q  I  Q  P  K  F  F  Q  N  D
133  TGC  AGA  GCT  TAC  CAT  GAT  AGG  CGT  CCC  CGT  ATA  GAA  CCC  TTA  AAT  GAC  CGT  AGC  CGT  CAT  CCG  TTT
45  C  R  A  Y  H  D  R  R  P  R  I  E  P  L  N  D  R  S  R  H  P  F
199  TGC  AAG  gfatgtcagaatcatcagtaatcgatcattatacaacaccaggggggtgtggccctacgggattgtaaccagtaactcggctctatctactatccag  GCC  TTT
67  C  K  A  F
320  CAC  GCA  TCT  TCT  CCC  TCC  CAA  GCT  ACA  CGC  GAC  CCG  TAC  CGT  GTA  CTC  GGA  GTA  GGG  AAG  AAT  GCA
71  H  A  S  S  P  S  Q  A  T  R  D  P  Y  R  V  L  G  V  G  K  N  A
386  TCT  GCC  GCA  GAA  ATT  AAA  CGG  GCA  TAC  TAC  GGA  CTG  GCC  AAA  AAA  TAT  CAC  CCA  GAT  ACG  AAC  AAG
93  S  A  E  I  K  R  A  Y  Y  G  L  A  K  K  Y  H  P  D  T  N  K
452  GAT  GCT  AAT  GCG  AAG  GAA  AAA  TTT  GCA  GAA  GCC  CAG  TCA  GCG  TAC  GAG  CTG  CTT  TCA  GAT  GCA  GAA
115  D  A  N  A  K  E  K  F  A  E  A  Q  S  A  Y  E  L  L  S  D  A  E
518  AAG  AGA  CAA  GCA  TAC  GAT  CGT  TAT  GGC  TCC  GCG  GCA  TTC  GAC  CAA  AAT  GGC  GGT  TTC  AAT  CCT  GGC
137  K  R  Q  A  Y  D  R  Y  G  S  A  A  F  D  Q  N  G  G  F  N  P  G
584  GCC  CAT  GAC  GGT  ACT  GGT  GGT  CCA  TTC  TCC  GGA  GCA  GCC  ACC  GGT  GGA  TTC  CAC  GGG  TTT  GGC  GGC
159  A  H  D  G  T  G  G  P  F  S  G  A  A  T  G  G  F  H  G  F  G  G
650  GGG  TTC  CCT  GGT  GGT  GGG  TTC  TCT  GCG  AAT  ATA  AAT  TTC  GAG  GAT  CTT  TTT  GGT  GCC  TTT  GCG  GGT
181  G  F  P  G  G  F  S  A  N  I  N  F  E  D  L  F  G  A  F  A  G
716  GGT  TCG  GGG  CGG  AGG  GGT  CGG  TCG  AAG  GGT  GGG  CCG  TTC  CGG  TCT  ACA  GTG  GTT  GAA  GGT  GAT  GAT
203  G  S  G  R  R  G  R  S  K  G  G  P  F  R  S  T  V  V  E  G  D  D
782  ATT  GAA  GTA  CAG  ACA  AAT  ATC  TCA  TTC  ATG  GAT  GCG  GCC  AAA  GGA  ACG  ACG  AAG  GAA  GTT  TTC  ATA
225  I  E  V  Q  T  N  I  S  F  M  D  A  A  K  G  T  T  K  E  V  F  I
848  ACT  CCC  CTT  GTT  CAG  TGC  CGT  ACT  TGT  GAC  GGC  GAG  GGG  ACA  AAA  CAG  GGT  ACA  AAG  CGG  GCA  CAA
247  T  P  L  V  Q  C  R  T  C  D  G  E  G  T  K  Q  G  T  K  R  A  Q
914  TGC  AAA  ACA  TGC  AAT  GGT  ACG  GGG  TCA  CAA  GTT  CAT  TTC  ATC  CAG  AGT  GGA  TTT  CAT  ATG  GAA  AGT
269  C  K  T  C  N  G  T  G  S  Q  V  H  F  I  Q  S  G  F  H  M  E  S
980  ACC  TGT  TCC  TCG  TGC  GGC  GGT  GCA  GGT  GTT  TCC  ATA  CCC  CGG  GGA  TCC  GAA  TGC  AAT  ATA  TGC  GGC
291  T  C  S  S  C  G  G  A  G  V  S  I  P  R  G  S  E  C  N  I  C  G
1046  GGT  GAT  GGC  GTT  ATC  CGG  GAA  CAA  AAA  ACG  GTG  CAT  GTC  AAT  ATC  CCA  GGG  GGC  GTG  GAG  GAT  GGA
313  G  D  G  V  I  R  E  R  K  T  V  H  V  N  I  P  G  G  V  E  D  G
1112  ATG  CGG  TTG  ATC  GTG  CCT  GGA  GAG  GGA  GAT  ATG  CCT  CGA  GTA  GAA  CCG  GGT  GCT  CAA  ATG  CGG  CGT
335  M  R  L  R  V  P  G  E  G  D  M  P  P  V  E  P  G  A  Q  M  R  R
1178  GGT  GAT  CTT  TAT  GTC  TTT  ATC  AAG  GTA  GCC  CTT  GAT  TCC  CGA  TTC  AGC  AGG  TCT  GGT  TCG  GAT  GTC
357  G  D  L  Y  V  F  I  K  V  A  P  D  S  R  F  S  R  S  G  S  D  V
1244  CTG  TAC  ACA  GCG  CAG  ATT  CCT  CTC  ACA  ACG  GCA  CTG  CTT  GGT  GGC  GAA  GTC  ACA  GTC  CCC  ACG  CTT
379  L  Y  T  A  Q  I  P  L  T  T  A  L  L  G  G  E  V  T  V  P  T  L
1310  GAC  AAC  GAA  GTT  AAA  GTG  AAG  GTG  ACC  GCA  CCG  GGA  ACC  GGA  GAC  AAA  ATC  ACC  CTA  TCT
401  D  N  E  V  K  V  K  V  A  T  R  G  T  G  T  G  D  K  I  T  L  S
1376  GGA  ATG  GGA  ATG  CGG  AAG  CTT  GAG  GGT  CGG  CGT  GGC  CAG  CAG  GGT  GAC  CTC  AAG  ATT  GAA  TTC  AAG
423  G  M  G  M  R  K  L  E  G  R  R  G  Q  Q  Q  G  D  L  K  I  E  F  K
1442  GTT  GCC  ATG  CCG  AAA  TAC  CTG  ACT  GCG  AAC  CAG  CGA  AQC  ATT  CTG  GAA  GTG  CTT  GCT  GAC  GAG  ATG
445  V  A  M  P  K  Y  L  T  A  N  Q  R  T  I  L  E  V  L  A  D  E  M
1508  GGC  GAC  GAC  ACC  GCT  CGA  CGC  ATG  ATG  AAC  GTC  CAC  AAA  TAC  GAC  A gtgagtattatcgaaaaatcaccctacaagatg
467  G  D  D  T  A  R  R  M  M  N  V  H  K  Y  D
1594  aagccatcatctgcaactglaatgtgtaagattaaagcgaaggttaaccacatgatacttaatttctcctcgtctttctctctag  AG  CCT  TCC  TCT  CCC  GGC  TCT  TCC
482  K  P  S  S  P  G  S  S
1708  TCG  TCG  GGC  AAA  AAA  GAT  AGC  AGC  AAC  AGC  AGC  ACT  GCC  AGC  AGT  GAC  TCA  CAC  AAA  AAT  GAA  GGC
490  S  S  G  K  K  D  S  S  N  S  S  T  A  S  C  D  S  H  K  N  E  G
1774  TTC  CTC  AAG  TCT  GCA  TGG  CAC  AAA  CTC  ATG  CAA  CAC  AAT  AAC  GGC  AAC  AAG  GAC  ACA  GGG  TCT  GAT
512  F  L  K  S  A  W  H  K  L  M  Q  H  N  N  G  N  K  D  T  G  S  D
1840  GGC  AAT  ACC  AGC  GAC  GGG  AAC  AAG  ACC  GAC  GAA  TCG  AAG  AAA  GCC  TCC  GGC  TCG  GGG  TGA
534  G  N  T  S  D  G  N  K  T  D  E  S  K  K  A  S  G  S  G  *
1906  TATCCTCTGTCTTCCACGATATGGCAGTATTTTTGTTTCATAATCATTGTCAATTATTTTTCTTATCATAGCGTTGGCAGGCAAAAATGGTATTCTGT
2006  GGTTGCTTTC

```

Figura 5 - Sequência de nucleotídeos (1-2015) do *PbMDJ1* e da sequência deduzida de aminoácidos (1-551). Os introns estão em letras minúsculas. Estão em destaque os aminoácidos que correspondem ao domínio J (vermelho), região rica em glicina/fenilalanina (verde) e o "motif" CXXCXGXG (azul). As regiões sublinhadas são os sinais putativos de poliadenilação.

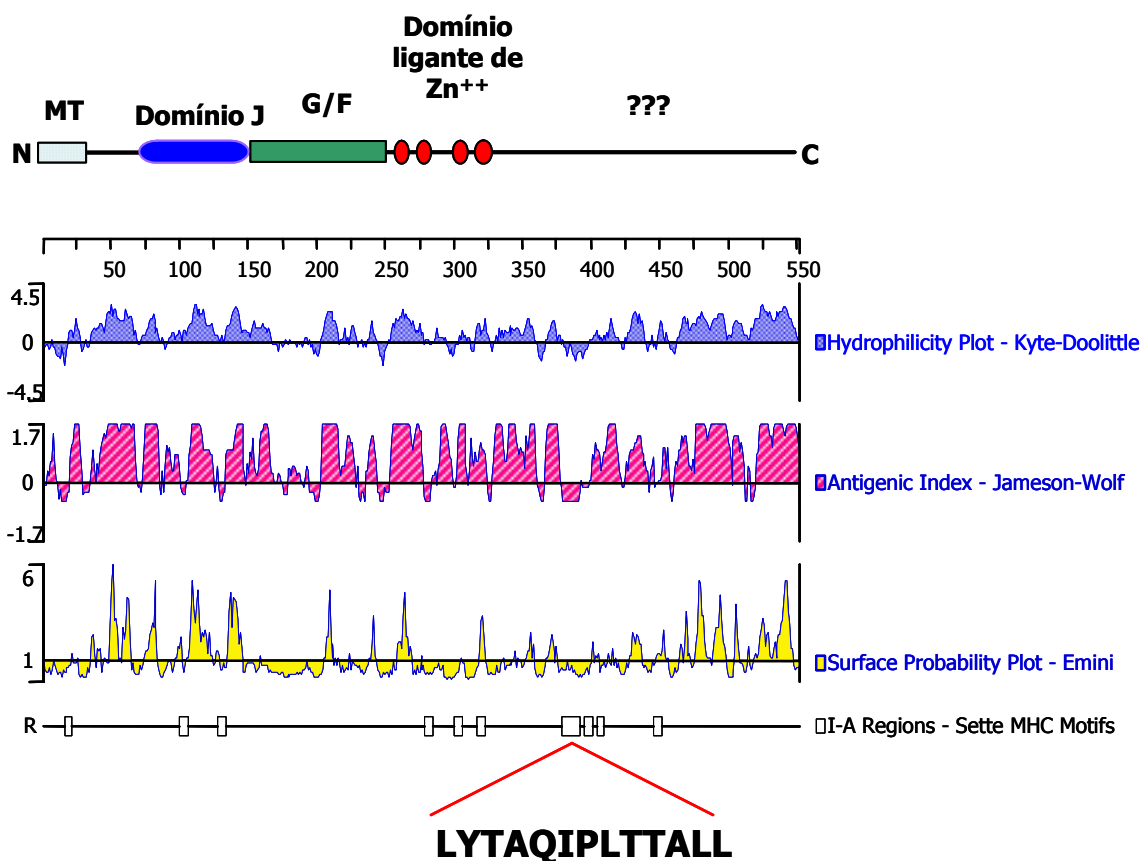


Figura 6 – Representação esquemática da PbMdj1 mostrando a localização dos domínios conservados e análise da sequência deduzida de aminoácidos. A análise foi realizada utilizando o programa Lasergene, módulo Protean (DNASTar Inc.). No gráfico de hidrofobicidade de Kyte-Doolittle, os valores negativos indicam hidrofobicidade e no gráfico em amarelo os picos acima da linha indicam probabilidade de localização na superfície. A seta vermelha indica um possível epítipo para apresentação de células T murinas, o qual está localizado entre duas regiões hidrofílicas (retângulo). A posição dos aminoácidos está indicado na parte superior da figura.

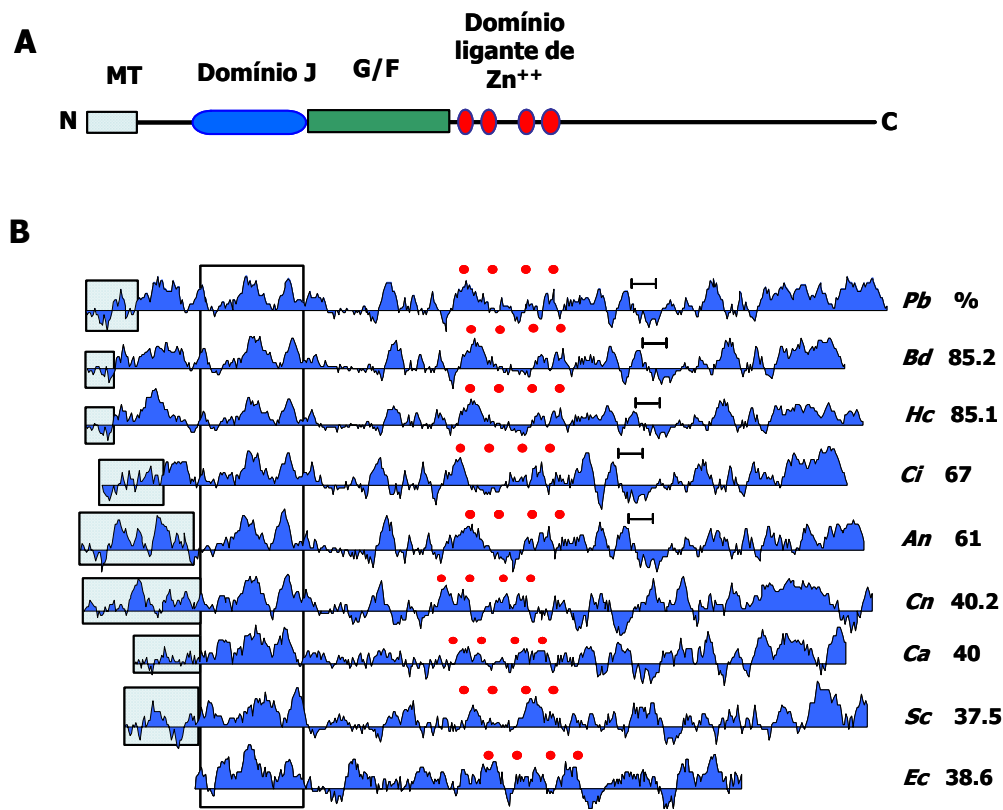


Figure 7 – A, Representação esquemática do PbMdj1 mostrando a localização dos domínios conservados. **B,** Plot de hidrofiliidade Kite-Doolittle (Protean module; DNASTar Inc.) de seqüências Mdj1-like dos seguintes fungos: *Pb*, *P. brasiliensis* (AF334811); *Bd*, *B. dermatitidis* (http://genome.wustl.edu/BLAST/blasto_client.cgi); *Hc*, *H. capsulatum* (http://genome.wustl.edu/BLAST/blasto_client.cgi); *Ci*, *C. immitis* (http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/coccioides_immitis); *An*, *A. nidulans* (EAA57980); *Cn*, *C. neoformans* (EAL21819); *Ca*, *C. albicans* (EAK92195); *Sc*, *S. cerevisiae* (CAA82189); *Ec*, *E. coli* (BA000007). As barras horizontais indicam a localização do epítipo de célula T com um mínimo de 12 aminoácidos, como predito pelo programa Sette major histocompatibility complex motif (Protean module; DNASTar Inc). A porcentagem de identidade com PbMdj1 está indicada à direita.

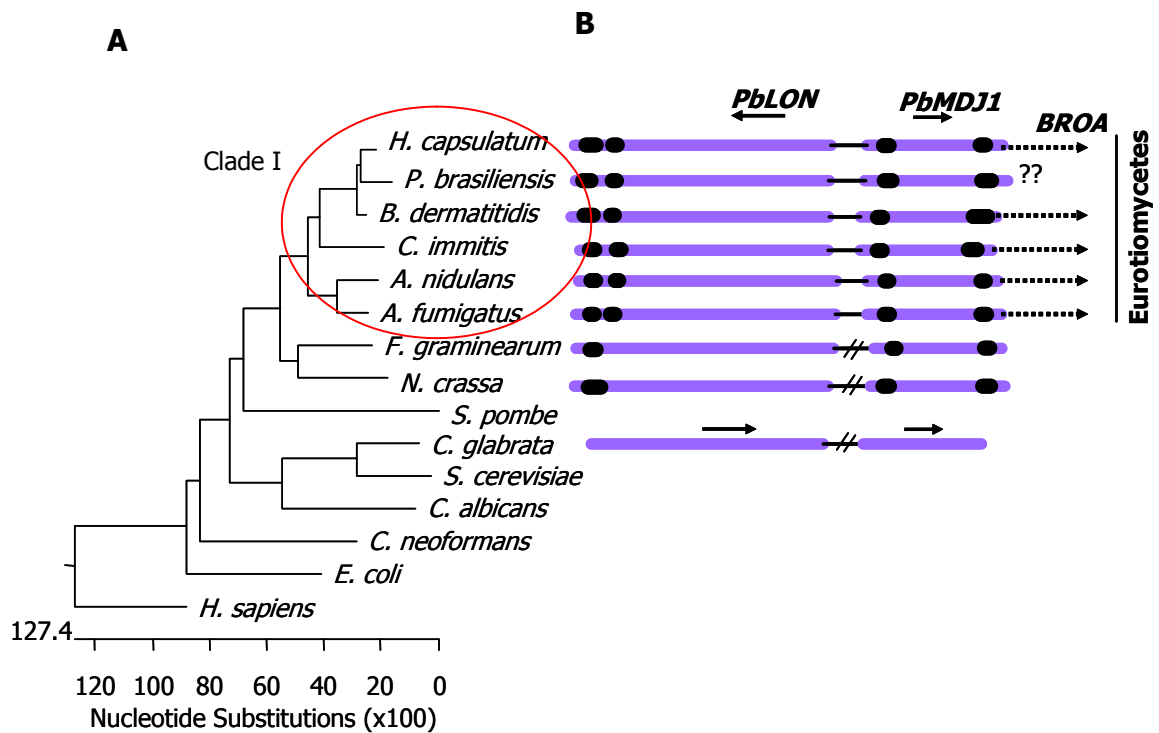


Figura 8 – **A**, Árvore filogenética de seqüências fúngicas de Mdj1 obtida com auxílio do programa Clustal W. Além das seqüências indicadas na Figura 7, foram incluídas aquelas do *A. fumigatus* (EAL93469), *N. crassa* (EAA76137), *F. graminearum* (EAA76137) *S. pombe* (CAB09769), *C. glabrata* (CAG60838) e *Homo sapiens* (AF061749). **B**, representação esquemática da organização cromossômica do *MDJ1* e *LON* e seu direcionamento nas espécies que apresentam estes genes no mesmo cromossomo. Estão indicadas a localização dos introns (caixas pretas) e os exons (azul). A distância de separação dos genes (linha interrompida) em *N. crassa*, *F. graminearum* e *C. glabrata* é, respectivamente, 236.960 kb, 1.982.719 kb e 19.091 kb.

4.2. Expressão da PbMdj1 truncada

Para expressão de PbMdj1 recombinante, um fragmento de cDNA contendo 757 pb da porção 5' do gene *PbMDJ1* foi subclonado nos sítios *EcoRI* e *SpeI* do vetor pHIS3 (Figura 9A). O fragmento clonado corresponde aos aminoácidos 14 ao 266 da PbMdj (252 aminoácidos, 25,8 kDa) e inclui o domínio J, a região rica em G/F e dois domínios ligantes de zinco (Figura 7). Este fragmento contém um grande número de regiões hidrofílicas e epítomos para anticorpos, como mostrado pelo índice de Jameson-Wolf, índice antigênico do módulo Protean (Lasergene – DNASTAR Inc.). Para verificar a presença do inserto no vetor de expressão (pHIS3), alguns clones recombinantes foram digeridos com as mesmas enzimas utilizadas para a construção do plasmídeo pHIS3PbMdj1 (Figura 9B). O inserto de dois clones positivos foi sequenciado e verificou-se que a fase aberta de leitura estava correta.

Para expressão da proteína recombinante, os mesmos plasmídeos foram introduzidos em bactérias *E. coli* BL21pLysS. A indução foi feita com 0,5 mM de IPTG em diferentes tempos a 37 °C. Nestas condições, observou-se o aparecimento de uma banda de aproximadamente 31 kDa após 1 e 3 h de indução, a qual não foi observada no extrato total das bactérias não induzidas (0 h) ou contendo o vetor sem inserto (Figura 9C).

A análise da solubilidade da proteína recombinante foi verificada em SDS-PAGE 12%. Para tal, as bactérias induzidas com IPTG foram lisadas e as porções solúvel e insolúvel foram analisadas separadamente. Na Figura 10 pode-se observar que a maior parte da proteína foi expressa na forma de corpos de inclusão insolúveis. Por esse motivo, a purificação da proteína recombinante (PbMdj1r) em coluna de afinidade foi feita após solubilização com agente desnaturante (uréia).

Para a purificação de PbMdj1 recombinante, as bactérias foram induzidas em larga escala e processadas como descrito em Material e Métodos para a obtenção do extrato total da bactéria. O precipitado insolúvel foi ressuspenso em tampão contendo 8 M de uréia e o sobrenadante foi analisado em SDS-PAGE (Figura 11). Este material foi paralelamente aplicado em coluna de Ni-NTA e eluído em tampão 8 M de uréia em pH ácido. Os eluatos foram analisados em SDS-PAGE 12% (Figura 11), onde se pode observar que a proteína recombinante foi melhor eluída nas frações de pH 5,9 e 4,5. Salienta-se que o "doublet" observado em 31 kDa é resolvido em uma única banda na ausência de uréia.

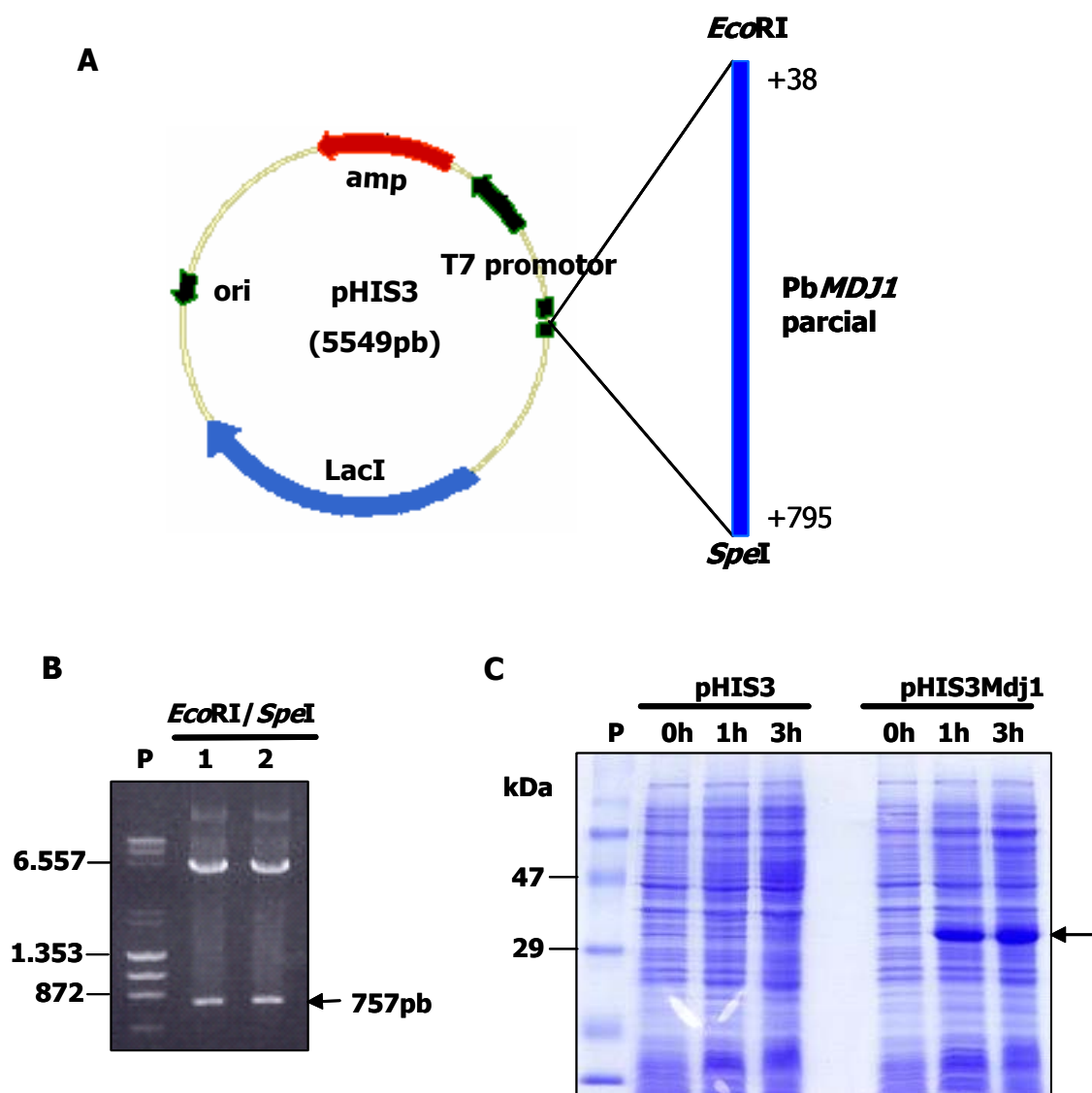


Figura 9: **A** – Representação esquemática do plasmídeo de expressão pHIS3 contendo o inserto o *PbMDJ1* truncado (nt 38 a 795, oligoiniciados por B3/A7). **B** – Gel de agarose 1%, impregnado com brometo de etídeo, mostrando a digestão da construção pHIS3Mdj1 (1 e 2) com as enzimas *EcoRI* e *SpeI*. A banda de 757pb corresponde ao inserto. Marcadores (P) estão indicados em pb **C** – Gel de poliacrilamida 12%, corado pelo “Coomassie blue”, mostrando o perfil do extrato total de bactérias *E. coli* BL21pLysS contendo o vetor (pHIS3Mdj) ou o controle sem inserto (pHIS3), antes (0 h) e após indução com IPTG por 1 e 3 h. A proteína recombinante (massa aparente de 31 kDa) está indicada pela seta.

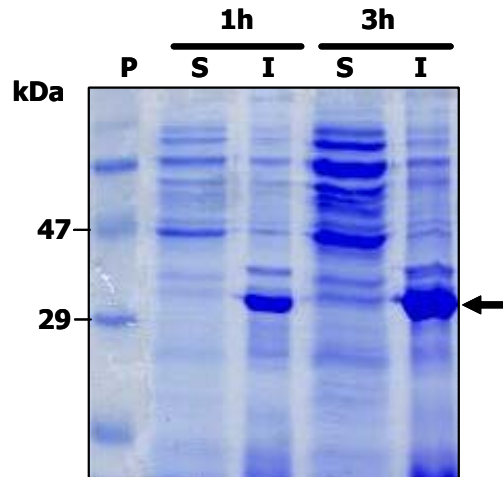


Figura 10 – Gel de poliacrilamida 12%, corado com o corante “Coomassie blue”, apresentando o perfil dos lisados de bactérias (BL21pLysS) transformadas com o plasmídeo pHis3Mdj1 após 1 e 3h de indução com IPTG (0,5mM). **S**, fração solúvel e **I**, fração insolúvel (seta); **P**, padrão de massa molecular em kDa. A seta indica a proteína PbMdj1 recombinante.

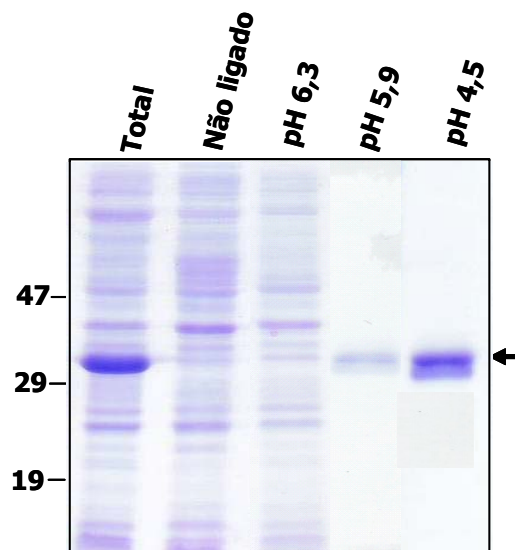


Figura 11 – Purificação da PbMdj1 recombinante (seta, 31 kDa) em coluna Ni-NTA, a partir do extrato bruto de proteínas expressas em bactérias *E. coli* BL21pLysS, solubilizado em 8M de uréia. O extrato total de proteínas, proteínas não ligantes, proteínas eluídas pelos tampões com pH 6,3, 5,9 e 4,5, bem como a migração do padrão de peso molecular em kDa estão indicados.

Após purificação em coluna de níquel, a proteína recombinante resultante foi utilizada na produção de anticorpos policlonais anti-PbMdj1 de coelhos. Aproximadamente 300 µg da proteína foi aplicada em gel de SDS-PAGE 12%. Esse procedimento foi seguido para separar a proteína recombinante da uréia e de traços de outras proteínas bacterianas ligantes de níquel. O gel foi corado por "Coomassie blue" e a banda correspondente à proteína recombinante foi cortada do gel, ressuspensa em PBS e homogenizada pela passagem em seringa e agulha. Este material foi aplicado por via subcutânea em vários pontos no dorso de coelho.

Após 40 dias de imunização, o soro do animal apresentou reatividade fraca com a proteína purificada em "immunoblotting" (Figura 12A). O soro coletado após o reforço (65 dias), entretanto, foi fortemente reativo (Figura 12B), com títulos que alcançaram 1:16.000 mesmo quando testado com uma pequena quantidade da proteína recombinante, como visto na Figura 12C.

Os anticorpos policlonais anti-PbMdj1r foram utilizados em experimentos de imunolocalização e de localização da proteína nativa. Para tanto, foi realizada uma purificação de IgG total em coluna de proteína A, como descrito em Material e Métodos. A Figura 13A mostra as preparações obtidas, nas quais as bandas correspondentes à cadeia pesada e leve da imunoglobulina G estão indicadas pelas setas. Paralelamente, foram purificados anticorpos policlonais monoespecíficos (Figura 13B).

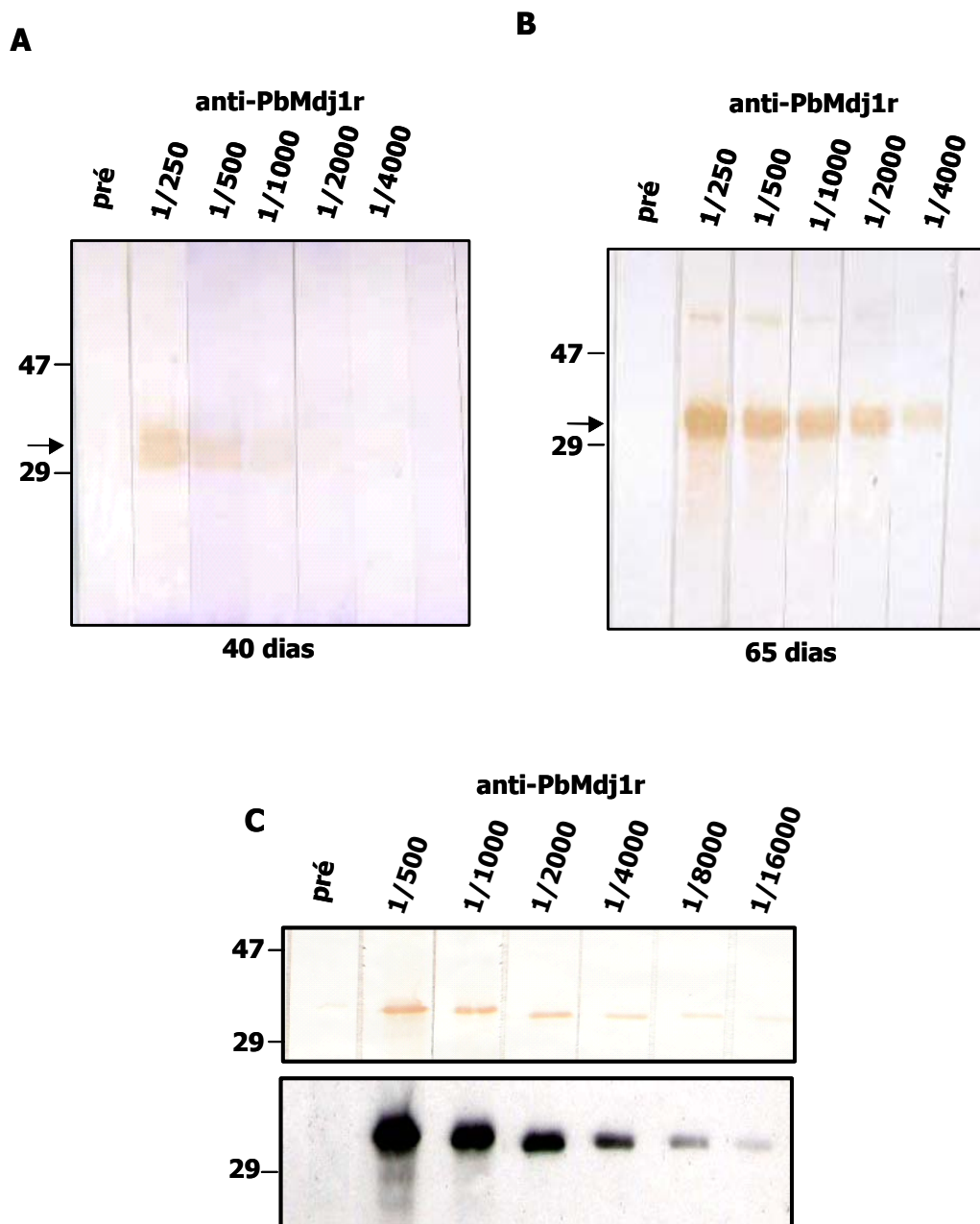


Figura 12 – “Immunoblotting” mostrando a reatividade do soro policlonal anti-PbMdj1 com a proteína recombinante purificada (300 μ g em **A** e **B** e 100 ng em **C**). Observa-se a reação com o soro de coelho pré-imune (1/250) e imune em várias diluições após 40 e 65 dias da imunização. **C**, reação com soro de coelho imunizado após 65 dias, revelado por DAB e quimioluminescência. O marcador de massa molecular à esquerda está representado em kDa.

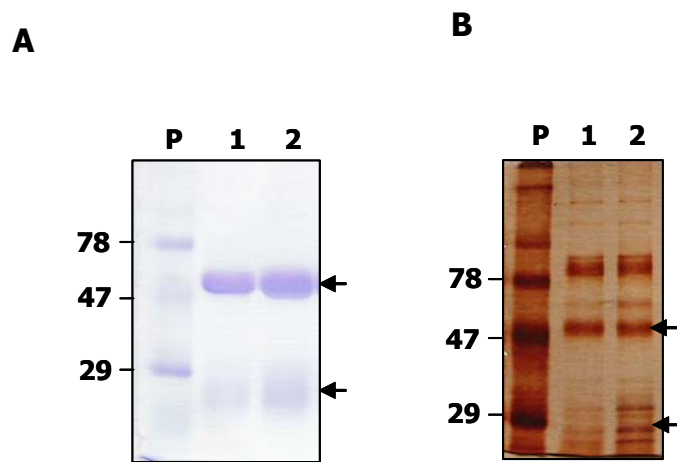


Figura 13 - A, Purificação de IgG total em coluna de Proteína A Sepharose a partir de soro de coelho hiperimune anti-PbMdj1 recombinante e **B**, Purificação de IgG policlonal monoespecífica anti-PbMdj1 a partir de soro total hiperimune. Os eluatos foram submetidos a SDS-PAGE 10% e os géis corados por "Coomassie blue" (A) e nitrato de prata (B). P, padrão de massa molecular (valores em kDa); 1 e 2, frações eluídas em tampão ácido. As setas indicam a cadeia pesada e leve da imunoglobulina G.

4.3. Detecção da proteína PbMdj1 nativa

Com o uso do anticorpo policlonal anti-PbMdj1r foi possível identificar e localizar a proteína nativa no extrato mitocondrial de leveduras de *P. brasiliensis*. Extratos citoplasmáticos e mitocondriais totais foram preparados a partir de células recolhidas antes ou após choque térmico de 42 °C (Figura 14A) e testados por “immunoblotting” com soros pré-imune ou hiperimune anti-PbMdj1 (1:1.500). Observa-se na Figura 14B que os soros reconheceram fortemente uma banda de aproximadamente 55 kDa nas amostras mitocondriais, a qual não foi reconhecida pelo soro pré-imune de coelho. Esta banda corresponde ao peso molecular estimado de PbMdj1 desprovido da sequência de endereçamento mitocondrial clivada.

O componente do extrato mitocondrial proveniente de células que sofreram choque-térmico mostrou uma marcação mais acentuada, sugerindo que PbMdj1 tem sua expressão aumentada em condições de estresse térmico (Figura 14B). O mesmo ocorreu com os níveis de transcrição de *PbMDJ1* (Figura 15) analisada inicialmente por ensaio de “Northern blot”, onde se observou o aparecimento de bandas de aproximadamente 2,05 Kb somente após o choque térmico. Após 60 min o aumento foi mais pronunciado. O normatizador do ensaio foi a visualização da quantidade relativa das subunidades 18S e 28S do RNA ribossomal das amostras testadas, mostrado pelo gel de agarose corado com brometo de etídeo (Figura 15). Desta forma, o aumento da expressão da transcrição é acompanhado pelo aumento da tradução da proteína após choque térmico a 42 °C (Figura 14B e 15).

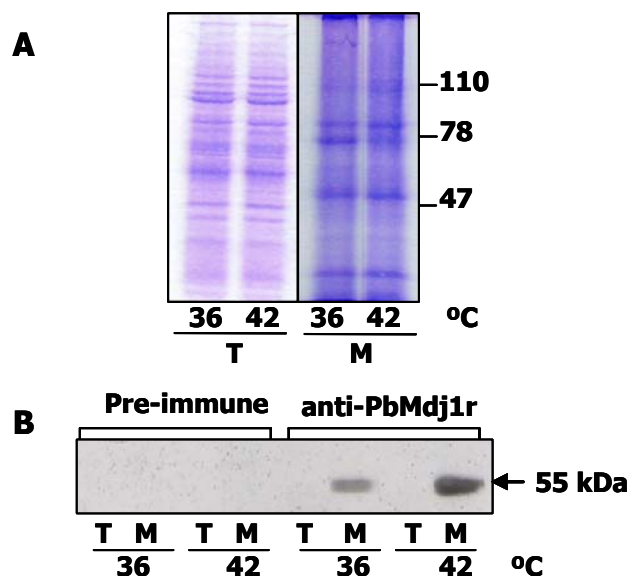


Figura 14 - Reconhecimento da PbMdj1 nativa pelo anticorpo anti-PbMdj1. **A**, Gel SDS-PAGE 10% corado pelo "Coomassie blue" do extrato total (T) e mitocondrial (M) de células leveduriformes de *P. brasiliensis* crescidas a 36°C antes e após choque térmico a 42 °C por 60 min. **B**, Western blot revelado por quimioluminescência com os extratos totais e mitocondriais (20 µg por poço) utilizando os soros pré-imune e anti-PbMdj1r na diluição de 1:1.500. O padrão de peso molecular está indicado em kDa. Uma banda de 55 kDa (seta) correspondente à PbMdj1 foi observada apenas nas frações mitocondriais.

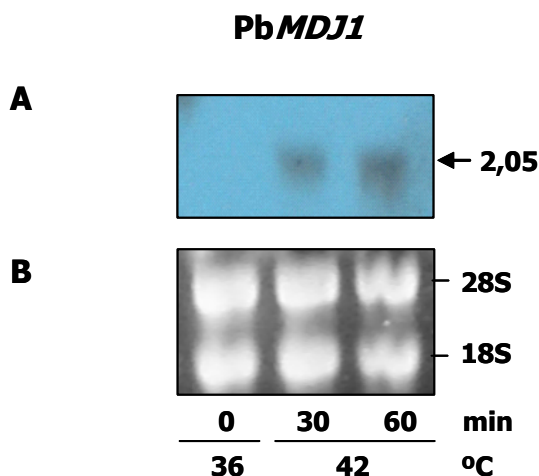


Figura 15 – **A**, Análise por "Northern blot" de RNA total de células leveduriformes de *P. brasiliensis* crescidas a 36 °C antes e após choque térmico a 42 °C por 30 e 60 min, usando a sonda o gene *PbMDJ1*. A seta indica a massa molecular em kb. O painel **B** mostra gel de agarose com brometo de etídeo, replica daquele transferido, no qual as subunidades 18S e 28S do rRNA estão visualizadas.

4.4. Purificação de PbMdj1 nativa a partir de extrato total de mitocôndrias de *P. brasiliensis*

Para a purificação de PbMdj1 nativa, as células leveduriformes de *P. brasiliensis* foram cultivadas e processadas como descrito em Material e Métodos para a obtenção do extrato mitocondrial do fungo. A fração IgG dos anticorpos policlonais anti-PbMdj1 foram acoplados na resina Affi-Gel 10 (BioRad), o extrato mitocondrial foi aplicado na coluna resultante e as proteínas ligadas foram eluídas em várias frações. A proteína PbMdj1 foi encontrada principalmente na fração 1. Três purificações foram realizadas e as alíquotas da fração 1 foram reunidas e concentradas. Este material foi aplicado em gel de SDS-PAGE 10%, corado pela prata e duas bandas foram identificadas (Figura 16A), entre as quais apenas a banda de 55 kDa reagiu em ensaio de "immunoblotting" com soro policlonal anti-PbMdj1 (Figura 16B). A banda de aproximadamente 65 kDa provavelmente foi carregada como parte de um complexo proteico.

Os anticorpos anti-PbMdj1 acoplados em resina Affi-Gel 10 foram utilizados em ensaios de imunocaptura, seguido de detecção das proteínas eluídas por "immunoblotting". Apenas uma banda de 55 kDa apresentou reatividade com o soro de coelho anti-PbMdj1, demonstrando a grande especificidade deste anticorpo (Figura 16C).

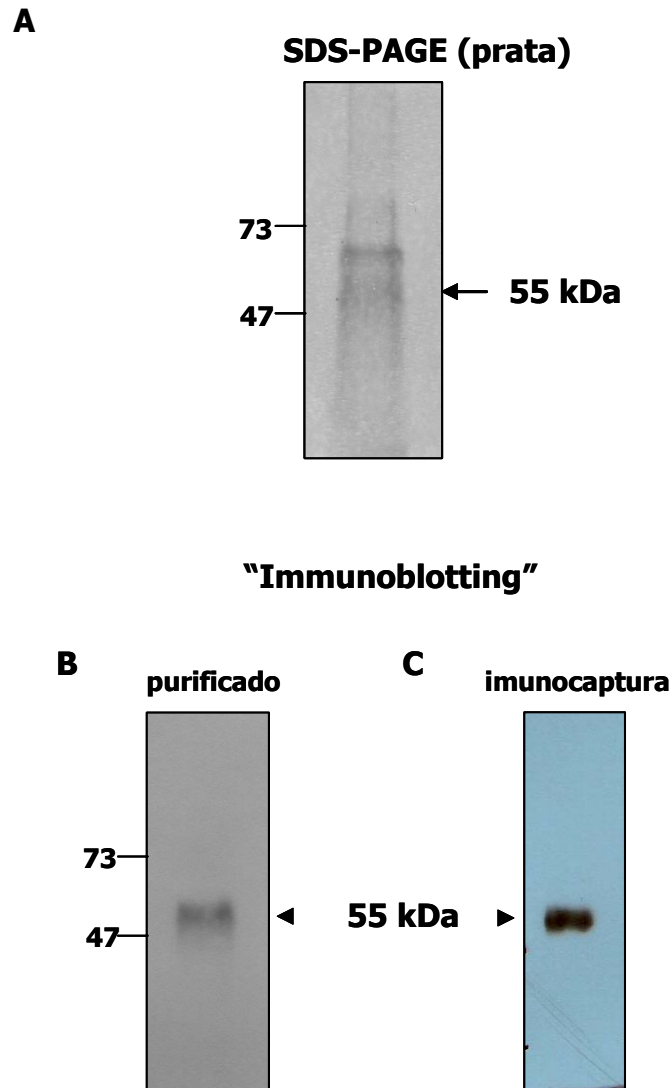


Figura 16 – Purificação de PbMdj1 nativa. **A**, Gel de SDS-PAGE 10% corado pela prata, mostrando o produto da purificação em coluna de afinidade anti-PbMdj1. **B** e **C**, “Immunoblotting” de anti-PbMdj1r com o produto de purificação da coluna de afinidade (B) ou de imunocaptura de extrato mitocondrial de *P. brasiliensis* (C) revelados por quimioluminescência. A banda de 55 kDa (seta) corresponde à PbMdj1. Os marcadores estão em kDa.

4.5. Localização de PbMdj1 em *P. brasiliensis*

Os anticorpos policlonais produzidos contra PbMdj1 recombinante purificada foram utilizados em experimentos de citolocalização da proteína nativa nas células fúngicas de *P. brasiliensis*. Para tanto, leveduras de *P. brasiliensis* crescidas em YPD-ágar foram permeabilizadas, fixadas em metanol e incubadas com soro (diluição 1:200) ou IgG (30 ou 60 µg/mL) de coelho pré-imune ou imunizado com PbMdj1r. As células incubadas com soro hiperimune apresentaram padrão de marcação granular (Figura 17B), o qual não foi observado com o soro controle pré-imune (Figura 17A). Com anticorpos mono específicos, o padrão de marcação foi semelhante ao observado com o soro hiperimune do coelho, demonstrando a especificidade da reação (Figura 17C).

Para verificar se a marcação correspondia à localização mitocondrial, o marcador mitocondrial fluorescente Mitotracker Red 580 foi utilizado. Este corante difunde-se passivamente através da parede e membrana das células fúngicas e acumula em mitocôndrias ativas, tornando-as visíveis em microscópio de fluorescência. Com a finalidade de padronizar o experimento, uma curva de tempo de incubação e concentração do corante foi realizada. Para a marcação das mitocôndrias, as leveduras foram incubadas nas concentrações de 10, 20 e 50 nM por 10 e 20 min. O melhor ponto para a observação das mitocôndrias foi de 20 nM por 20 min (Figura 18). As mitocôndrias puderam ser visualizadas por padrão de marcação granular no citoplasma celular. O padrão observado na Figura 17 foi semelhante ao obtido com o corante Mitotracker. Todavia, devido às limitações da técnica não foi possível sugerir uma localização mais precisa da marcação. Estes resultados foram melhor elucidados com os experimentos de microscopia confocal e eletrônica.

Em experimentos de dupla marcação em microscopia confocal, foi observado um padrão de marcação granular com o anticorpo anti-PbMdj1r (verde) e com o corante MitoTracker Red (vermelho). A sobreposição das imagens mostrou clara co-localização de PbMdj1 com o marcador mitocondrial (amarelo) (Figura 19A). Fraca intensidade de fluorescência foi observada com IgG de coelho pré-imune (Figura 19B).

Além da marcação na mitocôndria, foi observada reatividade do anticorpo policlonal anti-PbMdj1r com a superfície do fungo em toda extensão (Figura 19A). Forte marcação (verde) foi também observada na região de brotamento, o que pode ser observado particularmente na Figura 19C. O corte longitudinal desta imagem facilitou uma visão da grande intensidade de marcação na superfície da célula-filha. Foram realizados ainda experimentos de imunolocalização com *S. cerevisiae*, *C. albicans* e *C. neoformans* com soro de

coelho imune anti-PbMdj1r, porém todas as reações foram negativas, assim como as reações de "immunoblotting" com extrato mitocondrial de *S. cerevisiae* (dados não apresentados).

Detalhes da localização celular de PbMdj1 foram também explorados por microscopia eletrônica de transmissão, utilizando imuno-marcação com ouro coloidal. Este experimento foi realizado com a ajuda da Dra. Luciana Ganiko e da Dra. Edna Freymüller no Centro de Microscopia Eletrônica da UNIFESP/EPM.

Na Figura 20 pode-se observar detalhes da localização ultra-estrutural da proteína PbMdj1 de *P. brasiliensis*. Nestas microscopias, foi observado um grande número de mitocôndrias distribuídas preferencialmente na periferia da célula, as quais apresentaram morfologia alongada. Os anticorpos anti-PbMdj1r reagiram com moléculas no interior das mitocôndrias (seta), especialmente daquelas localizadas na região periférica próxima à membrana celular. As mitocôndrias que não estavam próximas à parede celular estavam menos marcadas. A marcação no citoplasma foi escassa, porém ocorreu em alguns pontos entre a membrana plasmática e as mitocôndrias. Abundante marcação foi observada na região de brotamento (Figura 20D), resultado que está de acordo com a intensidade de fluorescência vista nesta região pela microscopia confocal (Figura 19C). Intensa marcação foi visualizada ao longo de toda parede celular do fungo (Figura 20B e C), a qual não foi observada nas seções ultra-finas incubadas com IgG de coelho pré-imune (Figura 20E).

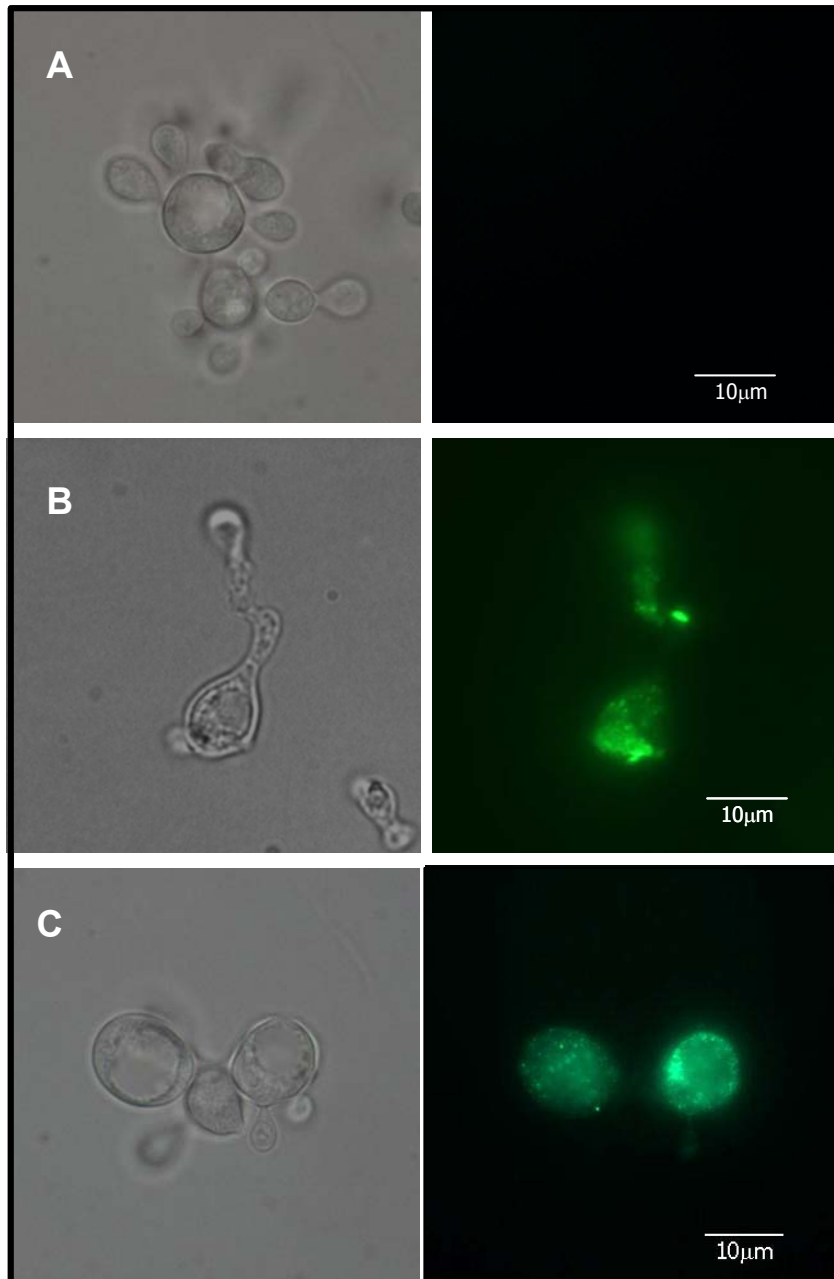


Figura 17 - Imunolocalização da PbMdj1 em leveduras de *P. brasiliensis* analisada por microscopia de fluorescência. As células foram incubadas com soro pré-imune (**A**), soro total hiperimune de coelho anti-PbMdj1 (**B**) ou anticorpo policlonal monoespecífico anti-PbMdj1 (**C**). As imagens em campo claro estão à esquerda.



Figura 18 - Marcação de *P. brasiliensis* com Mitotracker Texas Red, corante fluorescente seletivo para mitocôndrias. Células viáveis foram incubadas durante 20 min com uma concentração de 20 nM do corante.

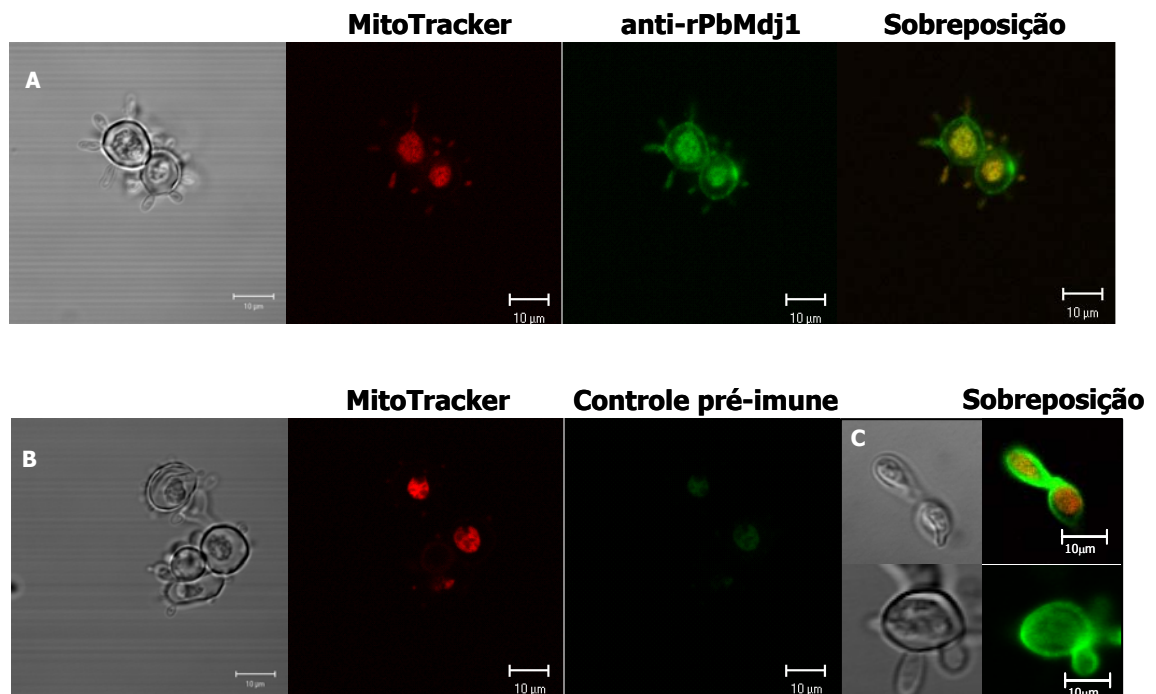


Figure 19 - Localização de PbMdj1 em células leveduriformes de *P. brasiliensis* por microscopia confocal. Em vermelho, marcação com MitoTracker Red. As imagens em verde mostram a reação do anti-PbMdj1r monoespecífico conjugado com FITC. O controle da reação foi realizado com IgG pré-imune (painel **B**). A sobreposição das imagens mostrou a co-localização da marcação (amarelo-laranja). O painel **C** traz duas imagens de secções de células brotantes mostrando forte reação com anti-PbMdj1r (painel inferior) ou com sobreposição de imagens (painel superior). Resultados similares foram obtidos com IgG anti-PbMdj1r ou anticorpos monoespecíficos.

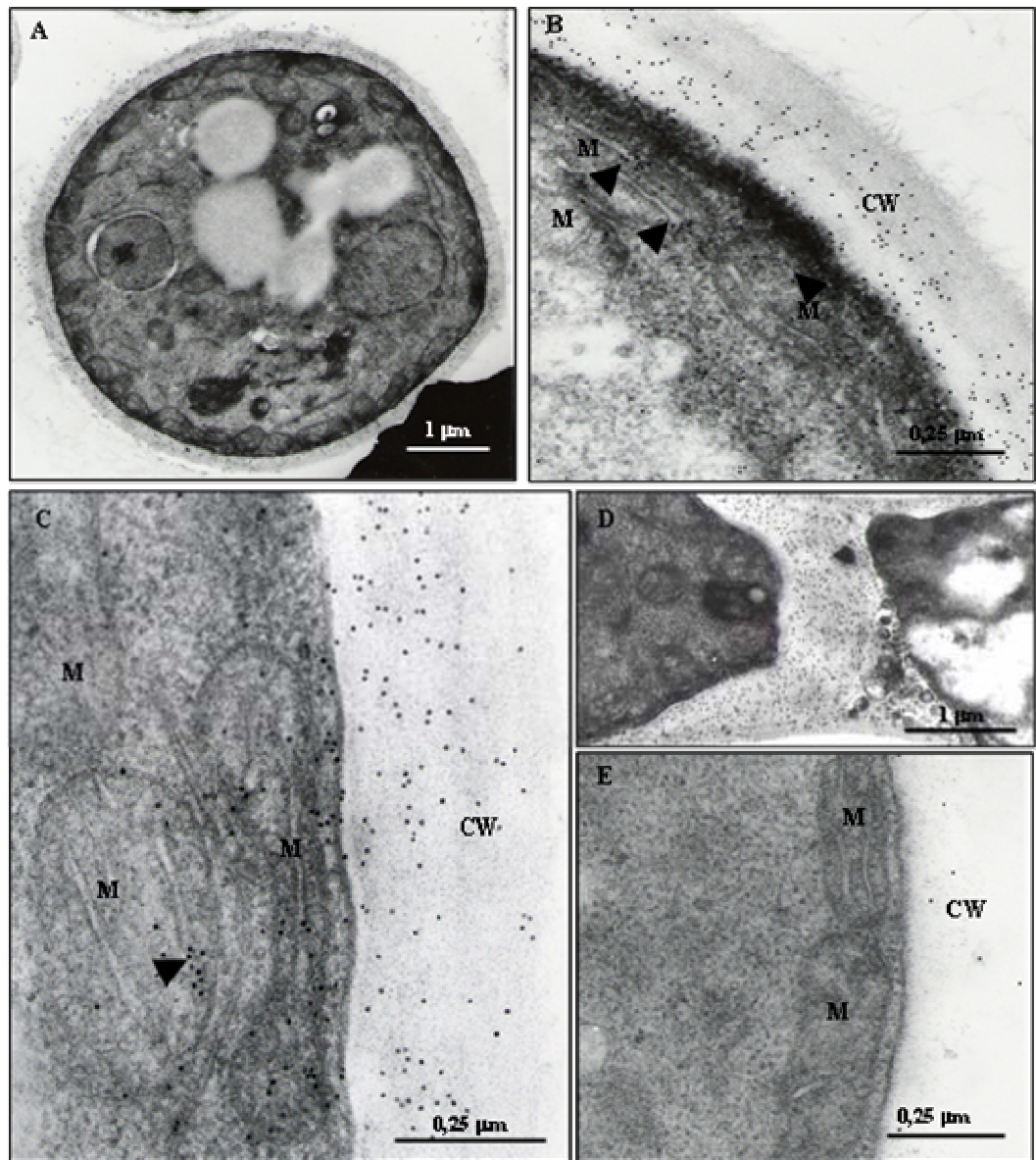


Figure 20 – Localização ultraestrutural de PbMdj1 em células leveduriformes de *P. brasiliensis* incubadas com a fração IgG (60 µg/mL) de ambos anti-PbMdj1r (A-D) ou do controle pré-imune (E). Cada painel mostra uma célula diferente. A, Fotomicrografia panorâmica. B e C, detalhe em maior aumento, mostrando a marcação dentro das mitocôndrias (M) e marcação da parede celular (PC). C, detalhamento da marcação na membrana celular e entre a mitocôndria e a parede celular. D, Intensa marcação na região de brotamento.

A marcação na superfície de células leveduriformes de *P. brasiliensis* foi também demonstrada por experimentos de citometria de fluxo (FACS). Para tanto, as células fúngicas foram fixadas em paraformaldeído e incubadas com 50, 100 e 200 µg/mL IgG de coelho pré-imune ou imunizado com PbMdj1r. Estas células foram analisadas segundo sua fluorescência, granulosidade e tamanho, onde se observou uma nítida curva dose-resposta. A maior reatividade (marcação superior a 50 %) foi observada na concentração de 200 µg/mL de IgG anti-PbMdj1r, enquanto o controle negativo (IgG de coelho pré-imune) apresentou apenas 7 % de marcação (Figura 21).

Esta localização ectópica de PbMdj1 foi também confirmada em ensaios de "immunoblotting" com extrato de parede de células leveduriformes de *P. brasiliensis*. A principal dificuldade de se identificar componentes de parede consiste na obtenção deste material a partir de células totais, uma vez que durante a extração deve-se garantir que o extrato não esteja contaminado com componentes citoplasmáticos.

Nossa análise foi realizada com uma técnica de extração branda de componentes fracamente ligados à parede celular do fungo, a qual ao mesmo tempo garante a integridade celular. Essa estratégia foi utilizada por López-Ribot e colaboradores (1996), que detectaram Hsp70 na parede celular de *C. albicans* extraída pela incubação de células com uma solução levemente alcalina contendo β-mercaptoetanol (β-ME).

Na figura 22A pode-se observar o padrão eletroforético das proteínas extraídas com β-ME da parede celular de *P. brasiliensis*. O extrato foi aplicado em gel de SDS-PAGE 10%, transferido para membrana de nitrocelulose e analisado por "immunoblotting" com IgG (12 µg/mL) monoespecífica purificada do soro pré-imune ou do soro hiperimune anti-PbMdj1r. Observa-se na Figura 22B que os anticorpos reconheceram uma banda de aproximadamente 55 kDa comparável com a mitocondrial reconhecida pelo mesmo soro, a qual não foi detectada pelo soro pré-imune de coelho. Uma banda inespecífica de aproximadamente 85 kDa, com menor intensidade de marcação, foi visualizada tanto com a IgG anti-PbMdj1r e IgG de soro de coelho pré-imune.

Células leveduriformes de *P. brasiliensis* foram tratadas com a solução alcalina com β-ME e incubadas com 200 µg/mL de IgG anti-PbMdj1r, as quais foram analisadas por citometria de fluxo. Este ensaio teve por finalidade verificar se haveria diminuição na intensidade de marcação. Ao contrário do que se esperava, houve aumento na marcação com consequente deslocamento da curva para a direita (Figura 21 - linha amarela).

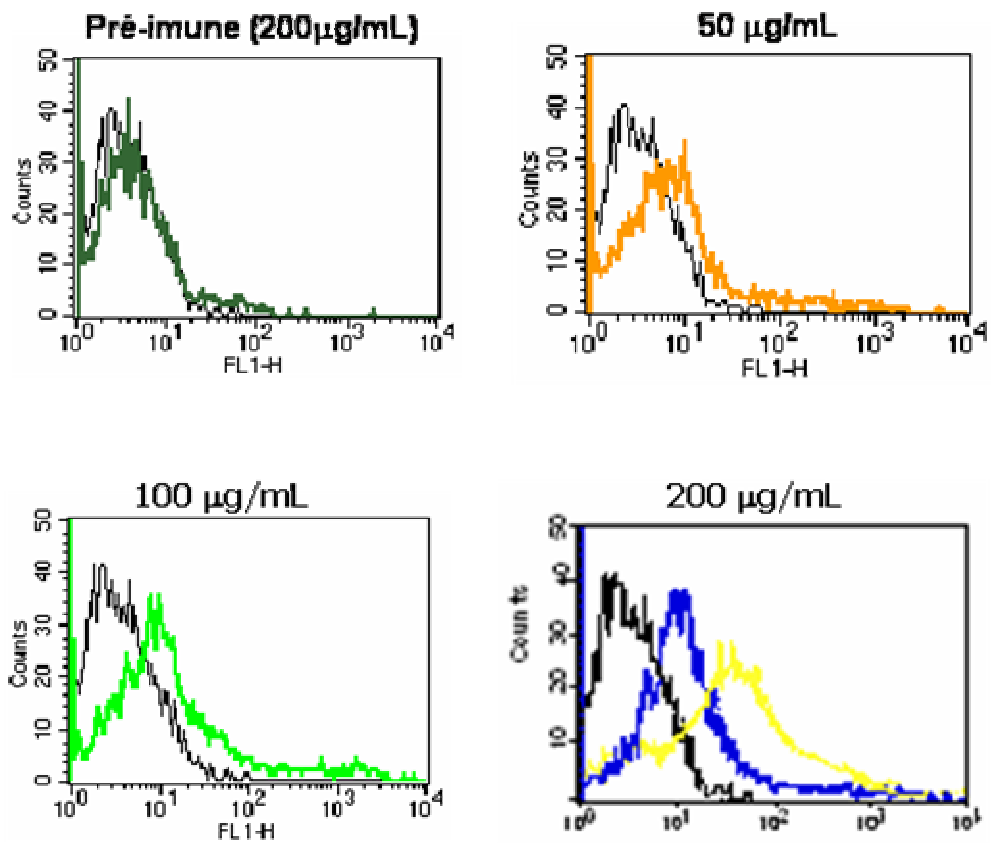


Figura 21 – Ensaio de citometria fluxo (FACS) com células leveduriformes de *P. brasiliensis* incubadas com IgG pré-imune de coelho (200 µg/mL) ou anti-PbMdj1r (50, 100 e 200 µg/mL). As linha pretas indicam o padrão de auto-fluorescência das células leveduriformes. No último quadro está apresentado em amarelo o padrão de marcação das células que foram previamente incubadas com solução levemente alcalina com β-mercaptoetanol.

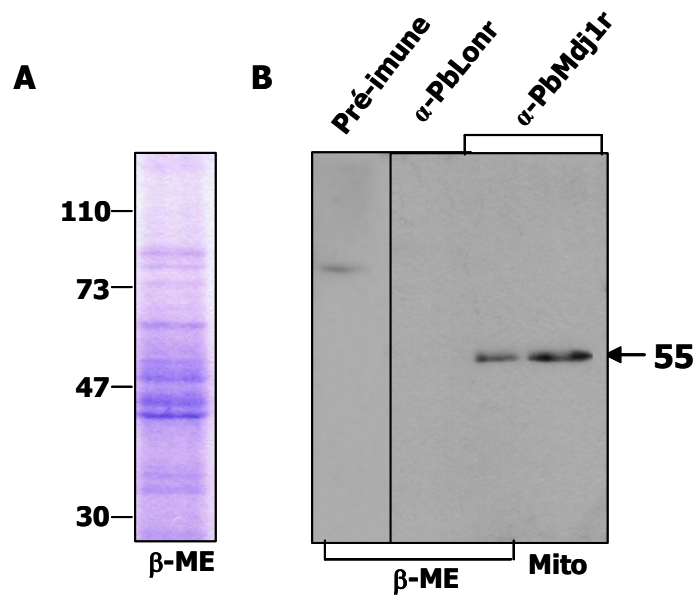


Figura 22 - Localização de PbMdj1 na parede celular de *P. brasiliensis*. **A**, Padrão do extrato de parede de *P. brasiliensis* extraído em solução contendo β -mercaptoetanol (β -ME) em gel de SDS-PAGE 10% corado pelo corante "Coomassie blue". **B**, "Western blot", revelado por quimioluminescência, do extrato β -ME utilizando a fração de IgG anti-PbMdj1r, anti-PbLonr e soro pré-imune na diluição 1:1.500. O extrato mitocondrial (Mito) foi aplicado em paralelo e analisado com IgG anti-PbMdj1r. Os pesos moleculares estão indicados em kDa.

4.6. Efeito de anticorpos policlonais anti-PbMdj1 no crescimento de *P. brasiliensis*.

Em virtude da presença de PbMdj1 na parede celular, buscou-se avaliar se a adição de anticorpos policlonais anti-PbMdj1r em culturas do fungo resultaria em alguma alteração no crescimento. Dessa forma, células de *P. brasiliensis* crescidas por 6 dias em meio líquido em microplacas foram incubadas com diferentes concentrações de IgG de coelho pré-imune ou imunizado contra PbMdj1r. Nenhuma alteração significativa foi observada em relação aos controles negativos, PBS e IgG de coelho pré-imune.

TABELA 1. Falta de inibição do crescimento de *P. brasiliensis* por IgG anti-PbMdj1r

Condições ($\mu\text{g/mL}$) ^a	Nº de CFU ^b
Meio de cultura	37 \pm 5,2
Anti-PbMdj1r	
200.....	38,33 \pm 4,7
100.....	46,75 \pm 9,0
50.....	37,75 \pm 2,7
25.....	38 \pm 0,8
12,5.....	39 \pm 0,8
Soro pre-imune	
200.....	46,5 \pm 3,5
100.....	41,75 \pm 4,9
50.....	42,25 \pm 5,7
25.....	43,25 \pm 3,1
12,5.....	41,6 \pm 5,8

^a Células leveduriformes (10^2) foram cultivadas na presença de 200, 100, 50, 25 ou 12,5 mg/mL de anticorpos. Depois da incubação por 48 ou 72 h at 36 °C, as culturas eram suplementadas com os anticorpos.

^b Número de CFU foi determinado no 6º dia de cultura. Não houve diferenças estatisticamente significativa no nº de CFU ($p > 0,05$).

4.7. Reatividade de PbMdj1 recombinante com soro de pacientes com paracoccidioidomicose (PCM)

A reatividade de 8 soros de pacientes com PCM, um com aspergilose, outro com histoplasmoze, além de um soro de pessoa saudável foram testados em experimentos de "immunoblotting" para proteína recombinante PbMdj1. Todos os soros foram testados na diluição de 1/100. Como controle positivo foi utilizado o soro hiperimune de coelho anti-PbMdj1r. Observa-se na Figura 23 que 3 soros de pacientes com PCM reconheceram a PbMdj1r.

4.8. PbMdj1 é exportada no sobrenadante de cultura de *P. brasiliensis*?

Para verificar se PbMdj1 é secretada no sobrenadante de cultura, células leveduriformes de *P. brasiliensis* foram crescidas por 4, 6, 8, 10 e 14 dias a 36 °C sob agitação (Figura 24) e o sobrenadante destas culturas coletados, concentrados e testados para a presença de PbMdj1 por "immunoblotting". Em nenhum dos pontos da curva de crescimento houve reatividade das proteínas secretadas com o soro de coelho anti-PbMdj1r. A viabilidade das células fúngicas foi averiguada durante o crescimento, já que a proteína do sobrenadante poderia ser o produto da lise de células mortas. O fungo apresentou 98 % de viabilidade no primeiro dia da contagem e 84 % no último dia (14^º) (Figura 24). Pode-se observar ainda que a fase exponencial ficou evidente a partir do 6^º dia e o pico de contagem foi no 10^º dia de cultivo, ponto no qual iniciou a fase estacionária. A viabilidade das células fúngicas foi determinada através da contagem em câmara de Neubauer utilizando o corante vital Tripán "blue".

Os experimentos de microscopia confocal, eletrônica e de FACS foram realizados com culturas de células fúngicas de 5 - 6 dias de crescimento. Na Figura 24 podemos observar que a viabilidade das células de *P. brasiliensis* em cultura era superior a 90 % neste período. Este tipo de informação serviu para descartar a hipótese de que os resultados encontrados nestes experimentos fossem produtos da ligação de moléculas citoplasmáticas oriundas de lise celular.

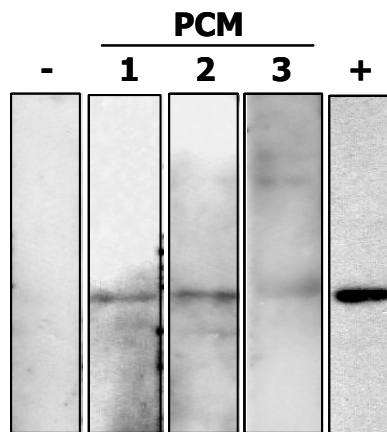


Figura 23 – Reconhecimento por “immunoblotting” da proteína recombinante PbMdj1 por 3 soros de pacientes (1:200) com PCM. Os controles positivo (PbMdj1r com soro de coelho 1:16.000) e negativo (soro de pessoa saudável) estão indicados. Os soros dos pacientes testados reagiram em teste de imunodifusão com gp43 com títulos de 1:64 e 1:32.

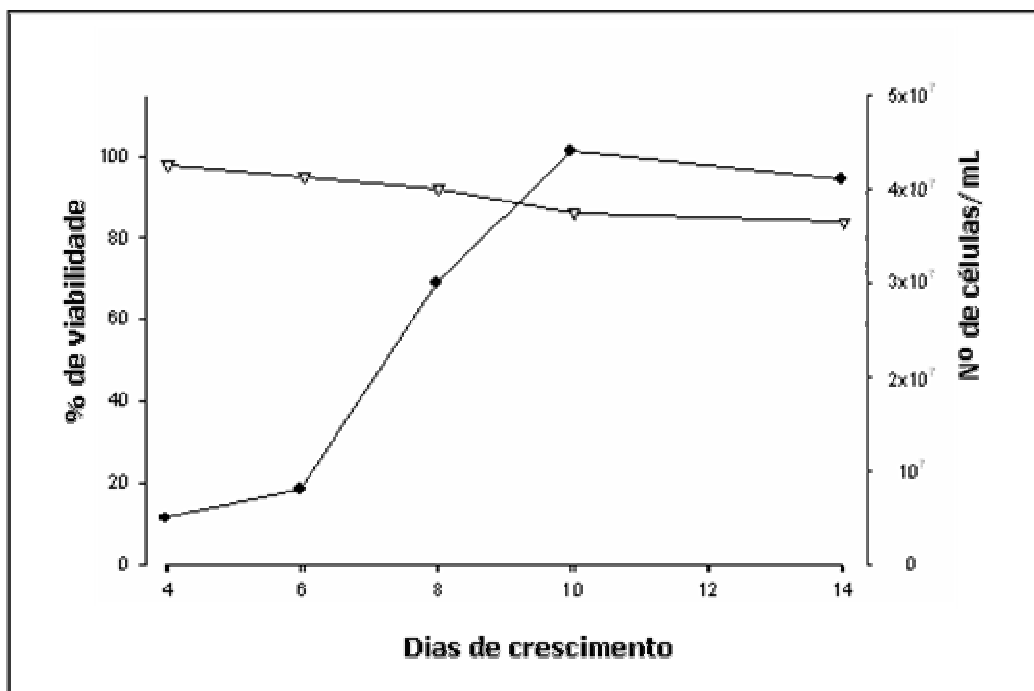


Figura 24 – Curva de crescimento do isolado Pb18 de *P. brasiliensis* mostrando a contagem de células viáveis (●) e a viabilidades do fungo (▼) durante 14 dias em meio YPD modificado. As células foram contadas em câmara de Neubauer.

PARTE II

4.9. Caracterização dos elementos de transcrição da região promotora dos genes *PbMDJ1/PbLON*

A segunda parte deste trabalho consistiu na caracterização da região promotora dos genes *PbMDJ1* e *PbLON*, os quais se encontram em direções opostas e possivelmente compartilhando elementos de transcrição. A Figura 25 apresenta os resultados referentes à preparação de reagentes para os experimentos de proteção contra Dnase I ("footprinting"). O fragmento correspondente à região intergênica dos genes *PbMDJ1/PbLON* (ML) dos isolados Pb3 e Pb18 foi amplificado por PCR utilizando os oligonucleotídeos D4 (sense) e 2A9 (anti-sense) (Figura 25C) como esquematizado na Figura 25B. O produto desta amplificação foi clonado em pGEM-T (Figura 25A).

Extratos totais dos isolados Pb18 e Pb3 de *P. brasiliensis* foram preparados a partir de células leveduriformes e utilizados em ensaios de "footprinting" e de retardo da motilidade eletroforética (EMSA). O perfil eletroforético destes extratos podem ser observados na Figura 25D.

A Figura 26A mostra um esquema da reação de DNase I "footprinting". O plasmídeo contendo o fragmento ML foi digerido com a enzima *EcoRI*, para a liberação do inserto, o qual foi purificado e as extremidades marcadas radioativamente com ajuda da T4 polinucleotídeo kinase (Promega) e [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP. Nesses experimentos, apenas uma das extremidades deve apresentar a marcação. Para a retirada da extremidade 3' marcada, foi utilizada a enzima de restrição *SpeI*, cujo sítio está presente no fragmento (Figura 26B). A sonda marcada foi incubada com extrato total do fungo e a enzima Dnase I foi adicionada à mistura em quantidade suficiente para provocar, em média, apenas uma clivagem por molécula de DNA. No controle não foi adicionado o extrato. Os produtos da clivagem gerados na presença ou ausência do extrato total de *P. brasiliensis* foram aplicados lado a lado em gel de eletroforese em condições desnaturantes.

Os melhores resultados estão nas Figuras 27 e 28, onde foram utilizados 100 μg (Pb18) e 120 μg (Pb3) de extrato total de *P. brasiliensis*. Extratos nucleares foram também preparados, entretanto o rendimento foi insuficiente para utilização nos ensaios. Na Figura 27 podemos observar duas regiões de proteção (as quais nomeamos AP1 e HSE2) no fragmento ML do isolado Pb18. Com o extrato do isolado Pb3 foram observadas 5 regiões de proteção (AP1, HSE1, HSE2, HSE3 e GT) (Figura 28). A sequência correspondente às regiões de

proteção foi identificada pela comparação com a reação de sequenciamento iniciada pelo oligonucleotídeo D4 aplicada paralelamente.

A sequência do fragmento ML foi analisada pelo programa de computador TFSEARCH (<http://molsun1.cbrc.aist.go.jp/research/db/TFSEARCH.html>), o qual detecta os fatores de transcrição putativos que poderiam se ligar nas regiões indicadas (Figura 29). Nesta análise, pode-se verificar que AP1 contém um motivo ligante de AP-1-like (GATGACTAAAGA) na direção de Pb*LON*, a -265 pb do códon de iniciação, com alta identidade com a sequência "AP-1 recognition elements" de mamíferos ARE (G/AC/GTGAGACTNC/ANA/T). Esta região também contém um motivo ligante de Skn-1-like (CTTAAGTCAATCCA) na direção de Pb*MDJ1*. As regiões de proteção HSE1 (CGGCTAACTTTGTTCCACGAAAA), HSE2 (ACTTGATCAACTCGGAGAACTCGTCGAATAG) e HSE3 (AGAAAGGGAATTGCGGAGTGAGT) contêm motivos com alta homologia para ligação com Hsf ("heat shock factor"). Estes elementos encontram-se nas posições -223, -257 e -331, respectivamente, do códon de iniciação de Pb*MDJ1*. A região de proteção HSE2 é homóloga a um elemento de choque térmico não convencional (ncHSE) de *MDJ1* de *S. cerevisiae* (Tachibana et al., 2002). As sequências de HSE-like estão direcionadas para Pb*MDJ1*. Todavia, as sequências identificadas como HSE-like são palindrômicas e podem funcionar em ambas as direções. O ensaio de proteção com o fragmento ML e o extrato do isolado Pb3 aparentemente apresentou uma região de proteção contendo homologia com um elemento de GATA-2 e GATA-1 direcionado para Pb*MDJ1*.

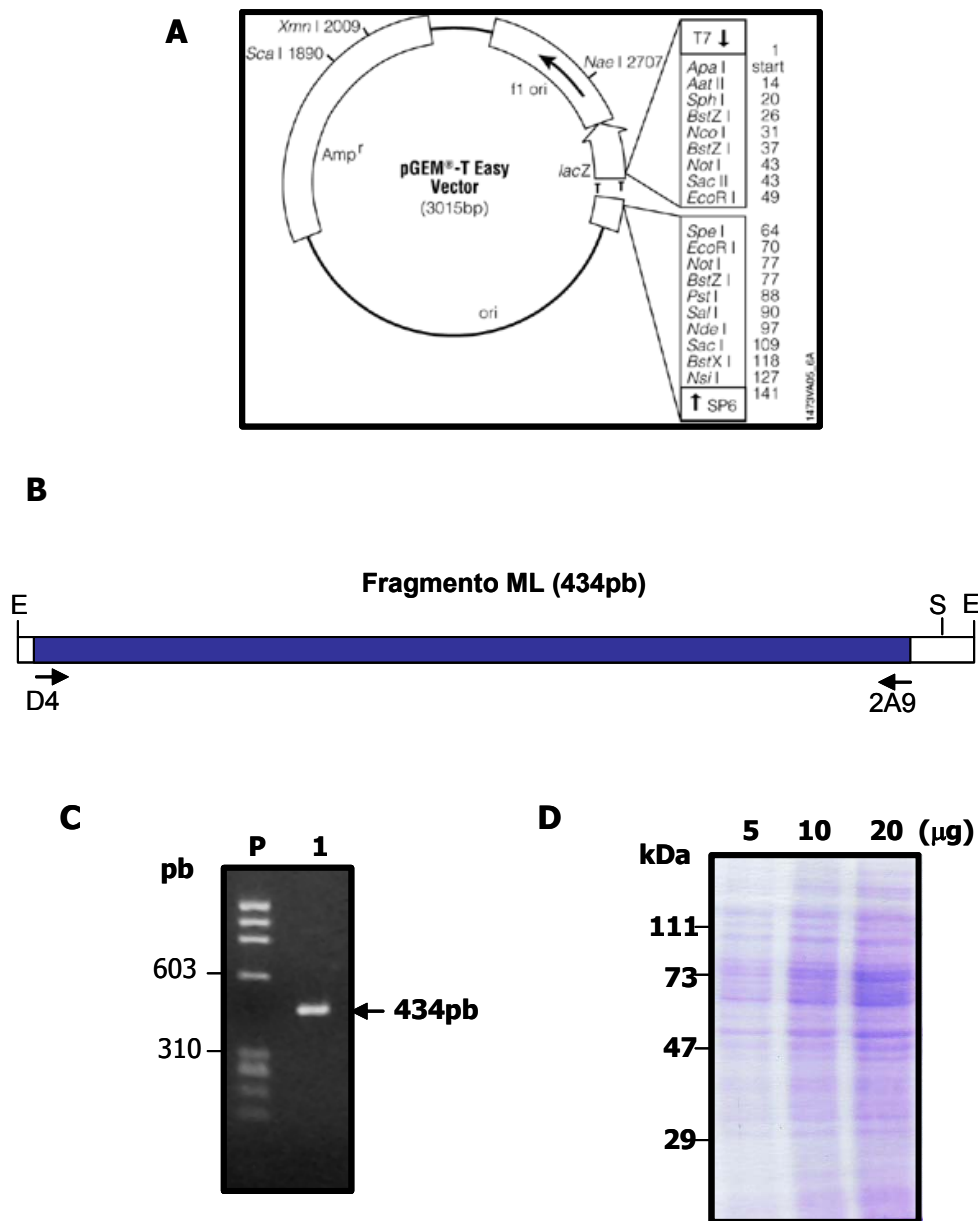


Figura 25 – **A**, Modelo esquemático do plasmídeo pGEM-T (Promega), mostrando os sítios de “poli linker”. **B**, representação esquemática do fragmento ML com os sítios de restrição após digestão com *EcoRI*. Os sítios das enzimas de restrição *EcoRI* (E), *SpeI* (S) estão indicados. D4/2A9, par de oligonucleotídeos utilizado para a amplificação do fragmento ML. **C**, Gel de agarose 1%, impregnado com brometo de etídio, mostrando o produto purificado do fragmento da região intergênica dos genes *PbMDJ1/PbLON* (ML) após digestão com *EcoRI* (434pb) do pGEM-T onde foi clonado. P, migração do padrão molecular, com valores em pb. **D**, Gel de SDS-PAGE 10%, corado por “Coomassie blue”, mostrando extrato total de *P. brasiliensis* utilizado em reações de proteção à DNase I.

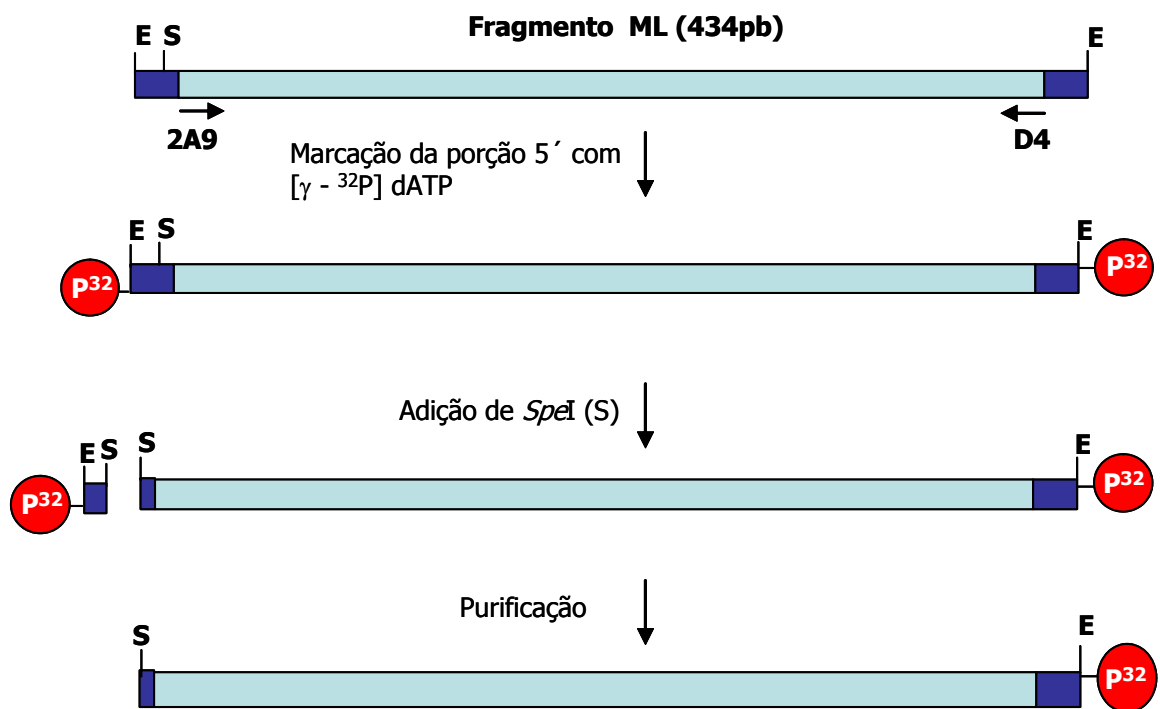


Figura 26 – Estratégia de marcação radioativa da região ML para ensaios de DNase I “footprinting”. A região ML está representada em verde e um fragmento da região “poli linker” do plasmídeo de clonagem pGEM-T em azul. Os sítios para as enzimas de restrição *EcoRI* (E) e *SpeI* (S) e os oligonucleotídeos utilizados para amplificar e clonar o fragmento ML (D4 e 2A9) estão indicados, assim como a estratégia para retirada da extremidade 3' marcada utilizando *SpeI*.

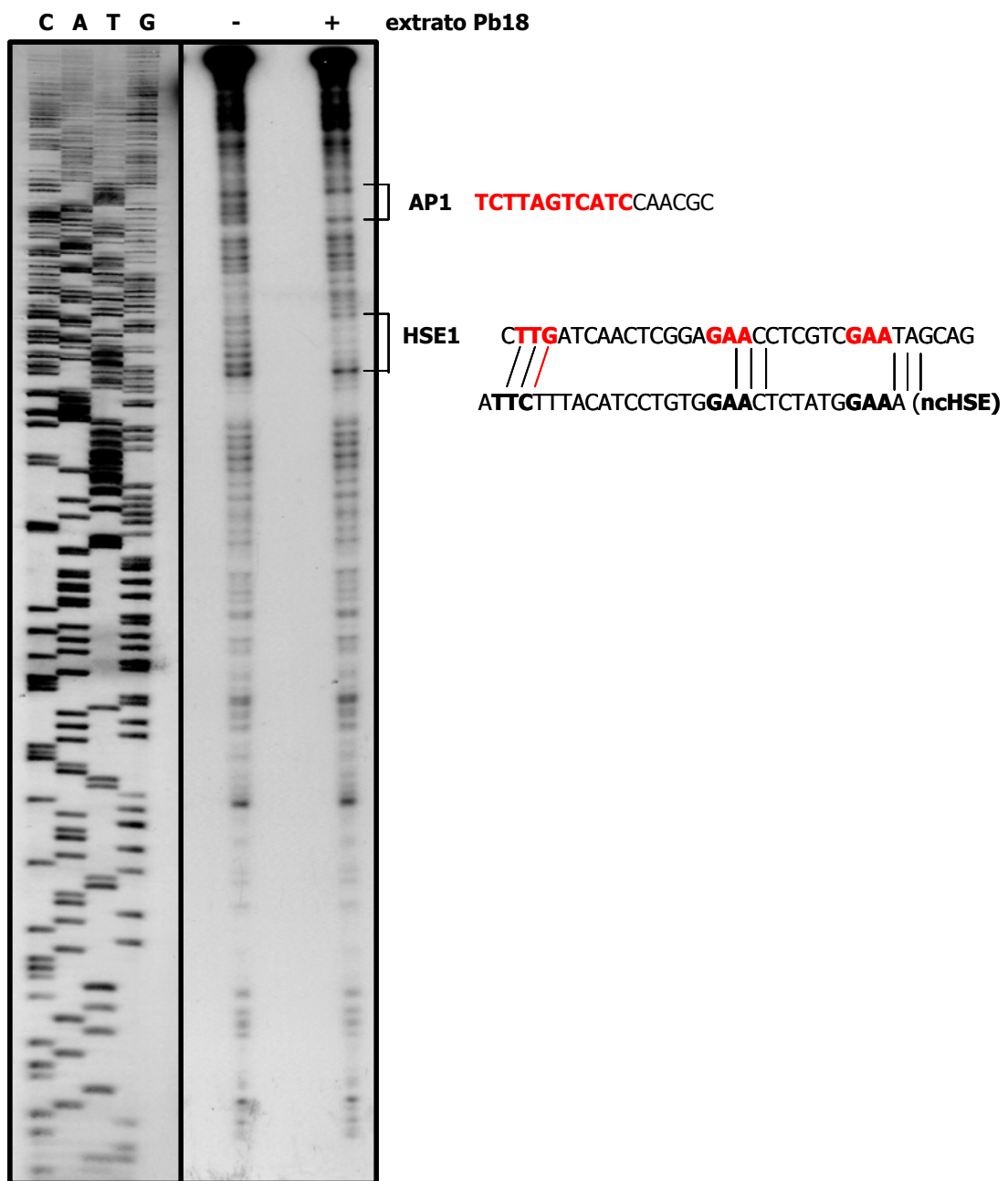


Figura 27 - Ensaio de proteção por DNaseI "footprinting". Gel desnaturante de poliacrilamida-uréia 6% mostrando a corrida eletroforética do sequenciamento do fragmento ML iniciado pelo oligonucleotídeo D4 (esquerda) e o ensaio de proteção contra DNaseI do fragmento ML do Pb18 na ausência (-) ou presença (+) de extrato total de Pb18. Estão indicadas as regiões de proteção e suas sequências, assim como a homologia com os elementos de transcrição não convencionais (ncHSE) de *S. cerevisiae*. Em vermelho estão assinalados os motivos contidos nos oligonucleotídeos.

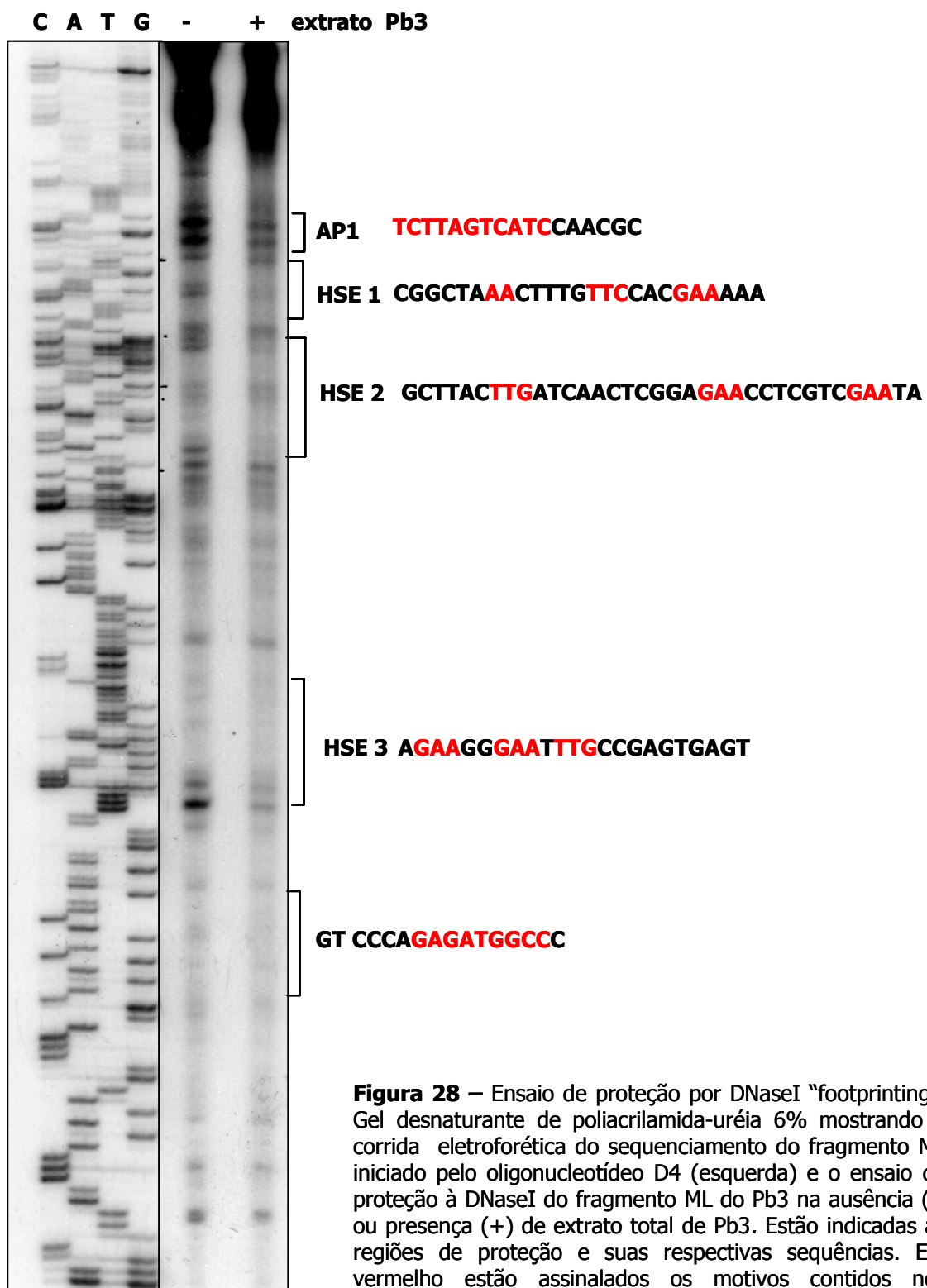
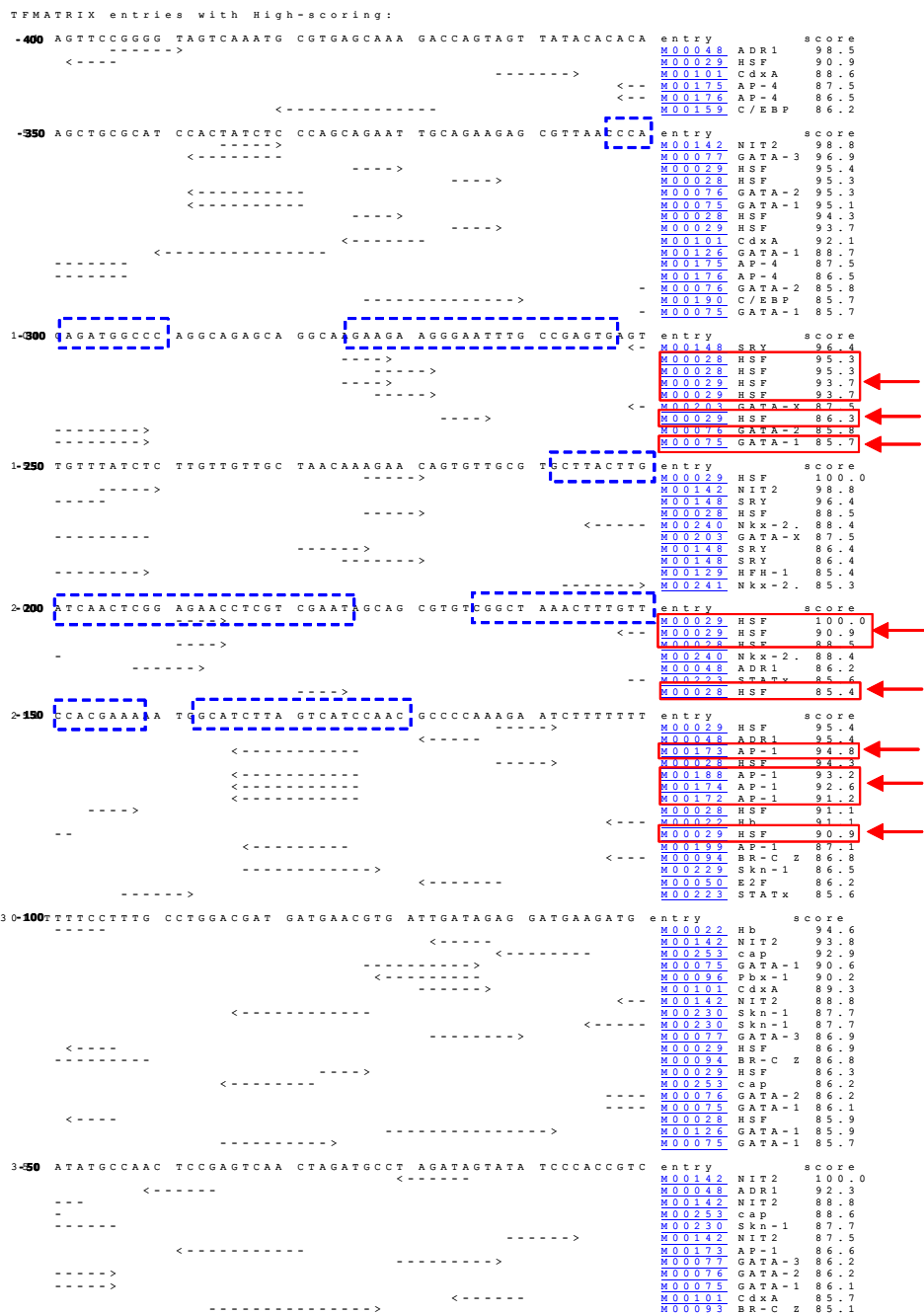


Figura 28 – Ensaio de proteção por DNaseI “footprinting”. Gel desnaturante de poliacrilamida-uréia 6% mostrando a corrida eletroforética do sequenciamento do fragmento ML iniciado pelo oligonucleotídeo D4 (esquerda) e o ensaio de proteção à DNaseI do fragmento ML do Pb3 na ausência (-) ou presença (+) de extrato total de Pb3. Estão indicadas as regiões de proteção e suas respectivas sequências. Em vermelho estão assinalados os motivos contidos nos oligonucleotídeos.

←
PbLON



→
PbMDJ1

Figura 29 – Análise da região promotora de PbLON/PbMDJ1 (ML) de *P. brasiliensis* pelo programa TFSEARCH (<http://molsun1.cbrc.aist.go.jp/research/db/TFSEARCH.html>), frente a uma matriz ampla de elementos de transcrição. As caixas pontilhadas em azul marcam as regiões de proteção encontradas no experimento de "footprinting". As posições dos nucleotídeos à direita estão em relação ao ATG inicial de PbMDJ1. As setas indicam os possíveis fatores de transcrição correspondentes.

As variações observadas no número de regiões de proteção entre estes dois isolados poderiam sugerir a existência de sítios de polimorfismo. Dessa forma, buscou-se avaliar se a própria região (ML) apresentaria algum tipo de polimorfismo entre os isolados. A sequência originalmente caracterizada foi do isolado Pb339 (Barros e Puccia, 2001; número de acesso AF334811). O primeiro passo foi clonar a região ML dos isolados Pb3, Pb5, Pb12, Pb18 de *P. brasiliensis*, utilizando como molde o DNA genômico destes isolados extraídos pela Dra. Flávia V. Morais e utilizados em sua tese de doutoramento (Morais, 2003; Morais et al., 2000). Este material clonado foi sequenciado no Centro de Estudos do Genoma Humano na USP utilizando o oligonucleotídeo sp6 do vetor.

O alinhamento das sequências ML mostrou que os isolados Pb339, Pb18, Pb12 e Pb5 foram homólogos, ao passo que em Pb3 foram encontradas 5 regiões de polimorfismo, sendo 3 substituições, 1 inserção de 2 nucleotídeos e 3 interrupções em relação aos outros isolados (Figura 30). Esse resultado foi confirmado em 4 clones e com diferentes oligonucleotídeos iniciadores (sp6, D4 e 2A9). Entretanto, estas diferenças não foram encontradas nos motivos mapeados pelo ensaio de DNase I "footprinting" (Figura 30), exceto pela mudança de um C por um G na região do elemento AP1, fora do núcleo principal de ligação ao fator de transcrição (Figura 30).

Para validar os elementos de transcrição mapeados pelos ensaios de DNase I "footprinting" foram realizados experimentos de EMSA com os oligonucleotídeos listados no item 3.7.3 de Material e Métodos. O método de retardo em gel é uma das formas mais rápidas de analisar a interação entre DNA e proteína "in vitro". Esta estratégia fundamenta-se no fato de que a mobilidade eletroforética de um ácido nucléico (oligonucleotídeo dupla fita) se altera quando está ligado a uma proteína (fator de transcrição). Cada oligonucleotídeo dupla fita foi testado com extratos celulares do Pb18 e Pb3. Na Figura 31 podemos observar uma interação específica entre os oligonucleotídeos marcados (HSE1³²P, HSE2³²P, HSE3³²P e AP1³²P) e proteína, a qual foi inibida pela adição de oligonucleotídeo não marcado (frio). Nesta figura pode-se observar ainda uma curva de competição entre o oligonucleotídeo marcado e o excesso molar do próprio oligonucleotídeo não marcado (frio). O padrão de migração das bandas ficou inalterado na presença do competidor inespecífico (BS10). Nenhuma interação foi observada para o elemento GATA nos ensaios de EMSA.

Na Figura 31 observa-se que o complexo AP1 e HSE1/proteína formado com proteínas de Pb3 apresentou um padrão de migração mais rápido quando comparado com o Pb18. Esses dados sugerem um polimorfismo no complexo dos fatores de transcrição ligantes em AP1 e HSE1. Nenhuma reação foi observada com o oligonucleotídeo HSE3 incubada com o

extrato do isolado Pb18. Este resultado poderia justificar porque não foi visualizada proteção da correspondente região com o extrato do isolado Pb18 (Figura 27). Estes achados vêm a contribuir com os estudos de polimorfismo em *P. brasiliensis* realizados em nosso laboratório (Morais et al., 2000; Carvalho et al., 2004).

A Figura 32 resume o mapeamento dos elementos de transcrição encontrados na região ML de *P. brasiliensis* pelo ensaio de "footprinting" e validados por EMSA. Pode-se observar nesta figura a localização dos elementos putativos e suas respectivas sequências. Nesta figura observa-se ainda que apesar da identidade da região ML do *P. brasiliensis* ser baixa com *H. capsulatum* e *B. dermatitidis*, foi possível identificar os elementos de transcrição AP1, HSE1 e HSE2 nesses organismos. Nenhuma região com homologia significativa foi identificada para os elementos HSE3 e GT.

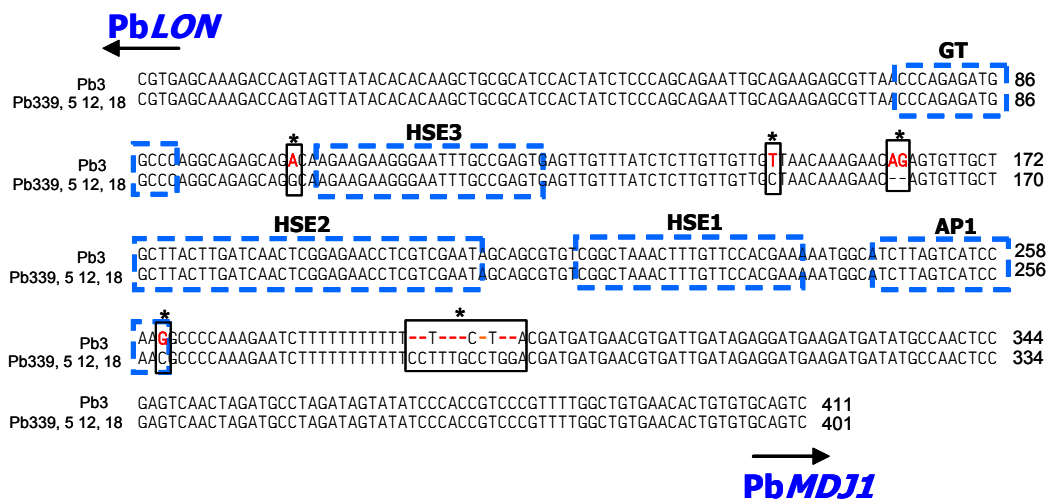


Figura 30 – Análise comparativa das sequências da região intergênica de *PbMDJ1*/*PbLON* (ML) dos isolados Pb18 e Pb3 de *P. brasiliensis*. Em azul estão indicadas as regiões de proteção encontradas no ensaio de “footprinting” com isolado Pb3 (Figura 28) e em vermelho as mutações encontradas na sequência. As setas indicam o direcionamento de cada gene. Foram analisados 4 clones individuais do fragmento de Pb3 e todos resultaram na sequência indicada nesta figura. Os asteriscos indicam os 5 pontos de mutação da região promotora ML de Pb3.

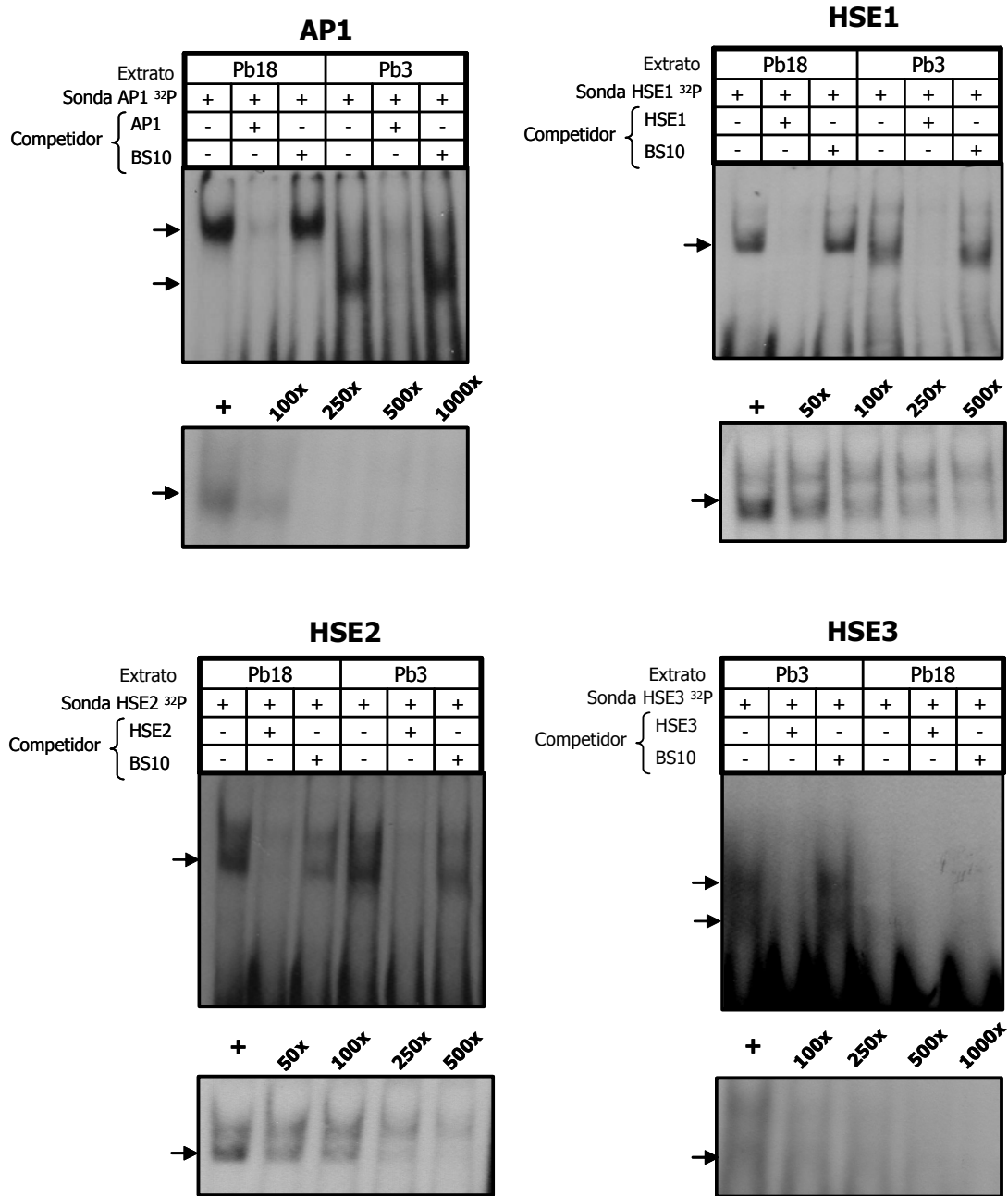


Figura 31 – Ensaio de mobilidade eletroforética em gel (EMSA) com os extratos totais da fase leveduriforme dos isolados Pb18 e Pb3 e os oligonucleotídeos dupla fita HSE1, HSE2, HSE3 e AP-1 marcados radioativamente. Estão indicados os competidores específicos e não-específico (BS10) não marcados. Abaixo, inibição com excesso molar do competidor específico não marcado. As setas indicam o complexo DNA/proteína específico.

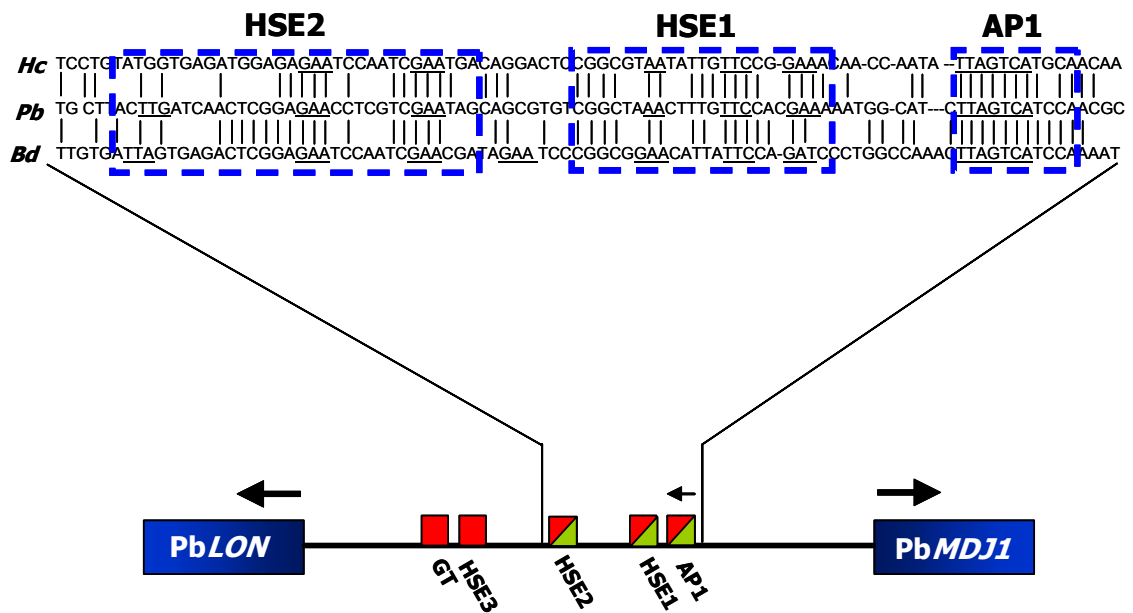


Figura 32 – Apresentação esquemática da região promotora *PbMDJ1/PbLON* (ML) mostrando os genes em direção opostas, compartilhando a região 5' intergênica e a localização dos elementos de transcrição encontrados nos isolados Pb3 (vermelho) e Pb18 (verde). Acima, análise comparativa dos elementos de transcrição da região promotora ML comuns aos fungos *P. brasiliensis* (*Pb*), *H. capsulatum* (*Hc*) e *B. dermatitidis* (*Bd*). Estão indicadas em caixas pontilhadas azuis as regiões de *P. brasiliensis* mapeadas neste trabalho por ensaios de proteção contra DNase I "footprinting".

4.10. Expressão de *PbMDJ1* e *PbLON*

A técnica de RT-PCR quantitativo em tempo real consiste no monitoramento da fluorescência liberada durante a reação de PCR, o que permite quantificar um produto específico presente em um determinado momento da reação (Tyagi et al., 1998; Bonnet et al., 1999).

Experimentos de RT-PCR quantitativo em tempo real foram realizados para monitorar os níveis de transcrição dos genes *PbMDJ1* e *PbLON* de *P. brasiliensis* durante a transição de micélio para levedura (M - L), levedura para micélio (L - M) e após estresse térmico a 42 °C. A resposta ao estresse térmico de outros genes *HSPs* (*HSP70*, *HSP82*, *HSP104*) e do gene que codifica ubiquitina (*UBI*) também foi analisada. Inicialmente foram feitas as curvas padrão para cada conjunto de oligonucleotídeo iniciador (Sistema Sybr Green – Applied Biosystems) ou sonda (Sistema TaqMan – Applied Biosystems) com o DNA total de *P. brasiliensis*, como detalhado em Materiais e Métodos. Essas curvas serviram de base para o cálculo das equações da reta, as quais foram utilizadas no cálculo do número de cópias (Figura 33). Os genes das subunidades α e β -tubulina de *P. brasiliensis* (α ou β -TUB) foram usados como normalizadores (referência interna) devido à sua expressão constitutiva.

Como pode ser observado na Figura 34, os níveis de mRNA do *PbMDJ1* e *PbLON* do isolado Pb18 aumentaram 2x e 3,6x após 30 e 60 min de choque térmico a 42 °C, respectivamente. No isolado Pb3, entretanto, o aumento da expressão desses genes ocorreu em um momento mais tardio da indução (2,9x após 60 min) e em menor escala para o mesmo tempo. Esses resultados confirmam que *PbMDJ1* e *PbLON* são genes envolvidos na proteção celular ao estresse térmico, assim como ocorre na maioria dos organismos onde esses genes foram estudados.

Esses resultados foram comparados aos níveis de expressão dos transcritos *HSP70*, *HSP82*, *HSP104* e *UBI* (Ubiquitina) de *P. brasiliensis* após choque térmico e esses resultados estão apresentados na Figura 35. A expressão desses genes aumentou de 3x a 3,9x após 30 min e de 6,4x a 8,2x após 60 min de elevação da temperatura a 42 °C. A expressão do gene *UBI* aumentou em 2,7x (30 min) e 5,5x (60 min). Em todos os casos, o aumento de expressão foi maior do que para *PbMDJ1* e *PbLON*.

O comportamento de *PbMDJ1* e *PbLON* durante a transição dimórfica dos isolados Pb18 e Pb3 também foi avaliada (Figura 36). Em Pb3, o padrão de expressão de *PbLON* e *PbMDJ1* foi semelhante durante a transição M – L e L – M. Ambos os genes alcançaram um pico de expressão após 24 h do início de transição M – L e voltaram aos níveis iniciais em 120

h. Durante a transição L – M, estes genes em Pb3 tiveram expressão diminuída, no ponto de 48 h os níveis de expressão aumentaram e permaneceram perto dos valores iniciais em 120 h. Em Pb18, *PbLON* apresentou um padrão similar de flutuação durante a transição L – M mas manteve-se elevado após o pico de 24 h. No entanto, *PbMDJ1* apresentou diminuição dos níveis de mRNA durante todo o período de transição analisado. Na transição M – L, mRNA de *PbMDJ1* manteve-se elevado em todos os pontos, com pico em 120 h (2,5x), enquanto que *PbLON* teve apenas um aumento transitório em 5 h. Estes resultados sugerem que *PbLON* e *PbMDJ1* têm regulação semelhante em Pb3, mas não em Pb18. Além disso, *PbMDJ1* parece estar preferencialmente expresso na fase leveduriforme do Pb18. É interessante mencionar que o perfil mostrado aqui difere das outras *HSPs* analisadas em Pb18 (Goldman et al., 2003): *HSP70*, *HSP82* e *HSP104* apresentaram aumento da expressão (4 a 5x) nas primeiras 5h após a mudança de temperatura, mas os níveis gradualmente diminuíram até chegar próximo aos valores iniciais no ponto de 120 h. Durante a transição de L – M, o perfil de expressão destes genes assemelhou-se ao de *PbMDJ1* em Pb18.

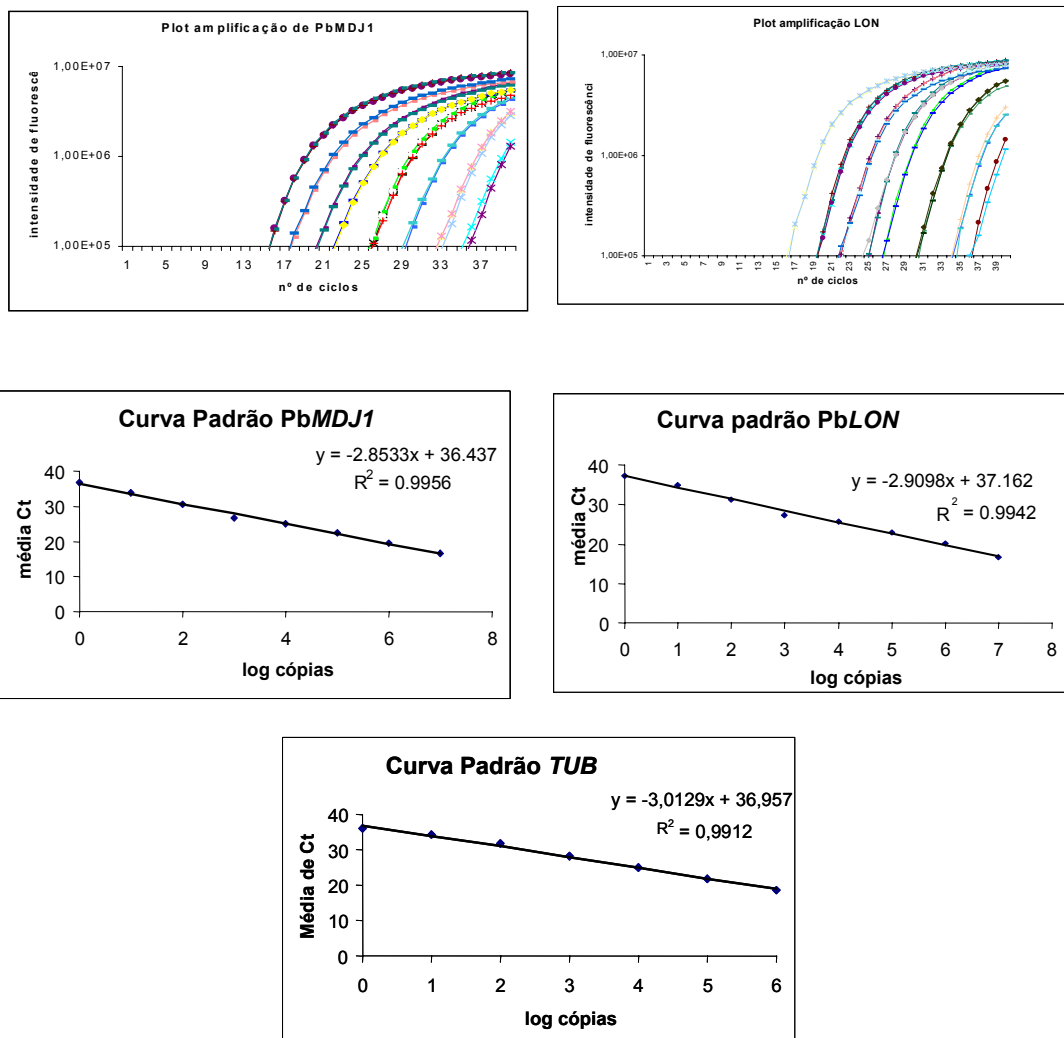


Figura 33 – Padrão de amplificação (painéis superiores) e curvas padrão representativas dos genes *PbMDJ1*, *PbLON* e β -tubulina de *P. brasiliensis*. O padrão de amplificação corresponde a PCRs realizados com diferentes quantidades de DNA genômico de *P. brasiliensis* (10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 cópias), calculadas de acordo com um tamanho de genoma estimado em 30 Mb.

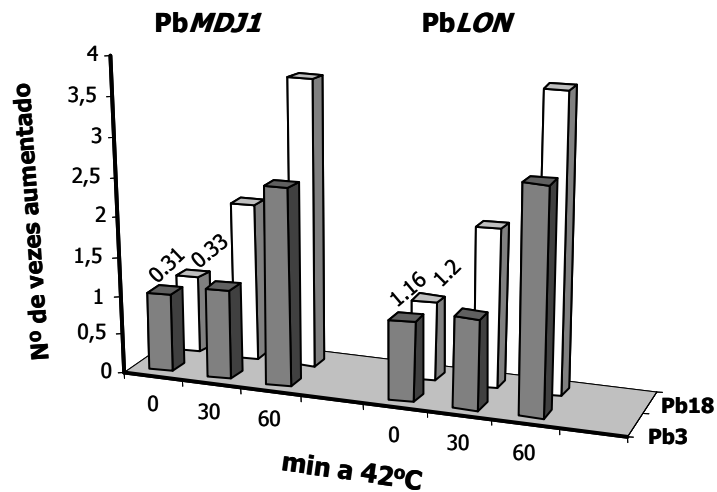


Figura 34 – RT-PCR quantitativo em tempo real (SyberGreen) dos genes *PbMDJ1* e *PbLON* dos isolados Pb18 e Pb3 de *P. brasiliensis* durante um choque térmico a 42 °C. A figura mostra o número de vezes em que o mRNA está aumentado quando comparado com as células no tempo 0 h (valor = 1), nos quais estão indicados os valores relativos de expressão..

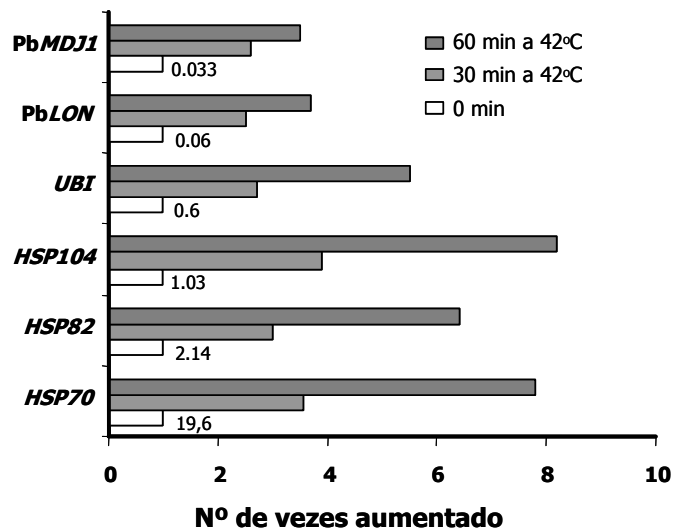


Figura 35 – RT-PCR quantitativo em tempo real (*TaqMan*) dos genes *PbMDJ1*, *PbLON*, *UBI*, *HSP104*, *HSP82* e *HSP70* do isolado Pb18 de *P. brasiliensis* durante um choque térmico a 42 °C. A figura mostra o número de vezes em que o mRNA está aumentado comparado com as células no tempo 0 h (valor = 1), nos quais estão indicados os valores relativos de expressão.

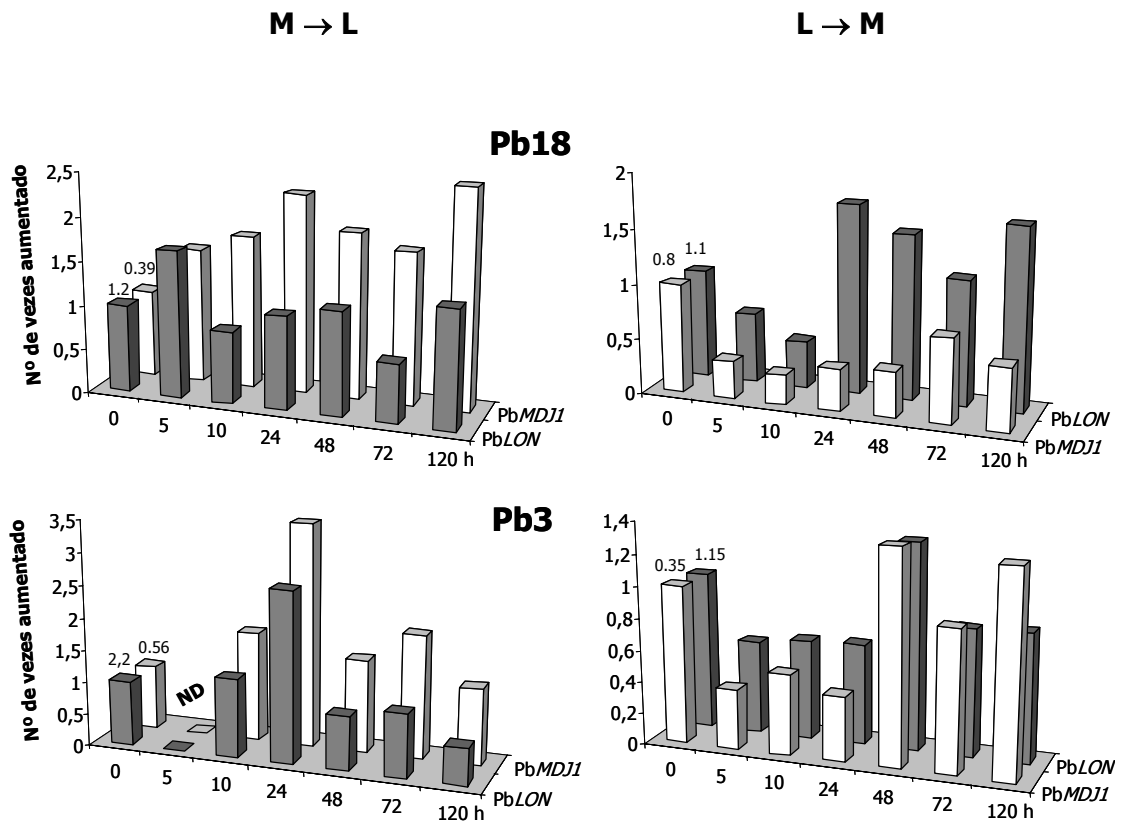


Figura 36 – RT-PCR quantitativo em tempo real (*SyberGreen*) dos genes *PbMDJ1* e *PbLON* dos isolados *Pb18* e *Pb3* de *P. brasiliensis* durante a transição de micélio para levedura (M? L) e levedura para micélio (L? M). A figura mostra o número de vezes em que o mRNA está aumentado comparado com as células no tempo 0 h (valor = 1), nos quais estão indicados os valores relativos de expressão. ND, não determinado.

4.11. Construções para o estudo da funcionalidade da região promotora ML

A primeira estratégia que será aplicada ao estudo da funcionalidade do promotor de *PbMDJ1/PbLON* consiste em construir plasmídeos para expressão em *H. capsulatum* de genes reporteres sob o comando da região promotora ML. A escolha levou em consideração o fato de que esse organismo tem métodos estabelecidos de manipulação genética e a possibilidade de manutenção episomal ou inserção cromosomal de plasmídeos teloméricos (Woods et al., 1992; Woods et al., 1998). Por outro lado, foi feito o contacto positivo com o Dr. William Goldman, da Washington University School of Medicine, no sentido de transformar o fungo e proceder às análises de expressão em seu laboratório.

Oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados para a construção dos plasmídeos teloméricos contendo a região promotora ligada a um gene "repórter". Duas estratégias foram planejadas para avaliar os níveis transcricionais dos genes *PbLON* e *PbMDJ1*. A primeira consiste na produção de vários fragmentos truncados da região intergênica. Para a segunda estratégia, serão preparados fragmentos com mutações pontuais em elementos identificados neste trabalho. Os genes *LacZ* (β -galactosidase) e *GFP* ("green florencece protein") serão utilizados como genes "repórter".

Estas construções serão inseridas no plasmídeo pBY33, o qual foi cedido pelo Dr. William Goldman. Este plasmídeo foi utilizado por Kügler e colaboradores para estudar a funcionalidade do promotor CBP1 de *H. capsulatum* (Kügler et al., 2000). pBY33 contém um gene de resistência à ampicilina, duas regiões de sequências teloméricas de *H. capsulatum*, uma origem de replicação e o gene repórter GFP.

A figura 37 mostra a estratégia de construção do plasmídeo com a região promotora truncada. Pode-se visualizar a região promotora dos genes *PbMDJ1/PbLON* com os quatro elementos encontrados neste promotor. A estratégia consiste em clonar fragmentos da região promotora utilizando um oligonucleotídeo iniciador próximo ao ATG inicial de *PbMDJ1* ou de *PbLON*, ambos com um sítio *XbaI* na sequência e um outro oligonucleotídeo interno. A estes diferentes fragmentos será acrescido, com a ajuda da T4 ligase, um "target" contendo um sítio *BamHI*. Estes fragmentos serão clonados inicialmente em plasmídeo de clonagem (pGEM-T – Promega) e em seguida no plasmídeo pBY33 nos sítios *XbaI/BamHI*.

A segunda estratégia consiste em produzir fragmentos de toda a região promotora com mutações pontuais. A confecção dos fragmentos mutados se baseia na técnica de PCR "overlap". Para tanto, foram desenhados oligonucleotídeos "overlap" das regiões protegidas em ensaios de "footprinting" contendo mutações pontuais nos nucleotídeos mais importantes

para a ligação dos fatores de transcrição. Na primeira etapa, duas reações de PCR separadas são utilizadas para gerar um produto primário de PCR, designado PCR A e PCR B. Ambos conterão as mutações pontuais em suas sequências. O PCR A será feito com os oligonucleotídeos 1 e 3 e o PCR B com os oligonucleotídeos 2 e 4 (Figura 38). A mutação será introduzida via oligonucleotídeo 2 e 3. A sequência do oligonucleotídeo 3 foi desenhada para complementar a sequência do oligonucleotídeo 2. Os produtos dos primeiros PCRs (fragmento A e B) serão utilizados em quantidades equimolares como molde para a fusão dos dois fragmentos mutados em um segundo PCR. No primeiro ciclo do segundo PCR, os produtos A e B contendo a mutação irão se anelar por complementariedade, de forma que os fragmentos se unirão após o processo de alongação realizado pela polimerase (*Taq* DNA polimerase).

Estes fragmentos mutados serão inseridos no plasmídeo pBY33 (modificado), o qual apresentará outro gene reporter (*LacZ*) em direção oposta ao gene da GFP, para simular o sistema dos genes *PbMDJ1/PbLON*.

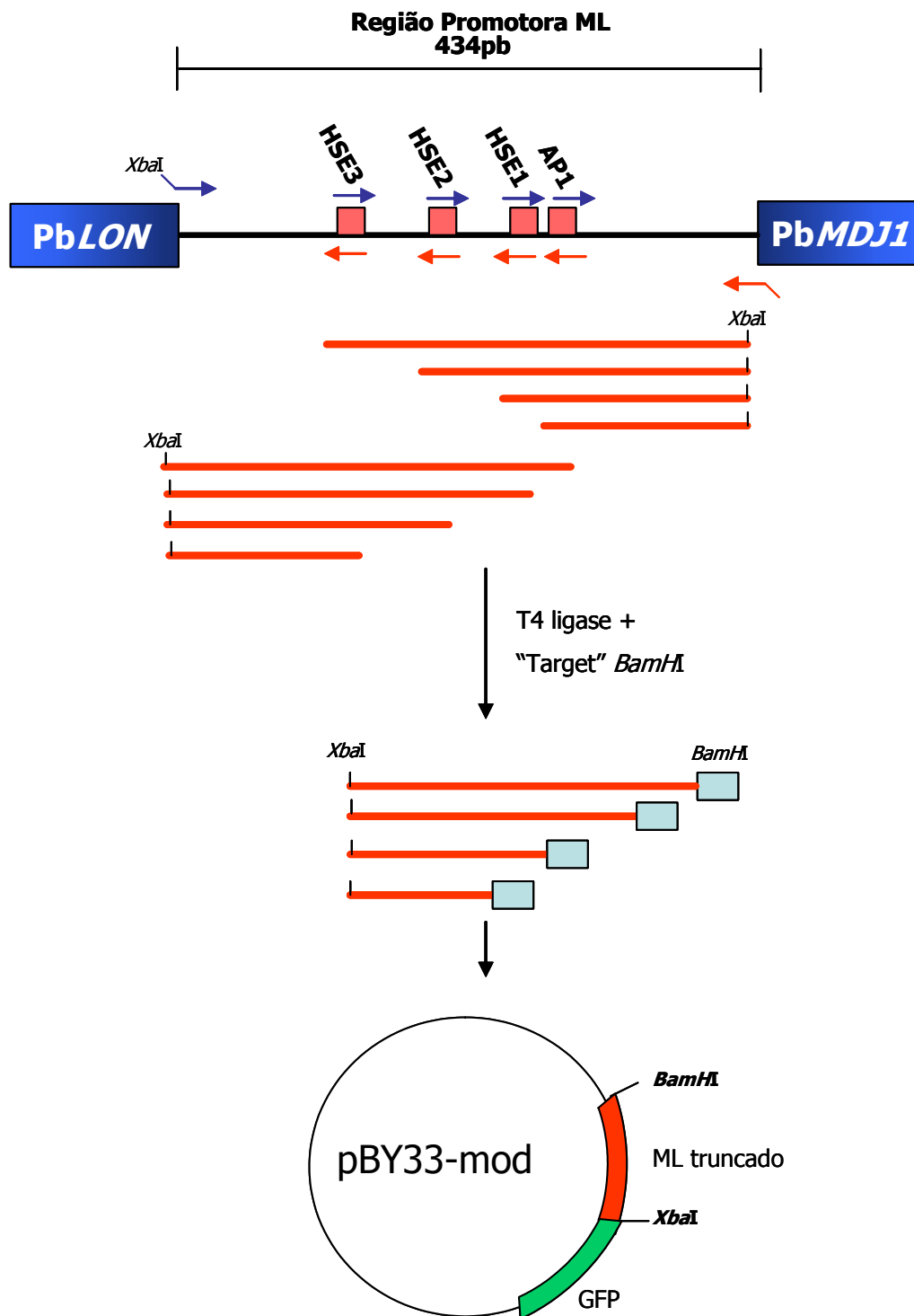


Figura 37 – Apresentação esquemática da construção dos plasmídeos para o estudo da funcionalidade da região promotora ML truncada. Os diferentes fragmentos truncados serão ligados ao "target" *Bam*HI e clonados no plasmídeo pBY33.

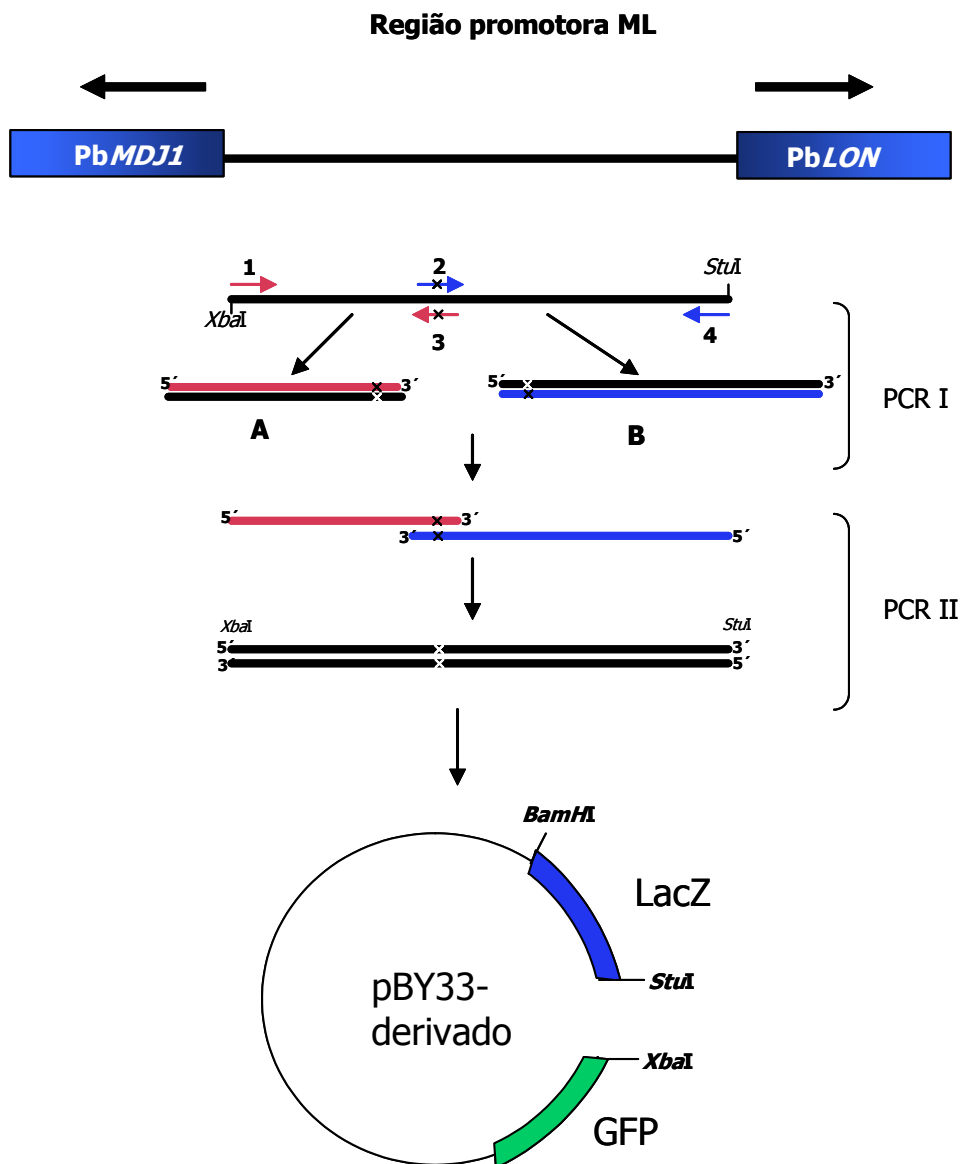


Figura 38 – Apresentação esquemática da geração de fragmentos mutantes pela técnica de PCR "overlap". Os produtos dos PCRs A e B (PCR I) serão utilizados em um segundo PCR (PCR II) para formar o fragmentos ML mutado. O produto será clonado no plasmídeo com duplo "reporter", derivado de pBY33.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Este trabalho apresenta o primeiro relato da localização extramitocondrial de um membro da família DnaJ (Hsp40), especificamente a Mdj1, na superfície celular, já que ela foi detectada na parede do *P. brasiliensis* em sua fase leveduriforme. A localização ectópica da PbMdj1 foi visualizada claramente por microscopia confocal e eletrônica e confirmada por FACS. Os estudos de imunolocalização foram realizados com anticorpos policlonais anti-PbMdj1r obtidos de coelho imunizado com a proteína recombinante. As evidências da especificidade das reações imunológicas com PbMdj1 vêm das seguintes observações: (I) anticorpos anti-PbMdj1r reconheceram especificamente, em "immunoblotting", um único componente de 55 kDa do extrato mitocondrial de *P. brasiliensis*; (II) os anticorpos anti-PbMdj1r reconheceram especificamente uma única proteína de 55 kDa do extrato de parede celular obtido de células leveduriformes de *P. brasiliensis* após tratamento com solução de β -ME levemente alcalina; e (III) microscopia confocal realizada com anticorpos mono-específicos resultaram em padrão de intensa marcação na parede celular e região do brotamento, além da mitocôndria do fungo.

A presença de Hsps na parede celular de fungos vem sendo relatada por alguns autores. Destaca-se um membro da Hsp70 e 90 (47 KDa) em *C. albicans* (López-Ribot et al., 1996a; Matthews et al., 1988), a Hsp60 em *H. capsulatum* (Gómez et al., 1992), um membro da Hsp70 em *S. cerevisiae* (López-Ribot et al., 1996b) e Hsp60 no *P. brasiliensis* (Passos et al., 2003). Também existem vários trabalhos relatando a presença de discretas quantidades de um tipo de Hsp70 mitocondrial e Hsp60 na membrana plasmática, vesículas e grânulos citoplasmáticos de células de mamíferos (Singh et al., 1997; Soltys et al., 1996 e Soltys e Gupta, 2000). Apesar da função das Hsps na parede celular ser pouco conhecida, foi demonstrado que a proteína a Hsp90 poderia estar envolvida na transição dimórfica ou na formação do tubo germinativo de *C. albicans* (Matthews et al., 1996). Além disso, a Hsp60 da parede celular de *H. capsulatum* medeia a interação do fungo com macrófago via receptor CD11/CD18 (Longe et al., 2003).

Embora a presença de um membro da família DnaJ (Hsp40) na superfície não tenha sido descrito antes, este fato já havia sido predito por Soltys e Gupta (2000), já que uma Hsp de superfície deve necessitar sua co-chaperone para exercer suas funções. Desta forma, uma Mdj1 extra-mitocondrial poderia auxiliar sua cognata Ssc1 (Hsp70 mitocondrial) de *P. brasiliensis* ectópica ou ainda funcionar como uma chaperone independente. Não coincidentemente, foi detectada uma proteína homóloga à Ssc1 na parede celular de *C.*

albicans (Urban et al., 2003, Edwards et al., 1999). Seria interessante averiguar se a Ssc1 de *P. brasiliensis* está presente na parede celular e se co-localiza com PbMdj1.

Existem várias evidências de que proteínas que não apresentam o peptídeo sinal, mas que conseguem alcançar a superfície celular, principalmente em *C. albicans* e *S. cerevisiae*, poderiam estar envolvidas em vários processos importantes na parede, incluindo alterações dinâmicas e interações com componentes do hospedeiro (Nombela et al., 2006). Especula-se ainda que estas proteínas poderiam ser "moonlighting", ou seja, realizar dupla ou multifunções dependendo da localização celular. Este é o caso da Tsa1, uma proteína nuclear que conhecidamente está envolvida no controle da homeostase durante o estresse oxidativo e que na parede celular de *C. albicans* está participa da sua biogênese (Urban et al., 2005). Em *P. brasiliensis*, os genes *TSA1* e *AGS1* (α -1,3 glucana sintase) foram altamente expressos na fase leveduriforme (Marques et al., 2004), porém ainda não foi demonstrada a participação da Tsa1 na biogênese da parede celular deste fungo.

A parede celular de fungo é um compartimento dinâmico que determina e mantém a forma da célula, mas também está envolvida ativamente em outros eventos biológicos. As glucanas e quitinas são os principais componentes da parede celular de fungos, que também comporta proteínas, lipídeos e glicoproteínas. Sua estrutura é complexa e dinâmica e abriga enzimas, adesinas, proteínas estruturais e Hsps, cujas características dependem de múltiplos fatores intrínsecos e externos (Chaffin et al., 1998). Atualmente vem se demonstrando uma grande quantidade de proteínas envolvidas com a biogênese da parede. Em *S. cerevisiae*, aproximadamente 20% do genoma é direcionado para esta função, o que ilustra a complexidade da superfície celular (Groot et al., 2001).

A análise do proteoma de parede celular de *C. albicans* mostrou basicamente três grupos de proteínas que não apresentam o sinal de direcionamento para parede celular. No primeiro grupo estão enzimas envolvidas com a glicólise, como é o caso da enolase e da frutose-bifosfato aldolase. Outro exemplo é o da enzima glicolítica gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GADPH), que foi detectada na parede celular de *C. albicans* (Navarro et al., 1997) e de *P. brasiliensis* (Barbosa et al., 2006) e que medeia a ligação do fungo com a laminina do hospedeiro. O segundo grupo consiste de proteínas de choque térmico (Hsps), que em *S. cerevisiae* atuam na regeneração do protoplasto (Pardo et al., 1999). No último grupo são encontrados fatores de alongação da tradução, que são proteínas que interagem com complexos de outras proteínas e RNA (Pitarch et al., 2002). Alguns destes componentes dos fungos patogênicos são promissores alvos de drogas e imunoterápicos (Nimrichter et al., 2005a).

Eroles e colaboradores (1997) propuseram que a presença das proteínas enolase e Hsp70 na parede celular de *C. albicans* eram o resultado de sua associação com a superfície da célula após liberação no meio externo por lise celular. Os autores demonstraram que tais proteínas podiam ligar-se à parede celular em sistema "in vitro", ou seja, livre de células. Entretanto, Nombela e colaboradores (2006) consideram que isto não exclui a possibilidade de que estas proteínas poderiam ser realmente exportadas para a membrana plasmática por um mecanismo desconhecido (Nombela et al., 2006). Neste contexto, é digno de nota que as células leveduriformes de *P. brasiliensis* utilizadas em todos os experimentos de microscopia de confocal, eletrônica e nas análises de FACS deste trabalho derivaram de culturas com baixo índice de mortalidade (Figura 24), o que nos leva a crer que a marcação dos anticorpos anti-PbMdj1r na parede de *P. brasiliensis* não é fruto da ligação de proteínas oriundas de lise celular. Por outro lado, a ausência de PbMdj1 no sobrenadante de cultura do fungo descarta a hipótese de exportação e re-incorporação na parede como acontece com a Bad1 de *B. dermatitidis*, por exemplo (Brandhorst e Klein, 2000).

A interação entre os constituintes da parede celular parece envolver não somente pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, mas também ligações covalentes e de fosfodiéster com polisacarídeos. Na Figura 20 pode-se verificar uma marcação abundante da parede celular com anticorpos anti-PbMdj1r, entretanto, foi obtido pouco rendimento na extração da proteína de 55 kDa com a solução alcalina contendo β -mercaptoetanol, sugerindo que a molécula não estaria ligada fracamente a este compartimento. Esta observação é reforçada pela análise de FACS com células tratadas da mesma forma, na qual foi observado aumento na porcentagem de células fluorescentes, ao contrário de diminuição dos níveis de marcação, como poderia ser esperado se PbMdj1 fosse totalmente extraída da parede celular. Portanto, é provável que o tratamento com β -mercaptoetanol em solução levemente alcalina tenha melhorado o acesso dos anticorpos anti-PbMdj1r anteriormente inacessível à PbMdj1. Isto também poderia explicar porque, embora a PbMdj1 pareça estar participando ativamente do processo de brotamento das células leveduriformes de *P. brasiliensis*, os anticorpos anti-PbMdj1r não estariam interferindo com o crescimento do fungo "in vitro", como averiguado neste trabalho.

Em *C. neoformans*, foi demonstrado um mecanismo de interferência direta no retardo do crescimento quando o fungo foi incubado com anticorpos anti-CMH (monohexosilceramida), possivelmente por interferência na biosíntese e organização da parede celular, onde foi detectada a presença desse composto (Rodrigues et al., 2000). Em nosso

laboratório, anticorpos anti-paracoccina, que é uma lectina fúngica (Coltri et al., 2006), foram capazes de inibir o crescimento do *P. brasiliensis*. A paracoccina é um componente de parede celular ligante de quitina e os anticorpos possivelmente perturbam essa interação e inibem brotamento (L. Ganiko, dados não publicados). No caso da PbMdj1, um componente celular poderia estar bloqueando o acesso do anticorpo à sua molécula alvo. Um exemplo de tal mecanismo de bloqueio foi recentemente detectado em *Fonsecaea pedrosoi*, para o qual anti-CMH reagiu com a parede celular somente na ausência de melanina (Nimrichter et al., 2005b). Outra hipótese para explicar a não interferência dos anticorpos é que a função de PbMdj1 na parede não estaria relacionada com o crescimento celular.

A análise de "Southern blot" feita por Barros e Puccia (2001) sugere a presença de uma única cópia do gene *PbMDJ1* no genoma de *P. brasiliensis*. Essa observação está de acordo com Feitosa e colaboradores (2003), que mapearam *PbMDJ1* e *PbLON* em uma única banda cromossômica em 12 isolados de *P. brasiliensis*. Em fungos nos quais o genoma está completamente sequenciado, como *Aspergillus* e *Candida*, *MDJ1* e *LON* estão presentes em cópias únicas, reforçando estas observações. Nenhuma evidência de "splicing" alternativo foi encontrada em *PbMDJ1*: as análises de "Northern blot" mostraram apenas uma banda marcada (Figura 15A). Em análises de RT-PCR somente uma banda era visualizada, tanto em preparações de leveduras crescidas a 36 °C, como induzidas por choque térmico a 42 °C. Portanto, os componentes reconhecidos pelo anti-PbMdj1r, tanto na mitocôndria quanto na parede celular, derivam do mesmo gene e não são produtos resultantes de expressão diferencial por "splicing" alternativo.

A possibilidade de haver proteínas derivadas de transcritos iniciados em sítios distintos também foi descartada. Este fenômeno foi observado com o gene que codifica a alanina glioxilato aminotransferase de anfíbios, o qual apresenta dois sítios de inícios de transcrição. O transcrito maior contém uma sequência de direcionamento mitocondrial, enquanto que o produto do transcrito menor é citoplasmático (Holbrook e Danpure, 2002). Em *PbMDJ1* não foi possível identificar o sítio de início de transcrição, entretanto análises de sequência não identificaram qualquer início de transcrição além daquele proposto que resultasse em ORF possível sem o sinal de direcionamento mitocondrial.

A maioria das proteínas mitocondriais é sintetizada no citoplasma como proteínas precursoras, as quais apresentam na porção N-terminal uma sequência de direcionamento mitocondrial. Essa sequência é reconhecida pela maquinaria de translocação da mitocôndria, a qual realiza o importe para a matriz mitocondrial. Esse processo normalmente é acompanhado

da remoção da sequência de direcionamento, a qual não é necessária para a função da molécula (Waltner et al., 1995). O processamento é realizado pela MPP ("matrix processing peptidase"), uma metaloprotease que apresenta duas subunidades, α -MPP e β -MPP (Kleiber et al., 1990). Esta enzima não reconhece uma sequência específica de aminoácidos para realizar o processamento da molécula e sim um conjunto de características que envolvem as propriedades estruturais da sequência primária e secundária da proteína. As sequências de direcionamento mitocondrial devem apresentar alguns aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina) e hidrofóbicos, os quais formam uma estrutura α -helix anfipática (Truscott et al., 2003). Uma sequência homóloga à MPP foi identificada no banco de ESTs de *P. brasiliensis*.

Com base nessas características, o programa TargetP definiu o sítio de clivagem da PbMdj1 e, conseqüentemente, o tamanho da molécula processada em 55 kDa, já que o peptídeo clivado foi de aproximadamente 3 kDa. Esta informação é importante, pois como observado na Figura 22, o componente do extrato β -ME de parede celular reativo com o soro anti-PbMdj1r migrou em paralelo com aquele reconhecido no extrato de mitocôndria. Este fato sugere que houve necessariamente um processamento da proteína encontrada na parede celular de *P. brasiliensis*.

Segundo Gupta e colaboradores (2000), proteínas mitocondrias que são encontradas em sítios extramitocondriais seriam inicialmente direcionadas para a mitocôndria e por algum mecanismo de exporte, ainda não compreendido, seriam encaminhadas para outros compartimentos celulares. Os autores citam como exemplo o caso da proteína fumarase, de tem direcionamento mitocondrial, mas que em *S. cerevisiae* encontra-se majoritariamente (80-90%) no citoplasma (Stein et al., 1994). Além do mecanismo mencionado anteriormente, os autores sugerem que a fumarase escapa da maquinaria de translocação após a clivagem do peptídeo de importe mitocondrial.

Algumas hipóteses levam em consideração a origem bacteriana da mitocôndria (Gray, 1992), que teria conservado diferentes mecanismos de exportação e secreção de proteínas (Finlay et al., 1997). Nesse sentido, três vias principais poderiam enviar proteínas de origem mitocondrial para outras localidades. Uma delas seria a fusão da mitocôndria com o retículo endoplasmático, acompanhada de transferência de proteínas e posterior distribuição para outros compartimentos celulares (Soltys e Gupta, 1999b). Outra consistiria na "fuga" da proteína do interior da mitocôndria e posterior translocação para a superfície celular a partir de complexos proteicos de exportação não clássicos (Nombela et al., 2006). A terceira via consistiria na formação de vesículas que sairiam da mitocôndria em direção aos diferentes locais da célula, entre eles a parede celular (Soltys e Gupta, 1999b). Estudos proteômicos de

"lipid rafts" de membrana plasmática mostraram que 24 % (196) das proteínas identificadas eram de origem mitocondrial, no entanto "lipid rafts" não foram identificados na mitocôndria (Bae et al., 2004). As imagens mostradas na Figura 20C sugerem que algumas marcações com ouro, em pequenos "clusters", estão deixando a mitocôndria e se dirigindo à superfície celular, mas não é possível dizer se há a participação de vesículas.

As análises de microscopia eletrônica aqui apresentadas mostram as mitocôndrias formando um "colar" próximas à membrana plasmática, porém não em contacto com ela. Este padrão foi anteriormente relatado em células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Kashino et al., 1987) e também pode ser visto em leveduras recentemente transformadas, porém não em hifas (Carbonell e Rodriguez, 1968). Em contrapartida, Edwards e colaboradores (1991) mostram microscopias de leveduras *P. brasiliensis* com mitocôndrias arredondadas, dispersas por todo o citoplasma e em menor número em relação às aquelas encontradas em nossos experimentos. Diferenças nas condições de cultivo do fungo talvez possam explicar essas contradições. De qualquer forma, uma localização periférica das mitocôndrias pode não ser fortuita, mas sim a consequência de um intenso tráfego de moléculas mitocondriais para a superfície celular.

As Hsps desempenham um importante papel na ativação da resposta imune em vários tipos de infecções (Maresca et al., 1994 e Kauffmann et al., 1991). Membros da família Hsp60, 70 e 90 ativam tanto a resposta imune celular quanto a humoral contra bactérias, protozoários e fungos (Young, et al., 1988; Kumar et al., 1990 e Deepe et al., 1996). Em alguns casos estas Hsps são encontradas como antígenos imunodominantes (Kaufmann et al., 1987; Garble et al., 1992). Cheng e colaboradores (1992), por exemplo, associaram a virulência de *C. albicans* com a super expressão da Hsp90 (47 KDa) não somente durante a resposta ao estresse, mas possivelmente ajudando o fungo a sobreviver no hospedeiro.

Na Figura 6 observa-se que PbMdj1 apresenta uma sequência (LYTAQIPLTTALL) que poderia ser reconhecida pelo MHC de classe II e com isto ser apresentada para linfócitos T, desencadeando uma resposta imune celular. Além disso, a PbMdj1 é composta por vários seguimentos hidrofílicos que são potenciais epítopos para anticorpos. Nós verificamos que a proteína recombinante PbMdj1 truncada foi reconhecida pelo soro de alguns pacientes com PCM, sugerindo que a molécula é capaz de induzir resposta imune humoral em pacientes. A baixa intensidade das reações pode estar relacionada com o fato de a proteína recombinante representar apenas parte da molécula e/ou à perda de epítopos conformacionais quando apresentada em fase sólida.

O crescente interesse no estudo molecular dos fungos, devido à sua importância econômica e em patologias humanas e veterinárias, levou ao estudo do genoma de várias espécies. Muitos destes projetos genomas já foram concluídos e outros estão em fase de finalização. A disponibilidade destes dados em bancos de sequências possibilitou um estudo amplo de análise comparativa com Mdj1 homólogas de diferentes fungos, como *B. dermatitidis*, *H. capsulatum*, *C. immitis*, *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *F. graminearum*, *N. crassa* e *C. neoformans*. A maioria destas sequências está disponível em bancos de genes (BLAST), entretanto a sequência dos fungos dimórficos *B. dermatitidis* e *H. capsulatum* foram adquiridas com o consentimento dos autores, uma vez que estes bancos ainda não estão disponíveis.

Uma árvore filogenética construída a partir das sequências de aminoácidos das Mdj1 fúngicas mostrou que *P. brasiliensis* agrupou com os fungos dimórficos *B. dermatitidis* e *H. capsulatum* em um ramo distinto, entretanto *C. immitis*, apesar de ser um fungo dimórfico, ficou em um ramo isolado da árvore filogenética (Figura 8). Estes dados são consistentes com aqueles encontrados na literatura quando sequências de DNA ribossomal foram analisadas (Bialek et al., 2000).

Foi observado alto grau de conservação da organização cromossômica dos genes *MDJ1* e *LON* entre os membros da classe dos *Eurotiomycetes*. Os homólogos deste locus inteiro provavelmente também incluem os genes que codificam Bro1, CreA e um pequeno gene hipotético adjacente ao *LON*. Esta organização até o momento foi encontrada em *A. nidulans*, *A. fumigatus* e *H. capsulatum*. Em termos de genoma comparativo, estes achados são relevantes e poderão ser significativos em estudos de evolução.

Mapeamento de elementos de transcrição da região promotora dos genes *PbMDJ1* e *PbLON*

Em *P. brasiliensis* o gene *PbMDJ1* encontra-se adjacente a *PbLON*, em direção oposta, e ambos compartilham a mesma região promotora de aproximadamente 385 pb (Barros e Puccia, 2001). Este tipo de arranjo gênico facilitaria uma rápida resposta a estímulo para genes que compartilham a mesma região promotora. Os genes *GAL1* e *GAL10* de *S. cerevisiae* apresentam este tipo de arquitetura gênica e sua regulação foi bem estudada. A expressão dos genes *GAL1* e *GAL10* de leveduras, os quais são essenciais no metabolismo da galactose, é regulada em nível transcripcional pela disponibilidade de galactose e glucose no meio (St. John e Davis, 1981). Esta indução depende da ativação de múltiplos fatores positivos e

negativos que controlam os elementos localizados em uma região de ativação de 365 pb (UAS_{GAL} – “upstream activation sequences”) (Johnston, 1987, West et al., 1987). A região UAS_G encontra-se no promotor de *GAL1* e *GAL10* em um seguimento equidistante deste genes (Johnston, 1987).

Recentemente, em análises de “microarray” utilizadas para identificar genes envolvidos na resposta ao estresse induzidos por substâncias reativas de nitrogênio em *H. capsulatum*, foi observado que vários genes que participam de uma mesma via além de serem co-regulados transcricionalmente encontram-se agrupados no genoma do fungo (Nittler et al., 2005). Os autores citam o exemplo dos genes *NPS1* e *LOM1* que codificam uma peptídeo sintase não ribossomal e uma L-ornitina monooxigenase, respectivamente. No *H. capsulatum* estas proteínas estão envolvidas na aquisição de ferro (sideróforos) e seus genes estão agrupados no mesmo locus genômico.

Em nosso trabalho foram mapeados e validados elementos de transcrição na região 5´ intergênciada compartilhada pelos genes *PbMDJ1* e *PbLON* (ML) de *P. brasiliensis*. Para tanto, foram utilizados ensaios de proteção contra DNase I “footprinting” e EMSA. Três dos elementos encontrados são homólogos a sítios de ligação do “heat shock factor” (HSE) e outro é homólogo a um sítio ARE, de reconhecimento de AP-1 (“activator protein 1”). Este estudo foi realizado com os isolados *Pb18* e *Pb3* onde observamos diferenças: (i) no número de elementos detectados entre os isolados; (ii) no padrão da regulação transcricional de *PbMDJ1* e *PbLON* durante a transição de fase entre os isolados; (iii) no padrão da regulação transcricional durante a transição de fase do isolado *Pb18*. Foi verificado ainda que a região ML é polimórfica no isolado *Pb3* e embora as mutações tenham ocorrido fora dos elementos de transcrição identificados neste trabalho, sua contribuição na expressão diferencial não é descartada.

Os elementos de choque térmico (HSE) são formados por várias repetições contínuas e/ou invertidas do “motif” nGAAn (Xiao et al., 1991; Amin et al., 1994). Para estas unidades pentaméricas formarem um HSE são necessários no mínimo três repetições de nGAAn (Fernandes et al., 1994; Slater et al., 1987), como aquela da sequência consenso nGAAnnTCCnnGAAn, por exemplo. Estas sequências clássicas são encontradas na maioria dos promotores de genes induzidos por estresse térmico, entre eles *HSP70*, *HSP60*, *HSP104* e *HSP10* de *S. cerevisiae* (Amin et al., 1994, Tachibana et al., 2002). Outros genes de choque térmico de levedura, como o *YDJ1*, *HSP82* e o próprio *MDJ1* (Giardina et al., 1995 Tachibana

et al., 2002; Yamamoto et al., 2005), também são regulados por HSE não-clássicas (ncHSE), onde o número de nucleotídeos entre as unidades pentaméricas pode variar.

O elemento HSE2 mapeado neste trabalho (CTTGATCAACTCGGAGAACCTCGTCGAATAGCAG) foi similar a um ncHSE encontrado na região promotora do *MDJ1* de *S. cerevisiae* (ATTC TTACATCCTGTGGAACTCTATTGGAAA) por Tachibana e colaboradores (2002), apesar do primeiro "gap" apresentar dois nucleotídeos a menos. O elemento HSE1 (CGGCTAAACTTTGTTCACGAAAA) mapeado na região promotora ML também pode ser considerado um ncHSE, enquanto a sequência de HSE3 apresentou maior similaridade com os elementos de choque térmico típico AGAAGGGAATTTGCC. As mutações observadas em HSE1 e HSE3 (G/T) são toleráveis pelo Hsf. Entretanto, as variações no alinhamento das unidades pentaméricas de HSE1, HSE2 e HSE3 em *P. brasiliensis*, o intervalo entre estes elementos e sua distância em relação ao início de transcrição poderiam explicar a diferença na resposta ao choque térmico de *PbMDJ1* e *PbLON* quando comparados com *HSP70*, *HSP82* e *HSP104*. Estas características poderiam determinar o grau de afinidade pelo fator(es) correspondente. Desta forma, é possível assumir que por questões de afinidade houve proteção de HSE1 somente com o extrato de Pb3, enquanto em reações de EMSA este elemento foi positivo para os dois isolados testados. Já HSE3 não apresentou interação com o extrato de Pb18 tanto em ensaios de proteção quanto em EMSA, sugerindo que não é ativado nesse isolado.

Ensaio de quantificação da expressão de *PbMDJ1* e *PbLON* mostraram que estes genes são aparentemente regulados de maneira coordenada durante o choque térmico e transição de fase no isolado Pb3, mas em Pb18 este fenômeno foi observado apenas durante o estresse térmico. Portanto, a regulação do locus *MDJ1/LON* é provavelmente mais sofisticada em Pb18. Por outro lado, as diferenças encontrados na resposta transicional de *PbLON* e *PbMDJ1* nos isolados Pb3 e Pb18 poderiam ser a consequência de um polimorfismo nos fatores de transcrição sugerido pela mobilidade eletroforética em EMSA.

A interação Hsf-HSE é conservada da levedura ao homem (revisado por Pirkkala et al., 2001). O Hsf é uma proteína que compartilha motivos estruturais comuns, incluindo: um domínio ligante de DNA, uma região responsável pela formação do trímero e outra região regulatória ativadora. Em mamíferos, os Hsfs encontram-se ligados às proteínas de choque térmico no citoplasma em condições normais. Quando as células recebem um estresse térmico, oxidativo ou nutricional ocorre a separação. O fator de transcrição é fosforilado pela proteína kinase C ou outra serino/treonina kinase, propiciando a formação de uma estrutura

homotrimérica (Kroeger et al., 1993) que entra no núcleo e liga-se aos HSEs (Price e Calderwood, 1991).

Em *S. cerevisiae*, embora exista apenas um fator de choque térmico (Hsf), ele pode ativar a transcrição de uma grande variedade de genes envolvidos na divisão celular, metade dos quais não contém elementos de choque térmico típicos (Hahn et al., 2004). Ao contrário de células de mamíferos, os Hsfs de *S. cerevisiae* encontram-se ligados aos HSEs em condições normais de crescimento (Santoro et al., 1998) e em resposta ao estímulo de estresse desencadeiam rápido início da transcrição (Jakobsen et al., 1988). A ativação da transcrição em levedura depende de duas regiões do Hsf: NTA (N-terminal) e CTA (C-terminal) (Bulman et al., 2001; Morimoto et al., 1998), entre as quais CTA parece ser responsável por uma resposta transcricional sustentada, além de participar da indução de genes com HSE não-convencional, entre eles a própria *MDJ1* (Estruch, 2000; Tachibana et al., 2002). Desta forma, a plasticidade da resposta ao estresse pelo *S. cerevisiae* depende dos dois domínios de ativação da transcrição da Hsf e da arquitetura do HSE (Sakurai et al., 2001).

Em *P. brasiliensis*, não foi identificada uma Hsf nos bancos de ESTs, mas em *C. immitis* e *A. nidulans* existem pelo menos 3 genes classificados de *HSF*, sugerindo que um número semelhante possa existir no agente da PCM.

AP1 é a designação dada a uma família de fatores de transcrição que se ligam ao sítio ARE (G/AC/GTGACTNC/ANA/T) (Gutman and Wasyluk, 1990). Em fungos, este fator está diretamente relacionado à indução de genes durante a resposta ao estresse oxidativo. Entre eles destacam-se *TRX2* (Kuge e Jones, 1994), *TRR1* (Urban et al., 2005), *GLR1* (Grant et al., 1996), *GSH1* (Wu et al., 1994), *TSA1* (Urban et al., 2005) que codificam respectivamente tiorredoxina, tiorredoxina redutase, glutatona redutase, γ -glutamilcisteína sintase e antioxidante tiol-específico. Stephen e colaboradores (1995) mostraram que leveduras mutantes desprovidas dos genes γ AP1 e γ AP2, os quais são homólogos de AP1 em levedura, foram mais sensíveis à oxidação por peróxido de hidrogênio. Em mamíferos, este fator pode formar homo e heterodímeros e regular diversos processos celulares, tais como proliferação, diferenciação, apoptose e resposta a estresse (Karin et al., 1997). Em *P. brasiliensis*, pelo menos um gene homólogo ao AP-1 foi identificado no banco de EST (Campos et al., 2005). Por outro lado, a presença de um sítio ARE sugere a ativação de *PbLON* sob condições de estresse oxidativo, porém esse assunto está ainda sob investigação no laboratório. Nesse fungo, Lon tem localização única na mitocôndria (Batista et al., 2006), onde as proteínas são constantemente atacadas por radicais livres resultantes do metabolismo aeróbico normal,

resposta a drogas ou a um ambiente tóxico no hospedeiro (Cadenas e Davies, 2000). Proteínas oxidadas e danificadas são seletivamente degradadas por proteinases mitocondriais como parte de um mecanismo de proteção, no qual Lon supostamente desempenha papel importante (Bota e Davies, 2002).

A fita oposta ao ARE apresenta um sítio ligante de skn-1-like. O fator de transcrição skn-1 atua no desenvolvimento mesodermal em *Caenorhabditis elegans* e não foi encontrado em outros organismos. Contudo, recentemente foi demonstrado que skn-1 também tem papel na resistência ao estresse oxidativo neste organismo (An e Blackwell, 2003). O presente estudo sugere que PbMDJ1 é preferencialmente expresso na fase patogênica do Pb18. Neste isolado foi demonstrado que Mdj1 está presente na parede e regiões de brotamento (Batista et al., 2006), onde supostamente atua como "chaperone" e/ou "co-chaperone". Entretanto, uma possível função enzimática também poderia ser considerada, baseada no fato de que DnaJ de bactérias possui atividade de tiol-redutase na regiões de "zinc-finger" (Crouy-Chanel et al., 1995; Tang et al., 2001). Portanto, PbMDJ1 poderia também ser regulado pelo estresse oxidativo e exercer uma função de proteção celular.

É interessante salientar que além da regulação da transcrição, a estabilidade do mRNA também é um importante fator envolvido no controle da expressão de genes (McCarthy, 1998). O principal caminho de degradação de mRNA em leveduras envolve os processo de deadenilação, seguido pelo "decapping" e degradação por exonucleases 5' → 3'. Alguns elementos promovem a degradação rápida de transcritos instáveis de leveduras, como por exemplo, Y₆₋₈CAU (Y = C ou U) e U(A/C)AUUUAUU (Muhlrad e Parker, 1992). Na região 3'UTR do PbMDJ1, onde detectamos 60 adeninas, há apenas duas cópias do primeiro motivo e nenhuma do segundo. Em contrapartida, foram encontrados cinco motivos Y₆₋₈CAU na região 3'UTR de *PbGP43*, onde o número de adeninas gira em torno de 20 (Morais, 2003). Essas observações sugerem que o transcrito do PbMDJ1 é mais estável que o *PbGP43*, porém essa afirmativa carece de evidências experimentais.

No Pb18, não houve semelhança do perfil de mRNA acumulado do PbMDJ1 ou do PbLON (este trabalho) com *HSP70*, *HSP60* ou *HSP104* (Goldman et al., 2003) durante a transição de micélio para levedura. Nesses genes, o pico de transcrição ocorreu de forma rápida e intensa, porém gradualmente diminuiu. PbLON sofreu uma super regulação rápida e transiente, enquanto PbMDJ1 acumulou gradualmente mais mRNA ao longo da transição. O gene da Hsp104 de *P. brasiliensis*, correspondente a uma chaperone mitocondrial ATP-dependente ClpB, foi caracterizado em *P. brasiliensis* e os autores verificaram que tanto o transcrito como a proteína foram preferencialmente expressos na levedura (Jesuino et al.,

2002). A mesma observação é válida para a Hsp70 e seu gene (Silva et al., 1999). A variação positiva do Pb*MDJ1* vista no presente trabalho é mais discreta do que a dos genes mencionados. Tanto que passa despercebida no trabalho de Nunes et al. (2005), do qual somos colaboradores, e na revisão de Nicola et al. (2005), onde o número maior de transcrito na fase leveduriforme da Pb01 (8) não foi significativa em relação ao da fase miceliana (4). Sua possível importância na manutenção da fase leveduriforme não é necessariamente menor, porém somente poderá ser avaliada quando mutantes contendo o gene deletado ou interferido (iRNA) estiverem disponíveis.

Este é o primeiro estudo de mapeamento de elementos de transcrição em *P. brasiliensis*. Este trabalho pode auxiliar no entendimento da regulação de genes de estresse térmico que poderiam estar envolvidos na relação fungo/hospedeiro. Por outro lado, as diferenças na regulação transcricional entre Pb18 e Pb3 de Pb*MDJ1*, Pb*LON*, Pb*GP43* (Carvalho et al., 2005) e provavelmente de outros genes poderão explicar os diferentes padrões de PCM experimental que esses isolados suscitam em camundongos (Carvalho et al., 2005).

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- ✓ O gene *PbMDJ1* de *P. brasiliensis* foi clonado e caracterizado. A ORF do gene está contida em um fragmento de 1897 pb.
- ✓ O locus cromossomal de *PbLON* e *PbMDJ1* é conservado entre os fungos da classe dos Eurotiomicetos;
- ✓ A sequência deduzida de *PbMdj1* apresentou alta identidade com *Mdj1* de outros fungos, principalmente entre os dimórficos;
- ✓ *PbMdj1* apresentou dupla localização, presente na mitocôndria e na parede celular de *P. brasiliensis*;
- ✓ A região 5' intergênica dos genes *PbMDJ1* e *PbLON* do isolado *Pb3* apresentou polimorfismo em relação aos outros isolados estudados;
- ✓ A expressão dos genes *PbMDJ1* e *PbLON* aumentou após choque térmico em ambos os isolados estudados, sugerindo tratar-se de genes de estresse;
- ✓ As análises de expressão do *PbMDJ1* no isolado *Pb18* sugerem que este gene é preferencialmente expresso na levedura e sua expressão está diretamente relacionada ao aumento de temperatura. Essa conclusão aparentemente não se aplica ao *Pb3*. Por outro lado, em *Pb3* o perfil de expressão do *PbLON* foi semelhante ao do *PbMDJ1* em ambas as transições;
- ✓ Elementos de choque térmico e de estresse oxidativo foram mapeados na região promotora dos genes *PbMDJ1* e *PbLON*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida S.R., Unterkircher C.S., Camargo Z.P. 1998. Involvement of the major glycoprotein (gp43) of *Paracoccidioides brasiliensis* in attachment to macrophages. *Med Mycol.* **36**(6):405-411.
- Almeida,A.J., Martins,M., Carmona,J.A., Cano,L.E., Restrepo,A., Leao,C. & Rodrigues,F. 2006. New insights into the cell cycle profile of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genetics and Biology* **43**, 401-409.
- Almeida,I.C., Neville,D.C.A., Mehlert,A., Treumann,A., Ferguson,M.A.J., Previato,J.O. & Travassos,L.R. 1996. Structure of the N-linked oligosaccharide of the main diagnostic antigen of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Glycobiology* **6**, 507-515.
- Amin,J., Fernandez,M., Ananthan,J., Lis,J.T. & Voellmy,R. 1994. Cooperative binding of heat shock transcription factor to the Hsp70 promoter in vivo and in vitro. *J Biol. Chem.* **269**, 4804-4811.
- An,J.H. & Blackwell,T.K. 2003. SKN-1 links *C. elegans* mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response. *Genes Dev.* **17**, 1882-1893.
- Andre,D.C., Lopes,J.D., Franco,M.F., Vaz,C.A.C. & Calich,V.L.G. 2004. Binding of laminin to *Paracoccidioides brasiliensis* induces a less severe pulmonary paracoccidioidomycosis caused by virulent and low-virulence isolates. *Microbes and Infection* **6**, 549-558.
- Bae,T.J., Kim,M.S., Kim,J.W., Kim,B.W., Choo,H.J., Lee,J.W., Kim,K.B., Lee,C.S., Kim,J.H., Chang,S.Y., Kang,C.Y., Lee,S.W. & Ko,Y.G. 2004. Lipid raft proteome reveals ATP synthase complex in the cell surface. *Proteomics.* **4**, 3536-3548.
- Bagagli,E., Franco,M., Bosco,S.D.M., Hebler-Barbosa,F., Trinca,L.A. & Montenegro,M.R. 2003. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. *Medical Mycology* **41**, 217-223.
- Bagagli,E., Sano,A., Coelho,K.I., Alquati,S., Miyaji,M., de Camargo,Z.P., Gomes,G.M., Franco,M. & Montenegro,M.R. 1998. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **58**, 505-512.
- Barbosa M.S., Cunha Passos D.A., Felipe M.S., Jesuino R.S., Pereira M., de Almeida Soares C.M. 2004. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase homologue is differentially regulated in phases of *Paracoccidioides brasiliensis*: molecular and phylogenetic analysis. *Fungal Genet Biol.* **41**(7):667-75.
- Barbosa,M.S., Bao,S.N., Andreotti,P.F., de Faria,F.P., Felipe,M.S.S., Feitosa,L.D., Mendes-Giannini,M.J.S. & Soares,C.M.D. 2006. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. *Infection and Immunity* **74**, 382-389.
- Bardwell J.C., Tilly K., Craig E., King J., Zylicz M., Georgopoulos C. 1986. The nucleotide sequence of the *Escherichia coli* K12 dnaJ+ gene. A gene that encodes a heat shock protein. *J Biol Chem.* **261**(4):1782-5.
- Barros,T.F. & Puccia,R. 2001. Cloning and characterization of a LON gene homologue from the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast* **18**, 981-988.
- Batista,W.L., Matsuo,A.L., Ganiko,L., Barros,T.F., Veiga,T.R., Freymuller,E. & Puccia,R. 2006. The PbMDJ1 gene belongs to a conserved MDJ1/LON locus in thermomimorphic pathogenic fungi and encodes a heat shock protein that localizes to both the mitochondria and cell wall of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Eukaryotic Cell* **5**, 379-390.
- Benard,G., MendesGiannini,M.J.S., Juvenale,M., Miranda,E.T. & Duarte,A.J.S. 1997. Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. *Journal of Infectious Diseases* **175**, 1263-1267.

- Benard,G., Orii,N.M., Marques,H.H.S., Mendonca,M., Aquino,M.Z., Campeas,A.E., Delnegro,G.B., Durandy,A. & Duarte,A.J.S. 1994. Severe Acute Paracoccidioidomycosis in Children. *Pediatric Infectious Disease Journal* **13**, 510-515.
- Bialek,R., Ibricevic,A., Fothergill,A. & Begerow,D. 2000. Small subunit ribosomal DNA sequence shows *Paracoccidioides brasiliensis* closely related to *Blastomyces dermatitidis*. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 3190-3193.
- Bisio,L.C., Silva,S.P., Pereira,I.S., Xavier,M.A.S., Venancio,E.J., Puccia,R., Soares,C.M.A. & Felipe,M.S.S. 2005. A new *Paracoccidioides brasiliensis* 70-kDa heat shock protein reacts with sera from paracoccidioidomycosis patients. *Medical Mycology* **43**, 495-503.
- Boddicker JD, Jones BD. 2004. Lon protease activity causes down-regulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 invasion gene expression after infection of epithelial cells. *Infect Immun.* **72**(4):2002-13.
- Bonfim S.M., Cruz A.H., Jesuino R.S., Ulhoa C.J., Molinari-Madlum E.E., Soares C.M., Pereira M. 2006. Chitinase from *Paracoccidioides brasiliensis*: molecular cloning, structural, phylogenetic, expression and activity analysis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **46**(2):269-83.
- Bonnet,F., Vigneron,M., Bensaude,O. & Dubois,M.F. 1999. Transcription-independent phosphorylation of the RNA polymerase IIC-terminal domain (CTD) involves ERK kinases (MEK1/2). *Nucleic Acids Research* **27**, 4399-4404.
- Boorstein,W.R. & Craig,E.A. 1990. Regulation of a yeast HSP70 gene by a cAMP responsive transcriptional control element. *EMBO J* **9**, 2543-2553.
- Borges-Walmsley MI, Walmsley AR. 2000. cAMP signalling in pathogenic fungi: control of dimorphic switching and pathogenicity. *Trends Microbiol.* **8**(3):133-41.
- Borges-Walmsley,M.I., Chen,D.L., Shu,X.H. & Walmsley,A.R. 2002. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends in Microbiology* **10**, 80-87.
- Bota,D.A. & Davies,K.J. 2002. Lon protease preferentially degrades oxidized mitochondrial aconitase by an ATP-stimulated mechanism. *Nat. Cell Biol.* **4**, 674-680.
- Bota,D.A., Ngo,J.K. & Davies,K.J. 2005. Downregulation of the human Lon protease impairs mitochondrial structure and function and causes cell death. *Free Radic. Biol. Med.* **38**, 665-677.
- Bradford,M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 254.
- Brandhorst,T. & Klein,B. 2000. Cell wall biogenesis of *Blastomyces dermatitidis* - Evidence for a novel mechanism of cell surface localization of a virulence-associated adhesin via extracellular release and reassociation with cell wall chitin. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 7925-7934.
- Brown G.D., Gordon S. 2003. Fungal beta-glucans and mammalian immunity. *Immunity.* **19**(3):311-5.
- Brummer,E., Castaneda,E. & Restrepo,A. 1993. Paracoccidioidomycosis - An Update. *Clinical Microbiology Reviews* **6**, 89-117.
- Brummer,E., Hanson,L.H. & Stevens,D.A. 1988. Gamma-Interferon Activation of Macrophages for Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* and Evidence for Nonoxidative Mechanisms. *International Journal of Immunopharmacology* **10**, 945-952.
- Brummer,E., Hanson,L.H., Restrepo,A. & Stevens,D.A. 1989. Intracellular Multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in Macrophages - Killing and Restriction of Multiplication by Activated Macrophages. *Infection and Immunity* **57**, 2289-2294.
- Bulman,A.L., Hubl,S.T. & Nelson,H.C. 2001. The DNA-binding domain of yeast heat shock transcription factor independently regulates both the N- and C-terminal activation domains. *J Biol. Chem.* **276**, 40254-40262.
- Burger,E., Vaz,C.C.A., Sano,A., Calich,V.L.G., SingerVermes,L.M., Xidieh,C.F., Kashino,S.S., Nishimura,K. & Miyaji,M. 1996. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in nude mice: Studies with isolates

differing in virulence and definition of their T cell-dependent and T cell-independent components. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **55**, 391-398.

Cadenas,E. & Davies,K.J. 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 222-230.

Calcagno AM, Nino-Vega G, San-Blas F, San-Blas G. 1998. Geographic discrimination of *Paracoccidioides brasiliensis* strains by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol.* **36**(6):1733-6.

Calich V.L.G., Singer-Vermes L.M., Russo M., Vaz C.A.C., Burger E. Immunogenetics in paracoccidioidomycosis. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, eds. Paracoccidioidomycosis. London: Boca Raton, 1994. 151-173 p.

Calich,V.L.G. & Kashino,S.S. 1998. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **31**, 615-623.

Calich,V.L.G., SingerVermes,L.M., Siqueira,A.M. & Burger,E. 1985. Susceptibility and Resistance of Inbred Mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. *British Journal of Experimental Pathology* **66**, 585-594.

Camargo,Z.P., Gesztesi,J.L., Saraiva,E.C.O., Taborda,C.P., Vicentini,A.P. & Lopes,J.D. 1994. Monoclonal-Antibody Capture Enzyme-Immunoassay for Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* Antibodies in Paracoccidioidomycosis. *Journal of Clinical Microbiology* **32**, 2377-2381.

Campos,E.G., Jesuino,R.S., Dantas,A.S., Brigido,M.M. & Felipe,M.S. 2005. Oxidative stress response in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Genet. Mol Res.* **4**, 409-429.

Cano,L.E., Gomez,B., Brummer,E., Restrepo,A. & Stevens,D.A. 1994. Inhibitory Effect of Deferoxamine Or Macrophage Activation on Transformation of *Paracoccidioides brasiliensis* Conidia Ingested by Macrophages - Reversal by Holotransferrin. *Infection and Immunity* **62**, 1494-1496.

Cano,L.E., SingerVermes,L.M., Vaz,C.A.C., Russo,M. & Calich,V.L.G. 1995. Pulmonary Paracoccidioidomycosis in Resistant and Susceptible Mice - Relationship Among Progression of Infection, Bronchoalveolar Cell Activation, Cellular Immune-Response, and Specific Isotype Patterns. *Infection and Immunity* **63**, 1777-1783.

Cano,M.I.N., Cisalpino,P.S., Galindo,I., Ramirez,J.L., Mortara,R.A. & da Silveira,J.F. 1998. Electrophoretic karyotypes and genome sizing of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Clinical Microbiology* **36**, 742-747.

Carbonell,L.M. & Rodriguez,J. 1968. Mycelial phase of *Paracoccidioides brasiliensis* and *Blastomyces dermatitidis*: an electron microscope study. *J Bacteriol.* **96**, 533-543.

Carmo JP, Dias-Melicio LA, Calvi SA, Peracoli MT, Soares AM. 2006. TNF-alpha activates human monocytes for *Paracoccidioides brasiliensis* killing by an H2O2-dependent mechanism. *Med Mycol. Jun* **44**(4):363-8.

Carmona,A.K., Puccia,R., Oliveira,M.C.F., Rodrigues,E.G., Juliano,L. & Travassos,L.R. 1995. Characterization of An Exocellular Serine-Thiol Proteinase Activity in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Biochemical Journal* **309**, 209-214.

Carneiro LC, de Faria FP, Felipe MS, Pereira M, de Almeida Soares CM. 2005. *Paracoccidioides brasiliensis* presents two different cDNAs encoding homologues of the fructose 1,6-biphosphate aldolase: protein isolation, cloning of the cDNAs and genes, structural, phylogenetic, and expression analysis. *Fungal Genet Biol* **42**(1):51-60.

Carvalho,K.C., Ganiko,L., Batista,W.L., Morais,F.V., Marques,E.R., Goldman,G.H., Franco,M.F. & Puccia,R. 2005. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* and gp43 expression in isolates bearing known PbGP43 genotype. *Microbes Infect.* **7**, 55-65.

Casanova,M. & Chaffin,W.L. 1991. Cell wall glycoproteins of *Candida albicans* as released by different methods. *J Gen. Microbiol.* **137**, 1045-1051.

- Chaffin,W.L., Lopez-Ribot,J.L., Casanova,M., Gozalbo,D. & Martinez,J.P. 1998. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol. Mol Biol. Rev.* **62**, 130-180.
- Cheng L, Hirst K, Piper PW. 1992. Authentic temperature-regulation of a heat shock gene inserted into yeast on a high copy number vector. Influences of overexpression of HSP90 protein on high temperature growth and thermotolerance. *Biochim Biophys Acta.* **1132**(1):26-34.
- Chin,D.T., Stephen,A.G., Webster,T., Smith,T., Alferd,L.G. 1988. Sequence of lon gene in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **263**:11718-28.
- Cisalpino,P.S., Puccia,R., Yamauchi,L.M., Cano,M.I.N., daSilveira,J.F. & Travassos,L.R. 1996. Cloning, characterization, and epitope expression of the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 4553-4560.
- Clemons,K.V., Feldman,D. & Stevens,D.A. 1989. Influence of Estradiol on Protein Expression and Methionine Utilization During Morphogenesis of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of General Microbiology* **135**, 1607-1617.
- Corredor,G.G., Peralta,L.A., Castano,J.H., Zuluaga,J.S., Henao,B., Arango,M., Tabares,A.M., Matute,D.R., Mcewen,J.G. & Restrepo,A. 2005. The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate. *Medical Mycology* **43**, 275-280.
- Coutinho ZF, Silva D, Lazera M, Petri V, Oliveira RM, Sabroza PC, Wanke B. 2002. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saude Publica.* **18**(5):1441-54.
- Crouy-Chanel,A., Kohiyama,M. & Richarme,G. 1995. A novel function of *Escherichia coli* chaperone DnaJ. Protein-disulfide isomerase. *J Biol. Chem.* **270**, 22669-22672.
- Cunha DA, Zancope-Oliveira RM, Sueli M, Felipe S, Salem-Izacc SM, Deepe GS Jr, Soares CM.2002. Heterologous expression, purification, and immunological reactivity of a recombinant HSP60 from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Clin Diagn Lab Immunol.* **9**(2):374-7.
- da Fonseca CA, Jesuino RS, Felipe MS, Cunha DA, Brito WA, Soares CM. 2001. Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect.* **3**(7):535-42.
- Daher,B.S., Venancio,E.J., de Freitas,S.M., Bao,S.N., Vianney,P.V.R., Andrade,R.V., Dantas,A.S., Soares,C.M.A., Silva-Pereira,I. & Felipe,M.S.S. 2005. The highly expressed yeast gene pby20 from *Paracoccidioides brasiliensis* encodes a flavodoxin-like protein. *Fungal Genetics and Biology* **42**, 434-443.
- De Moraes Borba C, Schaffer GM. 2002. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and an attempt to induce the dimorphic process with fetal calf serum. *Mycoses.* **45**(5-6):174-9.
- Deepe GS Jr, Gibbons R, Brunner GD, Gomez FJ. 1996. A protective domain of heat-shock protein 60 from *Histoplasma capsulatum*. *J Infect Dis.* **174**(4):828-34.
- Diez S, Garcia EA, Pino PA, Botero S, Corredor GG, Peralta LA, Castano JH, Restrepo A, McEwen JG. 1999. PCR with *Paracoccidioides brasiliensis* specific primers: potential use in ecological studies. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* **41**(6):351-8.
- Diez,S., Gomez,B.L., Restrepo,A., Hay,R.J. & Hamilton,A.J. 2002. *Paracoccidioides brasiliensis* 87-kilodalton antigen, a heat shock protein useful in diagnosis: Characterization, purification, and detection in biopsy material via immunohistochemistry. *Journal of Clinical Microbiology* **40**, 359-365.
- Diniz,S.N., Carvalho,K.C., Cisalpino,P.S., Silveira,J.F., Travassos,L.R. & Puccia,R. 2002. Expression in bacteria of the gene encoding the gp43 antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*: Immunological reactivity of the recombinant fusion proteins. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **9**, 1200-1204.
- Duchniewicz,M., Germaniuk,A., Westermann,B., Neupert,W., Schwarz,E. & Marszalek,J. 1999. Dual role of the mitochondrial chaperone Mdj1p in inheritance of mitochondrial DNA in yeast. *Mol Cell Biol.* **19**, 8201-8210.

- Edwards, M.R., Salazar, M.E., Samsonoff, W.A., Cano, L.E., Ostrander, G.A. & Restrepo, A. 1991. Electron-Microscopic Study of Conidia Produced by the Mycelium of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia* **114**, 169-177.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S. & von Heijne, G. 2000. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *Journal of Molecular Biology* **300**, 1005-1016.
- Eroles, P., Sentandreu, M., Elorza, M.V. & Sentandreu, R. 1997. The highly immunogenic enolase and Hsp70p are adventitious *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiology-Uk* **143**, 313-320.
- Estruch, F. 2000. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 469-486.
- Farias MR, Werner J, Muro MD, Marques SA, Marques MEA, Franco MF, Ribeiro MG, Custodio CC, Condas LAZ, Bosco SMG, Bagagli E. 2005. Canine Paracoccidioidomycosis: case report of generalized lymphadenitis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 47 (Suppl. 14), 64.
- Feder, M.E. & Hofmann, G.E. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology* **61**, 243-282.
- Feitosa, L.D., Cisalpino, P.S., dos Santos, M.R.M., Mortara, R.A., Barros, T.F., Morais, F.V., Puccia, R., da Silveira, J.F. & de Camargo, Z.P. 2003. Chromosomal polymorphism, syntenic relationships, and ploidy in the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genetics and Biology* **39**, 60-69.
- Felipe, M.S., Andrade, R.V., Arraes, F.B., Nicola, A.M., Maranhao, A.Q., Torres, F.A., Silva-Pereira, I., Pocas-Fonseca, M.J., Campos, E.G., Moraes, L.M., Andrade, P.A., Tavares, A.H., Silva, S.S., Kyaw, C.M., Souza, D.P., Network, P., Pereira, M., Jesuino, R.S., Andrade, E.V., Parente, J.A., Oliveira, G.S., Barbosa, M.S., Martins, N.F., Fachin, A.L., Cardoso, R.S., Passos, G.A., Almeida, N.F., Walter, M.E., Soares, C.M., Carvalho, M.J. & Brigido, M.M. 2005. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *J Biol. Chem.* **280**, 24706-24714.
- Felipe, M.S.S., Andrade, R.V., Petrofeza, S.S., Maranhao, A.Q., Torres, F.A.G., Albuquerque, P., Arraes, F.B.M., Arruda, M., Azevedo, M.O., Baptista, A.J., Bataus, L.A.M., Borges, C.L., Campos, E.G., Cruz, M.R., Daher, B.S., Dantas, A., Ferreira, M.A.S.V., Ghil, G.V., Jesuino, R.S.A., Kyaw, C.M., Leitao, L., Martins, C.R., Moraes, L.M.P., Neves, E.O., Nicola, A.M., Alves, E.S., Parente, J.A., Pereira, M., Pocas-Fonseca, M.J., Resende, R., Ribeiro, B.M., Saldanha, R.R., Santos, S.C., Silva-Pereira, I., Silva, M.A.S., Silveira, E., Simoes, I.C., Soares, R.B.A., Souza, D.P., De Souza, M.T., Andrade, E.V., Xavier, M.A.S., Veiga, H.P., Venancio, E.J., Carvalho, M.J.A., Oliveira, A.G., Inoue, M.K., Almeida, N.F., Walter, M.E.M.T., Soares, C.M.A. & Brigido, M.M. 2003. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. *Yeast* **20**, 263-271.
- Fernandes M, Xiao H, Lis JT. 1994. Fine structure analyses of the *Drosophila* and *Saccharomyces* heat shock factor--heat shock element interactions. *Nucleic Acids Res.* 22(2):167-73.
- Figuroa, J.I., Hamilton, A.J., Allen, M.H. & Hay, R.J. 1995. Isolation and partial characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* 58 Kda Extracellular Glycoprotein Which Is Recognized by Human Immune Sera. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **89**, 566-572.
- Finlay BB, Falkow S. 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev.* **61**(2):136-69.
- Fliss, A.E., Rao, J. & Caplan, A. 1999. The role of Ydj1 in androgen and estrogen receptor action. *Molecular Biology of the Cell* **10**, 326A.
- Forbes MS, Plantholt BA, Sperelakis N. 1977. Cytochemical staining procedures selective for sarcotubular systems of muscle: modifications and applications. *J Ultrastruct Res.* **60**(3):306-27.
- Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marques SA, Dillon NL, Mota NGS. 1987. Paracoccidioidomycosis: a recent proposed classification of its clinical forms. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.20 p129.
- Fu GK, Markovitz DM. 1998. The human LON protease binds to mitochondrial promoters in a single-stranded, site-specific, strand-specific manner. *Biochemistry.* **37**(7):1905-9.

- Fu GK, Smith MJ, Markovitz DM. 1997. Bacterial protease Lon is a site-specific DNA-binding protein. *J Biol Chem.* **272**(1):534-8.
- Garble TR. 1992. Heat shock proteins and infection: interactions of pathogen and host. *Experientia.* **48**: 635-9.
- Garcia NM, Del Negro GM, Heins-Vaccari EM, de Melo NT, de Assis CM, Lacaz C da. 1993. *Paracoccidioides brasiliensis*, a new sample isolated from feces of a penguin (*Pygoscelis adeliae*) *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* **35**(3):227-35.
- Gesztési, J.L., Puccia, R., Travassos, L.R., Vicentini, A.P., de Moraes, J.Z., Franco, M.F. & Lopes, J.D. 1996. Monoclonal antibodies against the 43,000 Da glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis* modulate laminin-mediated fungal adhesion to epithelial cells and pathogenesis. *Hybridoma* **15**, 415-422.
- Giardina, C. & Lis, J.T. 1995. Dynamic protein-DNA architecture of a yeast heat shock promoter. *Mol Cell Biol.* **15**, 2737-2744.
- Gil-Navarro I, Gil ML, Casanova M, O'Connor JE, Martinez JP, Gozalbo D. 1997. The glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is a surface antigen. *J Bacteriol.* **179**(16):4992-9.
- Gil-Navarro I, Gil ML, Casanova M, O'Connor JE, Martinez JP, Gozalbo D. 1997. The glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is a surface antigen. *J Bacteriol.* **179**(16):4992-9.
- Goldani, L.Z. & Sugar, A.M. 1998. Short report: Use of the polymerase chain reaction to detect *Paracoccidioides brasiliensis* in murine paracoccidioidomycosis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **58**, 152-153.
- Goldani, L.Z., Picard, M. & Sugar, A.M. 1994. Synthesis of heat-shock proteins in mycelia and yeast forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Medical Microbiology* **40**, 124-128.
- Goldberg AL, Moerschell RP, Chung CH, Maurizi MR. 1994. ATP-dependent protease La (lon) from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **244**:350-75.
- Goldman, G.H., Marques, E.D., Ribeiro, D.C.D., Bernardes, L.A.D., Quiapin, A.C., Vitorelli, P.M., Savoldi, M., Semighini, C.P., de Oliveira, R.C., Nunes, L.R., Travassos, L.R., Puccia, R., Batista, W.L., Ferreira, L.E., Moreira, J.C., Bogossian, A.P., Tekai, F., Nobrega, M.P., Nobrega, F.G. & Goldman, M.H.S. 2003. Expressed sequence tag analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: Identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence and pathogenicity genes. *Eukaryotic Cell* **2**, 34-48.
- Gomes, G.M., Cisalpino, P.S., Taborda, C.P. & de Camargo, Z.P. 2000. PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 3478-3480.
- Gomez FJ, Gomez AM, Deepe GS Jr. 1992. An 80-kilodalton antigen from *Histoplasma capsulatum* that has homology to heat shock protein 70 induces cell-mediated immune responses and protection in mice. **60**(7):2565-71.
- Gomez, B.L., Figueroa, J.I., Hamilton, A.J., Ortiz, B., Robledo, M.A., Hay, R.J. & Restrepo, A. 1997. Use of monoclonal antibodies in diagnosis of paracoccidioidomycosis: New strategies for detection of circulating antigens. *Journal of Clinical Microbiology* **35**, 3278-3283.
- Grant, C.M., Collinson, L.P., Roe, J.H. & Dawes, I.W. 1996. Yeast glutathione reductase is required for protection against oxidative stress and is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Mol Microbiol.* **21**, 171-179.
- Gray, M.W., Hanićjoyce, P.J. & Covello, P.S. 1992. Transcription, Processing and Editing in Plant-Mitochondria. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **43**, 145-175.
- Groot, P.W., Ruiz, C., Vázquez de Aldana, C.R., Duenas, E., Cid, V.J., Del Rey, F., et al. 2001. A genome approach for the identification and classification of genes involved in cell wall formation and its regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Comp. Funct. Genomics* **2**:124-142.

- Grose E, Tamsitt JR. 1965. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia, S.A. *Sabouraudia*. **4**(2):124-5.
- Grosso,D.D., de Almeida,S.R., Mariano,M. & Lopes,J.D. 2003. Characterization of gp70 and anti-gp70 monoclonal antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* pathogenesis. *Infection and Immunity* **71**, 6534-6542.
- Gupta,S.R. Mitochondrial proteins at unexpected cellular localitions: export of proteins from an evolutionary perspective. 2000. *International Review of Cytology* **194**:133-196.
- Gutman,A. & Wasyluk,B. 1990. The collagenase gene promoter contains a TPA and oncogene-responsive unit encompassing the PEA3 and AP-1 binding sites. *EMBO J* **9**, 2241-2246.
- Hahn,J.S., Hu,Z., Thiele,D.J. & Iyer,V.R. 2004. Genome-wide analysis of the biology of stress responses through heat shock transcription factor. *Mol Cell Biol*. **24**, 5249-5256.
- Hanhan D. 1985. Techniques for transformation of *E. Coli* in: DNA cloning: A practical approach (*D,M, Glover, eds.*). Vol I. 1985. p109-175.
- Hanna,S.A., da Silva,J.L.M. & Giannini,M.J.S.M. 2000. Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. *Microbes and Infection* **2**, 877-884.
- Hebeler-Barbosa,F., Montenegro,M.R. & Bagagli,E. 2003. Virulence profiles of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from armadillos (*Dasypus novemcinctus*). *Medical Mycology* **41**, 89-96.
- Hebeler-Barbosa,F., Morais,F.V., Montenegro,M.R., Kuramae,E.E., Montes,B., Mcewen,J.G., Bagagli,E. & Puccia,R. 2003. Comparison of the sequences of the internal transcribed Spacer regions and PbGP43 genes of *Paracoccidioides brasiliensis* from patients and armadillos (*Dasypus novemcinctus*). *Journal of Clinical Microbiology* **41**, 5735-5737.
- Holbrook,J.D. & Danpure,C.J. 2002. Molecular basis for the dual mitochondrial and cytosolic localization of alanine:glyoxylate aminotransferase in amphibian liver cells. *J Biol. Chem.* **277**, 2336-2344.
- Huang,H.C., Sherman,M.Y., Kandror,O. & Goldberg,A.L. 2001. The molecular chaperone DnaJ is required for the degradation of a soluble abnormal protein in *Escherichia coli*. *J Biol. Chem.* **276**, 3920-3928.
- Izacc,S.M., Gomez,F.J., Jesuino,R.S., Fonseca,C.A., Felipe,M.S., Deepe,G.S. & Soares,C.M. 2001. Molecular cloning, characterization and expression of the heat shock protein 60 gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med. Mycol.* **39**, 445-455.
- Jakobsen BK, Pelham HR. Constitutive binding of yeast heat shock factor to DNA in vivo. *Mol Cell Biol*. 1988; **8**(11):5040-2.
- Jesuino,R.S.A., Azevedo,M.O., Felipe,M.S.S., Pereira,M. & Soares,C.M.D. 2002. Characterization of a chaperone ClpB homologue of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast* **19**, 963-972.
- Kanetsuna,F. 1981. Ultrastructural studies on the dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis* and *Histoplasma capsulatum*. *Sabouraudia-Journal of Medical and Veterinary Mycology* **19**, 275-286.
- Karin M, Liu Z, Zandi E. 1997. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol*. **9**(2):240-6.
- Kashino,S.S., Calich,V.L., Singer-Vermes,L.M., Abrahamsohn,P.A. & Burger,E. 1987. Growth curves, morphology and ultrastructure of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. *Mycopathologia* **99**, 119-128.
- Kashino,S.S., Calich,V.L.G., Burger,E. & SingerVermes,L.M. 1985. In vivo and In vitro characteristics of 6 *Paracoccidioides brasiliensis* strains. *Mycopathologia* **92**, 173-178.
- Kaufmann SH, Schoel B, van Embden JD, Koga T, Wand-Wurtttenberger A, Munk ME, Steinhoff U. 1991. Heat-shock protein 60: implications for pathogenesis of and protection against bacterial infections. *Immunol Rev*. **121**:67-90.

Kaufmann SH, Vath U, Thole JE, Van Embden JD, Emmrich F. Enumeration of T cells reactive with *Mycobacterium tuberculosis* organisms and specific for the recombinant mycobacterial 64-kDa protein. *Eur J Immunol.* 1987, **17**(3):351-7

Kelley,W.L. 1998. The J-domain family and the recruitment of chaperone power. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 222-227.

Kleiber,J., Kalousek,F., Swaroop,M. & Rosenberg,L.E. 1990. The General Mitochondrial Matrix Processing Protease from Rat-Liver - Structural Characterization of the Catalytic Subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 7978-7982.

Kroeger PE, Sarge KD, Morimoto RI. 1993. Mouse heat shock transcription factors 1 and 2 prefer a trimeric binding site but interact differently with the HSP70 heat shock element. *Mol Cell Biol.* **13**(6):3370-83.

Kuge,S. & Jones,N. 1994. YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *EMBO J* **13**, 655-664.

Kugler,S., Sebghati,T.S., Eissenberg,L.G. & Goldman,W.E. 2000. Phenotypic variation and intracellular parasitism by *Histoplasma capsulatum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 8794-8798.

Kumar N, Zhao Y, Graves P, Perez Folgar J, Maloy L, Zheng H. 1990. Human immune response directed against *Plasmodium falciparum* heat shock-related proteins. *Infect Immun.* **58**(5):1408-14.

Kurita,N., Oarada,M., Miyaji,M. & Ito,E. 2000. Effect of cytokines on antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Medical Mycology* **38**, 177-182.

Kurzik-Dumke U, Gundacker D, Renthrop M, Gateff E. 1995. Tumor suppression in *Drosophila* is causally related to the function of the lethal(2) tumorous imaginal discs gene, a dnaJ homolog. *Dev Genet.* **16**(1):64-76.

Lacaz C.S., Mycological diagnosis. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, eds. *Paracoccydioidomycosis*. London: Boca Raton, 1994. 339-344 p.

Lacaz, CS. Historical evolution of the knowledge on paracoccidioidomycosis and its etiologic agent, *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, eds. *Paracoccydioidomycosis*. London: Boca Raton, 1994. 1-11 p.

Lacaz, CS. *Paracoccidioides brasiliensis*: morphology; evolutionary cycle; maintenance during saprophytic life; biology, virulence, taxonomy. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, eds. *Paracoccydioidomycosis*. London: Boca Raton, 1994. 13-25 p.

Laemmli UK . Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685. 1970.

Ref Type: Generic

Langer T, Neupert W. 1996. Regulated protein degradation in mitochondria. *Experientia.* **52**(12):1069-76.

Leal,C.V., Montes,B.A., Mesa,A.C., Rua,A.L., Corredor,M., Restrepo,A. & Mcewen,J.G. 2004. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med. Mycol.* **42**, 391-395.

Lee,S., Fan,C.Y., Younger,J.M., Ren,H.Y. & Cyr,D.M. 2002. Identification of essential residues in the Type II Hsp40 Sis1 that function in polypeptide binding. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 21675-21682.

Lindquist,S. & Craig,E.A. 1988. The heat-shock proteins. *Annual Review of Genetics* **22**, 631-677.

Lindquist,S. 1981. Regulation of protein synthesis during heat shock. *Nature* **293**, 311-314.

Lisse,T. & Schwarz,E. 2000. Functional specificity of the mitochondrial DnaJ protein, Mdj1p, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics* **263**, 527-534.

Long,K.H., Gomez,F.J., Morris,R.E. & Newman,S.L. 2003. Identification of heat shock protein 60 as the ligand on *Histoplasma capsulatum* that mediates binding to CD18 receptors on human macrophages. *J Immunol.* **170**, 487-494.

Lopez-Ribot JL, Chaffin WL. 1996. Members of the Hsp70 family of proteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* **178**(15):4724-6.

Lopez-Ribot,J.L., Alloush,H.M., Masten,B.J. & Chaffin,W.L. 1996. Evidence for presence in the cell wall of *Candida albicans* of a protein related to the hsp70 family. *Infect. Immun.* **64**, 3333-3340.

Lu,Z. & Cyr,D.M. 1998. The conserved carboxyl terminus and zinc finger-like domain of the co-chaperone Ydj1 assist Hsp70 in protein folding. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 5970-5978.

Maresca B, Kobayashi GS. 1994. Hsp70 in parasites: as an inducible protective protein and as an antigen. *Experientia.* **50**(11-12):1067-74.

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. 2004. Identification of genes preferentially expressed in the pathogenic yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis*, using suppression subtraction hybridization and differential macroarray analysis. *Mol Genet. Genomics* **271**, 667-677.

Matsuo,A.L., Tersariol,I.I.L., Kobata,S.I., Travassos,L.R., Carmona,A.K. & Puccia,R. 2006. Modulation of the exocellular serine-thiol proteinase activity of *Paracoccidioides brasiliensis* by neutral polysaccharides. *Microbes and Infection* **8**, 84-91.

Matthews R, Wells C, Burnie JP. 1988. Characterisation and cellular localisation of the immunodominant 47-Kda antigen of *Candida albicans*. *J Med Microbiol.* **27**(4):227-32.

Matthews R, Wells C, Burnie JP. 1988. Characterisation and cellular localisation of the immunodominant 47-Kda antigen of *Candida albicans*. *J Med Microbiol.* **27**(4):227-32.

Matute,D.R., Mcewen,J.G., Puccia,R., Montes,B.A., San Blas,G., Bagagli,E., Rauscher,J.T., Restrepo,A., Morais,F., Nino-Vega,G. & Taylor,J.W. 2006. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol. Evol.* **23**, 65-73.

McCarthy J.E. 1998. Posttranscriptional control of gene expression in yeast. *Microbiol Mol Biol Rev.* **62**(4):1492-553.

Mcewen,J.G., Bedoya,V., Patino,M.M., Salazar,M.E. & Restrepo,A. 1987. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. *J. Med. Vet. Mycol.* **25**, 165-175.

Mcewen,J.G., Ortiz,B.L., Garcia,A.M., Florez,A.M., Botero,S. & Restrepo,A. 1996. Molecular cloning, nucleotide sequencing, and characterization of a 27-kDa antigenic protein from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genetics and Biology* **20**, 125-131.

Mendes R.P., Negroni R., Arechavala A. Treatment and control of cure. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, eds. Paracoccidioidomycosis. London: Boca Raton, 1994. 373-387 p.

Mendes-Giannini MJ, Andreotti PF, Vincenzi LR, Monteiro da Silva JL, Lenzi HL, Benard G, Zancoppe-Oliveira R, de Matos Guedes HL, Soares CP. 2006. Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect.* **7**;

Missall,T.A., Pusateri,M.E. & Lodge,J.K. 2004. Thiol peroxidase is critical for virulence and resistance to nitric oxide and peroxide in the fungal pathogen, *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology* **51**, 1447-1458.

Molinari-Madlum,E.E.W.I., Felipe,M.S.S. & Soares,C.M.A. 1999. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates can be correlated to groups defined by random amplified polymorphic DNA analysis. *Medical Mycology* **37**, 269-276.

Montoya,A.E., Alvarez,A.L., Moreno,M.N., Restrepo,A. & Mcewen,J.G. 1999. Electrophoretic karyotype of environmental isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Medical Mycology* **37**, 219-222.

Montoya,A.E., Moreno,M.N., Restrepo,A. & Mcewen,J.G. 1997. Electrophoretic karyotype of clinical isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genetics and Biology* **21**, 223-227.

- Morais FV. O gene PbGP43 que codifica o antígeno principal do *Paracoccidioides brasiliensis*: polimorfismo e transcrição. Tese de doutorado, 2003.
- Morais,F.V., Barros,T.F., Fukada,M.K., Cisalpino,P.S. & Puccia,R. 2000. Polymorphism in the gene coding for the immunodominant antigen gp43 from the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 3960-3966.
- Moreira SF, Bailao AM, Barbosa MS, Jesuino RS, Felipe MS, Pereira M, de Almeida Soares CM. 2004. Monofunctional catalase P of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification, characterization, molecular cloning and expression analysis. *Yeast.* 21(2) 173-82
- Morimoto RI. 1998. Regulation of heat shock transcriptional response: cross talk between a family of the heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev.* **12**:3788-96.
- Muhlrad,D. & Parker,R. 1992. Mutations affecting stability and deadenylation of the yeast Mfa2 transcript. *Genes & Development* **6**, 2100-2111.
- Nascimento,F.R.F., Calich,V.L.G., Rodriguez,D. & Russo,M. 2002. Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: Essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. *Journal of Immunology* **168**, 4593-4600.
- Nicola,A.M., Andrade,R.V. & Silva-Pereira,I. 2005. Molecular chaperones in the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome. *Genet. Mol Res.* **4**, 346-357.
- Nielsen,H., Engelbrecht,J., Brunak,S. & von Heijne,G. 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* **10**, 1-6.
- Nimrichter,L. 2005. Structure, cellular distribution, antigenicity and biological functions of *Fonsecaea pedrosoi* ceramide monohexosides. *Infect. Immun.* **73**(12) 7860-8
- Nimrichter,L., Rodrigues,M.L., Rodrigues,E.G. & Travassos,L.R. 2005. The multitude of targets for the immune system and drug therapy in the fungal cell wall. *Microbes Infect.* **7**, 789-798.
- Nino-Vega,G.A., Calcagno,A.M., San Blas,G., San Blas,F., Gooday,G.W. & Gow,N.A.R. 2000. RFLP analysis reveals marked geographical isolation between strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Medical Mycology* **38**, 437-441.
- Nino-Vega,G.A., Munro,C.A., San Blas,G., Gooday,G.W. & Gow,N.A.R. 2000. Differential expression of chitin synthase genes during temperature-induced dimorphic transitions in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Medical Mycology* **38**, 31-39.
- Nombela C, Gil C, Chaffin WL. 2006. Non-conventional protein secretion in yeast.
- Nombela,C., Gil,C. & Chaffin,W.L. 2006. Non-conventional protein secretion in yeast. *Trends in Microbiology* **14**, 15-21.
- Nunes,L.R., Costa,d.O., Leite,D.B., da Silva,V.S., dos Reis,M.E., Silva Ferreira,M.E., Ribeiro,D.C., Souza Bernardes,L.A., Goldman,M.H., Puccia,R., Travassos,L.R., Batista,W.L., Nobrega,M.P., Nobrega,F.G., Yang,D.Y., Braganca Pereira,C.A. & Goldman,G.H. 2005. Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. *Eukaryot. Cell* **4**, 2115-2128.
- Odorizzi,G., Katzmann,D.J., Babst,M., Audhya,A. & Emr,S.D. 2003. Bro1 is an endosome-associated protein that functions in the MVB pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci.* **116**, 1893-1903.
- Pardo,M., Monteoliva,L., Pla,J., Sanchez,M., Gil,C. & Nombela,C. 1999. Two-dimensional analysis of proteins secreted by *Saccharomyces cerevisiae* regenerating protoplasts: A novel approach to study the cell wall. *Yeast* **15**, 459-472.
- Paris,S. & Duran,S. 1985. Cyclic Adenosine 3',5' Monophosphate (Camp) and dimorphism in the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia* **92**, 115-120.
- Paris,S., Durangonzalez,S. & Mariat,F. 1985. Nutritional studies on *Paracoccidioides brasiliensis* - the role of organic sulfur in dimorphism. *Sabouraudia-Journal of Medical and Veterinary Mycology* **23**, 85-92.

- Passos DAC, Bao SN, Chagas RF, Felipe MSS, Soares CMA. Cellular localization of the Hsp60 of *Paracoccidioides brasiliensis*. XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia. Florianópolis, SC, Brasil. pp-79
- Pellecchia,M., Szyperski,T., Wall,D., Georgopoulos,C. & Wuthrich,K. 1996. NMR structure of the J-domain and the Gly/Phe-rich region of the *Escherichia coli* DnaJ chaperone. *J Mol Biol.* **260**, 236-250.
- Pereira LA, Pereira M, Felipe MS, Zancope-Oliveira RM, Soares CM. 2004. Proteomic identification, nucleotide sequence, heterologous expression and immunological reactivity of the triosephosphate isomerase of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect.* **6**(10):892-900.
- Peterson,S.W. & Sigler,L. 1998. Molecular genetic variation in *Emmonsia crescens* and *Emmonsia parva*, etiologic agents of adiaspiromycosis, and their phylogenetic relationship to *Blastomyces dermatitidis* (*Ajellomyces dermatitidis*) and other systemic fungal pathogens. *Journal of Clinical Microbiology* **36**, 2918-2925.
- Pinto,A.R., Puccia,R., Diniz,S.N., Franco,M.F. & Travassos,L.R. 2000. DNA-based vaccination against murine paracoccidioidomycosis using the gp43 gene from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Vaccine* **18**, 3050-3058.
- Pirkkala L, Nykanen P, Sistonen L. 2001. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J.* **15**(7):1118-31.
- Pitarch A, Sanchez M, Nombela C, Gil C. 2002. Sequential fractionation and two-dimensional gel analysis unravels the complexity of the dimorphic fungus *Candida albicans* cell wall proteome. *Mol Cell Proteomics.* **1**(12):967-82.
- Price,B.D. & Calderwood,S.K. 1991. Ca²⁺ Is Essential for multistep activation of the heat-shock factor in permeabilized cells. *Molecular and Cellular Biology* **11**, 3365-3368.
- Prip-Buus,C., Westerman,B., Schmitt,M., Langer,T., Neupert,W. & Schwarz,E. 1996. Role of the mitochondrial DnaJ homologue, Mdj1p, in the prevention of heat-induced protein aggregation. *FEBS Lett.* **380**, 142-146.
- Puccia,R. & Travassos,L.R. 1991. 43-Kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis* - Immunochemical reactions with sera from patients with Paracoccidioidomycosis, Histoplasmosis, Or Jorge Lobos Disease. *Journal of Clinical Microbiology* **29**, 1610-1615.
- Puccia,R. & Travassos,L.R. 1991. The 43-Kda glycoprotein from the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* and its deglycosylated form - excretion and susceptibility to proteolysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **289**, 298-302.
- Puccia,R., Carmona,A.K., Gesztesi,J.L., Juliano,L. & Travassos,L.R. 1998. Exocellular proteolytic activity of *Paracoccidioides brasiliensis*: cleavage of components associated with the basement membrane. *Medical Mycology* **36**, 345-348.
- Puccia,R., Juliano,M.A., Juliano,L., Travassos,L.R. & Carmona,A.K. 1999. Detection of the basement membrane-degrading proteolytic activity of *Paracoccidioides brasiliensis* after SDS-PAGE using agarose overlays containing Abz-MKALTLQ-EDDnp. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **32**, 645-649.
- Puccia,R., Schenkman,S. & Travassos,L.R. 1985. Specificity of Gp43, An exocellular component of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **18**, A609.
- Puccia,R., Takaoka,D.T. & Travassos,L.R. 1991. Purification of the 43 Kda glycoprotein from exocellular components excreted by *Paracoccidioides brasiliensis* in liquid culture (Tom Medium). *Journal of Medical and Veterinary Mycology* **29**, 57-60.
- Rappleye,C.A., Engle,J.T. & Goldman,W.E. 2004. RNA interference in *Histoplasma capsulatum* demonstrates a role for alpha-(1,3)-glucan in virulence. *Molecular Microbiology* **53**, 153-165.
- Restrepo,A. & Jimenez,B.E. 1980. Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture-medium. *Journal of Clinical Microbiology* **12**, 279-281.
- Restrepo,A., Baumgardner,D.J., Bagagli,E., Cooper,C.R., McGinnis,M.R., Lazera,M.S., Barbosa,F.H., Bosco,S.M.G., Camargo,Z.P.F., Coelho,K.I.R., Fortes,S.T., Franco,M., Montenegro,M.R.,

Sano,A. & Wanke,B. 2000. Clues to the presence of pathogenic fungi in certain environments. *Medical Mycology* **38**, 67-77.

Restrepo,A., Cano,L.E. & Ochoa,M.T. 1985. A yeast-derived antigen from *Paracoccidioides brasiliensis* useful for serologic testing. *Sabouraudia-Journal of Medical and Veterinary Mycology* **23**, 23-29.

Restrepo-Moreno, A. Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, eds. Paracoccydioidomycosis. London: Boca Raton, 1994. 121-130 p.

Ricci,G., Mota,F.T., Wakamatsu,A., Serafim,R.C., Borra,R.C. & Franco,M. 2004. Canine paracoccidioidomycosis. *Medical Mycology* **42**, 379-383.

Robertson GT, Kovach ME, Allen CA, Ficht TA, Roop RM 2nd. 2000. The *Brucella abortus* Lon functions as a generalized stress response protease and is required for wild-type virulence in BALB/c mice. *Mol Microbiol.* **35**(3):577-88.

Rodrigues,E.G. & Travassos,R. 1994. Nature of the reactive epitopes in *Paracoccidioides brasiliensis* polysaccharide antigen. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* **32**, 77-81.

Rodrigues,M.L., dos Reis,F.C.G., Puccia,R., Travassos,L.R. & Alviano,C.S. 2003. Cleavage of human fibronectin and other basement membrane-associated proteins by a *Cryptococcus neoformans* serine proteinase. *Microbial Pathogenesis* **34**, 65-71.

Rodrigues,M.L., Travassos,L.R., Miranda,K.R., Franzen,A.J., Rozental,S., de Souza,W., Alviano,C.S. & Barreto-Bergter,E. 2000. Human antibodies against a purified glucosylceramide from *Cryptococcus neoformans* inhibit cell budding and fungal growth. *Infect. Immun.* **68**, 7049-7060.

Rooney,P.J. & Klein,B.S. 2004. Sequence elements necessary for transcriptional activation of BAD1 in the yeast phase of *Blastomyces dermatitidis*. *Eukaryot. Cell* **3**, 785-794.

Rowley,N., Pripbuus,C., Westermann,B., Brown,C., Schwarz,E., Barrell,B. & Neupert,W. 1994. Mdj1P, A Novel Chaperone of the Dnaj Family, Is Involved in Mitochondrial Biogenesis and Protein-Folding. *Cell* **77**, 249-259.

Sakurai H, Fukasawa T. 2001. A novel domain of the yeast heat shock factor that regulates its activation function. *Biochem Biophys Res Commun.* **285**(3):696-701.

Salem-Izacc SM, Jesuino RS, Brito WA, Pereira M, Felipe MS, Soares CM. 1997. Protein synthesis patterns of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in stage-specific forms and during cellular differentiation. *J Med Vet Mycol.* **35**(3):205-11

Salina,M.A., Shikanai-Yasuda,M.A., Mendes,R.P., Barraviera,B. & Giannini,M.J.S.M. 1998. Detection of circulating *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in urine of paracoccidioidomycosis patients before and during treatment. *Journal of Clinical Microbiology* **36**, 1723-1728.

San Blas,G., Nino-Vega,G. & Iturriaga,T. 2002. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: Molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Medical Mycology* **40**, 225-242.

San Blas,G., Travassos,L.R., Fries,B.C., Goldman,D.L., Casadevall,A., Carmona,A.K., Barros,T.F., Puccia,R., Hostetter,M.K., Shanks,S.G., Copping,V.M.S., Knox,Y. & Gow,N.A.R. 2000. Fungal morphogenesis and virulence. *Medical Mycology* **38**, 79-86.

San-Blas G. 1985. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall glucans, pathogenicity, and dimorphism. *Curr Top Med Mycol.* **1**:235-57.

San-Blas G., San-Blas F. Biochemistry of *Paracoccidioides brasiliensis* dimorphism. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, eds. Paracoccydioidomycosis. London: Boca Raton, 1994. 49-63 p.

Sandhu,G.S., Aleff,R.A., Kline,B.C. & Lacaz,C.D.S. 1997. Molecular detection and identification of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Clinical Microbiology* **35**, 1894-1896.

Sanger F, Nickeln S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Proc Natl Acad Sci* **74**:5463-67

- Sano,A., Defaveri,J., Tanaka,R., Yokoyama,K., Kurita,N., Franco,M., Coelho,K.I.R., Bagagli,E., Montenegro,M.R., Miyaji,M. & Nishimura,K. 1998. Pathogenicities and GP43kDa gene of three *Paracoccidioides brasiliensis* isolates originated from a nine-banded armadillo (*Dasybus novemcinctus*). *Mycopathologia* **144**, 61-65.
- Sano,A., Tanaka,R., Yokoyama,K., Franco,M., Bagagli,E., Montenegro,M.R., Mikami,Y., Miyaji,M. & Nishimura,K. 1998. Comparison between human and armadillo *Paracoccidioides brasiliensis* isolates by random amplified polymorphic DNA analysis. *Mycopathologia* **143**, 165-169.
- Santoro N, Johansson N, Thiele DJ. 1998. Heat shock element architecture is an important determinant in the temperature and transactivation domain requirements for heat shock transcription factor. *Mol Cell Biol.* **18**(11):6340-52
- Savel'ev,A.S., Novikova,L.A., Kovaleva,I.E., Luzikov,V.N., Neupert,W. & Langer,T. 1998. ATP-dependent proteolysis in mitochondria. m-AAA protease and PIM1 protease exert overlapping substrate specificities and cooperate with the mtHsp70 system. *J Biol. Chem.* **273**, 20596-20602.
- Semighini,C.P., de Camargo,Z.P., Puccia,R., Goldman,M.H. & Goldman,G.H. 2002. Molecular identification of *Paracoccidioides brasiliensis* by 5' nuclease assay. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **44**, 383-386.
- Sghaier H, Le Ai TH, Horiike T, Shinozawa T. 2004. Molecular chaperones: proposal of a systematic computer-oriented nomenclature and construction of a centralized database. *In Silico Biol.* **4**(3):311-22.
- Sheffield,P., Garrard,S. & Derewenda,Z. 1999. Overcoming expression and purification problems of RhoGDI using a family of "parallel" expression vectors. *Protein Expr. Purif.* **15**, 34-39.
- Shi YY, Hong XG, Wang CC. 2005. The C-terminal (331-376) sequence of *Escherichia coli* DnaJ is essential for dimerization and chaperone activity: a small angle X-ray scattering study in solution. *J Biol Chem.* **280**(24):22761-8.
- Silva,S.P., Borges-Walmsley,M.I., Pereira,I.S., Soares,C.M., Walmsley,A.R. & Felipe,M.S. 1999. Differential expression of an hsp70 gene during transition from the mycelial to the infective yeast form of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mol. Microbiol.* **31**, 1039-1050.
- Singer-Vermes LM, Burger E, Franco MF, Di-Bacchi MM, Mendes-Giannini MJ, Calich VL. 1989. Evaluation of the pathogenicity and immunogenicity of seven *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible inbred mice. *J Med Vet Mycol.* **27**(2):71-82.
- Singh,B., Soltys,B.J., Wu,Z.C., Patel,H.V., Freeman,K.B. & Gupta,R.S. 1997. Cloning and some novel characteristics of mitochondrial Hsp70 from Chinese hamster cells. *Exp. Cell Res.* **234**, 205-216.
- Slater MR, Craig EA. 1987. Transcriptional regulation of an hsp70 heat shock gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **7**(5):1906-16.
- Soares, R.B.A., Gomez, F.J., Cunha-Passos, D.A., Bao, S.N., Soares, C.M.A., Deepe Jr, G.S. 2005. Vaccination with heat shock protein 60 induces T cell mediated response and is protective against experimental *Paracoccidioides brasiliensis* pulmonary infection. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 47 (Supl. 14), 41p.
- Soares,C.M.A., Madlun,E.E.W.I., Dasilva,S.P., Pereira,M. & Felipe,M.S.S. 1995. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates by random amplified polymorphic Dna analysis. *Journal of Clinical Microbiology* **33**, 505-507.
- Soares,R.B., Velho,T.A., De Moraes,L.M., Azevedo,M.O., Soares,C.M. & Felipe,M.S. 2005. Hygromycin B-resistance phenotype acquired in *Paracoccidioides brasiliensis* via plasmid DNA integration. *Med. Mycol.* **43**, 719-723.
- Soltys,B.J. & Gupta,R.S. 1996. Immunoelectron microscopic localization of the 60-kDa heat shock chaperonin protein (Hsp60) in mammalian cells. *Exp. Cell Res.* **222**, 16-27.
- Soltys,B.J. & Gupta,R.S. 2000. Mitochondrial proteins at unexpected cellular locations: export of proteins from mitochondria from an evolutionary perspective. *Int. Rev. Cytol.* **194**, 133-196.

- Souto, J.T., Figueiredo, F., Furlanetto, A., Pfeffer, K., Rossi, M.A. & Silva, J.S. 2000. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. *American Journal of Pathology* **156**, 1811-1820.
- Srikantha, T., Chandrasekhar, A. & Soll, D.R. 1995. Functional analysis of the promoter of the phase-specific WH11 gene of *Candida albicans*. *Mol. Cell Biol.* **15**, 1797-1805.
- Stahlberg H, Kutejova E, Suda K, Wolpensinger B, Lustig A, Schatz G, Engel A, Suzuki CK. 1999. Mitochondrial Lon of *Saccharomyces cerevisiae* is a ring-shaped protease with seven flexible subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**(12):6787-90.
- Stambuk, B.U., Puccia, R., Dealmeida, M.L.C., Travassos, L.R. & Schenkman, S. 1988. Secretion of the 43-Kda glycoprotein antigen by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* **26**, 367-373.
- Stein, I., Peleg, Y., Evenram, S. & Pines, O. 1994. The single translation product of the Fum1 gene (Fumarase) is processed in mitochondria before being distributed between the cytosol and mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **14**, 4770-4778.
- Stephen, D.W., Rivers, S.L. & Jamieson, D.J. 1995. The role of the YAP1 and YAP2 genes in the regulation of the adaptive oxidative stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* **16**, 415-423.
- Studier FW, Moffat BA. 1986. Use of T7 RNA polymerase to direct expression high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**:113-30.
- Suzuki C.K., Kutejova E., Suda K. 1995. Analysis and purification of ATP-dependent mitochondrial lon protease of *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* **260**:486-594.
- Suzuki, C.K., Suda, K., Wang, N. & Schatz, G. 1994. Requirement for the yeast gene LON in intramitochondrial proteolysis and maintenance of respiration. *Science* **264**, 891.
- Svidzinski TI, Miranda Neto MH, Santana RG, Fischman O, Colombo AL. 1999. *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from patients with acute and chronic disease exhibit morphological differences after animal passage. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* **41**(5):279-83.
- Svidzinsky, T.I.E. & Camargo, Z.P. 1995. Isoenzyme profile of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* **33**, 281-285.
- Syken J, De-Medina T, Munger K. 1999. TID1, a human homolog of the *Drosophila* tumor suppressor l(2)tid, encodes two mitochondrial modulators of apoptosis with opposing functions.
- Szabo, A., Korszun, R., Hartl, F.U. & Flanagan, J. 1996. A zinc finger-like domain of the molecular chaperone DnaJ is involved in binding to denatured protein substrates. *Embo Journal* **15**, 408-417.
- Taborda, C.P., Juliano, M.A., Puccia, R., Franco, M. & Travassos, L.R. 1998. Mapping of the T-cell epitope in the major 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th-1 response protective against fungal infection in BALB/c mice. *Infection and Immunity* **66**, 786-793.
- Tachibana, T., Astumi, S., Shioda, R., Ueno, M., Uritani, M. & Ushimaru, T. 2002. A novel non-conventional heat shock element regulates expression of MDJ1 encoding a DnaJ homolog in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol. Chem.* **277**, 22140-22146.
- Tang, W. & Wang, C.C. 2001. Zinc fingers and thiol-disulfide oxidoreductase activities of chaperone DnaJ. *Biochemistry* **40**, 14985-14994.
- Terada, K., Kanazawa, M., Bukau, B. & Mori, M. 1997. The human DnaJ homologue dj2 facilitates mitochondrial protein import and luciferase refolding. *Journal of Cell Biology* **139**, 1089-1095.
- Tosco, A., Gargano, S., Kobayashi, G.S. & Maresca, B. 1997. An AP1 element is involved in transcriptional regulation of delta9- desaturase gene of *Histoplasma capsulatum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **230**, 457-461.
- Travassos L.R., Immunochemistry of *Paracoccidioides brasiliensis* antigens. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, eds. Paracoccydioidomycosis. London: Boca Raton, 1994. 67-82 p.

- Travassos,L.R., Taborda,C.P., Iwai,L.K., Cunha-Neto,E. & Puccia,R. 2004. The gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis*: a major diagnostic antigen and vaccine candidate. In: ***Mycota XII, Human Fungal Pathogens*** (Ed. by J.E.DOMER & G.S.KOBAYASHI), pp. 279-296. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg.
- Trends Microbiol.* **14**(1):15-21.
- Truscott,K.N., Brandner,K. & Pfanner,N. 2003. Mechanisms of protein import into mitochondria. *Current Biology* **13**, R326-R337.
- Tyagi,S., Bratu,D.P. & Kramer,F.R. 1998. Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nat. Biotechnol.* **16**, 49-53.
- Urban,C., Xiong,X., Sohn,K., Schroppel,K., Brunner,H. & Rupp,S. 2005. The moonlighting protein Tsa1p is implicated in oxidative stress response and in cell wall biogenesis in *Candida albicans*. *Mol Microbiol.* **57**, 1318-1341.
- van Dyck,L. & Langer,T. 1999. ATP-dependent proteases controlling mitochondrial function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol Life Sci.* **56**, 825-842.
- van Dyck,L., Neupert,W. & Langer,T. 1998. The ATP-dependent PIM1 protease is required for the expression of intron-containing genes in mitochondria. *Genes Dev.* **12**, 1515-1524.
- van Dyck,L., Pearce,D.A. & Sherman,F. 1994. PIM1 encodes a mitochondrial ATP-dependent protease that is required for mitochondrial function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol. Chem.* **269**, 238-242.
- Vicentini,A.P., Gesztesi,J.L., Franco,M.F., Desouza,W., deMoraes,J.Z., Travassos,L.R. & Lopes,J.D. 1994. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein Gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infection and Immunity* **62**, 1465-1469.
- Voos,W. & Rottgers,K. 2002. Molecular chaperones as essential mediators of mitochondrial biogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1592**, 51-62.
- Wagner,I., Arlt,H., van Dyck,L., Langer,T. & Neupert,W. 1994. Molecular chaperones cooperate with PIM1 protease in the degradation of misfolded proteins in mitochondria. *EMBO J* **13**, 5135-5145.
- Walsh,P., Bursac,D., Law,Y.C., Cyr,D. & Lithgow,T. 2004. The J-protein family: modulating protein assembly, disassembly and translocation. *EMBO Rep.* **5**, 567-571.
- Walter,S. & Buchner,J. 2002. Molecular chaperones - Cellular machines for protein folding. *Angewandte Chemie-International Edition* **41**, 1098-1113.
- Waltner,M. & Weiner,H. 1995. Conversion of a nonprocessed mitochondrial precursor protein into one that is processed by the mitochondrial processing peptidase. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 26311-26317.
- Wang N, Gottesman S, Willingham MC, Gottesman MM, Maurizi M. 1993. A human mitochondrial ATP-dependent protease that is highly homologous to bacterial Lon protease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**(23):11247-51.
- Wanke B, Londero A.T. Epidemiology and Paracoccidioidomycosis infection. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, eds. Paracoccidioidomycosis. London: Boca Raton, 1994. 109-120 p.
- Westermann,B. & Neupert,W. 1997. Mdj2p, a novel DnaJ homolog in the mitochondrial inner membrane of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular Biology* **272**, 477-483.
- White DL, Mazurkiewicz JE, Barnett RJ. 1979. A chemical mechanism for tissue staining by osmium tetroxide-ferrocyanide mixtures. *J Histochem Cytochem.* **27**(7):1084-91.
- Woods,J.P. & Goldman,W.E. 1992. In vivo generation of linear plasmids with addition of telomeric sequences by *Histoplasma capsulatum*. *Molecular Microbiology* **6**, 3603-3610.
- Woods,J.P., Heinecke,E.L. & Goldman,W.E. 1998. Electrotransformation and expression of bacterial genes encoding hygromycin phosphotransferase and beta-galactosidase in the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*. *Infection and Immunity* **66**, 1697-1707.

Wright,R., Basson,M., D'Ari,L. & Rine,J. 1988. Increased amounts of HMG-CoA reductase induce "karmellae": a proliferation of stacked membrane pairs surrounding the yeast nucleus. *J Cell Biol.* **107**, 101-114.

Wu,A.L. & Moye-Rowley,W.S. 1994. GSH1, which encodes gamma-glutamylcysteine synthetase, is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Mol Cell Biol.* **14**, 5832-5839.

Xiao,H. & Lis,J.T. 1988. Germline transformation used to define key features of heat-shock response elements. *Science* **239**, 1139-1142.

Yamamoto,A., Mizukami,Y. & Sakurai,H. 2005. Identification of a novel class of target genes and a novel type of binding sequence of heat shock transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol. Chem.* **280**, 11911-11919.

Young D, Lathigra R, Hendrix R, Sweetser D,Young RA. 1988. Stress prpteinss are targets in leprosy and tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 4267-70.

Zacharias,D., Ueda,A., Moscardibacchi,M., Franco,M. & Sanblas,G. 1986. A comparative histopathological, immunological, and biochemical-study of experimental intravenous Paracoccidioidomycosis induced in mice by 3 *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* **24**, 445-454.

8. ABSTRACT

8. ABSTRACT

Paracoccidioides brasiliensis is the dimorphic fungus responsible for paracoccidioidomycosis in man, who is infected by inhalation of conidia. The cellular differentiation of *P. brasiliensis* from mycelium (M) to yeast (Y) in the lungs is essential for infection to occur. J-domain (DnaJ) proteins, of the Hsp40 family, are essential cofactors of their cognate Hsp70 chaperones, besides acting as independent chaperones. In the present study, we have cloned and sequenced the heat shock gene PbMDJ1, which encodes an Mdj1 homologue that is a mitochondrial DnaJ in yeasts. The gene sequence consists of an ORF of 1719bp interrupted by three introns and translates 551 amino acid residues. PbMdj1 is organized in modules consisting of a J domain, followed by a glycine/phenylalanine-rich segment and four CXXCXGXG (zinc finger) domains. The C-terminal is not conserved. We expressed a His-tagged N-terminal region of PbMdj1 and used the recombinant protein to immunize rabbits to obtain anti-PbMdj1r serum. Immune-localization was performed using confocal and electron microscopy, and also flow cytometry.

We demonstrated the presence of PbMdj1 not only in the mitochondria, where it is apparently sorted, but also in the cell wall of *P. brasiliensis*. Labeling was abundant throughout the cell wall and especially in the budding regions; however, anti-PbMdj1r did not affect fungal growth in the concentrations tested in vitro, possibly due to the poor access of the antibodies to their target in growing cells. Labeled mitochondria stood preferentially close to the plasma membrane and gold particles were detected in the thin space between them, towards the cell surface. The anti-rPbMdj1 antibodies used in the reactions specifically recognized a single 55 kDa mitochondrial and cell wall (alkaline β -mercaptoethanol extract) component, compatible with the predicted size of the protein devoid of its matrix peptide-targeting signal. This is the first time a DnaJ member has been observed on the cell surface, where its function is speculative.

In the present work we show that Mdj1 and the mitochondrial proteinase Lon homologues are heat shock proteins in the *P. brasiliensis* and that their gene organization is conserved among thermomorphic fungi and *Aspergillus*, where the genes are adjacent and have a common 5' region. We mapped and validated transcription elements in the 5'-shared intergenic (ML) region of MDJ1/LON from *P. brasiliensis* using both DNase I protection footprinting and mobility shift assays. Three of them were similar to canonical and non-conventional heat shock elements and one is a putative AP-1 binding domain (ARE), related to oxidative stress. Similar motifs were detected in the correspondent locus of *B. dermatitidis* and *H. capsulatum*. Our studies compared *P. brasiliensis* Pb18 with genetically distinct Pb3, where the ML region is polymorphic outside mapped motifs. In these isolates, different

numbers of elements were detected and the pattern of mRNA accumulation of the genes was distinct during phase transition. In Pb18, *PbMDJ1* was preferentially expressed in the yeast phase. This is the first study of transcription elements in *P. brasiliensis* that might help to understand regulation of stress-related genes involved in fungal adaptation to the host.

Lista de trabalhos publicados

Autor

1 - Batista WL, Matsuo AL, Ganiko L, Barros TF, Veiga TR, Freymuller E, Puccia R. The PbMDJ1 gene belongs to a conserved *MDJ1/LON* locus in thermotolerant pathogenic fungi and encodes a heat shock protein that localizes to both the mitochondria and cell wall of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Eukaryot Cell*. 2006; 5(2):379-90.

2 - Batista WL, Barros TF, Goldman GH, Morais FV, Puccia R. Identification of transcription elements in the 5' intergenic region shared by *LON* and *MDJ1* heat shock genes from the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. Evaluation of gene expression. *Fungal Genetics and Biology* (**submetido**).

Co-autor

3 - Nunes LR, Costa de Oliveira R, Leite DB, da Silva VS, dos Reis Marques E, da Silva Ferreira ME, Ribeiro DC, de Souza Bernardes LA, Goldman MH, Puccia R, Travassos LR, Batista WL, Nobrega MP, Nobrega FG, Yang DY, de Braganca Pereira CA, Goldman GH. Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. *Eukaryot Cell*. 2005; 4(12):2115-28.

4 - Carvalho KC, Ganiko L, Batista WL, Morais FV, Marques ER, Goldman GH, Franco MF, Puccia R. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* and gp43 expression in isolates bearing known PbGP43 genotype. *Microbes Infect*. 2005 7(1):55-65.

5 - Marques ER, Ferreira ME, Drummond RD, Felix JM, Menossi M, Savoldi M, Travassos LR, Puccia R, Batista WL, Carvalho KC, Goldman MH, Goldman GH. Identification of genes preferentially expressed in the pathogenic yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis*, using suppression subtraction hybridization and differential macroarray analysis. *Mol Genet Genomics*. 2004; 271(6):667-77.

6 - Goldman GH, dos Reis Marques E, Duarte Ribeiro DC, de Souza Bernardes LA, Quiapin AC, Vitorelli PM, Savoldi M, Semighini CP, de Oliveira RC, Nunes LR, Travassos LR, Puccia R, Batista WL, Ferreira LE, Moreira JC, Bogossian AP, Tekaiia F, Nobrega MP, Nobrega FG, Goldman MH. Expressed sequence tag analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence and pathogenicity genes. *Eukaryot Cell*. 2003; 2(1):34-48.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)