

**Antônio Augusto Rocha**

**Mapeamento de sítios envolvidos na transcrição do gene PbGP43 de *Paracoccidioides brasiliensis*, com ênfase na participação de motivos NIT2 na regulação gênica.**

**Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências**

**São Paulo  
2008**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**Antônio Augusto Rocha**

**Mapeamento de sítios envolvidos na transcrição do gene  
PbGP43 de *Paracoccidioides brasiliensis*, com ênfase na  
participação de motivos NIT2 na regulação gênica**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosana Puccia**

**Tese apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo para obtenção  
do Título de Doutor em Ciências**

**São Paulo  
2008**

## Ficha catalográfica

Rocha, Antônio Augusto

**Mapeamento de sítios envolvidos na transcrição do gene PbGP43 de *Paracoccidioides brasiliensis*, com ênfase na participação de motivos NIT2 na regulação gênica.** / Antônio Augusto Rocha – São Paulo, 2008.

**xvi, 162 f.**

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

Titulo em inglês: Mapping of sites involved in the transcription of the PbGP43 gene from *Paracoccidioides brasiliensis* with emphasis in the involvement of NIT2 motifs in gene regulation.

1. *Paracoccidioides brasiliensis*. 2. gp43. 3. regulação gênica. 4. nitrogênio.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E  
PARASITOLOGIA**

# **DICCIPLINA DE BIOLOGIA CELULAR**

**Chefe de Departamento:**

**Prof. Dr. José Daniel Lopes**

**Coordenador do Curso de Pós-graduação:**

**Prof. Dr. Renato Arruda Mortara**

*“Para que o mal triunfe, basta que os homens de bem não façam nada.”*

-Edmund Burke-

*Deus*

*Muito obrigado pela força, paciência e perseverança;  
Muito obrigado por tudo que vivi e aprendi;  
Muito obrigado por todas as dificuldades que passei;  
Muito obrigado por tudo que me foi dado no momento certo;  
Muito obrigado pelas pessoas que conheci;  
Por fim, muito obrigado por compreender o “porque”.*

*“E ele disse-lhes: Por que temeis, homens de pouca fé? Então, levantando-se, repreendeu os ventos e o mar, e seguiu-se uma grande bonança.”*

*Mateus 8:26*

V

***Aos meus pais Antônio e Genis (queria que vocês estivessem aqui!).  
Às minhas irmãs Adriela e Isabela.  
À minha esposa Kátia.***

***Ao meu “fiotinho” Gabriel, a luz mais brilhante na pior escuridão.***

vi  
**AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora **Rosana Puccia** pela oportunidade de trabalhar em um laboratório completo e de qualidade. Muito obrigado por sempre ter fornecido todo o material necessário para o desenvolvimento de minha pesquisa.

Ao **Prof. Travassos** e **Prof. Sérgio Schenkman**, pelas dicas valiosas.

Ao **Prof. João Bosco Pesqueiro**, pelo uso do aparelho de PCR em tempo real.

Ao **Prof. Gustavo H. Goldman** e ao **Dr. Iran Malavazi**, pela parceria nos experimentos de transformação do *Aspergillus* feitos neste trabalho.

Ao **Rodrigo** (“Rodrigão”), pelas conversas e pelo apoio.

Ao **Luiz Severino** (“Luizão”), por sempre me ajudar em todas as vezes que pedi.

Aos colegas de laboratório: **Luciane, Wagner, Thiago, Milene, Larissa, Alisson e Paloma**. Muito obrigado.

À toda “galera” da Disciplina de Biologia Celular: **Cristiane, Geisa, Rafael, Tereza, Sheila, Mococa (até hoje não sei seu nome!), Cláudio, Alberto, Bianca, Thaysa, Luiz, Filipe, Fabi, Andrey** e a todos que de um jeito ou de outro sempre deram uma mão.

À **Marcia Martins** e ao **Marcelo** pelas conversas sempre agradáveis e por sempre tirarem minhas dúvidas quanto ao funcionamento da máquina de FAX.

À **Maria**, “seu” **Américo, Claudeci e Rose** os funcionários da Disciplina de Biologia Celular: muito obrigado por tudo!

vii

À minha **família**, principalmente, minhas irmãs **Adriela e Isabela**, meus cunhados **Paulo e Rômulo**, minhas sobrinhas **Rafaela, Genis e Isadora**, minha

tia **Ana Maria** (minha gratidão eterna!), minha prima **Tânia** e meu primo **Paulinho**, minha esposa **Kátia** e meu “fioti” **Gabriel**. Amo muito todos vocês!!

À **FAPESP** – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – que financiou este trabalho.

viii

## **ABREVIATURAS**

Amp	ampicilina
APS	persulfato de amônio

ATP	adenosina-trifosfato
pb	pares de base
cDNA	DNA complementar
cpm	contagem por minuto
D.O.	densidade óptica
dATP	desoxiadenosina-trifosfato
dCTP	desoxicitidina-trifosfato
dGTP	desoxiguanosina-trifosfato
dTTP	desoxitimidina-trifosfato
ddATP	di-deoxiadenina-trifosfato
ddCTP	di-deoxicitidina-trifosfato
ddGTP	di-deoxiguanosina-trifosfato
ddTTP	di-deoxitimidina-trifosfato
DNase	desoxiribonuclease
dNTP	desoxiribonucleosídeo-trifosfato
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
IPTG	isopropil-tio-galactopiranosídeo
mRNA	RNA mensageiro
nt	nucleotídeo
ORF	fase aberta de leitura
PCM	paracoccidioidomicose
PCR	reação de polimerização em cadeia
PMSF	fluoreto de fenilmetanosulfonato
RNA	ácido ribonucleico
RNase	ribonuclease
RP	região promotora
rpm	rotações por minuto
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS
SSC	tampão salina citrato de sódio
TBE	tampão tris-borato-EDTA
TE	tampão tris-EDTA
TEMED	N,N,N,N'-tretametilenodiamina
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
U	Unidade enzimática

ix

UTR	Região não-traduzida
UV	Ultravioleta
V	Volts
W	Watts

ONPG	o-nitrofenil $\beta$ -D-galactopiranosídeo
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo

x  
**ÍNDICE**

Dedicatória	vi
Agradecimentos	vii

Abreviaturas	ix
Resumo	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A paracoccidiodomicose e seu agente etiológico	18
1.2. Paracoccidiodomicose humana	24
1.3. A gp43 do <i>P. brasiliensis</i>	27
1.4. Polimorfismo no gene PbGP43	31
1.5. Exoglucanases fúngicas e sua regulação	32
2. OBJETIVOS	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1. Soluções	41
3.2. Meios de cultura	44
3.2.1. Meios para cultivo de bactérias	44
3.2.1.1. Meio LB	44
3.2.1.2. Meio LB amp/kan	44
3.2.2. Meios para cultivo de <i>P. brasiliensis</i>	44
3.2.2.1. Meio de YPD modificado	44
3.2.2.2. Meio F12	44
3.2.3. Meios para cultivo de <i>A. nidulans</i>	44
3.2.3.1. Meio mínimo	44
3.2.3.2. Meio completo	45
3.3. Isolados fúngicos	45
3.4. Amplificação por PCR	46
3.5. Clonagem dos fragmentos de PCR	46
3.6. Digestão de DNA com enzimas de restrição	47
3.7. Preparação de plasmídeos	47
3.7.1. Mini preparação por fervura	47
3.7.2. Mini preparação por lise alcalina	48
3.8. Obtenção do extrato proteico total da fase leveduriforme de <i>P. brasiliensis</i>	48
3.9. Ensaio de “DNase I footprinting”	49
3.10. Ensaio de EMSA (“electrophoretic mobility shift assay”)	51

3.11. Extração de DNA de <i>P. brasiliensis</i>	52
3.12. “Southern blot”	53
3.13. Ensaio de PCR para a clonagem da região 5’ intergênica do PbGP43	53
3.13.1. PCR inverso	53
3.13.2. PCR usando os oligonucleotídeos GPI	55
3.14. Sequenciamento automático de DNA	55
3.15. Sequenciamento manual de DNA	55
3.16. Curvas de crescimento de células leveduriformes de <i>P. brasiliensis</i> e induções	57
3.17. Extração de RNA total em pequena escala de células leveduriformes de <i>P. brasiliensis</i>	58
3.18. Síntese da fita de DNA complementar a partir do RNA total	59
3.19. Ensaio de RT PCR em tempo real	59
3.20. Análise estatística	60
3.21. Construção do cassete pANGP1-3:: $\beta$ -galactosidase	60
3.22. Transformação de <i>A. nidulans</i> com o cassete pANGP1-3:: $\beta$ -galactosidase	61
3.23. Isolamento de transformantes	62
3.24. Ensaio para avaliar a atividade da $\beta$ -galactosidase	62
3.24.1. Cor das colônias	62
3.24.2. Extração de proteínas	62
3.24.3. Dosagem proteica	62
3.25. Extração de DNA genômico de <i>A. nidulans</i>	62
3.26. Cepas bacterianas e preparo de células competentes	63
3.27. Oligonucleotídeos	65
3.28. SDS-PAGE	67
3.29. Colunas de afinidade para a purificação de proteínas ligantes de DNA	67
3.30. Detecção de gp43 no sobrenadante de cultura de células leveduriformes de <i>P. brasiliensis</i> estimuladas com sulfato de amônio (10 mM)	69

4. RESULTADOS	72
4.1. Mapeamento de elementos de transcrição da região 5' intergênica proximal (-1 a -326) do PbGP43 por “DNase I footprinting” e “Eletrophoretic Mobility Shift Assay” (EMSA)	72
4.2. Clonagem de um fragmento de 1.8 Kb correspondente a região 5' intergênica do gene PbGP43 do isolado Pb339	80
4.3. Análise do fragmento de 1,8 kb correspondente a região 5' intergênica do gene PbGP43 do isolado Pb339	88
4.4. Mapeamento de elementos de transcrição na região 5' intergênica distal (-327 a -2047) do PbGP43 por “Eletrophoretic Mobility Shift Assay” (EMSA)	90
4.5. Análise dos nucleotídeos contendo o núcleo GATA do elemento NIT2	93
4.6. Efeito das fontes de nitrogênio sobre a transcrição do PbGP43	96
4.7. Detecção de um fator AreA-like (NIT2-like) e de uma proteína NMR-like no genoma do isolado Pb3	99
4.8. Ensaio de EMSA com oligonucleotídeos contendo mutação pontual	103
4.9. Análise dos elementos NIT2 presentes na região 5' intergênica do PbGP43 e em seus homólogos	103
4.10. Purificação da proteína ligante de N7 e N4 em de colunas de afinidade	106
4.11. Construções e ensaios para gene repórter em <i>A. nidulans</i>	106
4.12. Efeito da adição de sulfato de amônio na expressão de gp43	111
4.13. Análise comparativa da região 5' intergênica do gene PbGP43 em diversos isolados de <i>P. brasiliensis</i>	113
4.14. Análise comparativa da região 5' intergênica dos genes homólogos ao PbGP43 de outros fungos	121
4.15. Transcrição do PbGP43 durante o crescimento de <i>P. brasiliensis</i> em meio definido	125
4.16. Efeito do soro fetal bovino (SFB) sobre a transcrição do PbGP43	127
4.17. Efeito das fontes de carbono sobre a transcrição do PbGP43	127

5. DISCUSSÃO	135
6. CONCLUSÕES	150
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	153
8. ABSTRACT	167
9. ANEXOS	169

xiv  
**RESUMO**

O presente trabalho mostra o envolvimento de motivos de ligação do tipo NIT2 na modulação da transcrição do gene *PbGP43*, que codifica um importante

antígeno do patógeno humano *Paracoccidioides brasiliensis*. Esta investigação foi motivada pela descoberta de um elevado número de motivos do tipo GATA (ou TATC) dentro dos 2047 pb da região 5' intergênica do PbGP43 do isolado Pb339, presentemente clonado e sequenciado neste trabalho. Este fragmento de 2047 pb contém 23 sítios NIT2, que formam 4 "clusters" putativos, dois deles idênticos. Nossa análise foi baseada em ensaios de EMSA ("electrophoretic mobility shift assay") usando sondas selecionadas e ensaios de PCR em tempo real do gene PbGP43 de culturas de *P. brasiliensis* expostas a, ou depletadas, de sulfato de amônio e glutamina. Os resultados sugerem que pelo menos alguns motivos NIT2 podem ser funcionais e que o PbGP43 é modulado por fontes primárias de nitrogênio. Nós mapeamos 4 oligonucleotídeos contendo motivos TATC que formaram complexos DNA-proteína possivelmente envolvendo um fator NIT2. Esta afirmação é baseada nas seguintes observações: i) eles formaram bandas de maior intensidade nos ensaios de EMSA com extrato de células que cresceram na ausência de sulfato de amônio; ii) uma mutação pontual no núcleo TATC (para GATC) diminuiu a intensidade das bandas formadas e iii) todos os complexos migraram de forma semelhante. Tanto sulfato de amônio quanto glutamina provocaram diminuição no acúmulo de mRNA do PbGP43, sendo que o efeito pôde ser revertido quando o sal foi retirado do meio. Esta modulação foi vista não só em Pb339, mas também nos isolados Pb3 e Pb18. Os oligonucleotídeos usados para iniciar a reação para amplificação dos 2047 pb da região 5' intergênica do PbGP43 usando DNA do isolado Pb339 também amplificaram um fragmento de tamanho similar usando DNA do Pb18 e de seis outros isolados. Para os isolados Pb2, Pb3, Pb4 e Pb5 os amplicons foram de ~1500 pb e para Pb9 e Pb17 foi de ~3000 pb. No Pb18, esta sequência é 98% idêntica à de Pb339. No Pb3, além do amplicom de menor tamanho, o número de motivos NIT2 e "clusters" é menor. Ensaio de gene repórter conduzidos em *A. nidulans* mostraram que os primeiros 480 pb da região 5' intergênica não só foram responsáveis pela transcrição do gene, mas também continham os elementos necessários para a regulação negativa na presença de sulfato de amônio como fonte de nitrogênio. Além de terem sido testadas fontes de nitrogênio na modulação do PbGP43, o efeito da adição de glicose e soro fetal bovino também foi analisado. Nas condições testadas, o aumento de glicose de 0,18 para 1,5%

levou a uma queda no acúmulo de mRNA do gene, no entanto, o contrário foi visto quando a concentração do açúcar subiu de 1,5 para 3%. Para o soro fetal bovino, não houve alteração significativa. Por fim, o mapeamento de elementos de transcrição da região proximal ao ATG (-1 a -326 pb) pelas técnicas de DNase I footprinting e EMSA levaram à identificação de três regiões de proteção localizadas entre os nucleotídeos -216 e -260 da região promotora proximal. Este é o primeiro relato de modulação por fontes de nitrogênio primárias do gene *PbGP43*.

Xvi

## **I. INTRODUÇÃO**

### **1.1. *A paracoccidioidomicose e seu agente etiológico***

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença crônica e aguda, de natureza granulomatosa. É endêmica em países da América Latina, desde o México (23° N) até a Argentina (34° S), com prevalência em países da América do Sul (revisão em Restrepo et al., 2001). Não existem relatos da doença nas Guianas, Nicarágua e Chile, sendo que a maioria dos casos ocorre no Brasil onde a taxa de incidência anual é de 10-30 pacientes por milhão de habitantes e a taxa de mortalidade anual é 1,4 indivíduo por milhão de habitantes (Restrepo, 2003). Os termos “patologia importada” ou “patologia exótica” referem-se aos casos de PCM diagnosticados nos Estados Unidos, Ásia e Europa entre indivíduos que moraram ou permaneceram por algum tempo em regiões endêmicas (revisão em Brummer et al., 1993 e Lacaz et al., 1994b). Dados estatísticos indicam que cerca de 10 milhões de pessoas que vivem em regiões endêmicas já entraram em contato com o fungo (revisão em San-Blas et al., 2002). Entre 1980 e 1995, a PCM destacou-se como a 8ª causa de mortalidade por doenças infecciosas e parasitárias de caráter crônico e apresentou a mais elevada taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas no Brasil (Coutinho et al., 2002). Vale salientar que a PCM acomete parcelas da população com menores condições de acesso ao atendimento médico (Marques, 2003).

A PCM teve várias denominações ao longo do tempo. Foi chamada de blastomicose brasileira, blastomicose sul-americana, granuloma paracoccidióico, adenomicose, doença de Lutz e doença de Lutz-Splendore-Almeida. O termo paracoccidioidomicose foi oficializado em 1971, em um Simpósio realizado em Medellín, na Colômbia (revisão em Lacaz, 1994a).

O agente etiológico da PCM é o fungo dimórfico térmico *Paracoccidioides brasiliensis*. Este microrganismo foi descrito pela primeira vez em 1908 por Adolpho Lutz (Lutz, 1908) e estudado por Alfonso Splendore, que o chamou de *Zymonema brasiliense*. Em 1930, Floriano Paulo de Almeida oficializou o nome *Paracoccidioides brasiliensis* (Almeida, 1930), que é atualmente classificado como um Eucarioto do reino Fungi, filo Eumycota, subfilo Deuteromicotina, classe Hyphomycetes, ordem Moniliales, família Moniliaceae, gênero *Paracoccidioides* e espécie *brasiliensis* (Lacaz, 2002).

O hábitat do *P. brasiliensis* ainda não foi determinado (revisão em Restrepo et al., 2001). Borelli (1972) criou o termo "reservárea" para indicar o seu habitat

natural, ou seja, o local onde o indivíduo pode infectar-se com o fungo. Essas regiões normalmente estão sob a influência de um clima tropical, apresentando verão quente e úmido, com inverno frio e seco. As “reserváreas” ficam frequentemente em lugares elevados, próximos a rios e a outros cursos de água. A mais importante condição climática para o crescimento do *P. brasiliensis* parece ser a temperatura, que varia entre 18 °C e 24 °C (revisão em Restrepo-Moreno, 1994). Com base no diagnóstico da PCM em residentes locais, 14 “reserváreas” foram identificadas no Brasil, as quais estão localizadas à margem de rios, colinas com altitude entre 52 e 950 metros acima do nível do mar e em áreas com vegetação estendendo-se desde florestas tropicais até savanas. Uma destas “reserváreas” é a Suruí e está localizada no estado de Rondônia, região que engloba a Amazônia brasileira (Wanke e Londero, 1994).

Coutinho et al. (2002) apresentaram dados referentes à mortalidade provocada pela PCM em regiões brasileiras entre os anos 1980 e 1995. As maiores taxas de mortalidade por ano ocorreram na região Sudeste e Sul, especificamente em São Paulo (59,38), Minas Gerais (24,9), Paraná (28,9) e Rio Grande do Sul (17,50). Todavia, foram observados dados referentes às outras regiões como Norte, Nordeste e Centro-Oeste, nas quais os estados mais afetados foram Rondônia (3,19 mortes por ano), Pará (3,13), Bahia (3,69), Maranhão (1,38), Mato Grosso do Sul (7,19) e Goiás (6,19). Esses resultados mostram que a doença está sendo encontrada tanto em locais com clima quente e úmido, como frio e seco, os quais apresentam os mais variados tipos de vegetação.

O isolamento do *P. brasiliensis* do solo ou vegetais tem sido raro e geralmente o seu re-isolamento de uma mesma região, porém em épocas diferentes, não foi possível (revisões em Franco et al., 2000 e Restrepo et al., 2001). O primeiro isolamento do fungo do solo ocorreu em 1963, no Recife (Shome et al., 1963), seguido de outros na Argentina (Negroni, 1966), Venezuela (Albornoz, 1971) e Minas Gerais (Silva-Vergara et al., 1998).

Em relação a animais naturalmente infectados, os relatos mais consistentes constam do isolamento do fungo de órgãos de tatus *Dasypus novemcinctus* vivendo em regiões do Brasil como a Amazônia (Naiff et al., 1986), Botucatu/SP (Bagagli et al., 1998), Ibiá/MG (Silva Vergara et al., 2000) e Serra da

Mesa/ES (Macedo et al., 1999). Tatus contaminados com *P. brasiliensis* foram também encontrados em Manizales, na Colômbia (Corredor et al., 1999). Até o momento, entretanto, não houve o isolamento do fungo a partir de solo localizado próximo às tocas de tatus (Bagagli et al., 1998; revisão em Restrepo et al., 2001).

O *P. brasiliensis* é um fungo dimórfico termo-dependente que se apresenta nas formas de micélio quando em saprofitismo ou cultivado a 26 °C, ou de levedura, em tecidos infectados ou quando cultivado a 37 °C (revisão em San-Blas et al., 2002). Até o momento, apenas a forma assexuada ou imperfeita do organismo foi descrita, justificando sua classificação anterior como Deuteromiceto (Lacaz, 1994a).

A manipulação genética nessa espécie iniciou-se apenas recentemente pelos grupos que o estudam (Soares et al., 2005; Leal et al., 2004; Almeida et al., 2007). A transformação do *P. brasiliensis*, via *Agrobacterium tumefaciens*, feita por Almeida et al. (2007) foi o relato mais bem sucedido onde os autores avaliaram alguns parâmetros como: condições de co-cultivo, diferentes promotores e susceptibilidade da célula hospedeira. Os autores também apresentaram evidência de que as construções se integraram de forma randômica e simples (cópia única) por núcleo haplóide. Soares et al. (2005) transformaram as células leveduriformes do fungo via eletroporação com plasmídeo aberto ou linearizado carregando o gene para resistência a higromicina B. Leal et al. (2004) transformaram as células leveduriformes via *A. tumefaciens*, também com um plasmídeo carregando o gene de resistência a higromicina.

Almeida et al. (2006) avaliaram o tamanho e a ploidia do genoma de *P. brasiliensis*. A análise do ciclo celular por citometria de fluxo de 10 isolados revelou um genoma variando de 26,3 a 35,5 Mb por célula leveduriforme uninucleada. A ploidia dos mesmos isolados foi determinada em células uninucleadas por comparação do tamanho do genoma com a média do tamanho do genoma haplóide obtido por cariotipagem eletroforética. Os resultados mostraram que todos os isolados apresentaram um conteúdo de DNA haplóide, ou pelo menos aneuplóide (Almeida et al., 2007).

A forma miceliana infectante do *P. brasiliensis* cresce lentamente em meio de cultura. Microscopicamente, as hifas não apresentam nenhuma característica incomum: são delgadas, hialinas, multinucleadas, septadas e ramificadas.

Clamidoconídeos intercalares e terminais de 5 a 20  $\mu\text{m}$  de diâmetro podem ser encontrados nas hifas entre uma e 4 semanas de cultivo. Essas estruturas são arredondadas e provavelmente constituem a forma de transição entre as formas de micélio e levedura do fungo (Lacaz et al., 1991). Na fase leveduriforme, o fungo tem uma forma esférica, oval, alongada ou piriforme com múltiplos brotamentos (revisão em Lacaz, 1994b). A célula mãe mede de 4 a 50  $\mu\text{m}$  e é multinucleada, porém os brotos inicialmente parecem possuir um só núcleo (Feitosa et al., 2003; Montoya et al., 1999). Apesar de menos comuns, células com brotamento único ou em cadeias de blastoconídeos também podem ocorrer (Brummer et al., 1993). As leveduras apresentam uma parede celular densa e multilamelar refrátil, além de múltiplos vacúolos, gotas de lipídeos e um grande número de mitocôndrias no citoplasma (Kashino et al., 1987).

O processo de transição da fase de micélio para a de levedura resulta em uma série de alterações celulares, sendo que a da estrutura da parede é a mais conhecida. A parede celular do *P. brasiliensis* é composta predominantemente de polissacarídeos do tipo quitinas e glucanas, que perfazem aproximadamente 80% do seu peso seco. Sabe-se que a quitina é três vezes mais abundante na fase leveduriforme, que abriga 95% de  $\alpha$ -1,3-glucana e 5% de  $\beta$ -1,3-glucana. A fase de micélio expressa glucanas apenas do tipo  $\beta$ -1,3-ligadas (revisão em San-Blas e San-Blas, 2000).

Isolados submetidos a vários subcultivos apresentaram concomitantemente menor quantidade de  $\alpha$ -1-3-glucana e menor virulência, mas após passagem em animal, ambas foram recuperadas, o que sugeriu um papel do polissacarídeo na patogenicidade fúngica (revisão em San-Blas e San-Blas, 1994). Entretanto, já foi descrita virulência em isolados desprovidos de  $\alpha$ -1-3-glucana (revisão em San-Blas e San-Blas, 2000). Silva et al. (1985 e 1994) evidenciaram o papel da  $\beta$ -1,3-glucana como um potente imunomodulador na PCM. Nesse contexto, a  $\beta$ -1,3-glucana seria um candidato direto a fator de virulência, enquanto que a  $\alpha$ -1,3-glucana exerceria um papel indireto, camuflando de certo modo a primeira. A fração da parede celular insolúvel em álcali (contendo quitina e  $\beta$ -1,3-glucana) extraída de isolados menos patogênicos foi melhor indutora de TNF sérico quando comparada com extrato semelhante de isolados mais virulentos. A

diferença entre essas preparações era o conteúdo de  $\beta$ -1,3-glucana (Figueiredo et al., 1993). Posteriormente, foi observado que esse polímero era capaz de favorecer uma resposta terapêutica quando injetado em pacientes com PCM grave (Meira et al., 1996). Na fase leveduriforme de *Histoplasma capsulatum*, as  $\alpha$ -1,3-glucanas, localizadas na camada mais externa na parede, bloqueiam a ligação das  $\beta$ -glucanas a seu principal receptor (dectina-1) localizado na parede dos macrófagos provocando uma redução da eficácia do sistema imune através da não ativação dos macrófagos (Rappleye et al., 2007).

O trabalho de Silva et al. (2006) mostrou que a melanina também pode ser considerada um possível fator de virulência em *P. brasiliensis*, visto que as células fúngicas com melanina foram menos fagocitadas, mais resistentes a atividade antifúngica dos macrófagos e menos susceptíveis a diversos tipos de drogas antifúngicas.

Atualmente estão disponíveis dois bancos de sequências expressas (ESTs) pelo *P. brasiliensis*. O primeiro reúne os resultados do projeto desenvolvido por Felipe e colaboradores da região Centro-Oeste brasileira, no qual foi analisado o isolado Pb01 nas fases miceliana e leveduriforme. O trabalho preliminar (Felipe et al., 2003) descreve a obtenção de 2.160 genes, porém o grupo conhece atualmente 6.102 genes, os quais representam possivelmente 80% do repertório de genes do fungo (Felipe et al., 2005). O segundo banco genômico contém as sequências obtidas pelo grupo paulista, liderado por Goldman e colaboradores (2003). Esse trabalho analisou o isolado Pb18 na fase leveduriforme, recém-isolada de órgão de camundongo, e identificou um total de 4.692 genes. Esses dados possibilitaram a realização de um trabalho que selecionou genes expressos preferencialmente na fase leveduriforme do fungo por SSH (“suppression subtraction hybridization”) e “macroarrays” (Marques et al., 2004). Foram identificados 20 genes altamente expressos em leveduras, entre eles o *AGS1* ( $\alpha$ -1,3 - glucana sintase) e *TSA1* (antioxidante tiol - específico).

Tavares et al. (2007) utilizaram microarray para identificar os genes expressos em células leveduriformes do isolado Pb01 após serem fagocitados por macrófagos peritoniais murinos. Dos 1152 genes analisados, 152 foram diferencialmente transcritos. Entre os genes que apresentaram uma regulação positiva estão aqueles relacionados ao stress oxidativo (*HSP60* e *SOD3*), à

biossíntese de aminoácidos (*METG*), à cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (*QRC8* e *COX17p*) e histonas (*HHT2*, *HHF2*, *HTZ1*). Os que apresentaram regulação negativa estão envolvidos com a síntese de polissacarídeos da parede celular (*FKS*) e com a glicólise (*ENO*). Estes resultados mostraram que o *P. brasiliensis* possui uma plasticidade transcricional que dá a ele a capacidade de sobreviver no ambiente severo encontrado nos macrófagos. Bailão et al. (2007) identificaram genes diferencialmente expressos em células leveduriformes de *P. brasiliensis* tratado com plasma humano, mimetizando sítios de infecção superficial. Os genes com regulação positiva identificados estavam relacionados a degradação de ácidos graxos, síntese de proteínas, sensores de mudança de osmolaridade, remodelamento da parede e defesa.

Em nosso laboratório foram estudados dois genes de choque térmico que codificam proteínas mitocondriais: a proteinase *PbLon* e a chaperone *PbMdj1* (Barros e Puccia, 2001; Batista et al., 2006). *Mdj1p* é o membro da família DnaJ (*Hsp40*) localizado na matriz mitocondrial e essencial na degradação de substratos pela *Lon* (Langer e Neupert, 1996). Resultados recentes demonstram a presença da *PbMdj1* na parede celular do *P. brasiliensis*, sugerindo que a molécula pode estar envolvida na relação parasita/hospedeiro (Batista et al., 2006).

Atualmente foram liberadas as versões do genoma dos isolados *Pb3*, *Pb18* e *Pb01* realizadas pelo Broad Institute ([http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides\\_brasiliensis.1/MultiHome.html](http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis.1/MultiHome.html)). Assim como o genoma de outros fungos, o de *P. brasiliensis* fornecerá uma grande oportunidade de estudo dentro das diversas áreas da pesquisa permitindo assim, a ampliação do conhecimento.

## **1.2. Paracoccidioidomicose humana**

A infecção humana pelo *P. brasiliensis* ocorre principalmente pelo sistema respiratório através da inalação de conídeos da forma miceliana do fungo. Sob o estímulo do aumento da temperatura, os conídeos transformam-se em leveduras

nos alvéolos pulmonares, como comprovado experimentalmente em camundongos (McEwen et al., 1987). Na maioria dos casos, o fungo é destruído e a infecção é resolvida com cura espontânea. A doença no homem pode se desenvolver logo após a infecção ou anos depois, pois o *P. brasiliensis* tem a capacidade de permanecer quiescente no pulmão por um período de tempo indeterminado (Restrepo et al., 1981). Quando a doença se desenvolve, pode ficar contida nos pulmões ou disseminar-se para outros órgãos ou sistemas através da via hematogênica e/ou linfática, causando lesões secundárias (Franco et al., 1986).

As manifestações clínicas da PCM estão associadas a fatores relacionados com o parasita, como a virulência e a dimensão do inóculo, e com o hospedeiro, notadamente seu “status” imunológico e susceptibilidade genética à infecção. Restrepo et al. (1983) analisaram a frequência de grupos sanguíneos, Rh e HLA em pacientes com PCM e indivíduos normais. Os autores observaram que somente dois HLAs (A9 e B13) tiveram um aumento significativo entre os pacientes com PCM quando comparados com controles saudáveis, sendo que o antígeno A9 prevaleceu nos indivíduos com a forma progressiva da doença. Esses resultados sugeriram que o HLA-A9 poderia estar envolvido na suscetibilidade à doença.

A PCM ativa acomete mais frequentemente trabalhadores rurais adultos, do sexo masculino, sendo que a proporção homem:mulher é de aproximadamente 13:1 (Brummer et al., 1993) e pode variar entre 4:1 em áreas endêmicas do Brasil e 15:1 na Colômbia, Equador e Argentina (Borelli, 1972). A diferença entre os sexos não existe nas infecções subclínicas pelo *P. brasiliensis* ou na PCM ativa entre indivíduos pré-púberes, sugerindo que as mulheres adultas possuem um mecanismo natural de defesa contra a progressão da doença (Restrepo et al., 1984). Esse fato tem sido creditado à presença do estradiol, já que a transformação de micélio para levedura *in vitro* é inibida pelo 17  $\beta$ -estradiol, mas não pela testosterona (Salazar et al., 1988). O mecanismo envolvido nesse processo inibitório seria o bloqueio da síntese de proteínas durante a transformação dimórfica (Clemons et al., 1989), sendo que foi demonstrada a presença de receptores para estrógeno no citoplasma do fungo (Loose et al., 1983; Stover et al., 1986).

A PCM apresenta uma gama de manifestações clínicas que variam entre o pólo anérgico e o hiperérgico. O pólo anérgico (formas severas) caracteriza-se por lesões generalizadas, com numerosos fungos, reações negativas em testes intradérmicos contra antígenos fúngicos (paracoccidioidina), imunidade humoral hiper reativa, com altos títulos de anticorpos específicos, níveis de gamaglobulina e IgE aumentados e redução nos níveis séricos de albumina. O pólo hiperérgico (formas brandas) caracteriza-se por apresentar lesões localizadas ativas em pacientes que mantêm boas condições gerais, os quais abrigam poucos parasitas contidos em granulomas epitelióides típicos, mostram imunidade celular preservada, testes intradérmicos positivos para paracoccidioidina, além de baixos títulos ou ausência de anticorpos específicos (revisão em Del Negro et al., 1994).

Clinicamente a micose é dividida em adulta (crônica ou pulmonar) e juvenil (aguda ou linfática). Ambas podem evoluir para uma doença com alto grau de severidade, podendo ocasionar a morte em pacientes não tratados adequadamente (revisões em Franco, 1986; Brummer et al., 1993; Del Negro et al., 1994). A PCM juvenil acomete indivíduos com menos de 30 anos e crianças de ambos os sexos, sendo responsável por cerca de 3 a 5 % dos casos de PCM. Esta forma tem caráter disseminado, afetando principalmente os órgãos do sistema retículo endotelial, como fígado, baço, linfonodos e medula óssea. A PCM adulta é a forma mais frequente e normalmente evolui a partir de focos quiescentes do fungo após um período indeterminado de latência. Esta forma caracteriza-se pela progressão lenta. Atinge preferencialmente homens acima dos 35 anos, causa lesões pulmonares (forma unifocal) e eventualmente mucocutâneas, com ou sem disseminação para outros órgãos (forma multifocal).

O diagnóstico de certeza da PCM é o micológico. Na maioria dos casos, as células leveduriformes de *P. brasiliensis* podem ser visualizadas ao microscópio ótico a partir de amostras clínicas como escarro, aspirado brônquico ou lavado broncoalveolar, material granulomatoso da base de úlceras, crostas ou material de suas extremidades, pus dos linfonodos que drenam, líquido céfalo-raquidiano, medula óssea ou aspirados de linfonodos, além de amostras de biópsias. Exames microscópicos de amostras biológicas coradas com KOH 10% ou calcofluor podem evidenciar os elementos fúngicos típicos da sua fase leveduriforme, levando ao diagnóstico (Lacaz, 1994b; Brummer et al., 1993).

Em material de biópsia, técnicas especiais de coloração, tais como metanamina de prata, hematoxilina e eosina, e ácido periódico de Shiff revelam um processo granulamatoso com infiltrados de polimorfonucleares, macrófagos, mononucleares, células gigantes multinucleadas fagocitando leveduras únicas ou multibrotantes. A sensibilidade do exame direto, incluindo preparações úmidas, esfregaços e histopatologia, varia de 85 a 100% em diferentes centros especializados da América Latina (Brummer et al., 1993; Lacaz, 1994b). Resultados falso-negativos podem ocorrer, pois pequenas formas teciduais de *P. brasiliensis* podem ser confundidas com *Histoplasma capsulatum* (Lacaz, 1994b), *Coccidioides immitis* (Greer, 1990) ou *B. dermatitidis* (Salfeder, 1979; Figueroa et al., 1994). Quando possível, o material clínico deve ser cultivado, porém o tempo requerido para isolar *P. brasiliensis* de amostras clínicas é longo. Em muitos casos, o resultado sorológico é a primeira indicação da natureza micótica da doença, principalmente naqueles pacientes que ainda não apresentam lesões clínicas aparentes. O diagnóstico sorológico tem valor diagnóstico em associação ao micológico, e, principalmente, valor prognóstico no acompanhamento dos pacientes.

O tratamento contra a PCM inicia-se com um controle nutricional do paciente, descanso e a diminuição do uso de álcool e de tabaco, os quais podem agravar a doença. As drogas anti-fúngicas mais utilizadas são os derivados de sulfonamidas, que promovem a cura em cerca de 70% dos indivíduos, e os anti-fúngicos anfotericina B e derivados de imidazol, recomendados no início do tratamento dos casos mais avançados. A falta de anticorpos circulantes contra antígenos de *P. brasiliensis* é um importante critério de cura da PCM, no entanto, isso ocorre em raros casos, pois, após a cura clínica, pode ocorrer queda no título dos anticorpos, restando, porém, uma “cicatriz sorológica” (Lacaz, 2002). 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).

*In vivo*, o *P. brasiliensis* multiplica-se intracelularmente após a ingestão por macrófagos pulmonares não ativados, os quais são destruídos liberando numerosas células leveduriformes (Brummer et al., 1989). A ativação de

macrófagos pulmonares é feita principalmente por IFN- $\gamma$ , que exerce um papel essencial na defesa do hospedeiro contra o fungo. Estudos realizados *in vitro* demonstraram que macrófagos pulmonares ativados têm habilidade para matar células leveduriformes de *P. brasiliensis* (Brummer et al., 1988; Brummer et al., 1989) e conídios (Cano et al., 1992). Em estudo semelhante, observou-se que a restrição de ferro é um dos mecanismos pelos quais macrófagos ativados controlam a transformação intracelular do conídio ingerido e o crescimento de células leveduriformes (Cano et al., 1994). Gonzalez et al. (2007) mostraram que o mecanismo fungicida mediado por óxido nítrico de macrófagos murinos ativados por IFN- $\gamma$  contra conídios de *P. brasiliensis* é dependente de ferro. Kurita et al. (1999a e 1999b) observaram atividade fungicida e fungistática de PMN humanos e murinos ativados com IFN- $\gamma$  *in vitro*. Além disso, foi demonstrado que monócitos do sangue de pacientes com PCM após pré – ativação com IFN- $\gamma$  são capazes de eliminar leveduras de isolado virulento e não virulento do fungo (Calvi et al., 2003).

### **1.3. A gp43 do *P. brasiliensis***

A gp43 é o principal antígeno do *P. brasiliensis* e é a molécula melhor estudada até o momento (revisão em Travassos et al., 2003). A gp43 é uma glicoproteína encontrada no sobrenadante de cultura do fungo e tem migração semelhante à da ovoalbumina em gel de SDS-PAGE (Puccia et al., 1986). A molécula é secretada continuamente por leveduras do *P. brasiliensis* em crescimento exponencial, no entanto a secreção diminui na fase estacionária (Stambuk et al., 1988; Camargo et al., 1988). A proteína foi localizada por microscopia eletrônica dentro de grandes vacúolos no citoplasma, na parte externa da membrana plasmática, na parede celular e em lomasomas de células leveduriformes e micelianas de *P. brasiliensis* (Straus et al., 1996; Sandoval et al., 1997).

A caracterização do gene PbGP43 que codifica a gp43 foi realizada por Cisalpino et al. (1996) e demonstrou a presença da ORF em um fragmento de 1.329 nt, distribuída em dois exons separados por um intron de 78 nt e contendo uma sequência líder de 105 nt (nº de acesso ao GenBank U26160). A sequência

traduzida prevê um único sítio de *N*-glicosilação, compatível com a presença de uma única cadeia oligossacarídica, a qual foi caracterizada por Almeida e colaboradores (1996). Essa cadeia é curta, do tipo “high-mannose” *N*-ligada e não é essencial para que a secreção ocorra (Puccia e Travassos, 1991a).

As propriedades de adesina da gp43 foram também demonstradas em relação à sua capacidade de ligação com elementos da matriz extracelular, especificamente com laminina (Vicentini et al., 1994). Ensaio *in vitro* mostraram que células fúngicas tratadas com laminina-1 de sarcoma murino tinham maior capacidade de adesão a uma monocamada de células de rim de cachorro (MDCK) do que as não tratadas (Vicentini et al., 1997). Estudos *in vivo* demonstraram um aumento da infecção intratesticular de hamster quando os animais foram infectados com *P. brasiliensis* previamente recoberto com laminina murina (Vicentini et al., 1994; Lopes et al., 1994). Essa ligação *in vivo* e *in vitro* foi inibida com anticorpos monoclonais anti-gp43 (Gesztési et al., 1996) ou anti-epitopo da proteína ligante de lamina de *Staphylococcus aureus* (Vicentini et al., 1997). Em outro estudo, Hana e colaboradores (2000) inibiram significativamente a adesão de leveduras às células Vero com um “pool” de soros de pacientes com PCM e com soro de coelho hiper-imune anti-gp43. Mendes-Giannini et al. (2006) mostraram que o isolado Pb18 recém recuperado de animal apresentou uma capacidade maior de adesão *in vitro* a componentes da matriz extracelular do que o isolado Pb18 antes da passagem em animal. A gp43 ligou-se com laminina e fibronectina. O peptídeo NLGRDAKRHL - derivado da gp43 – foi o que mais contribuiu para a adesão de células do *P. brasiliensis* às células Vero. O peptídeo sintético YIGRS, derivado da laminina, ou RGD, derivado da laminina e fibronectina, mostraram a maior inibição à adesão da gp43 às células Vero.

Barbosa et al. (2006) mostraram que a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) de *P. brasiliensis* é expressa no citoplasma e na parede celular da forma leveduriforme do fungo, onde se liga a proteínas da matriz extracelular como a fibronectina, laminina e colágeno tipo I. O tratamento das células leveduriformes com anticorpos anti-GAPDH inibem a adesão e internalização das células.

Andre et al. (2004) observaram que leveduras de Pb18 (virulento) e Pb265 (pouco virulento) recobertas com laminina murina não apresentaram aumento da

infecção em modelo de infecção intratraqueal. Os autores observaram diminuição na infecção provocada pelo isolado Pb265. Porém, deve-se considerar que o fungo expressa outros componentes, além da gp43, que podem se ligar à proteínas da matrix extracelular (Mendes-Giannini et al., 2000), que podem estar envolvidos no estabelecimento da infecção. A despeito desses resultados, ainda se pode sugerir que a gp43 esteja envolvida no processo de disseminação fúngica: a adesão à laminina das células epiteliais propiciaria a formação de sítios de ancoragem para os propágulos fúngicos que chegam aos alvéolos pulmonares. Após a aderência, poderia ocorrer a degradação da membrana basal e penetração do fungo (Travassos et al., 2003). Um possível fator ligado à degradação da membrana basal é uma serino-tiol proteinase extracelular de *P. brasiliensis*, considerando-se que essa protease extracelular tem a capacidade de hidrolizar, *in vitro*, componentes da membrana basal ou ligados a ela, como fibronectina, laminina, colágeno IV e proteoglicanos (Carmona et al., 1995; Puccia et al., 1998; Puccia et al., 1999). Além disso, a gp43 também foi apontada como possível mecanismo de evasão da resposta imune por inibir a função de macrófagos (Popi et al., 2002).

A gp43 foi caracterizada em função da sua grande capacidade antigênica (Puccia et al., 1986). Os trabalhos de Restrepo e Moncada (1974), Restrepo e Drouhet (1970) e de Yarzabal e colaboradores (1971 e 1976) apontavam para a existência de um antígeno encontrado em frações intra ou extracelulares de *P. brasiliensis* que era reconhecido por soros de pacientes de PCM em ensaios de imunodifusão (ID) e imunoeletroforese. Na ocasião, o antígeno foi denominado de linha ou banda 1, arco A e antígeno E<sub>2</sub>, as quais referiam-se à mesma molécula como demonstrado por Contí-Díaz e Mackinnon (1980). Yarzabal et al. (1977) produziram um soro de coelho anti-antígeno E<sub>2</sub> e posteriormente isolaram um componente antigênico em colunas de afinidade com o anticorpo imobilizado, porém as características moleculares do antígeno não foram estudadas.

A purificação da gp43 foi originalmente realizada em colunas de gel filtração e afinidade em concanavalina A, como também em coluna de afinidade com soro de paciente com PCM (Puccia et al., 1986). Com uma pequena quantidade da glicoproteína purificada foi possível obter soros hiperimunes de coelho anti-gp43 de altos títulos, os quais passaram a ser a fonte de IgG para

compôr colunas de afinidade de maior calibre. A eluição da gp43 desse tipo de coluna, no entanto, demandava um grande volume de tampão com pH 3,0, levando a uma considerável perda no processo posterior de concentração. Uma cromatografia subsequente em gel filtração servia para retirar contaminantes glicosilados, especialmente uma galactomana de alto peso molecular (Puccia et al., 1991; Puccia et al., 1994). A gp43 obtida dessa maneira foi utilizada na sua caracterização imunoquímica (Puccia e Travassos, 1991b) e produção de anticorpos monoclonais (Puccia e Travassos, 1991a).

Como mencionado anteriormente, a gp43 é o principal antígeno diagnóstico do fungo caracterizado até o momento, porém outros têm sido pesquisados, como por exemplo a gp27 (McEwen et al., 1996), a gp70 (Salina et al., 1998), a gp87 (Gómez et al., 1997; Diez et al., 2002) e a hsp60 (Cunha et al., 2002). Entre eles, apenas a gp70 foi testada com um grande número de pacientes e mostrou ser um outro potencial antígeno diagnóstico para a PCM, pois, assim como a gp43, a gp70 foi reconhecida apenas por pacientes com a PCM (Salina et al., 1998; Marques da Silva, 2004).

A utilidade diagnóstica da gp43 purificada tem sido verificada em vários ensaios imunológicos como ELISA, hemaglutinação passiva, dot blot e ELISA de captura com anticorpos monoclonais, além de imunodifusão (Camargo et al., 1994; Mendes-Giannini et al., 1990; Puccia e Travassos, 1991a; Taborda e Camargo, 1993 e 1994; Camargo et al., 1994). Em ELISA convencional, a especificidade do teste pode ser conseguida por absorção dos soros com filtrado de cultura de *H. capsulatum* (Mendes-Giannini et al., 1984) ou por tratamento da molécula com glicosidases ou agentes químicos que neutralizem epitopos de carboidratos (Puccia e Travassos, 1991; Taborda e Camargo, 1993 e 1994; Neves et al., 2003).

Entretanto, o diagnóstico ainda é feito com antígenos totais, nos quais a gp43 é o principal componente antigênico. O teste mais utilizado é a imunodifusão, que apresenta alta especificidade e sensibilidade variando entre 65 a 100% dependendo da natureza da preparação antigênica utilizada (Mendes-Giannini et al., 1994; revisão em Camargo et al., 2000). Camargo et al. (1988) padronizaram uma preparação de antígenos a partir de sobrenadante de cultura do isolado B-339 de *P. brasiliensis*. Essa preparação era rica em gp43 e foi

testada e utilizada em ensaios de imunodifusão em todo Brasil. Todavia, o *P. brasiliensis* apresenta uma conhecida instabilidade na expressão da gp43 (Moura-Campos et al., 1995; Matttar-Filho et al., 1997), de forma que a disponibilidade da molécula recombinante representaria um grande passo na padronização de ensaios diagnósticos. Recentemente, Carvalho et al (2008) expressaram isoformas de gp43 recombinante em *Pichia pastoris*. Os autores concluíram que essas isoformas podem ser usadas para o diagnóstico da PCM em substituição à gp43 nativa.

#### **1.4. Polimorfismo no gene PbGP43**

Nosso laboratório estudou o polimorfismo no gene PbGP43 em isolados do *P. brasiliensis* provenientes de indivíduos com PCM pulmonar e linfática, um de solo e outro de tatu. Através do sequenciamento de dois fragmentos clonados da ORF desses isolados, observou-se um padrão de polimorfismo importante no exon 2, entre os nucleotídeos 578 e 1160 (Morais et al., 2000). Foram definidos os genótipos A a F, caracterizados pelas substituições informativas (observadas em mais de um isolado) em comparação com uma sequência consenso do PbGP43. O genótipo A foi o mais polimórfico (14 a 15 substituições) e, conseqüentemente, distante filogeneticamente dos demais. Três amostras de PCM pulmonar (Pb2, ou 1925, Pb3 e Pb4) formaram esse grupo, cuja gp43 traduzida tem um ponto isoelétrico básico (ao redor de 8,0). A região promotora também é mais polimórfica nesses isolados e no Pb3 a expressão do PbGP43 sofreu repressão em resposta a condições de choque térmico (Carvalho et al., 2005).

Matute et al. (2006) analisaram o polimorfismo de 5 genes diferentes em 65 isolados de *P. brasiliensis*. Os autores concluíram que pode haver pelo menos 3 espécies filogeneticamente distintas denominadas S1, PS2 e PS3. Assim como no genótipo A, no PS2 estão os isolados mais polimórficos (Pb2, Pb3 e Pb4). Carrero et al. (2008) analisaram a sequência ITS e as regiões codificadoras e não codificadoras de vários genes em 21 isolados de *P. brasiliensis*, sendo 14 isolados já conhecidos e 7 isolados novos. Todos os isolados analisados agruparam dentro dos três grupos filogenéticos relatados por Matute et al. (2006),

com exceção do isolado Pb01. Este isolado se separa dos demais nas análises filogenéticas e já é considerado uma outra espécie do gênero *Paracoccidioides*.

Carvalho et al. (2005) estudaram a virulência de isolados de *P. brasiliensis* classificados em distintos grupos genéticos de acordo com o polimorfismo do PbGP43. Os resultados mostraram que Pb2, Pb3 e Pb4 (genótipo A) foram pouco agressivos após infecção de camundongos inoculados pelas vias intraperitoneal, intratraqueal (i.t.) e endovenosa (e.v.). Os animais infectados com esses isolados apresentaram produção preferencial, na infecção i.t., de anticorpos anti-gp43 do tipo IgG2a, IgG2b e IgG3 sugestivos de uma resposta imune predominante do tipo Th1 (Carvalho, 2004). Nos outros animais houve predominância de IgG1 e IgA, sugestivos de uma resposta Th2 predominante. Quando Pb3, Pb5, Pb12 e Pb18 adaptados *in vivo* foram testados i.t. e i.v., a infecção por Pb3 teve caráter regressivo e foi plena de IFN- $\gamma$ , ao contrário das demais infecções, que foram progressivas (Carvalho, 2004).

### **1.5. Exoglucanases fúngicas e sua regulação**

Como mencionado anteriormente, o gene que codifica a gp43 foi sequenciado a partir do DNA genômico do isolado Pb339 de *P. brasiliensis* clonado por Cisalpino et al. (1996). Análises comparativas de sequência mostraram que a gp43 possui uma alta percentagem de identidade em aminoácidos com as exo- $\beta$ -1,3-glucanases fúngicas, variando de 54% no gênero *Aspergillus* a 61% em *H. capsulatum*. A molécula não apresentou, no entanto, atividade enzimática, provavelmente devido à substituição do ácido glutâmico no sítio NEP por uma lisina (Cisalpino et al., 1996). Chambers et al. (1993), testando a atividade de uma exo  $\beta$ -1,3-glucanase de *Cândida albicans*, mostraram que a substituição do ácido glutâmico no sítio NEP diminuiu a atividade enzimática em até 15.000 vezes, sugerindo que o ácido glutâmico participa na catálise da exoglucanase testada.

As glucanas são polímeros de glicose unidos por ligações glicosídicas, podendo assumir as configurações  $\alpha$  e  $\beta$ . Acredita-se que as glucanas possuem várias funções. Na parede celular de *Sacharomyces cerevisiae*, as  $\beta$ -(1,3)-glucanas são os principais responsáveis pela força mecânica (revisão em Klis et

al., 2002). Na forma madura, as cadeias de  $\beta$ -(1,3)-glucana de células de *S. cerevisiae* na fase estacionária são moderadamente ramificadas e contém de 3-4% de ligações glicose  $\beta$ -(1,6). No entanto, seu grau de ramificação pode depender das condições de crescimento.  $\beta$ -glucanas citoplasmáticas e extracelulares de fungos filamentosos, provavelmente agem como compostos para armazenagem de carbono que podem ser reutilizados quando o organismo se encontra em meio com limitação das fontes deste elemento. Isto sugere que estes compostos desempenham uma importante função na sobrevivência destes organismos (Pitson et al., 1993). Segundo Hinton e Pressey (1980), as glucanas podem ser encontradas em microrganismos e plantas superiores como principais constituintes da parede celular, como material citoplasmático ou de reserva vacuolar e como substâncias extracelulares.

As glucanases são as enzimas que hidrolisam os polímeros de glucanas. Existem dois grupos principais de glucanases, as exo e as endo glucanases, sendo que as exoglucanases são aquelas que catalisam a hidrólise da cadeia de  $\beta$ -glucana pela clivagem sequencial dos resíduos de glicose a partir do terminal não redutor liberando a glicose como único produto da hidrólise (revisão em Martin et al., 2007).

Evidências experimentais sugerem que as  $\beta$ -(1,3)-glucanases fúngicas desempenham papéis chave em processos morfogênicos-morfolíticos durante o desenvolvimento e diferenciação (Pitson et al., 1993). O crescimento e extensão da parede celular dependem de um delicado balanço entre a hidrólise da parede existente e a síntese da nova (Adams, 2004).

As funções das  $\beta$ -(1,3)-glucanases extracelulares ainda continuam desconhecidas, embora a disponibilidade de evidências sugere que elas possuem as mais diversas funções (Pitson et al., 1993). A relação, tanto estrutural quanto funcional, entre as  $\beta$ -glucanases secretadas e aquelas associadas com a parede celular, no mesmo organismo, não é bem entendida. Por exemplo, a exo- $\beta$ -(1,3)-glucanase (Exg) de *C. albicans* é uma enzima extracelular, e assim como a enzima EXG1p de *S. cerevisiae*, Exg possui as atividades de hidrolase e transferase sugerindo que uma de suas funções está relacionada ao metabolismo e morfogênese das glucanas da parede celular em ambos os organismos (revisão em Martin et al., 2007).

Glucanases possuindo mais de uma atividade metabólica já são conhecidas na literatura. Christakopoulos et al. (1994) purificaram e caracterizaram uma  $\beta$ -glucosidase de *Fusarium oxysporum* que possuía atividades de exo-glucosidase e de transglicosilação. Em *Paecilomyces thermophila* também foi caracterizada um  $\beta$ -glucosidase termoestável apresentando ambas as atividades, de transglicosilação e exoglucanase (Yang et al., 2008).

Algumas  $\beta$ -glucanases fúngicas parecem ser constitutivas e são sintetizadas independentemente da fonte de carbono usada, mas a maioria, no entanto, parece estar sob o controle de mecanismos regulatórios como indução e/ou repressão catabólica. A presença de uma molécula indutora, associada à ausência de glicose, é considerada condição essencial para a produção de  $\beta$ -glucanases em fungos (Pitson et al., 1993).

Além das formas de controle vistas acima, aparentemente algumas glucanases estão sob o controle de outros mecanismos que não a indução e/ou repressão catabólica do carbono. Em *Trichoderma atroviride*, o gene que codifica uma exo- $\beta$ -(1,3)-glucanase (*Gluc78*) foi expresso somente sob condições de carência de fontes de nitrogênio e não na presença de seu próprio substrato ou compostos relacionados (Donzelli & Harman, 2001). Em *Verticillium fungicola* (Amey et al., 2003), o gene codificando  $\beta$ -(1,6)-glucanase tem múltiplos elementos GATA (envolvidos com repressão por nitrogênio) em seu promotor, sugerindo que esta enzima pode, também, ser sensível à repressão por fontes de nitrogênio (van Helden et al., 1998).

A maioria dos organismos procariotos e eucariotos possuem os mais elaborados mecanismos para fornecer um suprimento constante de nitrogênio. Os fungos podem usar os mais diversos compostos como fontes de nitrogênio e são capazes de expressar de forma rápida as enzimas catabólicas das mais diferentes vias. Uma vasta quantidade de estudos sobre o metabolismo do nitrogênio e sua regulação tem sido conduzido em *S. cerevisiae*, *A. nidulans* e *Neurospora crassa* (Marzluf, 1997).

Certos compostos nitrogenados – amônia, glutamina e glutamato – são preferencialmente usados pelos fungos. No entanto, quando estas fontes primárias de nitrogênio não estão disponíveis ou se encontram em baixas

concentrações de forma a limitar o crescimento fúngico, muitas fontes de nitrogênio diferentes podem ser usadas, como por exemplo, nitrato, nitrito, purinas, amidas, a maioria dos aminoácidos e proteínas. A utilização de qualquer um destes compostos secundários é altamente regulada e quase sempre requer a síntese de um grupo específico de enzimas catabólicas e permeases, que por sua vez, também estão sob o controle da repressão catabólica do nitrogênio (Marzluf, 1997). O controle do nitrogênio envolve a ativação de genes estruturais que são inibidos quando fontes preferíveis do elemento (como sulfato de amônio e glutamina) estão presentes no meio. A síntese de permeases e enzimas catabólicas de uma via catabólica específica é controlada em nível transcricional e, freqüentemente, requer dois sinais distintos específicos: primeiro, um sinal global (geral) indicando uma desrepressão pelo nitrogênio, e segundo, um sinal específico da via em questão indicando a presença do substrato ou de um intermediário específico da via metabólica. Estes dois sinais permitem a expressão seletiva dos genes específicos de uma determinada via metabólica dentre muitas existentes nos fungos (Marzluf, 1997). No entanto, alguns sistemas são controlados somente pela repressão metabólica do nitrogênio, ou seja, não envolvendo indução. Genes regulatórios globais de ação positiva, por exemplo, *AreA* em *A. nidulans* (Kudla et al., 1990), *Nit-2* em *N. crassa* (Fu & Marzluf, 1987), *Gln-3* em *Saccharomyces* (Minehart & Magasanik, 1991) e *Nre* em *Penicillium* (Haas et al., 1995) são classificados como fatores de transcrição do tipo “zinc finger” ligantes da sequência GATA. Todos estes fatores são membros da família GATA de fatores de transcrição, e como característica marcante, todos possuem o domínio de ligação ao DNA muito semelhante. Este domínio consiste de um motivo simples do tipo “zinc finger” com quatro cisteínas (cis2/cis2) quelando o elemento zinco, um “loop” central contendo 17 aminoácidos e uma região básica imediatamente adjacente. Estes fatores são responsáveis pela ativação de genes estruturais quando fontes preferíveis de nitrogênio estão ausentes no meio (Marzluf, 1997).

Em *N. crassa*, mutações em um gene designado *Nmr* (“nitrogen metabolic regulation”) resultaram em um fenótipo de desrepressão do gene da nitrato redutase e de outros genes controlados pelo metabolismo do nitrogênio quando fontes preferíveis de nitrogênio - amônia ou glutamina - estavam presentes no

meio (Premakumar et al., 1980; Tomsett et al., 1981). Este fenótipo sugere que o gene *Nmr* age como um regulador negativo e poderia codificar uma proteína repressora ou um modulador da atividade do ativador positivo NIT-2. O gene *Nmr* codifica uma proteína de 488 aminoácidos que não possui qualquer motivo do tipo quinase ou de ligação a moléculas de DNA (Young et al., 1990). A proteína NMR quando foi expressa em *E. coli* não apresentou qualquer capacidade de ligação à DNA ou a glutamina; no entanto, estes resultados devem ser analisados com cuidado, pois a proteína expressa necessitou ser desnaturada antes de ser solubilizada (Young et al., 1990). Várias evidências indicam que a proteína NMR funciona como um regulador negativo que se liga à proteína NIT-2 e de algum modo modula a *trans*-ativação ou interfere com sua ligação ao DNA

Em *A. nidulans*, o homólogo de NIT-2 é a proteína AreA. Assim como NIT-2, AreA é regulado em resposta a fontes de nitrogênio. A função de AreA também é controlada através da interação com um controlador negativo chamado NmrA. É sugerido que na presença de fontes preferíveis de nitrogênio, NmrA interage com AreA prevenindo a ativação dos genes envolvidos com o metabolismo do nitrogênio (Adrianopoulos et al., 1998). Estudos recentes mostraram que NmrA interage com AreA *in vitro*, porém NmrA não previne a ligação de AreA ao seu sítio no DNA (Lamb et al., 2003; Lamb et al., 2004).

Todd et al. (2005) verificaram que, em resposta ao crescimento de *A. nidulans* na presença de fontes de nitrogênio não preferíveis, ocorre um acúmulo de AreA no núcleo. Quando fontes preferíveis estão novamente no meio, ocorre a reversão do processo, ou seja, a proteína AreA deixa o núcleo de forma muito rápida. Essa migração de AreA do citoplasma para o núcleo não ocorre quando as fontes de carbono e nitrogênio são limitantes e que AreA é rapidamente expulso do núcleo quando as células estão sob condições limitantes de carbono.

É digno de nota que a resposta às condições limitantes de nitrogênio - reguladoras da expressão de genes envolvidos na utilização de fontes de nitrogênio - não ocorre quando as células também não possuem carbono suficiente para o seu crescimento (Fraser et al., 2001; Hynes, 1973; Hynes, 1974; Polkinghorne & Hynes, 1982). Este efeito é independente da repressão catabólica do carbono mediado pelo fator de transcrição repressor CreA (Fraser et al., 2001).

Como mencionado anteriormente, o PbGP43 foi clonado, sequenciado e caracterizado por Cisalpino et al. (1996) a partir de DNA genômico do isolado Pb339 de *P. brasiliensis*. O fragmento continha apenas 326 pb de região 5' intergênica contados a partir do ATG inicial. Como a função da gp43 ainda é desconhecida, neste trabalho foram abordados os aspectos de regulação da expressão do PbGP43 na presença de diversos compostos. A identificação de elementos de transcrição putativos localizados na região 5' intergênica do PbGP43 também foi analisada na tentativa de encontrar possíveis elementos ligantes de fatores de transcrição que pudessem controlar a expressão do gene podendo assim, fornecer evidências de uma possível função da gp43. Uma última abordagem foi a identificação de homólogos do PbGP43 em fungos filogeneticamente próximos e comparação de suas regiões 5' intergênicas. Toda esta análise só foi possível após a clonagem, durante este projeto, de um segmento de 1,7 kb correspondente a região 5' do PbGP43 além dos 326 pb já conhecidos. A clonagem deste segmento foi um dos objetivos deste projeto.

## II. OBJETIVOS

- ✓ Mapeamento de elementos de transcrição e identificação de compostos reguladores da expressão do PbGP43;
- ✓ Clonagem da região 5' intergênica do PbGP43 do isolado Pb339;
- ✓ Análise comparativa da região 5' intergênica do PbGP43 nos isolados de *P. brasiliensis* e de seus homólogos em outros fungos.

### **III. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Soluções**

Todas as soluções descritas foram preparadas com água bidestilada, exceto as soluções para manipulação de ácidos nucleicos, as quais foram preparadas utilizando água com padrão Milli-Q e esterilizadas em autoclave a 120°C por 15 min.

- ✓ PBS: 1,15 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 0,2 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e água para 1000 ml;

- ✓ Tampão de amostra para SDS-PAGE: Tris 65 mM, pH 6,8, glicerol 10 %, SDS 2 %,  $\beta$ -mercaptoetanol 2 % e 0,002 % de azul de bromofenol;
- ✓ Corante de azul de Coomassie: azul de Coomassie R-250 0,15%, metanol: água: ácido acético (4:4:1, v/v/v);
- ✓ Solução estoque de acrilamida/bis 30 % para gel de proteína: 30 g de acrilamida, 0,8 g de bis-acrilamida e água até 100 ml. A solução foi filtrada em papel de filtro comum e armazenada a 4 °C, sob a proteção da luz;
- ✓ Tampão para gel de proteína (separação): 0,75 mM de Tris-HCl, pH 8,8, 0,2 g de SDS e água até 100 ml;
- ✓ Solução estoque de acrilamida/bis 12 %: 12 g de acrilamida, 1,2 g de bis-acrilamida e água até 100 ml. A solução foi filtrada em papel de filtro comum e armazenada a 4 °C, sob a proteção da luz;
- ✓ Tampão para gel de proteína (empacotamento): 0,25 mM de Tris-HCl, pH 6,8, 0,2 g de SDS e água até 100 ml;
- ✓ Solução de acrilamida-uréia para gel de sequenciamento: 82,5 ml de acrilamida/bis 38 %, 252 g de uréia e água autoclavada até 500 ml. Após filtração a solução foi armazenada a 4 °C, sob proteção da luz;
- ✓ Solução de acrilamida-uréia-TBE para gel de sequenciamento: 81 mL de solução de acrilamida-uréia 6 % e 7 mL de TBE 10X. Antes do uso foram adicionados 350  $\mu$ L de persulfato de amônio 10 % e 70  $\mu$ L de TEMED;
- ✓ Solução de acrilamida-TBE 0,5X para gel usado na técnica de EMSA: 4 mL da solução estoque de acrilamida (30 %), 1 mL de TBE 10X e água suficiente para 20 mL. Antes do uso eram adicionados 120  $\mu$ L de persulfato de amônio 10 % e 8  $\mu$ L de TEMED;
- ✓ TBE 10X: 108 g/L de Tris-base, 55 g/L de ácido bórico, 3,72 g/L de EDTA, pH 8,3;
- ✓ STET: 50 mM de Tris-HCl pH 8,0, 50 mM de EDTA, 8 % de sacarose, 5 % de Triton X-100;
- ✓ TE: 10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, pH 8,0;
- ✓ Tampão de sonicação: 50 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM de NaCl, 10 mM de imidazol, pH 8,0;
- ✓ Solução salina: 0,85 % de NaCl;

- ✓ Elementos traços:  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (75 mM),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (180 mM),  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (25 mM),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (18 mM),  $\text{CoCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (6 mM),  $\text{Cu}(\text{SO}_4) \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (6 mM),  $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (1 mM) e EDTA (140 mM). Os componentes foram adicionados na ordem listada em 1/8 do volume final de água destilada. Cada componente foi dissolvido completamente antes de adição do próximo. A solução foi aquecida até 100°C e então resfriada para 60°C. Ajustou-se o pH entre 6,5 e 6,8 com solução de NaOH 10 M. Deixou-se resfriar até atingir a temperatura ambiente para acerto do volume final;
- ✓ Solução de sais 20X concentrada:  $\text{NaNO}_3$  (3,2 M), KCl (140 mM),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (200 mM) e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (40 mM). Os componentes foram dissolvidos em água destilada e utilizados na composição do Meio Mínimo;
- ✓ Solução 1 de esferoplastização: Sulfato de amônio (0,8 M) e Ácido cítrico pH 6 (100 mM). Dissolveu-se o sulfato de amônio em água destilada e adicionou-se o volume adequado de solução de ácido cítrico 1 M, pH 6;
- ✓ Solução 2 de esferoplastização: Extrato de levedura (1 %, p/v) e Sacarose (2 %, p/v);
- ✓ Solução 3 de esferoplastização: Sulfato de amônio (400 mM), Sacarose (1 %, p/v) e Ácido cítrico pH 6 (50 mM). Sulfato de amônio e sacarose foram dissolvidos em água destilada. Adicionou-se o volume necessário de uma solução de ácido cítrico 1 M, pH 6;
- ✓ Solução 4 de esferoplastização: Polietilenoglicol (PEG) PM 6000 g/mol (25 %, p/v),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (100 mM), KCl (0,6 M), Tris HCl pH 7,5 (10 mM). Os componentes foram dissolvidos em água destilada e acrescentou-se o volume necessário de solução Tris HCl, pH 7,5 (1 M);
- ✓ Solução 5 de esferoplastização:  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (50 mM), KCl (0,6 M),  $\beta$ -Morpholino-ethansulfonato (MES) pH 6,0 (10 mM) e Os componentes foram dissolvidos em água destilada;
- ✓ Solução de depuração: 0,25 M de ácido clorídrico;
- ✓ Solução de desnaturação: 1,5 M de cloreto de sódio, 0,5 M de hidróxido de sódio;
- ✓ Solução de neutralização: 0,5 M de Tris, 1,5 M de cloreto de sódio, pH 7,5;
- ✓ Tampão SSC (20x): 175,3 g/L de cloreto de sódio, 27,6 g/L de citrato trissódico dihidratado, pH 7,0, em 1 L de água;

- ✓ Tampão SSPE (20x): 175,3 g de cloreto de sódio, 27,6 g de fosfato diácido de sódio mono hidratado, 7,4 g de EDTA, pH 7,4, em 1 L de água;
- ✓ Denhardt's (50X): 10 g/L de polivinilpirrolidona (pvp), 10 g/L de BSA e 10 g/L de Ficoll 400 (Amersham), em água. A solução foi esterilizada por filtração;
- ✓ Solução de hibridização [membrana de nylon (Hybond-N<sup>+</sup>™)]: para 50 mL de solução adicionar 15 mL de SSPE (20X), 2,5 mL de SDS 10%, 0,5 mL de DNA de esperma de salmão (100 µg/mL), 25 mL de formamida, 5 mL de Denhart's e completar com água;
- ✓ Tampão de extração de proteína para *A. nidulans*: 60 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 40 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 10 mM de KCl e 1 mM de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O. O pH foi ajustado para 7. Concentração dos inibidores de protease: 50 mM de β-mercaptoetanol, Benzamidina 5 mM, Aprotinina 10µg/ml, PMSF 15 mM e Leupeptina 7,5µg/ml. Os inibidores foram adicionados na hora do uso;
- ✓ Substrato cromogênico x-GAL: 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolylβ-D-Galactopyranosídeo preparado na concentração de 20 µg/µl diluído em N,N-dimetilformamida;
- ✓ Substrato cromogênico ONPG: o-nitrofenil β-D-galactopiranosídeo preparado na concentração de 3 mg/ml diluído em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0;
- ✓ Tampão Z para o ensaio enzimático de β-galactosidase: 0,06 M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,04 M de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,01 M de KCl, 0,001 M de MgSO<sub>4</sub> e 0,05 M de β-mercaptoetanol. O pH foi ajustado para 7. O β-mercaptoetanol foi adicionado somente na hora do uso.

### 3.2. Meios de cultura

Os meios de cultura foram preparados com água bidestilada e esterelizados por autoclavação a 120° C, por 15 min ou filtro esterilizados em membrana de 0,22 µm (Millipore). As formulações abaixo foram seguidas na preparação dos meios líquidos. Para a preparação de meios sólidos, foi adicionado 1,5 % de ágar (BioBrás). Para a manutenção de linhagens de bactérias a -70° C, foi adicionado 20 % de glicerol (v/v) ao meio líquido.

#### 3.2.1. Meios para cultivo de bactérias

3.2.1.1. Meio LB: 1 % de triptona, 0,5 % de extrato de levedura e 1 % de NaCl, pH 7,3.

3.2.1.2. Meio LB amp/kan: meio LB acrescido 100 µg/ml de ampicilina e 100 µg/ml de kanamicina, adicionados na hora do uso. As soluções de antibióticos foram adicionadas em meio com ágar antes de solidificar, a uma temperatura menor que 50 °C.

### **3.2.2. Meios para cultivo de *P. brasiliensis***

3.2.2.1. Meio de YPD modificado (YPDmod): 0,5 % de extrato de levedura, 0,5 % de peptona de caseína e 1,5 % de glicose, pH 6,5.

3.2.2.2. Meio F12 (Gibco): Meio definido que foi usado para o crescimento das culturas leveduriformes do *P. brasiliensis* em ensaios de indução e curvas de crescimento. Este meio foi suplementado com: sulfato de amônio (10 mM), glutamina (10 mM), glicose (1,5 e 3%) e soro fetal bovino (2%), conforme a necessidade. O meio padrão foi F12 suplementado com 1,5% de glicose (F12/glicose), que é a concentração usada em YPD modificado (YPDmod), já que F12 contém apenas 0,18% de glicose em sua formulação.

### **3.2.3. Meios para cultivo de *A. nidulans***

3.2.3.1. Meio mínimo (MM): 1X solução de sais (Kafer, 1977), 0,1 % de solução de elementos traços (v/v) e 1 % de glicose (p/v). O pH foi ajustado para 6,5 com NaOH 2M. Para meio sólido foi adicionado 2 % de agar. Para os ensaios da atividade de β-galactosidase foi utilizado MM suplementado com 2 % de glicose. A linhagem WG355 foi mantida em MM suplementado com biotina e arginina. As linhagens transformadas foram mantidas em MM suplementado apenas com biotina.

3.2.3.2. Meio completo (YG): 0,5 % de extrato de levedura, 2 % de glicose (p/v), 0,1 % de solução de elementos traços. Para a regeneração de protoplastos foi utilizado meio completo suplementado com KCl (0,6 M). Para meio Top Agar de regeneração dos esferoplastos foi adicionado 1% (p/v) de agar.

### 3.3. Isolados fúngicos

Todas os isolados de *P. brasiliensis* utilizadas no decorrer deste trabalho estão apresentadas na Tabela 1. As amostras foram mantidas em meio sólido de YPDmod, a 37 °C ou 4 °C e utilizadas após um período de 5 - 7 dias de repique.

Tabela 1: Isolados de *P. brasiliensis* utilizados neste trabalho.

Nome original	Código	Fonte	Isolado por/fornecido por:
608	Pb3	PCM crônica	M. H. H. Forjaz/ T. I. E. Svidzinski
18	Pb18/Pb7	PCM crônica	?/ Z. P. Camargo
339	Pb339	PCM crônica	?/ A. Restrepo

Todas as linhagens de *A. nidulans* utilizadas no decorrer deste trabalho estão apresentadas na Tabela 2. As amostras foram mantidas em meio sólido (MM) suplementados com arginina e biotina ou somente biotina, a 30 °C ou 4 °C e utilizadas após um período de 4 dias de repique.

Tabela 2: Linhagens de *A. nidulans* utilizadas neste trabalho

linhagem	Genotipo	Referência
WG355	biA1 bga0 argB2	van Gorcon et al., 1986
ANGP1	biA1 bga0 argB2::pANGP1 argB <sup>+</sup> WG355 derivado carregando pANGP1	Este trabalho
ANGP2	biA1 bga0 argB2::pANGP2 argB <sup>+</sup> WG355 derivado carregando pANGP2	Este trabalho
ANGP3	biA1 bga0 argB2::pANGP3 argB <sup>+</sup> WG355 derivado carregando pANGP3	Este trabalho
AGB246	biA1 bga0 argB2::pAN923-41B argB <sup>+</sup>	Lima et al., 2005

### 3.4. Amplificação por PCR

As reações de PCR para a clonagem de produtos a serem sequenciados ou expressados foram feitas usando 1 U da enzima “High Fidelity PCR Enzyme Mix” (Fermentas), 0,2  $\mu$ M de cada oligonucleotídeo iniciador, 2 mM de  $MgSO_4$  e 0,2 mM de cada dNTP em tampão 60mM Tris- $SO_4$  (pH 8,9), 18 mM de  $(NH_4)_2SO_4$  e 1,5 mM de  $MgCl_2$ . As demais reações foram feitas em 50 mM de KCl, 1,5 mM de  $MgCl_2$ , 10 mM de Tris-HCl, pH 8,8, 0,08% Nonidet P40 (NP-40), com 0,2 mM de cada dNTP, 0,2  $\mu$ M de cada iniciador e 1,5 U de Taq polimerase recombinante (Fermentas).

As amplificações foram feitas em um termociclador Perkin Elmer. O número de ciclos e a temperatura de anelamento variavam de acordo com a reação. As temperaturas de extensão foram diferentes para cada enzima, sendo 68 °C para a “High Fidelity” e “Long PCR” e 72 °C para a Taq recombinante.

### 3.5. Clonagem dos fragmentos de PCR

Os produtos de PCR foram purificados a partir do gel de agarose através do kit de isolamento de ácidos nucleicos “Perfectprep Gel Cleanup” (Eppendorf) ou BioClean (Biotools). O material resultante foi dosado de acordo com a intensidade da banda em gel de agarose comparativamente à intensidade das bandas do padrão de peso molecular  $\lambda$ -HindIII e  $\phi$ -HaeIII.

A clonagem do produto de PCR foi feita em vetor pGEM-T easy (Promega) ou TA cloning (Invitrogen) com a enzima T4 DNA ligase de acordo com as especificações do fabricante, e usando os reagentes fornecidos pelos kits. A razão molar entre vetor:inserto foi mantida em 1:3.

O produto de ligação foi utilizado para transformar bactérias competentes DH5- $\alpha$  produzidas no laboratório. Foram utilizados 100  $\mu$ L (DH5- $\alpha$ ) de células competentes para 10  $\mu$ L do produto de ligação. O material foi deixado no gelo por 30 min, submetido a um choque térmico (42° C) por 90 seg, e imediatamente colocado no gelo por 2 min. O produto foi diluído em 400  $\mu$ L (DH5- $\alpha$ ) de meio LB sem antibiótico, incubado por 1 h a 37° C, sob agitação, e plaqueado em meio seletivo de LB Amp (DH5- $\alpha$ ). O meio foi previamente impregnado com 87,5  $\mu$ g/mL

de X-Gal e 0,1 mM de IPTG, para a seleção das colônias transformadas com inserto (colônias brancas) ou sem inserto (colônias azuis).

As colônias brancas foram re-isoladas em meio sólido LB Amp e os plasmídeos analisados para a presença do inserto.

### **3.6. Digestão de DNA com enzimas de restrição**

Os plasmídeos resultantes das mini-preparações foram digeridos com endonucleases de restrição para verificação da presença do inserto. O tampão, a quantidade de enzima e a temperatura de incubação da reação foram especificados pelo fabricante (Fermentas), variando as concentrações de acordo com a enzima de restrição utilizada. As digestões foram feitas por 1 a 4 h.

Após a digestão, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose, em tampão TBE, a 5 V/cm, usando como padrões de peso molecular o DNA do fago  $\lambda$  digerido com Hind III (Fermentas; 23,1 kb, 9,4 kb, 6,56 kb, 4,3 kb, 2,3 kb, 2,0 kb e 0,56 kb) e o DNA do fago  $\phi$  X-174-RF digerido com Hae III (Fermentas; 1,36 kb, 1,1 kb, 0,8 kb, 0,6 kb, 0,3 kb, 0,28 kb, 0,27 kb, 0,23 kb, 0,19 kb, 0,12 kb e 0,07 kb).

### **3.7. Preparação de plasmídeos**

3.7.1. Mini-preparação por fervura: O isolamento de plasmídeos por mini-preparação por fervura foi feito em tubos para microcentrífuga. Colônias de bactérias recombinantes isoladas foram crescidas em meio seletivo a 37 °C por 18 h a 200 rpm. Após centrifugação (20.000 x g), as células precipitadas foram ressuspendidas em 360  $\mu$ l de STET, aos quais foram adicionados 40  $\mu$ l de lisozima (10 mg/ml, Amersham Bioscience), preparada na hora do uso. A suspensão foi fervida por 1 min, e imediatamente centrifugada por 15 min (20.000 x g). O precipitado foi descartado, o DNA do sobrenadante foi precipitado pela adição de um volume de isopropanol por 15 min a -70 °C, e depositado por centrifugação. O precipitado seco foi ressuspendido em 20 a 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O contendo RNase (20  $\mu$ g/ml) e EDTA (1 mM), dissolvido a 65 °C por 10 min, incubado por 3 h a 37 °C para digestão do RNA, e armazenado a -20 °C.

3.7.2. Mini-preparação por lise alcalina: Uma colônia isolada foi inoculada em 10 mL de meio LB Amp e crescida durante a noite, sob agitação, a 37° C. As bactérias (3 mL) foram sedimentadas por centrifugação e ressuspendidas em 100 µL de uma solução composta por 50 mM de glicose, 25 mM de Tris-HCl, pH 8,0 e 10 mM de EDTA, pH 8,0. Em seguida, foram adicionados 200 µL de uma solução de hidróxido de sódio 200 mM e SDS 1 %. A mistura foi homogeneizada suavemente e após 3 a 5 min eram adicionados 200 µL de uma solução composta por 3 M de acetato de potássio e 5 M de ácido acético. O material foi incubado no gelo por 30 min e posteriormente centrifugado a 14000 rpm, por 15 min, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para tubos Eppendorf e acrescido de 300 µL de isopropanol. O DNA plasmidial foi precipitado por centrifugação (15 min, a 4° C, a 14000 rpm), lavado com 1 mL de etanol 70 % gelado e ao precipitado seco foram adicionados 50 µL de TE contendo 200 µg/mL de RNase. O material foi incubado por 1 hora a 37°C, o DNA precipitado novamente com 2,5 volumes de etanol 100 %, lavado com 500 µL de etanol 70 % e o precipitado final de DNA seco foi ressuspendido em 30 µL de água estéril.

### **3.8. Obtenção do extrato proteico total da fase leveduriforme de *P.brasiliensis***

O extrato proteico total de *P. brasiliensis* foi obtido a partir das modificações introduzidas por Moraes (2003) nos protocolos sugeridos por Srikantha et al. (1995) para *Candida albicans* e Tosco et al. (1997) para *Histoplasma capsulatum*. Células leveduriformes do fungo crescidas sob agitação em meio YPDmod por tempos variados foram recolhidas por centrifugação (3000xg por 10 min), filtradas em papel de filtro comum, recolhidas em tubos e lavadas 3 vezes com 1 volume de PBS. Para cada mL de células úmidas foram adicionados 2 mL de uma solução de lise contendo 200 mM de Tris-HCl pH 8,0, 400 mM de  $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$ , 10 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM de EDTA, 10 % de glicerol, 1 mM de phenyl methyl-sulphonyl fluoride (PMSF), 1 mM de orto-fenantrolina e 7 mM  $\beta$ -mercaptoetanol. As células foram lisadas pela adição de pérolas de vidro (1:1, células:pérolas, v:v) e agitação vigorosa em vórtex (10 ciclos de 30 seg, intercalados com 30 seg de incubação em gelo). Os debris celulares foram separados por centrifugação (3.000xg por 15 min) e o sobrenadante foi submetido

a uma ultracentrifugação de 100.000xg por 3 h. O sobrenadante obtido foi submetido à diálise contra uma solução contendo 20 mM de HEPES pH 8,0, 5 mM de EDTA, 20 % de glicerol, 1 mM de PMSF, 1 mM de fenantrolina e 7 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol e armazenado a  $-20^{\circ}$  C para posterior utilização nos experimentos.

### **3.9. Ensaio de “DNase I footprinting”**

Para a realização dos ensaios de “DNase I footprinting”, o kit “Core Footprinting System” (Promega) foi utilizado. Aproximadamente 1 $\mu$ g de DNA correspondente ao segmento analisado da região 5' intergênica proximal ao ATG do gene PbGP43 (obtido por PCR usando oligonucleotídeos flanqueando a região de interesse) foi usado na reação de incorporação de fosfato radioativo nas extremidades terminais. Em um tubo Eppendorf foram adicionados: 15  $\mu$ L da solução de DNA, 1  $\mu$ L de tampão kinase (70 mM Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM MgCl<sub>2</sub> e 5 mM DTT), 2  $\mu$ L da enzima T4 polinucleotídeo kinase (Promega) e 1  $\mu$ L de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] dATP (10mCi/ml). A reação foi incubada a 37 $^{\circ}$  C por 35 min, adicionada de mais 1  $\mu$ L da enzima e incubada por outros 35 min à mesma temperatura.

O terceiro passo foi a remoção da extremidade 3' do fragmento de DNA, para que apenas uma delas ficasse marcada.

No mesmo tubo da reação de marcação foram adicionados: 5 $\mu$ L do tampão Y<sup>+</sup>/Tango<sup>TM</sup>, da Fermentas (33 mM Tris-acetato pH 7.9, 10 mM acetato de magnésio, 66 mM acetato de potássio e 0,1 mg/mL BSA), 2  $\mu$ L da enzima de restrição Spe I (40 U) e água suficiente para completar 50  $\mu$ L finais. A reação foi incubada a 37 $^{\circ}$  C por 2 horas. Em seguida, 1  $\mu$ L de NaCl 5 M foi adicionado à reação e o DNA extraído 2 vezes com uma solução contendo fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1). A fase aquosa foi separada por centrifugação (14000 x g por 5 min) e o DNA precipitado a  $-20^{\circ}$  C por 1 hora após adição de 2,5 volumes de etanol 100%. A suspensão foi centrifugada a 14000 x g por 20 min, o precipitado seco à temperatura ambiente, diluído em 100  $\mu$ L de tampão TE e mantido a 4 $^{\circ}$  C.

A última etapa do ensaio de “DNase I footprinting” corresponde à incubação da sonda com o extrato proteico. Para essa etapa, duas reações foram

necessárias. Em um primeiro tubo Eppendorf foram adicionados: 10 µL de tampão de ligação (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM KCl, 12.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 20% glicerol e 1 mM DTT), 35 µL de água e 5 µL da sonda previamente marcada. Essa reação corresponde ao controle. Em um outro tubo Eppendorf foram adicionados: 10 µL de tampão de ligação, 5 µL de sonda e diferentes quantidades de extrato proteico total em um volume máximo de 35 µL. Ambos os tubos foram mantidos no gelo por 40 min.

Depois da incubação em gelo, as soluções foram preparadas para o tratamento com a enzima RQ1 DNase I (Promega). Inicialmente as soluções foram incubadas à temperatura ambiente por 1 min com 50 µL da solução de Ca<sup>+2</sup>/Mg<sup>+2</sup> (5 mM CaCl<sub>2</sub> e 10 mM MgCl<sub>2</sub>). Depois, 3 µL da enzima RQ1 DNase I (diluída 20x em Tris-HCL 10 mM, pH 8,0) foram adicionados, misturados gentilmente, e incubados por 1 min também à temperatura ambiente. Por último, a reação foi interrompida pela adição de 90 µL da solução final (200 mM NaCl, 30 mM EDTA, 1% SDS e 100 µg/mL de RNA de levedura), previamente aquecida a 37° C. A reação foi extraída com ~200 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e a separação de fases feita por centrifugação (14000 x g por 5 min). A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e precipitada com 2,5 volumes de etanol 100% a -20° C por pelo menos 1 hora. A solução foi centrifugada a 14000 x g por 20 min, o sobrenadante descartado e o pellet seco à temperatura ambiente. Depois de completamente seco, o pellet foi ressuspendido em 10 µL de tampão de amostra (0.1 M de NaOH:formamida, 1:2 v:v; 0.1% xileno cianol e 0.1% azul de bromofenol), aquecido a 95° C por 3 min e rapidamente colocado no gelo por no mínimo 2 min. Um volume correspondente a 40000 cpm desta solução foi aplicado em um gel de sequência 6%. O gel foi corrido a 2100 V e 80 Watts em tampão TBE 1x até que o azul de bromofenol atingisse a extremidade inferior da placa. O gel foi retirado do aparato, seco e exposto em um filme de raios-X (X-Omat, Kodak) a -70°C.

### **3.10. Ensaios de EMSA (“eletrophoretic mobility shift assay”)**

Os ensaios de EMSA foram feitos de acordo com as recomendações do fabricante do kit “Gel Shift Assay Systems” (Promega). A primeira etapa do ensaio

de EMSA foi o anelamento dos oligonucleotídeos simples fita complementares. Para tal, em um microtubo de 500  $\mu\text{L}$  foram adicionadas e misturadas quantidades equivalentes (50  $\mu\text{L}$  de uma solução 10  $\mu\text{M}$ ) dos oligonucleotídeos senso e anti-senso. A reação ocorreu após incubação por 10 min a 95  $^{\circ}\text{C}$  e resfriamento lento à temperatura ambiente.

A segunda etapa do ensaio foi a marcação radioativa dos oligonucleotídeos dupla fita (1,75 pmol/ $\mu\text{L}$ ) com [ $\gamma\text{-P}^{32}$ ] dATP. Em um microtubo foram adicionados 2  $\mu\text{L}$  do oligonucleotídeo dupla fita (3,5 pmol), 2  $\mu\text{L}$  de tampão da enzima T4 polinucleotídeo kinase (70 mM Tris-HCl, pH 7,6, 10 mM  $\text{MgCl}_2$  e 5 mM DTT), 1  $\mu\text{L}$  da enzima T4 polinucleotídeo kinase (Promega), 1  $\mu\text{L}$  de [ $\gamma\text{-P}^{32}$ ] dATP (10mCi/ml) e 14  $\mu\text{L}$  de água. A reação foi incubada por 30 min a 37  $^{\circ}\text{C}$ , interrompida pela adição de 1  $\mu\text{L}$  de EDTA 0,5 M. Foram adicionados 25  $\mu\text{L}$  de TE para purificação do oligonucleotídeo marcado em uma coluna Sephadex G-25 (Amersham pharma) por centrifugação a 12,000 rpm por 1 min. Por último, as cpm desta solução contendo a sonda foi medida.

A terceira etapa do ensaio foi a incubação das sondas com o extrato proteico. Em um microtubo foi adicionado um volume contendo 10  $\mu\text{g}$  de extrato proteico total (máximo de 3,5  $\mu\text{L}$ ), 1,5  $\mu\text{L}$  de poly dl-dC (1,25 mg/mL), 1,5  $\mu\text{L}$  de BSA (10 mg/mL), 3  $\mu\text{L}$  de uma solução tampão 5x concentrada (125 mM de HEPES pH 7,5, 5 mM de EDTA, 5 mM de DTT e 50 % de glicerol) e água suficiente para completar 12  $\mu\text{L}$ . Essa mistura foi incubada por pelo menos 15 min no gelo e em seguida, um volume do oligonucleotídeo dupla fita marcado equivalente a 60.000 cpm foi adicionado na presença ou não de competidores totalizando 15  $\mu\text{L}$  de volume final. Os competidores (específicos ou não-específicos) foram adicionados em quantidades molares que variaram entre 50X a 100X. A reação foi incubada por 15 min a 37  $^{\circ}\text{C}$ . O produto das reações foi resolvido em gel de poliacrilamida 6 % (30:1 acrilamida/bis-acrilamida) em tampão TBE 0,5X, a 20 ma por 45 min. Os géis foram secos em papel de filtro e expostos em um filme de raios-X (X-Omat, Kodak) a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### **3.11. Extração de DNA de *P. brasiliensis***

Para extração de DNA de *P. brasiliensis*, células fúngicas leveduriformes com 5 dias de crescimento em YPD sólido foram repicadas em 100 mL de meio líquido para obtenção de um pré-inóculo (4-7 dias). Este foi transferido para 900 mL de meio fresco e cultivado por outros 7-8 dias.

A cultura foi filtrada em filtro de papel para separar as células do sobrenadante. As células fúngicas foram conservadas a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A extração de DNA foi feita segundo o método descrito por Cisalpino et al. (1996), com modificações.

Aproximadamente 10 mL de células fúngicas congeladas foram lisadas mecanicamente por maceração em gral na presença de nitrogênio líquido até a formação de um pó. Este foi ressuscitado em 25 mL de uma solução contendo 50 mM de Tris, 100 mM de EDTA, 5 % de sarcosil, 500  $\mu\text{g/mL}$  de proteinase K e as células lisadas por 15 min em um Potter-Elvehjen. O material foi incubado por 2 h a  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  e centrifugado para deposição de debris celulares. O DNA do sobrenadante foi semi-purificado com 4 extrações de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (50:49:1). À fase orgânica da segunda extração, foi adicionado o mesmo volume de uma solução de 0,1 M de Tris-HCl pH 9,0, 100 mM de EDTA. As duas fases aquosas foram reunidas e centrifugadas (10.000xg, 30 min) a fim de precipitar os componentes insolúveis da parede celular. Um volume de isopropanol foi adicionado ao sobrenadante e o material foi mantido durante a noite a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para facilitar a precipitação do DNA. O precipitado seco foi ressuscitado em TE (0,5 mL), dissolvido a  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 10 min, e tratado com RNase (100  $\mu\text{g/mL}$ ) por 1 h, a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, uma nova extração com fenol-clorofórmio e precipitação do DNA com isopropanol foi feita (como descrito anteriormente). O produto final foi dosado por espectrofotometria num aparelho Gene Quant (Pharmacia) e analisado em gel de agarose.

### **3.12. “Southern blotting”**

Todas as etapas do processo foram realizadas segundo Sambrook et al., 1989. Aproximadamente 10  $\mu\text{g}$  de DNA total de *P. brasiliensis* foram digeridos com diferentes enzimas de restrição e submetidos a uma corrida eletroforética de voltagem igual a 30 V por 24 horas em gel de agarose 0,8 %. A altura das bandas

foi medida e o gel foi lavado com tampão de depurinação por 20 min, tampão de denaturação por 30 min e tampão de neutralização por mais 30 min. O DNA presente no gel foi transferido para uma membrana de nylon Hybond<sup>+</sup>™ (Amershampharmacia Biotech) e fixado com luz UV em um aparelho “GS Gene Linker™” (BioRad) usando 100 mJoules de energia.

A segunda etapa do processo foi a marcação da sonda. Foi utilizado o kit “RadPrime DNA Labelling System” (Gibco, BRL) e todas as recomendações do fabricante foram seguidas. Após a marcação, os fragmentos de DNA marcados foram separados dos nucleotídeos livres não incorporados através de uma coluna Sephadex G-50 (Amersham) equilibrada em tampão TE. A atividade específica ideal da sonda deve ser em torno de  $1 \times 10^9$  cpm/ $\mu$ g.

A sonda foi aquecida a 100 °C por 5 min, colocada no gelo por 2 min, adicionada à solução de hibridização e incubada a 42 °C com a membrana contendo o DNA digerido durante pelo menos 12 horas. Após a hibridação, a membrana foi lavada em condições de alta estringência com solução de SSC 2X e SDS 0,1 % a 42 °C por 30 min, SSC 1X e SDS 0,1 % a 55 °C por 30 min e com solução SSC 0,1X e SDS 0,1 % a 55 °C, também por 30 min. Depois de lavada, a membrana foi envolvida em parafilme e exposta em um filme de raios-X (X-Omat, Kodak) à temperatura ambiente pelo tempo necessário.

### **3.13. Ensaios de PCR para a clonagem da região 5' intergênica do PbGP43**

#### **3.13.1. PCR inverso**

A técnica de PCR inverso permite amplificar e clonar sequências de DNA sem utilizar as técnicas tradicionais de clonagem (Ochman et al., 1988). Uma reação de PCR tradicional é usada para amplificar sequências situadas entre dois oligonucleotídeos iniciadores que estão orientados um em direção ao outro. No PCR inverso, esses oligonucleotídeos estão orientados em direções opostas, ou seja, um se afastando do outro e ambos anelam-se no fragmento de interesse próximos ao limite entre a sequência conhecida e a sequência que se deseja conhecer. A técnica consiste em digerir DNA genômico com uma enzima de restrição, circularizar os fragmentos (formando monômeros) com a enzima T4

ligase e fazer um PCR com os oligonucleotídeos anelando em direções opostas; desta forma, a região desconhecida será teoricamente amplificada.

Os ensaios foram desenvolvidos segundo Ochman et al. (1988) e modificados em nosso laboratório. Aproximadamente 15 µg de DNA total do fungo foram digeridos com BamHI. O DNA foi precipitado usando 2,5 volumes de etanol 100%, ressuspendido em água e submetido a uma corrida eletroforética de voltagem igual a 30 V por 24 horas em gel de agarose 0,8 %. O segmento do gel correspondente à posição do fragmento de interesse foi excisado, purificado usando o kit “Perfectprep Gel Cleanup” (Eppendorf) e quantificado. Aproximadamente 250 ng desse DNA foi usado em reações de ligação intramolecular, para a circularização, com 20 U da enzima T4 ligase (Fermentas) em um volume final de 500 µL. A concentração deve ser de no máximo 0,5 ng de DNA por µL de reação, a qual teoricamente favorece a formação de círculos monoméricos. O tempo de reação foi de 4 horas à temperatura de 22° C. Após a reação, o DNA foi extraído com 1 volume de fenol:clorofórmio (1:1), extraído duas vezes com clorofórmio (para a retirada do fenol, pois o mesmo interfere com a atividade da DNA polimerase) e foi precipitado com 2,5 volumes de etanol 100%. Essas etapas foram repetidas até a obtenção de aproximadamente 2 µg de DNA circularizado. Em seguida, as reações de PCR foram feitas usando as seguintes condições: 100 ng de DNA, 5 µL de tampão (50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de Tris-HCl, pH 9,0), 3% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO), 0,2 mM de dNTPs, 1 µM de cada oligonucleotídeo e 1,5 U da “Long PCR Enzyme Mix” (Fermentas).

As amplificações foram feitas em um termociclador Perkin Elmer e as condições foram as seguintes: 1 ciclo de 94° C (4 min) desnaturação inicial; 10 ciclos de 94° C (45 s) de desnaturação, 68° C (45 s) de anelamento e também 68° C (9 min) para alongação. Em seguida, foram executados 25 ciclos com as mesmas condições diferindo apenas no tempo de alongação que agora foi de 9 min e 10 s, seguidos por uma alongação final de 15 min. O produto da reação foi analisado em gel de agarose 0,8%.

### **3.13.2 PCR usando os oligonucleotídeos GPI**

As reações de PCR usando os oligonucleotídeos GPI foram feitas usando 1,5 U da enzima “Long PCR Enzyme Mix” (Fermentas), 0,2 µM de cada

oligonucleotídeo iniciador e 0,2 mM de cada dNTP em tampão 1X fornecido pelo fabricante (Fermentas).

As condições das reações de PCR estão resumidas na tabela abaixo.

Tabela 3: Resumo das condições e dos oligonucleotídeos das reações de PCR usados na clonagem da região 5' intergênica do gene PbGP43.

Reação	DNA(ng)*	Temp.(°C)	Ciclos	Reação	DNA(ng)	Temp.(°C)	Ciclos
1- PCRia e GPI-1	6	68	34	21- GPI-1 e 2134	3	60	34
2- PCRib e GPI-1	6	68	34	24- GPI-1 e 2134	3	68	34
3- ET4 e GPI-3	6	52	34	26- GPI-4 e ET2+3	30	52	34
4- ET4 e GPI-4	6	52	34	27- GPI-3 e ET2+3	30	52	34
6- PCRia e GPI-1	7,5	68	34	28- GPI-3 e PCRib	30	68	34
11- GPI-4 e ET4	10	50	34	29- GPI-1 e PCRib	30	68	34
14- GPI-3 e ET4	10	50	34	30- GPI-4 e ET2+3	30	52	34
17- GPI-4 e ET4	15	50	34	31- GPI-3 e PCRia	30	65	34
18- PCRia	15	68	34	32-GPI-4 e ET4	15	52	34
19- PCRia e GPI-1	20	65	38				

\* DNA total do isolado Pb339 de *P. brasiliensis*.

### 3.14. Sequenciamento automático de DNA

As amostras de DNA foram seqüenciadas no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo-USP utilizando um aparelho MegaBACE 1000 e o sistema de sequenciamento foi o DYEnamic ET Dye Terminator kit.

### 3.15. Sequenciamento manual de DNA

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

Utilizou-se o kit comercial "T7 Sequencing" (Amersham Bioscience), seguindo-se os protocolos para sequenciamento de DNA dupla fita sugeridos pelo fabricante.

Para reação, denaturou-se 32  $\mu$ l do DNA molde (1,5 a 2,0  $\mu$ g) pela adição de 8  $\mu$ l de NaOH 2 M. A mistura foi incubada à temperatura ambiente por 10 min para denaturação, e o DNA precipitado (15 min a  $-70^{\circ}\text{C}$ ) pela adição de 7  $\mu$ l de acetato de sódio 3 M (pH 4,8), 4  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O bidestilada estéril e 120  $\mu$ l de etanol 100 %. Após centrifugação, o precipitado seco foi ressuspenso em 10  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O

bidestilada estéril. A esse volume adicionou-se 2  $\mu$ l de cada primer (5,0  $\mu$ l de estoque) e 2  $\mu$ l de tampão de anelamento [1 M de Tris-HCl (pH 7,6), 100 mM de  $MgCl_2$  e 160 mM de DTT]. Em seguida, o material foi incubado por 5 min a 65  $^{\circ}C$ , 10 min a 37  $^{\circ}C$  e 5 min à temperatura ambiente. A esse volume adicionou-se 3  $\mu$ l de “Labelling Mix” dATP [1,375  $\mu$ M de cada dCTP, dGTP e dTTP, e 333,5 mM de NaCl], 1  $\mu$ l de [ $\alpha$ - $^{35}S$ ] dATP (12,5 mCi/ml; 1250,0 Ci/mmol) e 3 U de T7 DNA polimerase, para o alongamento do DNA por 5 min, a temperatura ambiente.

Microtubos foram previamente preparados com 2,5  $\mu$ L das misturas A, T, C e G, as quais contêm 40  $\mu$ M de Tris-HCl (pH 7,6) e 50 mM de NaCl, além dos demais componentes que variaram conforme a base: A (840  $\mu$ M de cada dCTP, dGTP e dTTP; 93,5  $\mu$ M de dATP; 14  $\mu$ M de ddATP), C (840  $\mu$ M de cada dATP, dGTP e dTTP; 93,5  $\mu$ M de dCTP; 17  $\mu$ M de ddCTP), G (840  $\mu$ M de cada dCTP, dATP e dTTP; 93,5  $\mu$ M de dGTP; 14  $\mu$ M de ddGTP) e T (840  $\mu$ M de cada dATP, dGTP e dCTP; 93,5  $\mu$ M de dTTP; 14  $\mu$ M de ddTTP). A eles foram adicionados 4,5  $\mu$ l da reação de alongamento e incubados a 37 $^{\circ}C$  por 5 min. As reações foram interrompidas pela adição de 5  $\mu$ l de solução de terminação [0,3 % DNA simples fita de M13mp18 em 50  $\mu$ l de TE].

Antes de serem aplicadas no gel de sequenciamento, as amostras foram desnaturadas a 75 – 80  $^{\circ}C$ , por 2 - 10 min, e imediatamente colocadas em gelo. As placas de vidro foram lavadas e limpas com  $H_2O$ , detergente e etanol. As placas secas e siliconizadas (Repel-Silane, LKB), foram montadas com espaçadores de teflon de 0,4 mm de espessura, segundo as instruções do fabricante.

A solução de gel acrilamida-uréia-TBE foi vertida nas placas e distribuída homogeneamente. Após polimerização, as placas foram montadas na cuba eletroforética para uma pré-corrída a 120 W, até a temperatura de 50  $^{\circ}C$  ser atingida.

Os produtos da reação de sequenciamento foram aplicados ao gel na sequência A, C, T, G e a eletroforese efetuada a 50  $^{\circ}C$ . Após eletroforese, o gel foi fixado a um papel de filtro, seco por 2 horas a 80  $^{\circ}C$  e exposto a filme de raio X (X-Omat, Kodak) a -70  $^{\circ}C$ .

### 3.16. Curvas de crescimento de células leveduriformes de *P. brasiliensis* e induções

Para a análise dos níveis de transcrito do gene PbGP43 em função do tempo de crescimento, as células do fungo foram crescidas a 36 °C sob agitação em meio F12/glicose por 12 dias, a partir de um pré-inóculo cultivado por 5 dias no mesmo meio. As células foram retiradas de 2 em 2 dias, contadas, sua viabilidade analisada usando o corante vital Tripán Blue e o pH do meio foi avaliado.

Para a análise dos níveis de transcrito do gene PbGP43 após exposição do *P. brasiliensis* a diferentes estímulos, ou para extração de proteínas totais, as células do fungo foram crescidas a 36 °C sob agitação (a partir de culturas estacionárias) e estimuladas por 30 min nessas condições da seguinte forma:

- a) indução com glicose: as células foram crescidas em meio F12 não suplementado e a elas foi adicionada o açúcar em concentrações finais de 1,5 e/ou 3%.
- b) privação de glicose: as células foram condicionadas em meio F12/glicose, lavadas por centrifugação com meio F12 e incubadas nesse meio por 30 min.
- c) indução com glicose ao longo do tempo: as células foram cultivadas em meio F12/glicose e a elas foi adicionada glicose para uma concentração final de 3%.
- d) indução com sulfato de amônio: as células foram cultivadas em meio F12/glicose e a elas foi adicionado sulfato de amônio em concentrações finais de 5 e 10 mM.
- e) privação de sulfato de amônio: parte das células induzidas com sulfato de amônio 10 mM foram lavadas com F12/glicose para retirar de todo o sulfato de amônio ( $-(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) e recolhidas após 30 min sob agitação a 36°C.
- f) indução com soro fetal bovino (SFB): as células foram cultivadas em meio F12/glicose e a elas foi adicionado SFB para uma concentração de 2 % (v/v).
- g) estresse osmótico: as células foram cultivadas em meio F12/glicose e induzidas pela adição de NaCl 0,6 M (concentração final).

- h) indução com glutamina: as células foram cultivadas em meio F12/glicose e a elas foi adicionada glutamina na concentração final de 10 mM.

O tempo de crescimento de cada isolado antes do estímulo foi variado. Tanto para os estímulos quanto para a curva de crescimento, as células fúngicas foram processadas para a extração do RNA total como descrito a seguir. Para extração de proteínas totais, foi usado Pb339 cultivado por 4 dias antes do estímulo com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ou NaCl. Células preparadas para esse fim foram recolhidas por centrifugação (3000xg por 5 min), lavadas duas vezes com PBS gelado e processadas para a extração de proteínas como descrito anteriormente.

### **3.17. Extração de RNA total em pequena escala de células leveduriformes de *P. brasiliensis***

A extração de RNA foi feita a partir de cerca de 0,1 mL de células fúngicas crescidas nas diferentes condições descritas anteriormente. As células foram lisadas mecanicamente por agitação vigorosa com pérolas de vidro (0,1 mL) na presença de 0,7 mL de reagente de TRIzol (Invitrogen) durante 10 min. Após 10 min em repouso à temperatura ambiente, a mistura foi centrifugada (14.000 x g) por 10 min a 4 °C para a remoção dos debris celulares. Para cada 0,75 ml de sobrenadante recuperado foram adicionados 0,2 ml de clorofórmio. A mistura foi agitada, deixada em repouso por 10 min e centrifugada a 14.000 rpm por 15 min. A fase superior foi fracionada em fenol (pH 4,3): clorofórmio : álcool isoamílico (50 : 49 : 1). A precipitação do RNA foi feita por 16 h a -20 °C pela adição à fase aquosa final de 0,25 ml (para cada 0,75 ml de TRIzol inicial) de isopropanol e 0,25 ml de uma solução de citrato de sódio 1,2 N/cloreto de sódio 0,8 N. O precipitado foi recolhido por centrifugação a 14.000 xg por 15 min, lavado com etanol 70%, seco e ressuspendido em água esterilizada. O RNA foi quantificado no aparelho Gene Quant (Amersham Bioscience), analisado em gel de formaldeído e preparado para o tratamento com a enzima DNase I.

A reação para a eliminação do DNA contaminante das preparações de RNA foi feita em um volume final de 10 µl, onde a quantidade de RNA total usada em cada reação e 2 U de DNase I (Promega) foram incubados à 37 °C por 30 min na presença 1 µl de tampão fornecido pelo fabricante (200 mM de Tris pH 8,3,

500 mM de KCl e 20 mM de MgCl<sub>2</sub>). A reação foi interrompida por aquecimento por 10 min a 65 °C. O RNA livre de DNA foi mantido a -70 °C até o momento do uso.

### **3.18. Síntese da fita de DNA complementar a partir do RNA total**

O DNA complementar foi feito com o “SuperScript II RT-PCR System” (Invitrogen). A primeira fita foi sintetizada em volume final de 20 µL, a partir de RNA total livre de DNA (2 ou 5 µg) e com 500 ng do oligonucleotídeo iniciador (oligo dT) incubados a 65 °C por 5 min e 1 min no gelo. Em seguida, foi adicionado o tampão de síntese do cDNA (0,05 M Tris-HCl, pH 8,3, 0,075 M KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>), 0,01 M DTT, 1 mM dNTP, 2 U/mL de RNaseOUT e 50 U da transcriptase reversa (SuperScript) e a mistura incubada a 42 °C por 50 min e 80 °C por 15 min para o fim da reação. O cDNA resultante foi diluído para uma concentração final de 20 ng/µL. A primeira fita de cDNA serviu como molde em reações de PCR em tempo real com os oligonucleotídeos iniciadores para o gene PbGP43 e  $\alpha$ -tubulina.

### **3.19. Ensaios de RT-PCR em tempo real**

O kit utilizado nos estudos de quantificação de transcrito foi o Sistema Sybr Green (Applied Biosystems). Este sistema utiliza um fluoróforo que se intercala nas moléculas de cDNA dupla fita no momento da polimerização. Todos os procedimentos foram realizados seguindo as instruções do fabricante.

Para cada reação de quantificação foram adicionados 2 µL de cada oligonucleotídeo específico a 1 µM, 5 µL da Master Mix do sistema Sybr Green (Applied Biosystems) e 1 µL de cDNA (20 ng/µL). As condições de ciclagem foram: 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  $\alpha$ -tubulina de *P. brasiliensis*. Ao final da reação foi 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 do sistema foi monitorada durante as etapas de anelamento a 60 °C e analisadas com relação aos seus correspondentes ciclos. Reações paralelas foram 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 foram visualizados utilizando o programa “Sequence Detector Software” e então exportados para o programa Microsoft Excel, onde os ciclos lineares (Ct) foram analisados em relação ao logaritmo da quantidade inicial de moléculas alvos. A equação da reta foi determinada através de análise de regressão linear. O valor do  $R^2$  para cada conjunto dos oligonucleotídeos e suas respectivas sondas foi também calculado.

### **3.20. Análise estatística**

A análise estatística foi realizada com Teste T de Student's do programa Microsoft Excel, do software Microsoft Office, considerando os valores de  $p < 0,05$  como significativos. Os valores de média e desvio padrão foram obtidos utilizando o mesmo programa.

### **3.21. Construção do cassete pANGP1-3:: $\beta$ -galactosidase**

As construções para os ensaios de expressão de gene repórter foram feitas no vetor pAN923-41B (van Gorcon et al., 1986). Fragmentos truncados da região 5' intergênica do PbGP43 foram amplificados por PCR usando os oligonucleotídeos iniciadores GR1, GR2 e GR3 (senso) e GRN (anti-senso), os quais contêm sítios de restrição para a enzima BamHI nas extremidades 5'. O oligonucleotídeo iniciador GRN (anti-sense) apresenta um ATG a jusante do sítio de restrição BamHI. Os fragmentos de PCR foram clonados no vetor pGEM-T easy (Promega). Depois de confirmada a presença do inserto neste vetor, as construções foram digeridas com a enzima de restrição BamHI e cada um dos fragmentos subclonado no vetor pAN923-41B, previamente digerido com a mesma enzima de restrição. A confirmação da subclonagem foi realizada através da digestão com a mesma enzima, porém a orientação da clonagem foi verificada usando as enzimas EcoRI (presente nos insertos) e PstI (presente no início do gene lacZ do vetor) e também por sequenciamento.

### **3.22. Transformação de *A. nidulans* com o cassete pANGP1-3:: $\beta$ -galactosidase**

A linhagem WG355 de *A. nidulans* (van Gorcon et al., 1986), foi transformada com os plasmídios contendo o cassete pANGP1-3:: $\beta$ -galactosidase. A mesma linhagem foi transformada com o plasmídio sem o inserto para ser usada como controle. Esta linhagem recebeu o nome de AGB246 (Lima et al., 2005).

Um inóculo de conídios da linhagem a ser transformada foi incubado a 37°C por 16 horas em 50 ml de meio YG acrescido de suplementos apropriados com agitação (150 rpm). Os tubos germinativos foram coletados e, em seguida, ressuspensos na seguinte solução de protoplastização: 20 ml de Solução 1 de Protoplastização, 20 ml de Solução 2 de Protoplastização, 6,5 ml de Sulfato de Magnésio 1 M, 400 mg de soroalbumina bovina (BSA) (Sigma) e 300 mg de Glucanex® (Novo Nordisk Ferment, Dinamarca). A enzima Glucanex apresenta uma mistura de atividades, incluindo glucanase, quitinase e protease, utilizada na digestão da parede celular dos tubos germinativos, na presença do estabilizador osmótico BSA. Os protoplastos foram obtidos após 5 horas de incubação a 30°C sob agitação (80 rpm), sendo então separados dos restos celulares por filtração em lã de vidro estéril. Os protoplastos foram coletados por centrifugação a 3200 g por 10 minutos e lavados duas vezes com Solução 3 de Protoplastização gelada para se retirar o excesso de enzimas. Para equilibrar osmoticamente os protoplastos, os mesmos foram ressuspensos no volume apropriado de Solução 5 de Protoplastização, e incubados no gelo por 10 minutos. Para a transformação foram adicionados 20  $\mu$ g do DNA em 100  $\mu$ l de protoplastos, e 50  $\mu$ l da Solução 4 de Protoplastização contendo PEG para promover a fusão das membranas dos protoplastos. O DNA entra no protoplasto na forma de um precipitado de cálcio, também presente na Solução 4, provavelmente através de transporte vesicular. Após incubação dessa solução em gelo por 20 minutos, adicionou-se 1ml da Solução 4 de Protoplastização com posterior incubação a temperatura ambiente por 20 minutos. A suspensão de protoplastos foi transferida para 30 ml de meio completo top Agar acrescido de KCl e semeada em meio de regeneração apropriado (biotina 1  $\mu$ g/ mL) a 37°C, até o aparecimento de colônias transformantes.

### **3.23. Isolamento dos transformantes**

Os transformantes foram isolados em meio de cultura mínimo contendo biotina (1 µg/ mL). As colônias isoladas foram transferidas para nova placa com meio de cultura para a produção de esporos.

Os esporos foram então suspensos em água e filtrados em lã de vidro estéril para novo inóculo.

### **3.24. Ensaio para avaliar a atividade da β-galactosidase**

**3.24.1 Cor das colônias:** Em placas de Petri contendo meio de cultura mínimo 2X glicose, biotina (1 µg/ mL) e x-gal (40 µg/ml), foram inoculados esporos de colônias isoladas de transformações com os plasmídios contendo os insertos, sendo que 50 % na presença de sulfato de amônio (10 mM). Como controle, foi utilizada a cepa AGB246.

A cor das colônias nos forneceu dados sobre a atividade da β-galactosidase, indicando os candidatos que apresentavam inserto.

**3.24.2. Extração de proteínas:** esporos das linhagens transformantes contendo os segmentos truncados da região 5' intergênica do PbGP43 (obtida a partir do ensaio em placas de Petri) e da linhagem transformante contendo apenas o vetor sem inserto (AGB246) foram inoculados em 50 ml de meio de cultura mínimo líquido contendo biotina (1 µg/ mL), a 37°C com agitação por 24 horas na presença e ausência de 10 mM de sulfato de amônio. Os esporos que cresceram na presença do sal por 24 h foram coletados para servirem de controle e o restante das células foi lavado com PBS 1x, ressuspensos em novo meio depletado do sal e em seguida coletados 30 min e 24 h depois.

O micélio foram coletados por filtração e congelados em nitrogênio líquido. A extração das proteínas foi realizada através da trituração do micélio em nitrogênio líquido, utilizando cadinho e pistilo. Após a trituração, foi adicionado 1 mL de tampão de extração de proteínas (Materiais e Métodos) e inibidores de Protease. As amostras foram incubadas sob agitação durante 10 minutos (intercalando 30 s de agitação no vórtex com 30 s de incubação no gelo) e centrifugadas a 20.000 x g, a 4°C durante 30 min. O sobrenadante foi separado do sedimento e imediatamente usado nos ensaios de quantificação da atividade de β-

galactosidase. O sedimento foi descartado. A concentração de cada amostra foi determinada pelo método de Bradford. A qualidade da solução de proteínas foi verificada em gel poliacrilamida.

**3.24.3 Dosagem protéica:** 2 a 5  $\mu$ L de extrato protéico de micélios crescidos com e sem sulfato de amônio foram incubados a 37°C durante 15 a 50 minutos com 1 mL de tampão Z (0,5 X) na presença de 0,2 mL de o-nitofenil- $\beta$ -D-galactose (ONPG) solubilizado em tampão fosfato de sódio (0,1 M) pH 7 na concentração de 3 mg/ mL. Após a incubação, foi adicionado 0,25 mL de tampão carbonato de sódio (2M) para interromper a reação. Os tubos foram centrifugados durante 15 min a 20.000 x g. Sua absorbância foi lida em espectrofotômetro a 420 nm e 550 nm.

Para aplicação, os valores das leituras foram convertidos em Unidades Miller (MILLER, 1972)

$$U = 1000 \times [(DO_{420} - 1,75 \times DO_{550})] / (t \times v \times DO_{600})$$

Onde  $DO_{420}$  foi a medida da absorbância da solução de proteínas em 420nm, t foi o tempo da reação em minutos, v foi o volume em mL do sobrenadante protéico usado no ensaio e  $DO_{600}$  foi considerado 1.

### **3.25. Extração de DNA genômico de *A. nidulans***

Para a produção de biomassa de micélio, esporos de linhagens de *A. nidulans* foram inoculados em meio de cultura completo e incubados por aproximadamente 16 horas a 37°C com agitação. Os micélios foram coletados por filtração a vácuo e congelados imediatamente em nitrogênio líquido para serem triturados com pistilo e cadinho. Para cerca de 40 mg de micélio foram acrescentados 500  $\mu$ L de Tampão de Extração de DNA. Foi adicionado em cada amostra um volume igual de fenol:clorofórmio (1:1) e agitado mecanicamente em agitador de tubos por 10 minutos a fim de que ocorresse precipitação de proteínas e quebra das membranas e paredes celulares. Para sedimentar as proteínas precipitadas e debris celulares as amostras foram centrifugadas a 20.000 x g por 15 minutos. A fase aquosa (sobrenadante) foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga onde foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio para a retirada de resíduos de fenol ou clorofórmio. As amostras foram centrifugadas a

20.000 x g por 5 minutos e a fase aquosa superior foi novamente transferida para outro tubo de microcentrífuga onde foi adicionado 0,54 volume de isopropanol para precipitar o DNA. A amostra foi centrifugada a 20.000 x g por 1 minuto e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi lavado com etanol 70% e centrifugado novamente a 20.000 x g por 1 minuto. O sobrenadante foi novamente descartado e o resíduo de etanol evaporado na temperatura ambiente por 30 minutos. O sedimento foi ressuscitado em água MilliQ estéril e tratado com RNase.

### **3.26. Cepas bacterianas e preparo de células competentes**

As cepas bacterianas selvagens e recombinantes eram mantidas em meio LB com repiques regulares ou congeladas a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  na presença de 20% de glicerol.

A cepa bacteriana utilizada nos ensaios de transformação e manutenção de plasmídeos foi a *Escherichia coli* DH5- $\alpha$ , genotipo  $F^{-}$ ,  $\phi 80d$  lacZ- $\Delta$ M15,  $\Delta$ -(lac ZYA-arg F) U169, end A1, rec A1, hsd R17 ( $rk^{-}$ ,  $mk^{+}$ ), deo R, thi-1, sup E44,  $\lambda^{-}$ , gyr A96, relA1 (Hanahan, 1985).

Bactérias competentes foram preparadas pelo método do cloreto de cálcio (Sambrook et al, 1989) modificado. Uma colônia isolada foi crescida em 3 ml de meio LB sob agitação, por 16 h a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Desse crescimento, 1 ml foi inoculado em 100 ml do mesmo meio e crescido sob agitação até atingir uma  $A_{550} = 0,35 - 0,60$ . As células foram transferidas para tubos de centrífuga estéreis, colocadas imediatamente no gelo (10 – 60 min) e precipitadas por centrifugação (3000 x g, 15 min) a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O precipitado bacteriano foi gentilmente ressuscitado em uma solução contendo 10 % de glicerol, 7,45 g/L de cloreto de potássio, 7,3 g/L de cloreto de cálcio e 0,98 g/L de acetato de potássio (pH 6,2). O volume utilizado foi de 1/3 do volume inicial da cultura de bactérias e a suspensão foi incubada de 10 a 60 min em gelo. As células foram precipitadas por centrifugação e novamente ressuscitadas na mesma solução, desta vez em um volume equivalente a 1/12,5 do volume inicial de cultura. As bactérias competentes foram alíquotadas e armazenadas a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **3.27. Oligonucleotídeos**

Tabela 4: Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de clonagem sequenciamento e PCR.

Oligo	Sentido	Sequência
490	Senso	5' GTC AGA TCT ATC ATG AAT TTT AGT TCC TTA AC 3'
2133	Senso	5' GCG CAT GCC CCA CTC AAT 3'
2134	Anti-senso	5' GGA TGC CAG GCA TAC CCA 3'
2135	Anti-senso	5' CCC AAA ACG GCT TCG ACA 3'
2137	Anti-senso	5' CGC CAC GGT GAC CGC TGT 3'
AA4	Senso	5' GCT ATC ACC TGT GGA CTC 3'
SPEI	Anti-senso	5' GCC.GCG.AAT.TCA.CTA.GTG.AT 3'
GPI1	Senso	5' TTG TTA CTG GGG CCG CGC AGG A 3'
GPI3	Senso	5' TTC GAG GTC GGT AGA GGG TGT 3'
GPI4	Senso	5' TGC CGA ATT GAG TAG AGT ATT G 3'
P1	Senso	5' TCT CGC TCT CTG TAT CTT TAG 3'
P2	Senso	5' TTT TGA TAG TTA TAG ATG TCA 3'
P3	Senso	5' CTA AAG ATA CAG AGA GCG AGA 3'
P4	Senso	5' CAG CAG CAT ATT TGA TTT CCT 3'

Tabela 5: Oligonucleotídeos utilizados nas construções para ensaio de gene repórter.

Oligo	Sentido	Sequência
GRN-BamHI	Anti-senso	5' GAG GAT CCC ATG ATG CCT ATG CC 3'
GR1-BamHI	Senso	5' ATG GAT CCC AGC AGC ATA TTT GA 3'
GR2-BamHI	Senso	5' AGG GAT CCT GTG TTT TAA TGT GG 3'
GR3-BamHI	Senso	5' ATG GAT CCC ACA CAC ACA TCT CA 3'

Tabela 6: Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de EMSA.

Oligo	Sentido	Sequência
E	Senso	5' CCC TGG CAT CTG CTG TTG ATC TTT T 3'
t12		
Et23	Senso	5' CTG TTG ATC TTT TCC TTA TTT TGT GGA 3'
Et23 $\Delta$	Senso	5' CTGTTGATCTTTTACTTATTTTGTGGA 3'
Et4	Senso	5' GCT ATC ACC TGT GGA CTC 3'
Et5	Senso	5' TTA AAG CTC ACT TGG ACC ATT 3'
Et6	Senso	5' GGG ATT ATG GTG TAT AAA TA 3'
Et7	Senso	5' AAG GGC CTG GTG TGA TTC TC 3'
E1	Senso	5' GAA AAG CAA TGA CTC ACT CAG 3'
N8	Senso	5' TTT GAT TTT ATC TCT TTG CTG 3'
N8 $\Delta$	Senso	5' TTT GAT TTG ATC TCT TTG CTG 3'
N7	Senso	5' AGA TTT TTT ATC TTT TCA AGA 3'
N7 $\Delta$	Senso	5' AGA TTT TTG ATC TTT TCA AGA 3'
N6	Senso	5' CTA TGA ACT TAT CTT AAA GCT 3'
N5	Senso	5' TAC TTC TGT TAT CTT GAA TGC 3'

N5Δ	Senso	5' TAC TTC TGT GAT CTT GAA TGC 3'
N4	Senso	5' ATT TAT TTA TCT CTT CTT TTA 3'
N4Δ	Senso	5' ATT TAT TGA TCT CTT CTT TTA 3'
P9	Senso	5' GTT TGC TCC TGG AGA AGC TAG 3'
P10	Senso	5' GTT CTT GGT AAA GGG GGG CGC 3'
P11	Senso	5' TTA TAT TAA GGG GCT CGG GCT T 3'
P12	Senso	5' TCC TGT TAT CTT GAA TGC TAC 3'
P13	Senso	5' TCC AGC AAA ATC ATT CAT GTC 3'
P14	Senso	5' TGG GTT GGG GGA TTA ACT CCA 3'

Tabela 7: Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de PCR em tempo real

Oligo	Sentido	Sequência
PbGP43	Senso	5' TCG TGA TAT AGA CAG CAC CGT TG 3'
	Anti-senso	5' AAG ACT TGG TTG TGG TAT GTG TCG 3'
α-tubulina	Senso	5' CGG CTA ATG GAA AAT ACA TGG C 3'
	Anti-senso	5' GTC TTG GCC TTG AGA GAT GCA A 3'

Tabela 8: Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de PCR inverso

Oligo	Sentido	Sequência
PCRi	Senso	5' TAT.CGG.CGG.GTG.GCT.ATT.GCT.GGA.GCC.ATG.GAT.C 3'
PCRia	Senso	5' GCG.AGA.ACA.CAG.CTG.GCA.AGA.GCC.AGG.TTA.AGA.G 3'
PCRib	Anti-senso	5' AGC TTT AAG ATG AGT CCA CAG GTG ATA GCT CTC A 3'

Tabela 9: Oligonucleotídeos utilizados na montagem das colunas de afinidade

Oligo	Sentido	Sequência
N7	Senso	5' AGA TTT TTT ATC TTT TCA AGA 3'
N4	Senso	5' ATT TAT TTA TCT CTT CTT TTA 3'
Cont	Senso	5' GAA AAG CAA TGA CTC ACT CAG 3'
role		

### 3.28. SDS-PAGE

A análise eletroforética das proteínas foi feita em géis de poliacrilamida (10 %) com SDS (Laemmli, 1970), no aparato MiniProtean (Bio Rad). As amostras foram fervidas por 3 - 5 min em tampão de amostra e submetidas à eletroforese em géis de poliacrilamida, preparados como segue:

Soluções estoque (armazenadas a 4 °C)	gel de empacotamento (5 ml)	Gel de Separação (9 ml)
	3%	10%
Acrilamida 30 %, bisacrilamida 0,8 %	-	3 ml
Tris/HCL 0,75 M (pH 8,8)+ SDS 0,2 %	-	4,5 ml
Acrilamida 12 %, bisacrilamida 1,2 %	1,25 ml	-
Tris/HCL 0,25 M (pH 6,8)+ SDS 0,2 %	2,5 ml	-
Água bidestilada	1,25 ml	1,5 ml
TEMED	4 – 10 $\mu$ l	4 – 10 $\mu$ l
Persulfato de amônio 10 % (W/V)	90 $\mu$ l	50 $\mu$ l

Terminada a corrida eletroforética, os géis foram corados com azul de Coomassie ou prata (Blum et al., 1987).

### 3.29. Colunas de afinidade para a purificação de proteínas ligantes de DNA

O protocolo de preparo de colunas de afinidade foi desenvolvido com base nos métodos de Kadonaga & Tjian (1986), com algumas modificações.

Primeiramente, oligonucleotídeos simples fita complementares e com extremidades coesivas (75  $\mu$ L ou ~200  $\mu$ g) foram anelados por aquecimento a 88 °C por 5 min, 65 °C por 10 min, 37 °C por 10 min e temperatura ambiente por 10 min. Os oligonucleotídeos dupla fita resultantes tiveram suas extremidades 5' fosforiladas na presença de 100 U da enzima polinucleotídeo kinase (Fermentas), 20  $\mu$ L do tampão A (500 mM Tris-HCl pH 7.6, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT, 1 mM espermidina e 1 mM EDTA) e 10 mM de dATP a 37 °C por 2 horas. A reação foi interrompida pela adição de 10  $\mu$ L de EDTA (0,5 M) e aquecimento a 75 °C por 10 min, seguidos de incubação por 10 min a 37 °C. Os oligonucleotídeos foram precipitados com etanol e ressuspensos em 83  $\mu$ L de água, 10  $\mu$ L de tampão de ligação 10x concentrado (400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM DTT, 5 mM ATP pH 7.8), 35 U da enzima T4 DNA ligase (Fermentas) e incubados a 4 °C por 16 horas. A enzima foi inativada a 65 °C por 10 min. Os oligonucleotídeos foram novamente precipitados e ressuspensos em 2 mL de tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 8. Uma pequena alíquota foi separada para quantificação.

A resina utilizada foi a CNBr-activated Sepharose 4B (GE Healthcare). Aproximadamente 0,6 g de resina seca (2 mL de resina úmida) foi ressuspensa em 2 mL de uma solução HCl 1 mM em um tubo Falcon de 15 mL, por 10 min. Todos os passos a seguir foram seguidos com tampões gelados. A resina foi lavada com 100 mL de HCl 1 mM em uma placa porosa. A resina lavada foi transferida para um tubo Falcon de 15 mL e incubada com DNA em solução de fosfato de potássio 10 mM por 16 horas a 4 °C, sob agitação branda. A resina foi precipitada por gravidade e o sobrenadante aferido por espectrometria para determinação da eficiência de acoplamento em comparação com a solução de DNA original. Verificou-se uma eficiência de 60%. A resina foi lavada com tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 8 (10x o volume da coluna ou 20 ml) para a retirada do excesso de ligante em uma placa porosa. A resina foi novamente transferida para um tubo de 15 ml, incubada com solução de bloqueio (0,1 M Tris-HCl, pH 8) por 2 horas no gelo, sob agitação. A resina foi, então, empacotada em uma coluna de plástico e lavada de forma alternada com uma solução ácida (0,1 M acetato de sódio, pH 4 e 0,5 M NaCl) e básica (0,1 M Tris-HCl, pH 8 e 0,5 M de NaCl) por 3 ciclos. A coluna foi equilibrada em PBS azida de sódio e mantida a 4 °C até o uso.

Após o preparo da coluna, a resina (250 µL) foi equilibrada com 10 volumes de tampão de ligação (25 mM de HEPES pH 7,5, 1 mM de EDTA, 1 mM de DTT e 10 % de glicerol). Um extrato total de proteínas do fungo preparado de acordo com o item 3.8 foi diluído no mesmo tampão, na proporção 500 µL de extrato: 200 µL de tampão de ligação (5x): 300 µL de água. Essa suspensão contendo 500 µg de proteína foi incubada com 250 µL de resina a 37 °C sob agitação branda por 45 min, a resina foi centrifugada a 3000 g por 15 s, o sobrenadante descartado e a resina lavada com 5 volumes de tampão de ligação por duas vezes. A eluição foi feita pela incubação de 1 volume de KCl 0,5 M por 5 min, à temperatura ambiente, sob agitação leve. A resina foi centrifugada e o sobrenadante foi coletado. Uma segunda eluição foi feita pela incubação da resina com 1 volume de NaCl 1M nas mesmas condições. Os volumes eluídos foram reunidos e dialisados contra uma solução contendo 10 mM de Tris-HCl pH 8,0, 5 mM de EDTA, 10 % de glicerol, 1 mM de PMSF, 1 mM de fenantrolina e 7 mM de β-

mercaptoetanol a 4 °C. A amostra foi liofilizada e aplicada em um gel de SDS-PAGE 8% para análise por coloração pela prata.

### **3.30. Detecção de gp43 no sobrenadante de cultura de células leveduriformes de *P. brasiliensis* estimuladas com sulfato de amônio**

Para a análise dos níveis da glicoproteína gp43 secretada no sobrenadante de cultura em função do tempo de crescimento e da adição de sulfato de amônio (10 mM), as células do fungo foram cultivadas a 36 °C sob agitação em meio F12/glicose por 5 dias. As células foram precipitadas e divididas em dois erlenmeyers (controle sem sulfato de amônio e teste) contendo meio fresco e cultivadas por 16 h. À cultura teste foi adicionado sulfato de amônio (10 mM). Após 16 h, o sobrenadante foi coletado e considerado ponto zero tanto na cultura teste (0+) quanto na controle (0-). As células foram sedimentadas e ressuspendidas em F12/glicose fresco por dois dias adicionais (24 e 48 h), quando sulfato de amônio foi adicionado apenas ao meio da cultura teste para cultivo por dois dias adicionais (72 e 96 h). Uma alíquota de cada ponto foi coletada para análise: a viabilidade das células foi analisada usando o corante vital Tripán Blue, o pH do meio foi avaliado e 200 µL do sobrenadante foram concentrados e observados em gel de SDS-PAGE 10% corado por impregnação pela prata.

A análise da atividade de proteases no sobrenadante de cultura foi feita através da incubação de gp43 purificada, com aqueles sobrenadantes de cultura onde os níveis de gp43 nativa estavam baixos. A incubação foi feita a 36 °C por 2 e 24 h e com 50 µL de sobrenadante puro ou diluído 5x em água. Para os controles, 1) o sobrenadante foi congelado e descongelado por 5x seguidas e 2) aquecido a 100 °C por 5 min. A gp43 purificada foi, 1) incubada apenas na presença de sulfato de amônio 10mM e 2) na presença de F12/glicose puro. Todos foram incubados a 36 °C por 24 h. As amostras incubadas foram concentradas, aplicadas em gel de SDS-PAGE 10% e coradas por impregnação pela prata.

## **IV. RESULTADOS**

**4.1. Mapeamento de elementos de transcrição na região 5' intergênica proximal (-1 a -326) do PbGP43 por “DNase I footprinting” e “Eletrophoretic Mobility Shift Assay” (EMSA)**

Inicialmente, a técnica de “DNaseI footprinting” foi usada para a identificação de elementos de transcrição presentes na região 5’ intergênica do *PbGP43* dos isolados Pb339 e Pb3. O passo inicial foi a amplificação por PCR e a clonagem dos segmentos de DNA a serem analisados.

O gene da *gp43* foi originalmente caracterizado por Cisalpino et al. (1996) a partir de um fragmento *EcoRI* de 3800 pb clonado no vetor pUC18. Nele, 326 pb correspondem a parte da região intergênica 5’ a partir do codon de iniciação do gene. A figura 1b resume a estratégia usada para a clonagem dos segmentos de DNA a serem analisados. Os oligonucleotídeos iniciadores 2133 (senso) e 2134 (anti-senso) e o DNA genômico do isolado Pb339 foram usados em reações de PCR para a amplificação de um fragmento de ~370 pb. Este fragmento foi clonado no vetor pGEM-T easy (figura 1a) e a confirmação da clonagem foi realizada através da digestão com *EcoRI*. Para a verificação da orientação do inserto no vetor, o DNA dos transformantes foi digerido com *Bgl* II (presente em um único sítio na posição – 30 da região 5’ intergênica) e *Spe* I (presente em um único sítio no vetor pGEM-T easy, próximo à região 3’ do sítio múltiplo de clonagem). A liberação de um fragmento de ~100 pb confirmou a clonagem do inserto na orientação desejada (senso). Esta construção recebeu o nome RP1. O mesmo procedimento foi feito para a obtenção da construção para o isolado Pb3, denominada RP3.

A figura 2 mostra o resultado do ensaio usando a RP1 e extrato proteico total homólogo. Após extensa padronização do ensaio, com 90 µg do extrato foram observadas regiões de proteção, as quais foram nomeadas Et1 a Et5. Essas regiões de proteção estão localizadas dentro de apenas 115 pb da região 5’ intergênica do gene, exatamente entre as posições –261 e –146. A localização das bases foi feita segundo comparação com uma reação de sequenciamento da região testada, analisada no mesmo gel. Durante os ensaios, nenhuma região de proteção foi observada da posição –146 até próximo do sítio de início da transcrição. As reações com a sonda RP3 não forneceram resultados detectáveis.

Quando o segmento de nucleotídeos correspondente às regiões de proteção (-261 a -146) foi lançado no programa TFSEARCH para a identificação de sítios de ligação de fatores de transcrição putativos frente a uma fonte ampla de elementos de transcrição, alguns fatores ligantes desses elementos foram

mostrados pelo programa. Esses fatores e suas respectivas orientações de ligação podem ser vistos na figura 3.

Como a função da gp43 ainda é desconhecida, torna-se difícil uma correlação teórica entre algum desses fatores e a regulação do PbGP43. Além disso, não podemos descartar a hipótese de que um fator ainda não descrito em outros organismos seja o responsável pela formação das regiões de proteção evidenciadas pelo “footprinting”.

Com base nas regiões de proteção, oligonucleotídeos dupla fita foram sintetizados para serem testados quanto à ligação de fatores de transcrição através de EMSA. Foram testados os oligonucleotídeos Et12, Et23, Et4 e Et5, cujas sequências estão indicadas em materiais e métodos e na figura 3. Os oligonucleotídeos Et12 e Et23 compartilham a região Et2 composta por 13 nt. Optamos por testar sequências com sobreposição de bases porque os ensaios de EMSA funcionam otimamente com oligonucleotídeos entre 20 e 40 nt (Molloy, 2000).

Os ensaios foram realizados utilizando extrato proteico total de células da fase leveduriforme dos isolados Pb339, Pb3 e Pb18. O primeiro teste foi a incubação das sondas radioativas com os extratos para averiguar a capacidade de formação de complexos DNA-proteína. A figura 4a mostra que apenas as sondas Et12 e Et23 formaram bandas intensas, sendo que o complexo com Et23 foi aparentemente o mais intenso, principalmente com o extrato de Pb339. Et4 e Et5 formaram complexos fracos com o extrato de Pb3 e nenhum complexo com o extrato de Pb339. Existe uma nítida diferença entre a migração das bandas DNA-proteína formadas com os extratos de Pb339 e Pb18 em relação ao de Pb3. Tanto com Et12 como com Et23, os complexos migraram mais rapidamente com proteínas ligantes de Pb3. Isso poderia ser explicado: 1. pela ligação a fatores de transcrição diferentes em isolados diferentes; 2. pela ligação a fatores de transcrição semelhantes, porém que apresentam isoformas distintas de acordo com o isolado; 3. ligação de mais de um fator por sonda.

Para averiguar se os complexos DNA-proteína vistos na figura 4a são específicos, foi feito um teste de competição de EMSA com excesso molar do próprio oligonucleotídeo não marcado (competidor específico). A figura 4b mostra o ensaio feito com as sondas Et12 e Et23 e os extratos de Pb339 e Pb3. A partir

de 100x de excesso do competidor específico, ocorreu o desaparecimento da banda positiva, sugerindo que o complexo é específico. As sondas Et4 e Et5 formaram complexos fracos com extrato de Pb3, e aparentemente inespecíficos (Figura 4c), já que sua intensidade não foi alterada na presença de excesso molar da sonda fria.

Considerando-se que as sondas Et12 e Et23 têm em comum a região 2, ensaios de competição entre elas foram feitos com os extratos do Pb339, Pb18 e Pb3. A figura 5a mostra que Et23 em excesso de 100x inibiu fortemente a reação positiva de Et12 com todos os extratos. Uma explicação para isso é que um único fator poderia estar se ligando na região Et2 de Et12. Como as duas sondas compartilham essa região, o excesso de Et23 não marcado faz com que a banda positiva de Et12 desapareça. Outra possibilidade é que um suposto complexo ligando em Et1 só seria estável na presença de um fator ligando em Et2. Não fica claro se existem duas bandas formadas com Et12 devido à baixa resolução do gel.

Quando o contrário foi feito, ou seja, Et23 marcado sofreu a competição de Et12 não marcado, a inibição não foi total mesmo com 500x de excesso molar do competidor. Esses resultados foram semelhantes para os extratos dos três isolados.

É digno de nota que Et23 contém uma substituição na posição -230 de C (consenso) para A no isolado Pb3.

Um oligonucleotídeo contendo esse sítio polimórfico (Et23 $\Delta$ ) foi testado utilizando extrato proteico total de células da fase leveduriforme dos isolados Pb339, Pb3 e Pb18. O primeiro teste foi a incubação das sondas radioativas Et23 e Et23 $\Delta$  com os três extratos citados anteriormente. O resultado dos ensaios pode ser visto na figura 5b. A sonda Et23 ligou-se mais intensamente que Et23 $\Delta$  nos ensaios com extratos de Pb339 e Pb18 e com Pb3 a ligação ficou inalterada.

Para averiguar se o complexo DNA-proteína visto com a sonda Et23 $\Delta$  era específico com extrato de Pb3, foi feito um teste de competição com excesso molar do próprio oligonucleotídeo não marcado (competidor específico). A figura 6a mostra que a partir de 250X de excesso do competidor específico ocorreu o desaparecimento da banda positiva, sugerindo especificidade.

A figura 6c mostra os ensaios feitos com dois oligonucleotídeos sintetizados com base em seqüências semelhantes à seqüência consenso de ligação do repressor catabólico CreA de *Aspergillus*. As seqüências das sondas Et6 e Et7 podem ser vistas no quadro da figura 6b e suas posições no esquema da figura 3. O teste foi feito usando o extrato do isolado Pb339. A figura 6c mostra que as sondas Et6 e Et7 formaram complexos que foram inibidos somente com 2000x e 3000x de excesso molar, respectivamente.

De maneira geral, os resultados apresentados são promissores e fazem das regiões Et1, Et2 e Et3 fortes alvos para a construção de promotores truncados com o objetivo de analisar sua funcionalidade no controle da expressão do gene *PbGP43*.

#### **4.2. Clonagem de um fragmento de 1.8 Kb correspondente a região 5' intergênica do gene *PbGP43* do isolado Pb339**

No gene da *gp43* do *P. brasiliensis* originalmente caracterizado por Cisalpino et al. (1996), a região 5' UTR tem no máximo 35 bp, já que o início de transcrição foi mapeado em -25, -33 e -35 (Morais, 2003) em quatro isolados distintos. A região 3' UTR variou entre 91 a 128 bp de acordo com o isolado ou o transcrito do mesmo isolado (Morais, 2003). Adjacente e em direção oposta, foi localizada a seqüência de um gene homólogo ao *lpo11* (Morais, 2003, Feitosa et al., 2003, [www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides\\_brasiliensis/MultiHome.html](http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html)), que em *Aspergillus* codifica a proteína importina11, cuja função é a ligação e o transporte de proteínas ribossomais do citoplasma para o núcleo (Plafker & Macara, 2002).

Para a obtenção de um fragmento mais abrangente da região 5' intergênica do *PbGP43* foi utilizada uma estratégia baseada no locus homólogo em fungos filogeneticamente próximos ao *P. brasiliensis*. Desta forma, valeu-se das informações de 2006 provenientes do sequenciamento dos genomas de *H. capsulatum*, *B. dermatitidis*, *C. albicans* e de espécies do gênero *Aspergillus*. Essas informações foram fundamentais na obtenção da região intergênica do *PbGP43* por PCR.

Quando a seqüência de aminoácidos da *gp43* de *P. brasiliensis* foi lançada no banco de dados dos genomas dos fungos mencionados acima, foram

identificadas sequências de genes homólogos aos de  $\beta$ -1,3-exoglucanases com alta identidade com o PbGP43, como resumido na Tabela 1.

Tabela 1: Percentagem de identidade e positividade de sequências homólogas a  $\beta$ -1,3-exoglucanases fúngicas com a gp43.

Organismo	Aminoácidos	
	Identidade	Positivo
<i>A. nidulans</i>	54%	71%
<i>A. fumigatus</i>	54%	72%
<i>A. terreus</i>	53%	70%
<i>H. capsulatum</i>	61%	76%
<i>B. dermatitidis</i>	60%	75%
<i>C. albicans</i>	50%	58%

Uma análise mais detalhada mostrou a conservação de parte do *locus* gênico nesses organismos, já que os genes homólogos adjacentes à  $\beta$ -1,3-exoglucanase coincidiram. Foram eles: o *lpo11* na porção 3' e um gene distante que codifica uma proteína ligada por âncora de glicosilfosfatidilinositol (PA-GPI) na porção 5' (Fig. 7). A ordem e a direção em que eles aparecem também são as mesmas, com exceção de *A. fumigatus*. O tamanho estimado da região intergênica entre a exoglucanase e PA-GPI foi de aproximadamente 5,5 kb no *H. capsulatum*, 9,2 kb em *A. nidulans*, 8,5 kb em *A. terreus* e 15,8 kb em *A. fumigatus*.

De posse dessas informações, a sequência de aminoácidos das proteínas PA-GPI dos fungos *H. capsulatum*, *B. dermatitidis*, *A. fumigatus*, *A. terreus* e *A. nidulans* foram alinhadas (J. Hein method) para a identificação de fragmentos conservados, cujas sequências pudessem servir de base para a síntese de oligonucleotídeos iniciadores a serem usados em reações de PCR com oligonucleotídeos conhecidos da região 5' do PbGP43. Essa estratégia parte do princípio de que há um gene homólogo ao PA-GPI localizado a 5' do PbGP43.

O resultado desse alinhamento, a posição dos oligonucleotídeos sintetizados (GPI-1, GPI-3 e GPI-4), bem como suas sequências podem ser vistas na figura 8.

Várias reações de PCR foram feitas e vários tamanhos de amplicons foram obtidos, no entanto, as reações que amplificaram produtos dentro do tamanho esperado foram as de número 6 e 19 (figura 9), ou seja, quando iniciadas pelos oligonucleotídeos PCRia e GPI-1. As diferentes condições de PCR (Tabela 3 – materiais e métodos) foram provavelmente responsáveis pelas diferenças em perfil de bandas. As condições usadas em cada uma das reações está descrita em materiais e métodos (PCR usando os oligonucleotídeos GPI).

Os amplicons foram testados por “Southern blotting” usando como sonda um fragmento de 110 pb da região 5’ intergênica do gene *PbGP43* localizado dentro dos 326 pb já conhecidos. O gel de agarose com as amostras, assim como o resultado do “Southern blotting” podem ser vistos na figura 9. As reações 28 e 31 apresentaram fragmentos com forte intensidade de hibridação, todavia aquela da reação 28 apresentou tamanho pequeno, enquanto a marcação na reação 31 foi difusa e aparentemente inespecífica. As reações positivas das colunas 26 e 30 foram descartadas não só pelo tamanho reduzido dos fragmentos marcados, como também pelo fato do oligonucleotídeo usado para fazer a reação de PCR ser o mesmo usado para fazer a sonda.

Os fragmentos de 6,5 kb, 5 kb e 3,5 kb do produto da reação 19 (PCRia/GPI-1) foram reconhecidos pela sonda e posteriormente melhor analisados. Um fragmento que englobava todas as bandas visíveis desta reação foi purificado do gel. Um PCR foi feito usando este DNA como molde e os mesmos oligonucleotídeos PCRia e GPI-1, a única diferença foi a temperatura de anelamento menor, 63 °C. O resultado da nova reação pode ser visto na figura 10a. Várias bandas, de alto e baixo peso molecular, foram obtidas, no entanto, o que observamos foi que a amplificação das bandas foi inespecífica, já que foram amplificadas pelo primer GPI-1 e PCRia individuais (figura 10a, colunas 1 e 2). A reação com PCRia (figura 10a, coluna 2) produziu bandas de tamanhos que variavam de 0,8 a 6,5 Kb, porém duas bandas mais fortes chamaram a atenção, uma de 1,8 e outra de 3,6 Kb aproximadamente. Um “Southern blotting” desse gel mostrou que a banda de 1,8 foi reativa com a sonda utilizada no experimento da figura 9, sugerindo que poderia conter um fragmento de interesse apesar de ter sido amplificado por um único iniciador.

Desta forma, a banda de 1,8 Kb foi purificada do gel e clonada no vetor pGEMT-easy (Promega) para sequenciamento. A análise da sequência deixou claro que o fragmento clonado era realmente um segmento maior da região 5' intergênica do *PbGP43* e também que o oligonucleotídeo PCRia ligou-se de forma inespecífica durante a reação de PCR, pois parte de sua sequência estava presente no terminal 5'. A figura 10b mostra um esquema do que aconteceu nesta reação, ou seja, o oligonucleotídeo PCRia por ser extenso, ligou-se de forma inespecífica em um ponto situado a ~1,8 Kb de distância do seu sítio original (no início da ORF do *PbGP43*).

Com base no sequenciamento, o oligonucleotídeo P4 foi sintetizado para ser usado em reações de PCR tendo como molde o DNA total do isolado Pb339 de *P. brasiliensis*. O resultado dessas reações de PCR pode ser visto na figura 11. A reação entre P4 e Et23 amplificou uma banda na altura aproximada de 1,8 kb (figura 11, reação 1). A reação entre P4 e Et6 produziu uma banda pouco maior que aquela produzida com P4 e Et23 (figura 11, reação 5). Os amplicons foram específicos e com tamanho semelhante ao esperado, confirmando a clonagem de uma parte maior da região 5' intergênica do *PbGP43*.

#### **4.3. Análise do fragmento de 1,8 kb correspondente a região 5' intergênica do gene *PbGP43* do isolado Pb339**

Foram realizadas 3 reações de sequenciamento para cada oligonucleotídeo, as quais foram alinhadas para se saber o limite de confiabilidade da sequência final. Com base nestes resultados, concluiu-se que a sequência completa do fragmento clonado possuía um total de 1721 pb, que somados aos 326 pb já conhecidos resultam um total de 2047 pb.

Cada amostra enviada para sequenciamento fornece ~1000 pb de leitura, dos quais 55 a 65% são confiáveis. Como 1000 pb sequenciados em ambas as direções forneceria a sequência completa do fragmento, uma tentativa de alinhamento usando o produto do sequenciamento dos oligonucleotídeos P4 e Et23 foi feita e, ao contrário do esperado, não houve identidade nas porções terminais 3' de suas sequências e sim dos segmentos -1600 a -1160 de P4 com o -600 a -125 de Et23 (lembrando que Et23 tem sentido reverso). Analisando a

sequência completa, ficou claro que os segmentos com alta identidade correspondiam aos fragmentos -1600 a -1160 e -600 a -125. Esses segmentos foram denominados Região 1a e Região 1b e podem ser vistos na figura 12 em vermelho. Essas regiões mantêm ~85% de identidade.

Além destas duas regiões de alta identidade, chamou também a atenção o elevado número de elementos de transcrição NIT2 putativos presentes nos 2047 pb de toda a região 5' intergênica atual.

#### **4.4. Mapeamento de elementos de transcrição na região 5' intergênica distal (-327 a -2047) do PbGP43 por “Electrophoretic Mobility Shift Assay” (EMSA)**

Para o mapeamento de elementos de transcrição da região recém clonada, os ensaios de EMSA foram conduzidos com a utilização de extrato total de proteínas de células da fase leveduriforme do isolado Pb339 induzidas de diferentes formas. Os extratos foram obtidos a partir de fungos crescidos em meio F12/glicose (N), meio F12/glicose contendo 10 mM de sulfato de amônio  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  e posteriormente lavadas para a retirada do sal em F12/glicose  $[-(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ . Foram também testados extratos de células que sofreram estresse osmótico (EO), onde as células crescidas em F12/glicose foram estimuladas com 0,6 M de NaCl.

As sondas selecionadas para os ensaios de EMSA foram sintetizadas a partir de elementos de transcrição putativos presentes na região 5' intergênica recém clonada, a saber: NIT2 (N9, N8, N7, N6, N5 e N4), ADR1 e STRE (P9, P10, P11 e P14), Skn-1 (P13) e GCN4 (E1).

A figura 13a mostra os ensaios feitos inicialmente com o extrato das células do isolado Pb339 crescidas em F12/glicose (N). Somente as sondas N8, N7, N5 e N4 (todas contendo elementos NIT2 putativos) formaram complexos DNA-proteína. O complexo formado com N7 foi o mais intenso. Para averiguar a especificidade do complexo DNA-proteína com as sondas N8, N7, N5 e N4, foi feito um teste de competição com excesso molar do próprio oligonucleotídeo não marcado (competidor específico). A figura 13b mostra que com 100x de excesso do competidor específico ocorreu o desaparecimento quase completo das bandas positivas, mostrando que todos os complexos são específicos.

Todas as sondas testadas na figura 13b foram posteriormente ensaiadas com extratos  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  e  $[-(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ , ou seja, de culturas estimuladas ou privadas de sulfato de amônio. O resultado pode ser visto na figura 14a, onde os complexos formados com as sondas incubadas com extrato  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  foram menos intensos que aqueles formados com as sondas incubadas com extrato  $[-(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ . Vale ressaltar que as células dos dois extratos provieram do mesmo frasco de crescimento, diferenciando-se apenas no estímulo.

As sondas radioativas também foram testadas com o extrato preparado a partir das células submetidas ao estresse osmótico (EO). Como pode ser visto na figura 14b, as sondas N8, N7, N5 (esta mais fracamente) e N4 formaram complexos DNA-proteína. A banda formada por N7 foi a mais intensa. Ou seja, os resultados foram similares aos da figura 13a.

#### **4.5. Análise dos nucleotídeos contendo o núcleo GATA do elemento NIT2**

Como mencionado anteriormente, na região intergênica analisada chama atenção o elevado número de elementos putativos NIT2 (GATA “motif”). Eles ao todo são 23 e estão distribuídos da seguinte maneira: 10 entre as regiões 1a e 1b, 3 na região 1a, 5 na região 1b, 2 próximos do ATG e 3 na extremidade 5'. Assim, a maioria dos elementos NIT2 putativos (17) localizam-se nos 1200 pb iniciais da região 5' intergênica. A figura 15 mostra a posição desses elementos. Alguns deles estão localizados bem próximos uns dos outros formando “clusters” (barras e números em vermelho), identificados pelos números Ia e Ib, II e III. Os “clusters” Ia e Ib possuem 5 elementos NIT2 putativos idênticos (figura 15). Os “clusters” II e III possuem apenas 2 elementos cada. Dentro de cada um destes “clusters”, os elementos encontram-se a menos de 40 pb de distância uns dos outros. A figura 15 ainda mostra uma análise da sequência de nucleotídeos que flanqueiam o núcleo GATA (ou TATC, fita complementar) de todos os 23 elementos NIT2. Analisando-se as 23 sequências, chegou-se a um consenso TATT a 5' e TTTA a 3' do núcleo GATA. Fica evidente o grande número de timinas flanqueando o núcleo do elemento. A análise dos oligonucleotídeos flanqueando o núcleo GATA das sondas N8, N7, N5 e N4, testados por EMSA nas figuras 13 e 14 também mostrou que as timinas estão presentes em grande número. A análise das sequências mostrou um consenso Tt/aTT a 5'e Tt/cTT a 3'. Mais uma vez, as

timinas flanqueiam o núcleo GATA do elemento NIT2 das sondas positivas para os ensaios de EMSA.

#### **4.6. Efeito das fontes de nitrogênio sobre a transcrição do PbGP43**

O primeiro experimento de estímulo com fontes primárias de nitrogênio utilizou o sulfato de amônio e o isolado Pb18. Após 10 dias de crescimento em F12/glicose, adicionou-se 10 mM de sulfato de amônio e alíquotas de células foram coletadas nos tempos indicados na figura 16a. Observou-se uma diminuição do acúmulo de transcrito já aos 15 min da adição da fonte de nitrogênio, que atingiu um valor 3x menor que o do controle e assim perdurou até pelo menos 24 h. A partir destes resultados, os mesmos testes foram feitos com os isolados Pb339 e Pb3, além de se usar outra fonte primária de nitrogênio, a glutamina. A figura 16b mostra o resultado representativo de três experimentos independentes feitos com o isolado Pb339 estimulado com sulfato de amônio 10 mM durante 30 min. O gráfico mostra que nos primeiros 30 min ocorreu uma queda de 2,3x na quantidade de transcrito acumulado do PbGP43. Como mostrado na figura 17a, os resultados de repressão com 10 mM de sulfato de amônio foram reproduzidos nos isolados Pb3 e Pb18. Os resultados com sulfato de amônio foram consistentes, porém restava saber se o efeito repressor seria revertido quando o sulfato de amônio fosse retirado do meio. Para isso, as células do fungo foram condicionadas em F12/glicose acrescido de 10 mM de sulfato de amônio e posteriormente privadas do sal por 30 min para análise do efeito na transcrição do PbGP43. O resultado pode ser visto na figura 16c para o isolado Pb339 e na figura 17b para o isolado Pb18: a retirada do sulfato de amônio do meio aparentemente desreprimiu a transcrição do gene, cujo acúmulo aumentou ~3x.

Além do sulfato de amônio, foi testado o comportamento do PbGP43 após a adição de glutamina ao meio na concentração de 10 mM. O único isolado testado foi Pb339. A glutamina foi escolhida pois parece ser o metabólito crucial na repressão catabólica do nitrogênio (Wang and Marzluf, 1979; Premakumar et al., 1979). As células foram crescidas em meio F12/glicose e em seguida estimuladas com 10 mM de glutamina. Assim como o sulfato de amônio, a

glutamina levou a uma queda no acúmulo de transcrito do gene em três experimentos isolados, como representado na figura 16c. O nível de diminuição do transcrito acumulado foi semelhante ao visto com o sulfato de amônio.

#### **4.7. Detecção de um fator AreA-like (NIT2-like) e de uma proteína NMR-like no genoma do isolado Pb3**

Um dos objetivos do trabalho passou a ser determinar a participação dos elementos NIT2 (GATA-motif) no controle da expressão do PbGP43. O fator NIT2 possui homólogos em vários fungos como: GLN3 (*S. cerevisiae*), AreA (*Aspergillus*) e NRE (*Penicillium chrysogenum*), os quais se ligam ao núcleo GATA no elemento de transcrição. A figura 18a mostra um alinhamento feito entre a sequência de aminoácidos conservada da região C-terminal do fator NIT2 de *N. crassa* e seu homólogo AreA em *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. terreus* e *A. niger*, dentro desta região está contido o domínio de ligação ao DNA. As setas vermelhas indicam os resíduos de cisteína responsáveis por quelar o elemento zinco (Zn). A distância entre os pares de cisteína é de 17 aminoácidos (“loop” central), sendo este número conservado na maioria dos fatores homólogos. A seta azul indica o resíduo de leucina cuja substituição nos fatores AreA e NIT2 leva a alterações no reconhecimento da sequência no promotor (Marzluf, 1997). A figura 18b mostra o “loop” central em detalhe.

A sequência de aminoácidos de AreA foi identificada no genoma do isolado Pb3, em uma sequência de 3201 pb situada no supercontig 6. A figura 18c mostra o quadro identificador da sequência. AreA de *A. nidulans* é composto por 876 aminoácidos, NIT2 por 1036 resíduos e o fator NIT2-like em *P. brasiliensis* tem 994 aminoácidos. A figura 19 mostra a sequência do fator NIT2-like identificado no genoma do isolado Pb3. Observam-se os resíduos de cisteína, o resíduo de leucina e os 17 aminoácidos que formam o “loop” central.

A figura 20 mostra parte da sequência da proteína NMR-like encontrada no genoma do *P. brasiliensis* Pb3. NMR (“nitrogen metabolic regulation”), na presença de fontes primárias de nitrogênio (sulfato de amônio, glutamina), interage com NIT2 fazendo com que este último se desligue do DNA deixando de ativar o gene (revisão em Marzluf, 1997). NMR em *A. nidulans* apresenta 352

aminoácidos (Stammers et al., 2001) e em *N. crassa* é composto por 488 aminoácidos (Young et al., 1990).

#### **4.8. Ensaios de EMSA com oligonucleotídeos contendo mutação pontual**

Os ensaios de EMSA descritos neste item foram realizados utilizando extrato proteico total de células da fase leveduriforme do isolado Pb339 crescido em meio F12/glicose. Foram testados os oligonucleotídeos N8, N7, N5 e N4 contendo elementos TATC com uma mutação pontual modificando-os para GATC (figura 21a). A diminuição do complexo DNA-proteína para N8 $\Delta$  e N7 $\Delta$  é mais notável se comparada àquela de N4 $\Delta$ . Para N5, que apresentava uma banda fraca, a abolição do complexo foi total. A diminuição de intensidade da banda sugere a ligação de um fator que necessita da sequência original TATC presente nos oligonucleotídeos originais.

Para averiguar se o mesmo fator estaria ligando em todas as sondas, ensaios de competição foram feitos entre eles e os resultados podem ser vistos nas figuras 21b e 21c. Nota-se que enquanto N5 compete sutilmente com as demais, N4, N7 e N8 competem avidamente entre si. Estes resultados levam a crer que o mesmo fator está ligando os quatro oligonucleotídeos.

#### **4.9. Análise dos elementos NIT2 presentes na região 5' intergênica do PbGP43 e em seus homólogos**

Como mostrado anteriormente, na região 5' intergênica do PbGP43 do isolado Pb339 é notável o elevado número de elementos putativos ligantes de NIT2 (GATA motif).

A figura 22 mostra um esquema onde estão indicadas as posições dos elementos NIT2 “upstream” ao PbGP43 dos isolados Pb339, Pb18, Pb3 e Pb01 em comparação àqueles dos genes homólogos encontrados em outros fungos. É importante ressaltar a presença de “clusters” putativos de elementos NIT2 nessa região em todos os fungos, com exceção do *A. terreus* e do isolado Pb01, os quais possuem elementos NIT2 distantes um do outro. Pb339, Pb18 e *A. fumigatus* possuem três “clusters”, enquanto Pb3 e *A. nidulans* possuem dois e *H. capsulatum* possui apenas um. *P. brasiliensis* chega a ter 5 elementos NIT2 em

um mesmo “cluster”, seguido pelo *A. fumigatus* com três e os demais com apenas dois.

#### **4.10. Purificação da proteína ligante de N7 e N4 em de colunas de afinidade**

Como detalhado em materiais e métodos, colunas de afinidade foram preparadas para purificar a(s) proteína(s) que se liga(m) em N7 e N4. Estes oligonucleotídeos foram escolhidos por formarem complexos DNA-proteína intensos. Para aumentar a eficiência de captura da proteína, cópias de cada oligonucleotídeo foram ligadas em “tandem” formando uma âncora. A figura 23a mostra a sequência de N7 e N4 com as extremidades coesivas, bem como um gel de agarose 2% evidenciando o aspecto de cada oligonucleotídeo ligado em “tandem”. Os experimentos de cromatografia foram feitos, porém, nenhuma banda específica foi identificada.

#### **4.11. Construções e ensaios para gene repórter em *A. nidulans***

Para averiguar a funcionalidade dos elementos NIT2 encontrados na região 5' intergênica do *PbGP43* do isolado Pb339, construções contendo fragmentos truncados de tamanhos crescentes desta região foram produzidos por PCR. Esses fragmentos receberam os nomes: 480 – *lacZ*, 840 – *lacZ* e 1040 – *lacZ*, sendo que os números representam o tamanho de cada fragmento. O tamanho de cada fragmento amplificado por PCR pode ser visto nas figuras 24a e 24b. Assim, 480 – *lacZ* engloba os elementos NIT2 próximos à ORF do gene, 840 – *lacZ* se estende até o “cluster” I e 1040 – *lacZ* até o “cluster” II (figura 24a). Essas construções foram usadas para análise de expressão em *A. nidulans* (WG355) através do vetor pAN923-41B que possui o gene *lacZ* como repórter, Amp como marcador de seleção em bactérias e o gene *ArgB*. Este sofrerá uma recombinação homóloga com o gene *argB* mutado em *A. nidulans*, reconstituindo o marcador de seleção (van Gorcon et al., 1986). Os três fragmentos foram clonados em pGEMT-easy e sub-clonados em pAN923-41B.

A figura 24c mostra a verificação da clonagem dos três fragmentos no vetor pAN923-41B. A confirmação se deu através da digestão do DNA das construções

com a enzima *Bam*HI, a qual liberou os insertos com os tamanhos esperados. É essencial que a clonagem nesse plasmídeo ocorra na orientação correta, que foi confirmada por reações de sequenciamento.

Após a transformação de *A. nidulans* WG355, foram feitas reações de PCR usando oligonucleotídeos específicos para cada uma das três construções (GR1, GR2 e GR3 – sense – GRN – antisense) e extrações de DNA genômico de cada uma das cepas transformadas para averiguar a integração das construções no genoma de *A. nidulans*. As cepas transformadas receberam os seguintes nomes: ANGP1, ANGP2 e ANGP3. O resultado pode ser visto no gel representado na figura 25a onde se verifica a presença de cada uma das construções dentro do tamanho esperado. É digno de nota que na construção 1040 – *lacZ* (linha 3) aparece uma segunda banda de migração mais rápida (~ 580pb). Sua presença se deve a um sítio inespecífico de ligação do primer GR3 dentro da própria sequência da região 5' intergênica do *PbGP43*, já confirmado por análises na sequência e por outros PCRs usando o DNA genômico de *Pb339* como molde.

Após a confirmação da presença das construções no genoma de *A. nidulans*, as colônias transformantes ANGP1, ANGP2 e ANGP3 foram isoladas em meio de cultura mínimo sólido contendo apenas biotina (1 µg/ mL). As colônias isoladas foram transferidas para uma nova placa com meio de cultura para a produção de esporos.

Foram obtidos dois transformantes de cada construção e todos foram inicialmente testados em placas contendo X-gal para averiguação da ativação de *lacZ* através da formação de sub-produto azul. Todas os transformantes testados responderam positivamente à ativação de *lacZ*. A figura 25b mostra a análise de um grupo de colônias transformantes crescendo em meio mínimo 2% glicose por 48 h em placas contendo X-gal que foram suplementadas ou não com sulfato de amônio na concentração de 10 mM. Como pode ser visto, as cepas transformantes carregando cada uma das construções expressaram a β-galactosidase somente nas placas sem sulfato de amônio, nas quais as colônias apresentaram coloração azul, ao contrário daquelas cultivadas na presença do sal. A intensidade da coloração azul foi maior para as construções 480 – *lacZ* e 840 – *lacZ*.

Para averiguar as diferenças na quantidade de expressão da  $\beta$ -galactosidase, sua atividade foi testada em extratos celulares de cada uma das cepas recombinantes de *A. nidulans*. Para tal, as culturas foram depletadas de sulfato de amônio por 30 min e 24 h após crescerem na presença do sal por 18 h em MM 2% glicose. A figura 25c mostra que a atividade enzimática aumentou 2,5 x nos primeiros 30 min e 5,3 x após 24 h de crescimento para as três construções. No entanto, a cepa ANGP3 contendo a construção do fragmento de 1040 pb apresentou os menores níveis de ativação da  $\beta$ -galactosidase mesmo na ausência de sulfato de amônio, sugerindo assim a existência de um possível elemento repressor localizado entre as posições – 840 e –1040 pb que pode ser funcional em *A. nidulans*.

#### **4.12. Efeito da adição de sulfato de amônio na expressão de gp43**

Os experimentos descritos acima verificaram o efeito do sulfato de amônio em nível transcricional, ou seja, analisando-se a quantidade de mRNA acumulado do *PbGP43*. Para analisar o efeito sobre a expressão da proteína, culturas de *P. brasiliensis* do isolado Pb339 foram feitas como descrito em materiais e métodos. A presença de gp43 foi verificada em géis de SDS-PAGE corados por prata e o resultado pode ser visto na figura 26. Na cultura controle, ou seja, aquela que não entrou em contato com sulfato de amônio, vemos a presença de gp43 em todos os pontos testados, porém aparentemente em menor quantidade no ponto 24- (24 h após a cultura ter sido lavada e as células ressuspendidas em meio F12/glicose fresco), pois 24 h foi tempo insuficiente para a cultura produzir grandes quantidades de gp43 secretada no sobrenadante. Em todos os outros pontos, a quantidade de gp43 foi aproximadamente a mesma. Por outro lado, na cultura teste, ou seja, aquela que entrou em contato com sulfato de amônio (10 mM), vemos a presença de gp43 nos mesmos pontos que a cultura controle, mas com as seguintes diferenças: 1) o ponto 24- da cultura teste possui uma quantidade de gp43 um pouco maior que o ponto 24- da cultura controle; 2) o ponto 48- da cultura teste possui uma quantidade de gp43 um pouco menor que o ponto 48- da cultura controle; e 3) após a adição de sulfato de amônio na cultura teste, houve uma aparente diminuição da quantidade de gp43 no sobrenadante desta cultura

nos pontos 24 h+ (correspondente a 72 h totais de cultura) e 48 h+ (correspondente a 96 h totais de cultura). Este resultado, quando comparado com a cultura controle, sugere que a presença de sulfato de amônio na cultura levou a uma diminuição nas quantidades de gp43. Considerando-se que aparentemente a gp43 está sendo degradada por uma protease regulada pelo sulfato de amônio, no entanto, não é possível concluir no momento que as modulações observadas em nível de mRNA pela adição ou depleção de sulfato de amônio são refletidas na taxa de gp43 do sobrenadante de cultura. É digno de nota que a quantidade de células e sua viabilidade foi a mesma em ambas as culturas, teste e controle.

O sobrenadante 48 h+ da cultura teste apresentou a menor quantidade de gp43, sendo por esse motivo usado para averiguar se alguma atividade proteolítica presente neste sobrenadante estaria degradando a gp43. Foram feitas incubações de gp43 purificada com diferentes volumes (10 e 50 uL) deste sobrenadante e por dois tempos diferentes (2 e 24 h). A figura 27a mostra que o maior volume (50 uL) do sobrenadante incubado por mais tempo (24 h) foi responsável pela maior degradação da gp43. Controles desse experimento incluíram (figura 27b): incubação da gp43 com o sobrenadante 48 h+ congelado e descongelado por 5x, este mesmo sobrenadante aquecido a 100 °C por 5 min, incubação da gp43 apenas com 10 mM de sulfato de amônio e apenas com F12/glicose, todos por 24 horas a 37 °C. A figura 27b mostra que as quantidades de gp43 permaneceram as mesmas. Esses resultados são interessantes, porém unitários e preliminares. A reprodutibilidade deverá ser averiguada, a quantificação de gp43 deverá ser realizada em géis corados pelo Coomassie blue, já que a coloração pela prata não é quantitativa, os controles deverão inserir inibidores de proteases. Além disso, o mais provável é encontrar indução de atividades proteolíticas mais pronunciadas na ausência de sulfato de amônio e isso será verificado no laboratório.

#### **4.13. Análise comparativa da região 5' intergênica do gene PbGP43 dos isolados Pb339, Pb3, Pb18 e Pb01**

Como apresentado anteriormente, a sequência completa de 2047 pb da região 5' intergênica do PbGP43 do isolado Pb339 foi amplificada usando os oligonucleotídeos P4 e GRN. No final de 2007 foi liberada uma versão incompleta

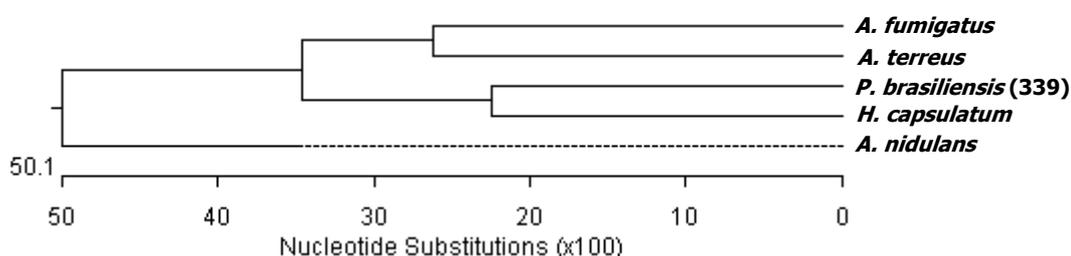
do genoma do Pb3, realizada pelo Broad Institute ([http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides\\_brasiliensis.1/MultiHome.html](http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis.1/MultiHome.html)). Tivemos, então, a oportunidade de comparar os resultados e verificamos que havia um “gap” no fragmento correspondente do Pb3. Essa observação apressou o objetivo de descobrir diferenças entre os isolados relativos à região intergênica do PbGP43. Para tal, os oligonucleotídeos P4 e GRN foram usados em reações de PCR tendo como molde DNA genômico dos isolados Pb2, Pb3, Pb4, Pb5, Pb6, Pb8, Pb9, Pb17, Pb18, Pb10, Pb11, Pb14 e Pb16. Como mostrado pelos géis de agarose da figura 28, vemos que Pb2, 3, 4 e 5 formaram amplicons de mesmo tamanho, ou seja, ~1500 pb; Pb9 e 17 formaram amplicons de tamanho maior ~3000 pb e Pb6, 8, 10, 11, 14, 16 e 18, formaram amplicons semelhantes ao formado com Pb339, ou seja, ~2000 pb. As bandas de amplificação foram específicas, pois os controles com os oligonucleotídeos individuais foram negativos.

Com base nessas informações, utilizamos os oligonucleotídeos P4 e GRN para sequenciar o fragmento de DNA do isolado Pb3. Esse sequenciamento foi privilegiado porque o tamanho do fragmento de PCR divergiu daquele previsto pelo genoma recém-liberado. Assim como em todos os sequenciamentos realizados neste trabalho, foram feitas três reações para cada oligonucleotídeo, as quais foram alinhadas para assegurar o limite de confiabilidade da sequência. O tamanho correto do fragmento amplificado para o isolado Pb3 foi de 1551 pb. Essa sequência foi enviada ao responsável pelo projeto genoma dos fungos dimórficos no Broad Institute e ficou confirmado o equívoco no ajuste dos contigs nesse projeto, devido à presença de uma região repetida. A figura 29 mostra uma representação da região 5' intergênica do PbGP43 do isolado Pb339, Pb18 (fornecida pelo genoma), Pb3 e Pb01 (fornecida pelo genoma), evidenciando as extensões das diferenças em sequência encontradas entre eles. As caixas pretas correspondem às regiões conservadas 1a e 1b, as quais, como mencionado anteriormente, mantêm ~85% de identidade. Como pode ser visto, as regiões 1a e 1b estão presentes em todos os isolados analisados, menos no Pb01 onde elas aparecem como uma só região como mostrado no alinhamento da figura 30. No isolado Pb3, as regiões 1a e 1b estão mais próximas uma da outra estando separadas por 60 pb. No Pb339, essa mesma região está separada por ~500 pb

de distância, como evidenciado no gel de agarose da figura 28 e no alinhamento da figura 31. Além da ausência das regiões 1a e 1b separadas, o isolado Pb01 também apresenta a região 5' intergênica mais polimórfica em relação aos outros isolados, como evidenciado pelos diferentes sítios de restrição mostrados no esquema da figura 29 e no alinhamento feito com a mesma região do isolado Pb339 mostrado na figura 32.

#### 4.14. Análise comparativa da região 5' intergênica dos genes homólogos ao PbGP43 de outros fungos

As diferenças entre a região 5' intergênica do PbGP43 dos isolados Pb339, Pb18, Pb01 e Pb3 levaram a uma análise comparativa dessa mesma região em genes homólogos presentes em outros fungos, os quais codificam  $\beta$ -exo-1,3-glucanases. A figura 33a mostra um esquema da ORF destes genes e os respectivos fungos. Note que em *H. capsulatum* a ORF tem apenas um nucleotídeo de diferença em relação ao PbGP43, apresenta 61% de identidade em sequência de aminoácidos, sendo que a posição e tamanho do intron são idênticos. No gênero *Aspergillus*, as sequências também compartilham alta identidade com a gp43 em torno de 54%. *A. terreus* e *A. fumigatus* possuem uma ORF com tamanho semelhante, porém há dois introns nos genes. *A. nidulans* tem características diferenciadas, já que possui uma ORF maior (1904 pb) e três introns. É interessante notar que a posição dos introns é semelhante entre eles. Uma árvore filogenética (ClustalW) das sequências de aminoácidos dos ortólogos à gp43 em fungos está mostrada abaixo.



O genoma dos fungos mencionados acima (menos Pb339) está disponível de forma que foi possível atualizar as comparações entre as regiões intergênicas 5' completas e os respectivos genes vizinhos. O esquema da figura 33b revela

que o tamanho dessas regiões é variável. Para o isolado Pb3, a distância do gene vizinho chega a 3,8 kb enquanto para Pb18, a distância chega a 6,5 Kb. Em ambos os casos, o gene vizinho codifica uma “predicted protein” (figura 34). Em *H. capsulatum*, a região 5´ intergêncica possui apenas 500 pb e o gene “upstream” codifica uma proteína hipotética. Para as espécies de *Aspergillus*, as regiões intergêncicas variam em tamanho, sendo 3,6 kb para o *A. terreus*, 1,6 kb para o *A. fumigatus* e 2,2 kb para o *A. nidulans*. No *A. terreus* e *A. nidulans* o gene 5´ vizinho codifica uma proteína hipotética. Em *A. fumigatus*, o gene “upstream” codifica a proteína importina 11, a qual, como mencionado anteriormente, tem a função de ligar e transportar proteínas ribossomais do citoplasma para o núcleo (Plafker & Macara, 2002). No Pb339, esse gene está “downstream” ao PbGP43 (Moraes, 2003, Feitosa et al., 2003).

A presença de elementos de transcrição putativos nas regiões exploradas acima foi verificada através do programa TFSearch. A tabela a seguir resume o número de alguns dos elementos encontrados.

Tabela 1 – Frequência de alguns elementos de transcrição putativos detectados na região intergêncica do PbGP43 de *P. brasiliensis* e homólogos fúngicos. Para o Pb339, a região completa é desconhecida e a análise abrange apenas 2047 pb, sendo que apenas 1500 pb foram analisados na formação da tabela.

	NIT2	ADR1	GCR1	StuAP
<i>P. brasiliensis</i> (339) <sup>1</sup>	19	3	-	-
<i>P. brasiliensis</i> (3) <sup>1</sup>	15	4	-	-
<i>H. capsulatum</i>	4	4	-	-
<i>A. terreus</i>	8	11	2	2
<i>A. fumigatus</i>	11	3	-	1
<i>A. nidulans</i>	18	10	3	2

<sup>1</sup> Sequência de 1,5 Kb.

Os fatores NIT2 e ADR1 foram escolhidos pois estão envolvidos com a ativação de genes diretamente ligados ao metabolismo do nitrogênio e da enzima álcool desidrogenase, respectivamente. O elemento NIT2 aparece em número elevado na maioria dos organismos e foi investigado neste trabalho. O fator GCR1 está ligado à ativação de genes que codificam enzimas glicolíticas como enolases

e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase em *S. cerevisiae* (Holland et al., 1987). StuAP é uma família de fatores presentes no gênero *Aspergillus*. São classificadas como “developmental modifiers” e estão envolvidas com a modificação dos padrões de diferenciação celular e organização espacial dos conidióforos. Células *stuA* mutantes produzem conidióforos curtos (Miller et al., 1992). Como esperado, estão presentes apenas no gênero *Aspergillus* e foram incluídas para atestar a confiabilidade das análises feitas pelo programa TFSearch.

Como mencionado anteriormente, o que chama atenção na tabela é o elevado número de elementos NIT2 no *P. brasiliensis* e no *A. nidulans*. No *P. brasiliensis* a quantidade de elementos ADR1 é consideravelmente menor do que aquela detectada em *A. terreus* e *A. nidulans*. Em 500 pb do *H. capsulatum* foi encontrado número igual de elementos NIT2 e ADR1. Já para *A. terreus*, o número de elementos NIT2 e ADR1 é similar. GCR1 só ocorreu em *A. nidulans* e *A. terreus*. É importante salientar que, com exceção dos elementos NIT2, todos os outros estão direcionados para o gene.

#### **4.15. Transcrição do PbGP43 durante o crescimento de *P. brasiliensis* em meio definido**

Para a determinação da quantidade de transcritos do gene PbGP43 acumulados ao longo do crescimento da fase leveduriforme do *P. brasiliensis* em meio definido, os isolados Pb3, Pb18 e Pb339 foram cultivados por 12 dias em meio F12/glicose. Para tal, as células foram inoculadas em meio fresco a partir de pré-inóculos de 10 dias de crescimento e alíquotas foram coletadas de 2 em 2 dias para análise.

A figura 35 mostra o resultado gráfico dos seguintes parâmetros: número (linhas vermelhas), viabilidade das células (linhas azuis) e o pH do sobrenadante de cultura (linhas verdes). Nota-se que a curva de crescimento foi semelhante para os 3 isolados, ou seja, a fase lag ocorreu até o sexto dia, a fase log de maior duplicação estendeu-se do sexto ao oitavo dia, quando as células entraram em fase log tardia. Durante o período avaliado, a viabilidade sofreu pouca variação (93%, dia 2 a 80%, dia 12), porém um declínio mais acentuado coincidiu com a fase logarítmica tardia (dia 8). A cultura do Pb339 apresentou um número de

células aparentemente menor, mas isso ocorreu porque havia muitos grumos dificultando a contagem real. Foram contadas apenas as células ao redor dos grumos e que puderam ser distinguidas das outras. O pH extracelular das culturas Pb3 e Pb18 acidificou de 6,0 para 5,0 entre 2 e 4 dias, aumentando progressivamente até 7,0 para o Pb3 e 8,0 para o Pb18. A variação do pH da cultura do isolado Pb339 foi diferente em dois aspectos: o pico de acidez ocorreu no oitavo dia (pH 5,0) e aos 12 dias estava em 6,5.

A quantidade relativa de mRNA do gene *PbGP43* foi determinada para cada ponto da curva por RT-PCR quantitativo em tempo real, para o qual a  $\alpha$ -tubulina foi o gene de referência (figura 36). A dosagem do ponto zero refere-se às células do pré-inóculo correspondente. Durante o tempo avaliado, o perfil dos três gráficos mostra um pico distinto de mRNA acumulado que ocorreu aos 4 dias (Pb3 e Pb339) ou aos 6 dias (Pb18). Em relação ao ponto zero, no pico o foi de aproximadamente 50x (Pb3), 4x (Pb18) ou 200x (Pb339). Estes pontos coincidem com a ascensão do número de células para os três isolados durante o crescimento.

Vale a pena ressaltar a diferença na quantidade de transcritos produzida por cada isolado, ou seja, Pb18 teve uma expressão muito abaixo daquela vista em Pb3 e, principalmente, em Pb339. Esse resultado foi visto repetitivamente em nossas experiências. No caso do Pb339, isso coincide com o fato do isolado ser um ótimo produtor de gp43 (Stambuk et al, 1988). Tendo em mãos os resultados de expressão do gene *PbGP43* ao longo dos dias de crescimento, a maioria dos ensaios de indução foram feitos usando culturas com o tempo de crescimento próximo ao pico de transcrição do gene. Os ensaios onde isso não ocorreu foram realizados antes das determinações apresentadas na figura 36.

#### **4.16. Efeito do soro fetal bovino (SFB) sobre a transcrição do *PbGP43***

Para verificar se componentes do SFB poderiam estimular a transcrição do *PbGP43*, culturas do *P. brasiliensis* dos isolados Pb3, Pb18 e Pb339 foram estimuladas por 30 min com 2% de SFB. A figura 37 mostra o resultado de três experimentos independentes, um para cada isolado onde, em relação ao controle, não houve variação significativa na resposta rápida no acúmulo ou diminuição de transcritos do gene após o estímulo em qualquer isolado. As células para os

isolados Pb339 e Pb3 foram crescidas por 4 dias antes da adição do SFB e 6 dias para o isolado Pb18.

#### **4.17. Efeito de fontes de carbono sobre a transcrição do PbGP43**

O primeiro experimento visando descobrir o efeito da adição de glicose ao meio de cultura de *P. brasiliensis* utilizou o isolado Pb18 com 10 dias de crescimento em meio F12/glicose. As células foram estimuladas com uma concentração final de 3% de glicose pelo acréscimo de 1,5% do monossacarídeo. Alíquotas das células foram coletadas após 15 min, 45 min e 24 h para análise. Como pode ser visto na figura 38, em 15 min houve um pico de acumulado de transcrito 5x maior que o do controle. Aos 45 min, a quantidade relativa de transcritos praticamente retornou às condições iniciais e em 24h houve um aumento em relação ao ponto anterior (2,5x maior).

A figura 39 mostra os experimentos de indução com glicose usando todos os isolados. Culturas em meio F12, que contém 0,18% de glicose na sua formulação, foram acrescidas de 1,5% de glicose por 30 min (figura 39a). Estes mesmos isolados, agora crescendo em meio F12/glicose, tiveram a concentração do açúcar elevada a 3,0% por 30 min adicionais (figura 39b). Os 3 isolados foram reprimidos com 1,5% de glicose e estimulados quando a concentração foi elevada a 3%, todavia para Pb3 e Pb339 o estímulo foi tal que ultrapassou em 5x e 7x os valores do controle, respectivamente. Esses resultados corroboram aquele da figura 38 para Pb18, onde houve o aumento na quantidade de transcritos do gene quando a concentração de glicose foi elevada de 1,5 para 3%. Por outro lado, os índices de repressão com 1,5% de glicose foram de 2,6x para Pb3, 4x para Pb18 e 3,5x para Pb339. É digno de nota que no meio F12 não observamos alterações no pH do meio como aquelas vistas em F12/glicose e em YPD (Puccia et al., 1998), ou seja, o pH das culturas variou entre 7,5 e 8,0.

Os experimentos anteriores sugeriram a repressão do PbGP43 com 1,5% de glicose. A figura 40 mostra os resultados dos ensaios de privação de glicose, nos quais as células controle foram condicionadas em F12/glicose e depois lavadas e ressuspensas em F12 não suplementado. Os resultados são de difícil interpretação, já que não foram reprodutíveis em experimentos duplicados para o mesmo isolado. O transcrito praticamente não variou (Exp1 de Pb3, Pb18 e

Pb339), foi reprimido (Exp 2 de Pb3 e Pb339) ou aumentou ligeiramente (Exp2 de Pb18) com a privação de glicose.

## V. DISCUSSÃO

Na primeira parte deste trabalho, nós procuramos elementos de transcrição putativos dentro dos primeiros 326 pb da região 5' intergênica do *PbGP43* de *P. brasiliensis* usando a técnica de “DNase I footprinting” e EMSA. A sequência de nucleotídeos entre as posições –255 e –217 foram protegidas e dois oligonucleotídeos contendo uma região de sobreposição correspondendo a estas regiões (Et12 e Et23) foram também positivas em ensaios de EMSA quando incubados com extrato total de proteínas da fase leveduriforme do fungo. Em ensaios de EMSA feitos com extratos totais dos isolados Pb339, Pb18 e Pb3, ficou evidente que as bandas migraram de forma mais rápida com extratos do isolado Pb3. Esta observação foi interessante, pois pode estar relacionada com as diferenças genéticas encontradas nos isolados de *P. brasiliensis* pertencentes ao grupo PS2 (Morais et al., 2003; Matute et al., 2006).

Chamou atenção o fato de que as regiões protegidas nos ensaios de “DNase I footprinting” correspondentes às sondas Et12 e Et23 apresentaram poucos elementos de transcrição putativos identificados pelo programa TFSearch. Considerando que estas sondas formaram intensas bandas nos ensaios de EMSA e que competiram entre si, pode-se especular que Et23 se liga a mais de uma proteína e que Et12 estaria competindo com uma delas, já que Et12 foi um inibidor mais fraco que Et23. Mais uma vez, os nucleotídeos em comum nestas duas sondas não mostram qualquer sítio de ligação para fatores de transcrição. Assim, um elemento de transcrição ainda não descrito poderia estar envolvido nessas ligações. Nossos resultados sugeriram que uma adenina na posição –230 seria importante para uma ligação de maior afinidade a Et23.

As regiões contendo Et4 e Et5, sondas negativas nos ensaios de EMSA, são ricas em elementos de transcrição putativos e foram protegidas nos ensaios de “DNase I”. Uma variação de 33-mer de Et4 contendo um elemento TATC (NIT2) na posição 5' foi testada, porém os ensaios de EMSA continuaram negativos (dado não mostrado). Esse resultado sugere que este elemento NIT2, e todos os outros presentes dentro desta sonda, provavelmente não são funcionais ou necessitam de sequências maiores para se ligarem.

Foram testadas duas sondas contendo elementos de transcrição putativos CreA (C/GC/TGGA/GG). Este fator de transcrição contendo um motivo do tipo dedo de zinco é um importante fator regulatório do catabolismo de fontes de carbono em fungos como *A. nidulans*. Embora uma das sondas tenha produzido uma banda intensa, não fica claro se ela é específica, pois o complexo formado só pôde ser inibido com 3000x de excesso molar da sonda não marcada. Existem dois outros elementos CreA dentro da região clonada posteriormente, nas posições -351 e -851, no entanto, sua capacidade de formação de complexos não foi testada.

Os resultados deste trabalho foram reunidos com aqueles previamente obtidos pela Dra. Flávia V. Morais (Morais, 2003), a qual começou a explorar no laboratório os elementos de transcrição putativos da região proximal promotora do PbGP43. O resultado foi o manuscrito anexo, o qual contém uma discussão que abraça os dois trabalhos. No geral, esse trabalho fornece importantes informações sobre possíveis elementos de transcrição presentes na região proximal do promotor do PbGP43.

Durante este projeto foi clonado e sequenciado um fragmento de 1721 pb correspondente à região 5' intergênica do PbGP43 do isolado Pb339 através de PCR com oligonucleotídeos conhecidos da porção 5' do gene (anti-sense) e oligonucleotídeos sense resultantes da análise de similaridade entre sequências do locus homólogo dos fungos *H. capsulatum*, *A. fumigatus*, *A. nidulans* e *A. terreus*, filogeneticamente próximos ao *P. brasiliensis*. Na extremidade 5', foi surpreendente notar que a primeira ORF ocorreu após aproximadamente 5,5 kb da  $\beta$ -1,3-exoglucanase em *H. capsulatum* e 2,2 e 3,6 kb em *A. nidulans* e *A. terreus*, respectivamente. Em *H. capsulatum*, essa ORF correspondia a um gene que codifica uma proteína GPI-ancorada ("GPI-anchored protein"). Hoje sabemos através do sequenciamento do genoma de *P. brasiliensis* ([http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides\\_brasiliensis/MultiHome.html](http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html).) que um gene codificando uma proteína GPI-ancorada está localizado a 5' do PbGP43 a distâncias que variam de 11 kb no isolado Pb3 a 12 kb no isolado Pb18. Além disso, em *A. nidulans* e *A. terreus*, a proteína GPI-ancorada ocorre,

porém, localiza-se a 9,2 kb em *A. nidulans* e 8,5 kb em *A. terreus* em relação à  $\beta$ -1,3-exoglucanase. Há duas ORFs mais próximas (2,2 e 3,6 kb) ao *EXG1* que codificam proteínas de função desconhecida.

Este é o segundo locus conservado identificado pelo nosso grupo, sendo que o primeiro corresponde ao locus dos genes *MDJ1/LON*, os quais codificam proteínas de direcionamento mitocondrial (Batista et al., 2006). Nesse caso, ambos os genes estão relacionados ao estresse e compartilham uma região 5' intergênica de 485 bp, onde foram mapeados elementos de transcrição de choque térmico e estresse oxidativo.

Quando o fragmento 2047 pb (1721 pb recém clonado somados aos 326 pb já conhecidos) do fragmento correspondente à região 5' intergênica do *PbGP43* do *Pb339* foi totalmente sequenciado constatou-se no interior do fragmento, a existência de duas regiões com um elevado grau de identidade (~85%), que foram denominadas regiões 1a (-600 e -125) e 1b (-1600 a -1160). Ambas as regiões apresentam uma extensão de aproximadamente 450 pb, sendo que elas estão separadas por 560 pb no *Pb339* e somente por 60 no *Pb3*. A sequência da região 5' intergênica no *Pb18* possui ~98 % de identidade com a de *Pb339*, portanto possui as regiões 1a e 1b nas mesmas posições que *Pb339*. O mais interessante foi a análise da sequência de *Pb01*, que além de ser consideravelmente diferente dos demais isolados analisados, não possui as regiões 1a e 1b separadas e sim unidas como uma única sequência. Carrero et al. (2008) mostraram em seu trabalho que *Pb01* é um isolado que não agrupa com os demais em análises filogenéticas. Os autores também sugerem que *Pb01* pode ser uma outra espécie. Apesar das diferenças na região 5' intergênica, os 500 pb iniciais de *Pb01* são conservados quando comparados com *Pb339* e *Pb18*.

A comparação da região 5' intergênica do *Pb339* com a de *Pb3* mostrou que este último é 510 pb menor, através do sequenciamento do produto de PCR análogo. Esse sequenciamento foi realizado no sentido de confrontar a sequência truncada apresentada no genoma do *Pb3*. As diferenças não estão restritas somente a esses isolados; reações de PCR usando o mesmo par de oligonucleotídeos, porém DNAs genômicos de diferentes isolados, mostrou três perfis de amplicons formados: *Pb2*, 4 e 5 ~1500 pb; *Pb9* e 17 ~3000 pb e *Pb6*, 8, 10, 11, 14, 16 e 18 ~2000 pb.

O genoma do isolado Pb3 mostra que o gene vizinho “upstream” codifica uma proteína desconhecida que se localiza a 3814 pb do códon inicial do PbGP43. Em genes homólogos ao PbGP43 de *H. capsulatum* e *Aspergillus* as distâncias para o gene vizinho “upstream” variaram entre 500 e 3600 pb.

As diferenças na região 5' intergênica do PbGP43 entre os isolados Pb339 e Pb3 poderiam explicar em parte porque o isolado Pb339 acumula mais mRNA do PbGP43 do que o isolado Pb3, e este mais que o isolado Pb18, como observado consistentemente ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Essa observação está ilustrada nos resultados de RT-PCR em tempo real da tabela abaixo, em experimentos realizados com *P. brasiliensis* cultivado em meio definido. Observe-se que o acúmulo de mRNA de experimentos independentes foi pelo menos 100x menor para Pb3 e até 2500x menor para Pb18, quando comparados ao Pb339.

**Acúmulo de transcrito do PbGP43 em diferentes isolados**

Isolado	Amostra	AT	Nº de células/mL	dias
Pb339	Exp1	<b>3860 ± 51,5</b>	$9,2 \times 10^6$	4
	Exp2	<b>4443 ± 25,6</b>	$1,1 \times 10^7$	4
	Exp3	<b>10106 ± 128</b>	$1,6 \times 10^7$	4
Pb3	Exp1	<b>41,6 ± 3,9</b>	$8,9 \times 10^6$	4
	Exp2	<b>55,5 ± 4,3</b>	$1 \times 10^7$	4
	Exp3	<b>51,66 ± 4,8</b>	$1,1 \times 10^7$	4
Pb18	Exp1	<b>7,4 ± 0,8</b>	$1,4 \times 10^7$	6
	Exp2	<b>4,1 ± 0,5</b>	$1 \times 10^7$	6
	Exp3	<b>6,95 ± 0,5</b>	$1,2 \times 10^7$	6

(AT), **acúmulo de transcrito (nº cópias);**  
(Nºcélulas), **nºcélulas no dia da extração do RNA;**  
(Nºde dias), **nº de dias de crescimento das culturas.**

Carrol (2000) discute porque as mudanças nos sistemas de elementos *cis* regulatórios dos genes teriam uma maior contribuição para a evolução da diversidade morfológica do que as mudanças no número de genes ou mudanças na função de uma proteína produzida por um determinado gene. Embora possam existir muitos fatores contribuindo para a importância dos elementos *cis* regulatórios na evolução, o autor enfatiza em seu artigo que o principal deles seria a organização modular do sistema de elementos *cis* regulatórios, nos quais elementos individuais podem agir e, portanto, evoluir independente de outros. Além deste, para o autor, existe um grande grau de “liberdade” na seqüência de elementos *cis* regulatórios que dá a eles tolerância a uma grande variedade de

mudanças causadas por mutações. Elementos regulatórios não precisam manter ORFs, eles podem funcionar mesmo a grandes distâncias e também em qualquer orientação em relação às unidades transcrpcionais que eles controlam. O oposto acontece com regiões codificadoras que podem ser anuladas facilmente por pequenas mutações. Considerando que alterações nos elementos *cis* regulatórios teriam uma contribuição maior para a evolução de um determinado gene, o que dizer então da ausência de um fragmento de 510 pb como ocorre no Pb3? Ou a duplicação de uma determinada região como no caso das regiões 1a e 1b? Outra informação relevante seria o tamanho da região 5' intergênica do PbGP43 que no Pb3 equivale a 3,8 Kb e no Pb18 a 6,4 kb. Esta região não possui ORFs, ou seja, está sujeita a um grande acúmulo de mutações que poderiam contribuir para a diferença no perfil de expressão do gene nos diferentes isolados.

Uma verificação rápida do locus do PbGP43 no isolado Pb18 mostrou que a ORF vizinha “upstream” codifica uma proteína hipotética. Desta região, os primeiros 2047 pb são 98% idênticos aos da Pb339. Será interessante verificar no futuro próximo se a região intergênica total do PbGP43 do Pb339 é semelhante à do Pb3 ou do Pb18 para endereçar de maneira experimental o que leva às diferenças transcrpcionais do gene em diferentes isolados e, possivelmente, em diferentes grupos filogenéticos do *P. brasiliensis* (Morais et al., 2000; Matute et al., 2006). Outro ponto a ser explorado refere-se à região entre -1040 e -840 que apresenta um potencial repressor.

Quando os 2047 pb correspondentes à região 5' intergênica do PbGP43 do isolado Pb339 foi analisada, o programa para computador TFSEARCH (<http://molsun1.cbrc.aist.go.jp/research/db/TFSEARCH.html>) apontou para a presença de uma grande quantidade e variedade de elementos de transcrição putativos. Na extremidade 5', destaca-se a presença de STRE-like. O fator de transcrição STRE (“stress-response element”) está envolvido na ativação da transcrição por choque térmico, estresse oxidativo, estresse osmótico e carência de fontes de nitrogênio. Durante um estresse osmótico, STRE ativa dois genes *HOG1* e *PBS2*, que codificam um membro da família das MAP kinases (“mitogen-activated protein”) e um membro da família das MAP kinases kinases,

respectivamente (Schüller et al., 1994). Neste trabalho, os ensaios de elevação da concentração de glicose para 3% levaram a um aumento no acúmulo de transcritos do gene, a qual pode ter sido uma resposta rápida do fungo à variação brusca na concentração de glicose. Alternativamente, pode ter sido resultado de um leve estresse osmótico. Existem dois elementos de transcrição STRE na região 5' UTR do gene *PbGP43* (-1887.ao -1879; -1797.ao-1789). Nossos experimentos de EMSA testaram as sondas P10 e P11 que contém esses elementos putativos, porém o resultado foi negativo (Fig. 13a), mesmo quando foram usados extratos preparados em condições de estresse osmótico com 0,6 M de NaCl (Fig. 14b). Por outro lado, no momento, desconhecemos a resposta do gene a esse tipo de estímulo.

Na extremidade 3' do fragmento clonado, ou seja, próxima à ORF do *PbGP43*, entre os vários fatores putativos podemos destacar ADR1, GCN4 e NIT2.

A fator de transcrição ADR1 de *Saccharomyces cerevisiae* é uma proteína que regula a expressão de genes envolvidos com o metabolismo de fontes de carbono. Primeiramente identificado como o regulador do gene *ADH2* (álcool desidrogenase), ADR1 se liga ao promotor deste gene ativando sua transcrição. O gene *ADH2* é reprimido na presença de glicose (Bowers et al., 1999). Esse fator liga-se ao DNA através de dois motivos do tipo dedo de zinco ("zinc finger") da classe Cys-2-His-2 (C2H2) (Cheng et al., 1994). As sondas P10 e P14, ambas possuindo elementos de transcrição ADR1, foram negativas em ensaios de EMSA; no entanto, estas mesmas sondas não foram testadas com extratos proteicos de células crescendo em meio com baixa concentração de glicose.

GCN4 é um regulador transcricional positivo que possui um motivo de ligação ao DNA do tipo zíper de leucina ("basic region leucine zipper"). Esse fator liga-se especificamente a promotores de genes envolvidos com a biossíntese de aminoácidos e induz de forma coordenada a ativação da transcrição (Ellenberger et al., 1992). Em levedura, muitos genes codificando enzimas envolvidas na biossíntese de aminoácidos estão sujeitas a um sistema comum de regulação. O fator GCN4 é necessário para o aumento da expressão desses genes quando a levedura está crescendo em meio pobre em fonte de aminoácidos. Thireos et al. (1984) mostraram que a expressão do fator GCN4 é regulada no nível traducional:

a eficiência da tradução do mRNA de GCN4 aumenta dramaticamente em condições de carência de aminoácidos. HIS3 e HIS4 são dois genes ativados por ele. Na condição testada no presente trabalho, a sonda E1, que possui um elemento GCN4, foi negativa nos ensaios de EMSA.

NIT2 também é um fator regulador positivo da transcrição de genes que codificam enzimas envolvidas com o catabolismo de fontes de nitrogênio durante condições de carência deste elemento (Marzluf, 1997). A discussão dos dados referentes a esse fator estão adiante neste capítulo.

Os trabalhos de Moraes (2003) e Carvalho et al. (2005) em nosso laboratório iniciaram as análises transcricionais do *PbGP43* do *P. brasiliensis*, cujo acúmulo de mRNA foi analisado em 3 isolados do fungo. A análise foi feita durante a transição da fase de micélio para levedura provocado pelo aumento de temperatura de crescimento 26°C para 36°C e também 30 min após o aumento de temperatura de 36°C para 42°C em meio YPD modificado. Os resultados evidenciaram o controle transcricional do gene, porém mostraram que uma regulação pós-transcricional e pós-traducional possivelmente existe, já que a relação entre o nível de transcrito com a produção de proteína durante a transição dimórfica não foi óbvia. *Pb3* e *Pb18*, por ex., possuíram níveis semelhantes de transcrito, porém níveis diferentes de proteína em alguns pontos. Isso pode ter ocorrido devido a modificações pós-transcricionais ou até mesmo por comprometimento da secreção. Os resultados também mostraram que isolados diferentes podem apresentar diferenças na regulação gênica.

No presente trabalho as análises de regulação transcricional do *PbGP43* foram feitas exclusivamente na fase leveduriforme de 3 isolados distintos do fungo crescidos em meio definido, com resultados inéditos. A técnica de RT-PCR quantitativo em tempo real foi usada para este propósito. Nosso objetivo foi encontrar estímulos reguladores da transcrição do gene de forma a correlacionar os elementos de transcrição mapeados na região promotora com a sua funcionalidade.

Os resultados aqui apresentados mostram avanços significativos no conhecimento do controle transcricional do *PbGP43* in vitro, quando o *P.*

*brasiliensis* foi cultivado em meio definido. Dentro das condições testadas, soro fetal bovino não alterou a transcrição, enquanto 1.5% de glicose aparentemente provocou sua repressão. Os resultados mais interessantes ficaram por conta da indução com sulfato de amônio, o qual provocou rápida repressão no acúmulo do mRNA do PbGP43, como discutido adiante.

A escolha dos indutores não foi aleatória. O uso de soro no meio de cultura tentou aproximar as condições de crescimento às condições de infecção. A gp43 é indubitavelmente expressa na maioria dos pacientes com paracoccidiodomicose, já que é possível fazer o diagnóstico imunológico da doença em quase 100% dos pacientes usando a gp43 como antígeno. Garcia (2004), estudando a expressão de gp43 *in vitro*, observou que alguns isolados que não expressavam gp43 no meio de cultura passaram a secretar o antígeno após recuperação de órgãos de camundongos infectados. Outros isolados, no entanto, mesmo após passagem pelo animal continuaram não secretando a glicoproteína. De qualquer forma, a expressão do PbGP43 *in vivo* pode estar sendo influenciada por fatores além dos componentes não presentes no soro. Além disso, em nossos experimentos usamos soro fetal bovino e não soro normal de camundongo.

A opção por variações na concentração da fonte de carbono (glicose) levou em consideração o fato de que a gp43 possui alta porcentagem de identidade com exo- $\beta$ -1,3-glicanases fúngicas (Cisalpino et al, 1996). A molécula, no entanto, não apresentou atividade enzimática, provavelmente devido à substituição do ácido glutâmico no sítio catalítico NEP por uma lisina. No entanto, por considerar a possibilidade do PbGP43 ter conservado características do promotor das exoglucanases, atualmente testamos as variações de transcrição do gene quando o fungo foi estimulado com glicose, o qual é um conhecido inibidor da expressão de exoglucanases (revisão em Martin et al, 2007).

Algumas  $\beta$ -glucanases fúngicas parecem ser constitutivas e são sintetizadas independentemente da fonte de carbono usada (revisão em Martin et al., 2007). Entretanto, o crescimento fúngico na presença de compostos como a quitina, que não é substrato para as  $\beta$ -glucanases, leva a um aumento marcante na sua síntese. A presença de uma molécula indutora, associada à ausência de glicose, é considerada condição essencial para a produção de  $\beta$ -glucanases em

fungos, sendo sua síntese geralmente regulada por indução e repressão catabólica. Acredita-se que as glucanas possuem várias funções. Na parede celular de *Sacharomyces cerevisiae*, as  $\beta$ -(1,3)-glucanas são os principais responsáveis pela força mecânica (revisão em Klis et al, 2002).  $\beta$ -glucanas citoplasmáticas e extracelulares provavelmente agem como compostos para armazenagem de carbono que podem ser reutilizados quando o organismo se encontra em meio com limitação das fontes deste elemento. Isto sugere que estes compostos desempenham uma importante função na sobrevivência destes organismos. As exo-hidrolases descritas até o momento catalisam a hidrólise das cadeias de  $\beta$ -glucana pela clivagem sequencial dos resíduos de glicose do terminal não redutor, liberando esta molécula como único produto da hidrólise. Evidências sugerem que as  $\beta$ -(1,3)-glucanases fúngicas desempenham papéis chave em processos morfogenéticos-morfolíticos durante o desenvolvimento, diferenciação e também na mobilização de  $\beta$ -glucanas em resposta a condições de exaustão de energia e de fontes de carbono. *Phanaerochaete chrysosporium* produz  $\beta$ -glucanas extracelulares em meio rico em glicose, mas depois da retirada desta fonte de carbono do meio há um aumento na produção das  $\beta$ -glucanases (revisão em Martin et al, 2007). Grandes quantidades de glucanases são frequentemente obtidas crescendo os fungos na presença de laminarina, escleroglucana ou preparações de parede celular fúngica contendo misturas complexas de glucanas como únicas fontes de carbono para as  $\beta$ -(1,3)-glucanases. No entanto, tais generalizações são sempre perigosas, pois em alguns fungos, grandes quantidades de  $\beta$ -(1,3)-glucanases são obtidas crescendo o fungo na presença de compostos contra os quais as glucanases não possuem atividade, como pustulan e quitina (Pitson et al., 1997b; El Katatny et al., 2000a e b; Jayus et al., 2005a , b). Como se pode notar, o controle das  $\beta$ -glucanases é complexo e varia de um organismo para o outro.

Nossos resultados mostraram uma diminuição no acúmulo do transcrito do *PbGP43* pelo aumento da concentração de 0,18% para 1,5% de glicose. Desta forma, é possível que elementos reguladores da transcrição de glucanases tenham sido mantidos no promotor do *PbGP43*.

Por outro lado, o efeito causado pela adição de glicose 1,5% não foi revertido em nossos experimentos de privação do açúcar, como esperávamos acontecer. Esses experimentos, na verdade, não foram reproduzíveis, sendo, portanto, inconclusivos. De qualquer forma, duas hipóteses podem explicar os resultados vistos nestes experimentos: a) a resposta do fungo quando a concentração de glicose no meio aumenta é mais rápida que sua resposta quando o contrário acontece; b) 0,18% de glicose é uma quantidade que pode ainda garantir, por um certo tempo, a inibição do gene.

O teste do sulfato de amônio e glutamina como moduladores do PbGP43 ocorreu inicialmente em função da presença do grande número de elementos NIT2 (motivo GATA) putativos na região promotora do gene. Como mencionado anteriormente, o gene que codifica uma  $\text{exo-}\beta(1,3)\text{-glucanase}$  de *T. atroviride* (*Gluc 78*) foi expresso somente sob condições de baixa concentração de fontes de nitrogênio e não na presença de seu substrato ou compostos relacionados. Isto sugere que fatores regulatórios além da repressão catabólica e indução podem desempenhar um papel importante na síntese de *Gluc 78*. Aparentemente não há outro exemplo similar em fungos, embora múltiplos sítios NIT2-like foram detectados no promotor do gene codificando uma  $\beta(1,6)\text{-glucanase}$  de *Verticillium fungicola* (revisão em Martin et al., 2007).

Nossos resultados com o PbGP43, que pode ter conservado elementos regulatórios de glucanases, mostram que o gene é modulado, ainda que de maneira pouco intensa, por fontes primárias de nitrogênio. Esses resultados foram indiretamente corroborados por ensaios de EMSA. As sondas N8, N7, N5 e N4, contendo elementos NIT2-like, formaram complexos que foram mais intensos com extratos obtidos na ausência de sulfato de amônio. NIT2 age como ativador quando ligado ao promotor dos genes que ele controla. A expressão do gene cessa quando do promotor se desliga e a regulação negativa depende de NMR (“nitrogen metabolic regulation”) (Marzluf, 1997). Proteínas homólogas a ambos os reguladores foram encontrados no genoma de *P. brasiliensis*. Estas observações, somadas aos nossos resultados, indicam que o mecanismo de regulação da expressão de genes controlados pelos fatores AreA e NIT2 pode ocorrer da mesma maneira no *P. brasiliensis*. Tentativas de se expressar em

bactéria a região C-terminal do homólogo de AreA de *P. brasiliensis* foram feitas, porém, nenhuma delas funcionou.

É digno de nota que as sequências de N7 e N5 ocorrem duas vezes e N4 está localizada tanto na Região 1a quanto na Região 1b e isso forneceria mais 2 sítios de ligação para o fator de transcrição ligante destes oligonucleotídeos. Os elementos NIT2 putativos da região 5' intergênica do *PbGP43* estão, em sua maioria, organizados em “clusters”, sendo que a maior distância entre os dois núcleos GATA (TATC, na fita complementar) de elementos adjacentes é de 35 pb e a menor de 11 pb. Chiang and Marzluf (1994) examinaram por EMSA a afinidade da proteína de fusão NIT2- $\beta$ GAL, composta pelo domínio de ligação ao DNA do fator de transcrição NIT2 fusionado à  $\beta$ -galactosidase, a fragmentos de DNA que continham dois elementos GATA separados por diferentes números de bases. Os autores visavam verificar a importância da distância entre dois elementos GATA adjacentes na formação do complexo DNA-proteína. Seus resultados mostraram que sítios fortes para a ligação do fator NIT2 devem estar a uma distância máxima de 30 pb; a 40 pb ainda houve ligação, porém mais fraca; acima deste valor a ligação foi praticamente abolida. Os autores ainda verificaram a importância do número mínimo de elementos NIT2 adjacentes na ligação da proteína de fusão NIT2- $\beta$ GAL ao DNA em ensaios de EMSA. Usando um oligonucleotídeo de 40 pb contendo 2 elementos NIT2 separados por 10 pb, os autores concluíram que pelo menos 2 elementos são necessários para a formação de um complexo estável. No entanto, eles não descartaram a possibilidade de um único elemento com características especiais conseguir também formar um complexo estável. Isto foi confirmado por Tao and Marzluf (1998) em um outro artigo onde os autores estudaram a importância dos “clusters” de elementos NIT2 no promotor do gene *Nit-3*, que codifica uma nitrato redutase. O promotor deste gene possui 3 “clusters” denominados I, II e III. Ensaios de EMSA usando uma sonda de 33 pb contendo um único elemento GATA (presente no “cluster” II) e a proteína NIT2 expressa em *E. coli* conseguiu formar um complexo oligonucleotídeo-NIT2 estável. O mais interessante é que o “cluster” II, contendo apenas um único elemento GATA, é o mais importante, seguido pelo “cluster” I, na regulação de *Nit-3*. Os resultados dos ensaios de gene repórter conduzidos em *A. nidulans* (WG355) mostraram que os primeiros -480 pb da

região 5' do PbGP43 contém os elementos necessários não só para ativação como também para a modulação negativa do gene na presença de sulfato de amônio. Pb339, Pb3 e Pb18 mostraram um padrão semelhante de regulação por fontes de N<sub>2</sub> e apesar das diferenças que apresentam no número de elementos NIT2, aqueles presentes no fragmento proximal de 480 pb (N1, N2, N3 e N4) são conservados. Pelo menos um deles, N4, foi capaz de formar um complexo DNA-proteína em ensaios de EMSA e possivelmente é o responsável pela modulação do PbGP43 por fontes primárias de nitrogênio observada neste trabalho. Isso deverá ser verificado através de uma mutação do núcleo GATA na construção 480-lacZ e verificação da expressão da enzima em *A. nidulans*.

Além do número de elementos NIT2 adjacentes e do espaçamento entre eles, o que mais determinaria a capacidade de ligação do fator ao elemento? No artigo de Chiang and Marzluf (1994), os autores também estudaram a importância dos nucleotídeos situados a 5' do núcleo GATA. As sondas usadas continham dois elementos GATA situados distantes em 10 pb e diferentes combinações de nucleotídeos "upstream" do núcleo GATA. A conclusão foi que sequências TA parecem ser preferidas em sítios fortes de ligação, seguidas por AA, TG e AG em ordem decrescente. Isto foi confirmado por Tao and Marzluf (1998), porém estes autores testaram um oligonucleotídeo contendo apenas um elemento GATA em que os 4 nucleotídeos "upstream" e "downstream" foram modificados. Em ambos os casos, as modificações quase aboliram a formação do complexo, ou seja, os nucleotídeos a 3' também contribuem para a ligação do fator. Os autores não discutem um provável envolvimento dos nucleotídeos a 3' na ligação do fator em sítios contendo um único elemento. Nossos resultados mostraram a presença de timinas a 5' e a 3' do núcleo GATA em todos os elementos positivos e isso pode ser significativo funcionalmente.

Uma outra abordagem foi a mutação no sítio TATC para GATC nas sondas testadas em EMSA, a exemplo da estratégia empregada por Chiang and Marzluf (1994). Nessa publicação, as sondas usadas continham dois elementos GATA situados a 10 pb de distância e somente o segundo elemento foi mutado em diferentes posições formando as combinações GATC e TATA. As sondas contendo um dos GATA mutados perdeu de forma acentuada a capacidade de

formar complexos DNA-proteína em EMSA, principalmente quando a combinação foi GATA-GATC. Nossos resultados mostraram, para todas as sondas, uma diminuição da intensidade das bandas formadas com sonda mutada. Esses resultados reforçam a suspeita de que o fator ligante destes oligonucleotídeos seria um NIT2-like. Na tentativa de se isolar e identificar o fator ligante dos oligonucleotídeos N7 e N4, colunas de afinidade contendo a sequência de DNA destes oligonucleotídeos ligadas a uma matriz de CNBr Sepharose foram construídas, porém nenhuma proteína de ligação pode ser evidenciada.

A grande quantidade de elementos NIT2 putativos presentes na região 5' intergênica do *PbGP43* ocorreu também na região 5' intergênica dos genes homólogos em outras espécies. Além da quantidade, a organização destes elementos em "clusters" ficou evidente. Somente em *A. terreus* a quantidade desses elementos foi baixa e todos estavam dispersos ao longo da região intergênica. Desta forma, fica evidente que a presença destes "clusters" na região intergênica do *PbGP43* e seus homólogos pode indicar um sítio de ligação do fator, bem como um sítio de importância fisiológica, já que a ligação por si não implica em ativação.

Os resultados apresentados quanto ao efeito da adição de sulfato de amônio na detecção da glicoproteína gp43 sugeriram que a adição do sal, aparentemente, levou a uma queda na quantidade de gp43 no sobrenadante de cultura. Essa queda foi possivelmente causada por alguma protease regulada por sulfato de amônio presente no sobrenadante como sugerido nos ensaios preliminares de incubação com a gp43 purificada. Os resultados da regulação no nível transcricional e agora em nível de proteína (no sobrenadante) fornecem, de forma satisfatória, uma explicação de porque as quantidades de gp43 no sobrenadante de cultura diminuem nas fases log tardia e estacionária (Camargo et al., 1988; Stambuk et al., 1988). Durante estas fases, há um acúmulo de amônia no sobrenadante de cultura responsável pela basidificação do meio, devido à secreção de urease (Puccia et al., 1998). Amônia no meio de cultura cessaria a ativação do *PbGP43* enquanto a gp43 presente no sobrenadante seria lentamente degradada por proteases (Puccia e Travassos, 1991; Camargo et al., 1988).

Estamos apenas começando a entender a regulação transcricional de genes de *P. brasiliensis* em nível de elementos de transcrição (Batista et al., 2006). Os estudos nesta área serão facilitados devido a finalização do projeto dos genomas dos isolados Pb18, Pb3 e Pb01, ([http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides\\_brasiliensis.2/MultiHome.html](http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis.2/MultiHome.html)) e pela manipulação genética do fungo. O presente trabalho apresenta uma contribuição significativa nessa área.

## VI. CONCLUSÕES

1) Foi clonada e sequenciada uma região de 1721 pb da região intergênica a montante do gene *PbGP43* do isolado Pb339 do *P. brasiliensis*. Desta forma, um total de 2047 pb dessa região (incluindo 326 pb previamente sequenciados) foram analisados quanto aos elementos de transcrição. Esse fragmento variou de tamanho (~1500 a 3000 pb) entre 14 isolados de *P. brasiliensis* analisados em reações de PCR.

2) O mapeamento da região 5' intergênica proximal ao ATG (-1 a -326) do *PbGP43* mostrou a presença de um ou dois sítios de ligação de um possível fator de transcrição de natureza desconhecida entre as posições -256 e -216 que engloba as sondas denominadas Et1, Et2 e Et3. A afinidade foi maior pela região de Et3 (-230 a -216), onde a alteração de C para A em -230, característica de Pb3, diminuiu a intensidade do complexo formado em ensaios de EMSA com extratos de Pb339 e Pb18.

3) Os complexos DNA-proteína formados com a incubação das sondas Et12 e Et23 com extrato Pb3 migraram mais rapidamente do que com extratos de Pb18 e Pb339 sugerindo polimorfismo do fator ligante;

4) Foram encontrados 23 elementos NIT2-like na região 5' intergênica do *PbGP43* do Pb339. Seu envolvimento na regulação do *PbGP43* foi sugerida pelos seguintes resultados: 4 sondas contendo elementos NIT2-like formaram complexos específicos em EMSA, os quais foram menos intensos quando incubados com extratos contendo  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ou quando mutados no elemento TATC. Paralelamente, fontes primárias de nitrogênio provocam a diminuição no acúmulo de transcrito do *PbGP43*.

5) Nas condições testadas, glicose reprimiu o *PbGP43* quando sua concentração subiu de 0,18 para 1,5%. O contrário foi visto quando sua concentração subiu de 1,5 para 3%;

6) Soro fetal bovino a 2% não alterou a expressão do *PbGP43*;

## **VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Adrianopoulos, A., Kourambas, S., Sharp, JA., Davis, MA. & Hynes, MJ. (1998). Characterization of the *Aspergillus nidulans* nmrA gene involved in nitrogen metabolite repression. *J. Bacteriol.* **180**: 1973-1977.

Adams, DJ. (2004). Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology-Sgm.* **150**: 2029-2035.

Albornoz, MB. (1971). Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. *Sabouraudia.* **9**: 248-253.

Almeida SR., Moraes JZ., Camargo ZP., Gesztesi JL. Mariano M. & Lopes J. D. (1998). Pattern of immune response to gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* in susceptible and resistant mice is influenced by antigen-presenting cells. *Cell. Immunol.* **190**: 68-76.

Almeida, IC., Neville, DC., Mehlert, A., Treumann, A., Ferguson, MA., Previato, JO., & Travassos, LR. (1996). Structure of the N-linked oligosaccharide of the main diagnostic antigen of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Glycobiology* **6**: 507-515.

Almeida, AJ., Carmona, JA., Cunha, C., Carvalho, A, C., Rappleye, A., Goldman, WE., Hooykaas, PJ., Leão, C., Ludovico, P. & Rodrigues, F. (2007). Towards a molecular genetic system for the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol.* **44**: 1387-1398.

Almeida, AJ., Martins, M., Carmona, JA., Cano, LE., Restrepo, A., Leão, C. & Rodrigues, F. (2006). New insights into the cell cycle profile of *Paracoccidioides brasiliensis*: Fungal Genetics and Biology, v. 43, p. 401-409.

Almeida, AJ., Matute, DR., Carmona, JA., Martins, M., Torres, I., McEwen, JG., Restrepo, A., Leão, C., Ludovico, P. & Rodrigues, F. (2007). Genome size and ploidy of *Paracoccidioides brasiliensis* reveals a haploid DNA content: Flow cytometry and GP43 sequence analysis: Fungal Genetics and Biology, v. 44, p. 25-31.

Almeida, F. (1930). Estudos comparativos do granuloma coccidioico nos Estados Unidos e no Brasil. Novo gênero para o parasita brasileiro. *An. Fac. Med. São Paulo.* **5**: 125-146.

Amey, RC., Mills, PR., Bailey, A., & Foster, GD. (2003). Investigating the role of a *Verticillium fungicola* beta-1,6-glucanase during infection of *Agaricus bisporus* using targeted gene disruption. *Fungal Genetics and Biology.* **39**: 264-275.

André, DC., Lopes, JD., Franco, MF., Vaz, CA. & Calich, VL. (2004). Binding of laminin to *Paracoccidioides brasiliensis* induces a less severe pulmonary paracoccidioidomycosis caused by virulent and low-virulence isolates. *Microbes Infect.* **6**:549-58.

Bailao, AM., Shrank, A., Borges, CL., Parente, JA., Dutra, V., Felipe, MS., Fiúza, RB, Pereira, M. & Soares, CM. (2007). The transcriptional profile of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells is influenced by human plasma: *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* **51**: 43-57.

Bagagli, E., Sano, A., Coelho, KI., Alquati, S., Miyaji, M., de Camargo, ZP., Gomes, GM., Franco, M., & Montenegro, MR. (1998). Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus noveminctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **58**: 505-512.

Barbosa, MS., Bao, S N., Andreotti, PF., de Faria, FP., Felipe, MS., dos Santos, FL., Mendes-Giannini, MJ., Soares, CM. (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: *Infect.Immun.* **74**: 382-389.

Barros, TF. & Puccia, R. (2001). Cloning and characterization of a LON gene homologue from the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast* **18**: 981-988.

Batista, WL., Matsuo, AL., Ganiko, L., Barros, TF., Veiga, TR., Freymuller, E., & Puccia, R. (2006). The PbMDJ1 gene belongs to a conserved MDJ1/LON locus in thermodimorphic pathogenic fungi and encodes a heat shock protein that localizes to both the mitochondria and cell wall of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Eukaryot. Cell.* **5**: 379-390.

Batista, WL., Barros, TF., Goldman, GH., Morais, FV., & Puccia, R. (2007). 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. Genet. Biol.* **44**: 347-356.

Bialek R, Ibricevic A, Fothergill A, Begerow D Small subunit ribosomal DNA sequence shows *Paracoccidioides brasiliensis* closely related to *Blastomyces dermatitidis*. (2000). *J Clin Microbiol.* **38**:3190-3193.

Blum H., Beier, H., Gross, HJ. (1987). Improved silver staining of plant protein, RNA and DNA in polyacrilamide gels. *Electrophoresis.* **8**: 93.

Borelli D. (1972). Some ecological aspects of paracoccidioidomycosis. *In: Pan American Health Organization. Scientific Publication*, **254**: 59-64.

Bowers, PW., Schaufler, LE., & Klevit, RE. (1999). A folding transition and novel zinc finger accessory domain in the transcription factor ADR1. *Nature Structural Biology.* **6**: 478-485.

Brummer E., Hanson LH. & Stevens DA. (1988). Gamma-interferon activation of macrophages for killing of *Paracoccidioides brasiliensis* and evidence for nonoxidative mechanisms. *Int. J. Immunopharmacol.* **10**: 945-952.

Brummer, E., Castaneda, E., & Restrepo, A. (1993). Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin. Microbiol. Rev.* **6**: 89-117.

Brummer, E., Hanson, LH., Restrepo, A., & Stevens, DA. (1989). Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. *Infect. Immun.* **57**: 2289-2294.

Calvi, SA., Peracoli, MT, Mendes, RP, Marcondes-Machado J, Fecchio D, Marques SA, Soares AM. (2003). Effect of cytokines on the in vitro fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. *Microbes Infect.* **5**: 107-113.

Cano, LE., Arango R., Salazar ME., Brummer E., Stevens DA. & Restrepo A. (1992). Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia by pulmonary macrophages and the effect of cytokines. *J. Med. Vet. Mycol.* **30**: 161-168.

Camargo, ZP., Taborda CP., Rodrigues EG. & Travassos LR. (1991). The use of cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests. *J. Med. Vet. Mycol.*, **29**: 29-31.

Camargo, ZP. & Franco, MF. (2000). Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev. Iberoam. Micol.* **17**: 41-48.

Camargo, ZP., Gesztesi, JL., Saraiva, EC., Taborda, CP., Vicentini, AP., & Lopes, JD. (1994). Monoclonal antibody capture enzyme immunoassay for detection of *Paracoccidioides brasiliensis* antibodies in paracoccidioidomycosis. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 2377-2381.

Camargo, ZP., Unterkircher, C., & Travassos, LR. (1989). Identification of antigenic polypeptides of *Paracoccidioides brasiliensis* by immunoblotting. *J. Med. Vet. Mycol.* **27**: 407-412.

Camargo, ZP., Unterkircher, C., Campoy, SP., & Travassos, L.R. (1988). Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. *J. Clin. Microbiol.* **26**: 2147-2151.

- Cano, LE., Gómes B., Brummer E., Restrepo A. & Stevens DA. (1994). Inhibitory effect of deferoxamine or macrophage activation on transformation of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia ingested by macrophages: reversal by holotransferin. *Infect. Immun.* **62**: 1494-1496.
- Carmona, AK., Puccia, R., Oliveira, MC., Rodrigues, EG., Juliano, L., & Travassos, LR. (1995). Characterization of an exocellular serine-thiol proteinase activity in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Biochem. J.* **309**: 209-214.
- Carrero, LL., Nino-Vega, G., Teixeira, MM., Carvalho, M. JA., Soares, CM. A., Pereira, M., Jesuino, RSA., McEwen, JG., Mendoza, L., Taylor, JW., Felipe, M. S., & San Blas, G. (2008). New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. *Fungal Genetics and Biology.* **45**: 605-612.
- Carroll, SB. (2000). "Endless forms: the evolution of gene regulation and morphological diversity". *Cell.* **101**: 577-80.
- Carvalho, KC, Ganiko, L., Batista, WL., Morais, FV., Marques, ER., Goldman, GH., Franco, MF. & Puccia, R. (2005). Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* and gp43 expression in isolates bearing known PbGP43 genotype: *Microbes.Infect.* **7** 55-65.
- Carvalho, KC., Vallejo, MC., Camargo, ZP. & Puccia, R. (2008). Use of recombinant gp43 isoforms expressed in *Pichia pastoris* for diagnosis of paracoccidioidomycosis. *Clin. Vaccine Immunol.* **15**: 622-629.
- Carvalho, KC. (2004). Análise da virulência de isolados de *Paracoccidioides brasiliensis* contendo sequências conhecidas do gene *PbGP43*. Produção e caracterização de isoformas recombinantes. Tese de doutorado (UNIFESP).
- Chambers, RS., Walden, AR., Brooke, GS., Cutfield, JF., & Sullivan, PA. (1993). Identification of A Putative Active-Site Residue in the Exo-Beta-(1,3)-Glucanase of *Candida Albicans*. *Febs Letters.* **327**: 366-369.
- Cisalpino, PS., Puccia, R., Yamauchi, LM., Cano, MI., da Silveira, JF., & Travassos, LR. (1996). Cloning, characterization, and epitope expression of the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Biol. Chem.* **271**: 4553-4560.
- Chen, JH. (1990). Cloning, Sequencing, and Expression of Mouse C-Ets-1 Cdna in Baculovirus Expression System. *Oncogene Research.* **5**: 277-285.
- Cheng, C., Kacherovsky, N., Dombek, KM., Camier, S., Thukral, SK., Rhim, E., & Young, ET. (1994). Identification of Potential Target Genes for Adr1P Through Characterization of Essential Nucleotides in Uas1. *Molecular and Cellular Biology.* **14**: 3842-3852.
- Chiang, TY. & Marzluf, GA. (1994). Dna Recognition by the Nit2 Nitrogen Regulatory Protein - Importance of the Number, Spacing, and Orientation of Gata Core Elements and Their Flanking Sequences Upon Nit2 Binding. *Biochemistry.* **33**: 576-582.
- Christakopoulos, P., Goodenough, PW., Kekos, D., Macris, BJ., Claeysens, M., & Bhat, MK. (1994). Purification and Characterization of An Extracellular Beta-Glucosidase with Transglycosylation and Exo-Glucosidase Activities from *Fusarium-Oxysporum*. *European Journal of Biochemistry.* **224**: 379-385.
- Clemons, KV., Feldman D. & Stevens DA. (1989). Influence of Oestradiol on protein expression and methionine utilization during morphogenesis of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Gen. Micro.* **135**: 1607-1617.
- Conti-Diaz, IA. & Mackinnon, JE. (1980). Electrophoretic migration of *Paracoccidioides brasiliensis* specific antigenic fraction. *Mycopathologia* **72**: 75-78.

Corredor, GG., Castano, JH., Peralta, A., Díez, S., Arango, M., McEwen, J., & Restrepo, A. (1999). Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. *Rev. Iberoam. Micol.* **19**: 216-220.

Coutinho, ZF., Silva D., Lazéra M., Petri V., Oliveira RM., Sabroza P., Wanke B. (2002). Paracoccidioidomycosis mortality in Brasil (1980-1995). *Caderno de Saúde Pública*. Rio de Janeiro. **18**: 1441-1454.

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**: 374-377.

Del Negro, G., Lacaz, CS., Zamith, VA., & Siqueira, AM. (1994). General Clinical Aspects: Polar Forms of Paracoccidioidomycosis. In *Paracoccidioidomycosis*: 225-232. Franco, M., Lacaz, C. S., Restrepo-Moreno, A. & Del Negro, G. (Ed.). London: Boca Raton.

Diez, S., Gomez, BL., Restrepo, A., Hay, RJ., & Hamilton, AJ. (2002). *Paracoccidioides brasiliensis* 87-kilodalton antigen, a heat shock protein useful in diagnosis: characterization, purification, and detection in biopsy material via immunohistochemistry. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 359-365.

Donzelli, BGG. & Harman, GE. (2001). Interaction of ammonium, glucose, and chitin regulates the expression of cell wall-degrading enzymes in *Trichoderma atroviride* strain P1. *Applied and Environmental Microbiology.* **67**: 5643-5647.

El Katatny, MH., Somitsch, W., Robra, KH., El Katatny, MS., & Gubitzy, G. M. (2000). Production of chitinase and beta-1,3-glucanase by *Trichoderma harzianum* for control of the phytopathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*. *Food Technology and Biotechnology.* **38**: 173-180.

El Katatny, MH., Somitsch, W., Robra, KH., & Gubitzy, GM. (2000). beta-1,3-glucanase and chitinase from *Trichoderma harzianum* rifai. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society.* **219**: U141.

Ellenberger, TE., Brandl, CJ., Struhl, K. & Harrison, SC. (1992). The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted alpha helices: crystal structure of the protein-DNA complex. *Cell.* **71**: 1223-1237.

Feitosa, LS., Cisalpino, PS., Santos, MRM., Mortara, RA., Barros, TF., Morais, FV., Puccia, R., Silveira, JF., & Camargo, ZP.(2003). Chromosomal polymorphism, syntenic relationships, and ploidy in the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal. Genet. Biol.* **39**: 60-9.

Felipe, MS., Andrade, RV., Petrofeza, SS., Maranhao, AQ., Torres, FA., Albuquerque, P., Arraes, FB., Arruda, M., Azevedo, MO., Baptista, AJ., Bataus, LA., Borges, CL., Campos, EG., Cruz, MR., Daher, BS., Dantas, A., Ferreira, MA., Ghil, GV., Jesuino, RS., Kyaw, CM., Leitao, L., Martins, CR., Moraes, LM., Neves, EO., Nicola, AM., Alves, ES., Parente, JA., Pereira, M., Pocas-Fonseca, MJ., Resende, R., Ribeiro, BM., Saldanha, RR., Santos, SC., Silva-Pereira, I., Silva, M. A., Silveira, E., Simoes, IC., Soares, RB., Souza, DP., De Souza, MT., Andrade, EV., Xavier, MA., Veiga, HP., Venancio, EJ., Carvalho, MJ., Oliveira, AG., Inoue, MK., Almeida, NF., Walter, ME., Soares, CM., & Brigido, MM. (2003). Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. *Yeast.* **20**: 263-271.

Felipe, MS, R V Andrade, F B Arraes, A M Nicola, A Q Maranhao, F A Torres, I Silva-Pereira, M J Pocas-Fonseca, E G Campos, L M Moraes, P A Andrade, A H Tavares, S S Silva, C M Kyaw, D P Souza, M Pereira, R S Jesuino, E V Andrade, J A Parente, G S Oliveira, M S Barbosa, N F Martins, A L Fachin, R S Cardoso, G A Passos, N F Almeida, M E Walter, C M Soares, M J Carvalho, M M Brigido. (2005). Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells: *J.Biol.Chem.* **280**: 24706-24714.

Figueiredo, F, Alves LM, Silva CL.(1993). Tumour necrosis factor production in vivo and in vitro in response to *Paracoccidioides brasiliensis* and the cell wall fractions thereof. *Clin Exp Immunol.* **93**:189-94.

Figuerola, JI., Hamilton A., Allen M. & Hay R.(1994). Immunohistochemical detection of a novel 22- to 25-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* in biopsy material and partial characterization by using species-specific monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 1566-1574.

Franco, M.(1986). Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J. Med. Vet. Mycol.* **25**: 5-18.

Franco, M., Bagagli, E., Scapolio, S., & da Silva, LC.(2000). A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. *Med. Mycol.* **38**: 185-191.

Fraser, JA., Davis, MA., & Hynes, MJ. (2001). The formamidase gene of *Aspergillus nidulans*: Regulation by nitrogen metabolite repression and transcriptional interference by an overlapping upstream gene. *Genetics.* **157**: 119-131.

Fu, YH. & Marzluf, GA. (1987). Characterization of Nit-2, the Major Nitrogen Regulatory Gene of *Neurospora-Crassa*. *Molecular and Cellular Biology.* **7**: 1691-1696.

Garcia, IP.,(2004). Estudos de isolados de *Paracoccidioides brasiliensis* secretores ou não de gp43 no processo de virulencia. Tese de Mestrado. UNIFESP.

Gesztesi, JL., Puccia, R., Travassos, LR., Vicentini, AP., de Moraes, JZ., Franco, MF., & Lopes, JD. (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.

Goldman, GH., dos Reis, ME., Duarte, R., 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., Tekaia, F., Nobrega, MP., Nobrega, FG., & Goldman, MH.(2003). 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.* **2**: 34-48.

Gomez, BL., Figuerola, JI., Hamilton, AJ., Ortiz, B., Robledo, MA., Hay, RJ., & Restrepo, A.(1997). Use of monoclonal antibodies in diagnosis of paracoccidioidomycosis: new strategies for detection of circulating antigens. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 3278-3283.

Gonzalez, A., Restrepo, A. & Cano, LE. (2007). Role of iron in the nitric oxide-mediated fungicidal mechanism of IFN-gamma-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia: *Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo.* **49**: 11-16.

Greer, DL. (1990). Paracoccidioidomycosis., p.942-946, *In*: Warren K.S. and A.F. Mahmoud (eds.). Tropical and geographical medicine. McGraw Hill Book Company, New York. U.S.A.

Haas, H., Bauer, B., Redl, B., Stoffler, G., & Marzluf, GA. (1995). Molecular-Cloning and Analysis of Nre, the Major Nitrogen Regulatory Gene of *Penicillium-Chrysogenum*. *Current Genetics.* **27**: 150-158.

Hanna, SA., Monteiro da Silva, J. L., & Giannini, M. J. (2000). Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. *Microbes. Infect.* **2**: 877-884.

Hanahan, D., Techniques for transformation of *E. coli* . *In* DNA cloning: a practical approach (*D, M, Glover, eds.*). *Vol. I.* 1985. p109-175.

Holland, MJ., Yokoi, T., Holland, JP., Myambo, K., & Innis, MA. (1987). The Gcr1 Gene Encodes A Positive Transcriptional Regulator of the Enolase and Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Gene Families in *Saccharomyces-Cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*. **7**: 813-820.

Hsu, T., Gogos, JA., Kirsh, SA., & Kafatos, FC. (1992). Multiple Zinc Finger Forms Resulting from Developmentally Regulated Alternative Splicing of A Transcription Factor Gene. *Science*. **257**: 1946-1950.

Hynes, MJ. (1973). Effect of Lack of A Carbon Source on Nitrate-Reductase Activity in *Aspergillus-Nidulans*. *Journal of General Microbiology*. **79**: 155-157.

Hynes, MJ. (1974). Repression of Enzymes of Nitrogen Catabolism by Methylammonium and Cesium-Chloride in Strains of *Aspergillus-Nidulans* Insensitive to Ammonium Repression. *Molecular & General Genetics*. **132**: 147-152.

Jayus, Jumadi, O., McDougall, BM., & Seviour, RJ. (2005). Synthesis of extracellular (1 -> 3)- and (1 -> 6)-beta-glucanase activities in carbon limiting chemostat culture by the fungus *Acremonium* sp IMI 383068. *Enzyme and Microbial Technology*. **36**: 680-686.

Jayus, McDougall, BM., & Seviour, RJ. (2005). The effect of dissolved oxygen concentrations on (1 -> 3)- and (1 -> 6)-beta-glucanase production by *Acremonium* sp IMI 383068 in batch culture. *Enzyme and Microbial Technology*. **36**: 176-181.

Kadonaga, JT. & Tjian, R. (1986). Affinity Purification of Sequence-Specific Dna-Binding Proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **83**: 5889-5893.

Kafer, E.. (1977). Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and its chromosomal aberrations. *Adv. Genet.* **19**: 33-131.

Kashino, SS., Calich, VL., Singer-Vermes, LM., Abrahamsohn, PA. & Burger, E. (1987). Growth curves, morphology and ultrastructure of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. *Mycopathologia*. **99**: 119-28.

Klis, FM., Mol, P., Hellingwerf, K., & Brul, S. (2002). Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *Fems Microbiology Reviews*. **26**: 239-256.

Kudla, B., Caddick, MX., Langdon, T., Martinezrossi, NM., Bennett, CF., Sibley, S., Davies, RW., & Arst, HN. (1990). The Regulatory Gene Area Mediating Nitrogen Metabolite Repression in *Aspergillus-Nidulans* - Mutations Affecting Specificity of Gene Activation Alter A Loop Residue of A Putative Zinc Finger. *Embo Journal*. **9**: 1355-1364.

Kurita, N., Oarada, M., Ito, E., Miyaji, M. (1999a). Antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol*. **37**: 261-7.

Kurita, N., Biswas, SK., Oarada, M., Sano, A., Nishimura, K., Miyaji, M. (1999b). Fungistatic and fungicidal activities of murine polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol*. **37**: 19-24.

Lacaz, CS., Porto E. & Martins JEC. (1991). *Paracoccidioidomicose*, p. 248- 261, In: Sarvier´s (eds). *Micologia Médica*, 8<sup>th</sup> ed. Sarvier Editora, São Paulo, Brazil.

Lacaz, CS. (1994a). Historical Evolution of the Knowledge on *Paracoccidioidomycosis* and its Etiologic Agent. In *Paracoccidioidomycosis*: 1-12. Franco, M., Lacaz, C. S., Restrepo-Moreno, A. & Del Negro, G. (Ed.). London: Boca Raton.

Lacaz, CS.(1994b). *Paracoccidioides brasiliensis*: Morphology; Evolutionary Cycle; Maintenance during Saprophytic Life; Biology, Virulence, taxonomy. In *Paracoccidioidomycosis*: 13-26. Franco, M., Lacaz, CS., Restrepo-Moreno, A. & Del Negro, G. (Ed.). London: Boca Raton CRC Press.

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

Lamb, HK., Leslie, K., Dodds, AL., Nutley, M., Cooper, A., Johnson, C., Thompson, P., Stammers, DK., & Hawkins, AR. (2003). The negative transcriptional regulator NmrA discriminates between oxidized and reduced dinucleotides. *Journal of Biological Chemistry*. **278**: 32107-32114.

Lamb, HK., Ren, JS., Park, A., Johnson, C., Leslie, K., Cocklin, S., Thompson, P., Mee, C., Cooper, A., Stammers, DK., & Hawkins, AR. (2004). Modulation of the ligand binding properties of the transcription repressor NmrA by GATA-containing DNA and site-directed mutagenesis. *Protein Science*. **13**: 3127-3138.

Leal, CV., Montes, BA., Mesa, AC., Rua, AL., Corredor, M., Restrepo, A. & McEwen, JG. (2004). Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol*. **42**: 391-5.

Lima, JF., Malavazi, I., von Zeska Kress Fagundes, MR., Savoldi, M., Goldman, MH., Schwier, E., Braus, GH., Goldman, GH.. (2005). The *csnD/csnE* signalosome genes are involved in the *Aspergillus nidulans* DNA damage response. *Genetics*. **171**: 1003-1015.

Loose, DS., Stover, EP., Restrepo, A., Stevens, DA., & Feldman, D. (1983). Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**: 7659-7663.

Lopes, JD., Moura-Campos, MC., Vicentini, AP., Gesztes, JL., de Souza, W., & Camargo, ZP.(1994). Characterization of glycoprotein gp43, the major laminin-binding protein of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **27**: 2309-2313.

Lutz, A.(1908). Uma micose pseudococcidica localizada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das hifoblastomicoses americanas. *Brazil Med.* **22**: 121-124.

Marques-da-Silva, SH.(2004). Detecção de gp43 e gp70 circulantes em soros, liquor e lavado broncoalveolar de pacientes com paracoccidioidomicose. Tese de Doutorado. UNIFESP.

McEwen, JG., Bedoya, V., Patino, MM., Salazar, ME., & Restrepo, A.(1987). Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. *J. Med. Vet. Mycol.* **25**: 165-175.

McEwen, JG., Ortiz, BL., Garcia, AM., Florez, AM., Botero, S. & Restrepo, A. (1996). Molecular cloning, nucleotide sequencing, and characterization of a 27-kDa antigenic protein from *Paracoccidioides brasiliensis*: *Fungal.Genet.Biol.* **20**, 125-131.

Marques ER, Ferreira ME, Drummond RD, Felix JM, Menossi M, Savoldi M, Travassos LR, Puccia R, Batista WL, Carvalho KC, Goldman MH, Goldman GH. (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**: 667-77.

Marques SA.(2003). Paracoccidioidomicose:atualização epidemiológica, clínica e terapêutica/Paracoccidioidomycosis: Epidemiological, clinical and treatment up-date. *An bras Dermatol.* Rio de Janeiro. **78**: 135-150.

Martin, K., McDougall, BM., McIlroy, S., Jayus, Chen, JZ., & Seviour, RJ. (2007). Biochemistry and molecular biology of exocellular fungal beta-(1,3)- and beta-(1,6)-glucanases. *Fems Microbiology Reviews*. **31**: 168-192.

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

Mattar-Filho, R., Azevedo, MO., Pereira, M., Jesuino, RS., Salem-Izacc, SM., Brito, WA., Gesztesi, JL., Soares, RB., Felipe, MS., & Soares, CM.(1997). Expression of glycoprotein gp43 in stage-specific forms and during dimorphic differentiation of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Med. Vet. Mycol.* **35**: 341-345.

Meira, DA., Pereira, PC., Marcondes-Machado, J., Mendes, RP., Barraviera, B., Pellegrino, JJ., Rezkallah-Iwasso, MT., Peracoli, MT., Castilho, LM., Thomazini, I., Da Silva, CL., Foss, NT., & Curi, PR.(1996). The use of glucan as immunostimulant in the treatment of paracoccidioidomycosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **55**: 496-503.

Mendes-Giannini, MJ., P F Andreotti, L R Vincenzi, J L da Silva, H L Lenzi, G Benard, R Zancope-Oliveira, H L Matos Guedes, C P Soares (2006). Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*: *Microbes.Infect.* **8**: 1550-1559.

Mendes-Giannini MJ, Taylor ML, Bouchara JB, Burger E, Calich VL, Escalante ED, Hanna SA, Lenzi HL, Machado MP, Miyaji M, Monteiro Da Silva JL, Mota EM, Restrepo A, Restrepo S, Tronchin G, Vincenzi LR, Xidieh CF, Zenteno E. (2000). Pathogenesis II: fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. *Med Mycol.* **38**:113-23.

Mendes-Giannini, MJS., Bueno, JP., & Shikanai-Yasuda, MA.(1990). Antibody response to 43 kDa glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* as a marker for the evaluation of patients under treatment. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **43**: 200-206.

Mendes-Giannini, MJ., Ricci, LC., Uemura, MA., Toscano, E., & Arns, CW. (1994). Infection and apparent invasion of Vero cells by *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Med. Vet. Mycol.* **32**: 189-197.

Miller, KY., Wu, JG., & Miller, BL. (1992). Stua Is Required for Cell Pattern-Formation in *Aspergillus*. *Genes & Development.* **6**: 1770-1782.

Miller, JH.. (1972). Experiments in Molecular Genetics, pp. 352–355. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Minehart, PL. & Magasanik, B. (1991). Sequence and Expression of Gln3, A Positive Nitrogen Regulatory Gene of *Saccharomyces-Cerevisiae* Encoding A Protein with A Putative Zinc Finger Dna-Binding Domain. *Molecular and Cellular Biology.* **11**: 6216-6228.

Molloy, PL. Electrophoretic mobility shift assay. In *Methods in Molecular Biology*: 235-246. Tymms, M J (Ed.). Totowa, NJ.

Montoya, AE., Alvarez, AL., Moreno, MN., Restrepo, A., & McEwen, JG.(1999). Electrophoretic karyotype of environmental isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med. Mycol.* **37**: 219-222.

Moura-Campos, MC., Gesztesi, JL., Vincentini, AP., Lopes, JD., & Camargo, ZP.(1995). Expression and isoforms of gp43 in different strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Med. Vet. Mycol.* **33**: 223-227.

Morais, FV., Barros, TF., Fukada, MK., Cisalpino, PS., & 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.

Morais, FV. (2003). O gene *PbGP43* que codifica o antígeno principal do *Paracoccidioides brasiliensis*: polimorfismo e transcrição. Tese de Doutorado. UNIFESP.

Naiff, RD., Ferreira, LC., Barrett, TV., Naiff, MF., & Arias, JR. (1986). [Enzootic paracoccidioidomycosis in armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in the State of Pará]. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **28**: 19-27.

Negróni, P. (1966). [The *Paracoccidioides brasiliensis* lives saprophytically in the soil of Argentina]. *Prensa. Med. Argent* **53**: 2381-2382.

Neves, AR., Mamoni RL, Rossi CL, de Camargo ZP, Blotta MH. (2003). Negative immunodiffusion test results obtained with sera of paracoccidioidomycosis patients may be related to low-avidity immunoglobulin G2 antibodies directed against carbohydrate epitopes. *Clin Diagn Lab Immunol.* **10**: 802-7.

Ochman, H., Gerber, AS., & Hartl, DL. (1988). Genetic Applications of An Inverse Polymerase Chain-Reaction. *Genetics.* **120**: 621-623.

Peterson, SW. & 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. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 2918-2925.

Pitson, SM., Seviour, RJ., & McDougall, BM. (1993). Noncellulolytic Fungal Beta-Glucanases - Their Physiology and Regulation. *Enzyme and Microbial Technology.* **15**: 178-192.

Pitson, SM., Seviour, RJ., & McDougall, BM. (1997). Effect of carbon source on extracellular (1->3)- and (1->6)-beta-glucanase production by *Acremonium persicinum*. *Canadian Journal of Microbiology.* **43**: 432-439.

Plafker, SM. & Macara, IG. (2002). Ribosomal protein L12 uses a distinct nuclear import pathway mediated by importin 11. *Molecular and Cellular Biology.* **22**. 1266-1275.

Polkinghorne, MA. & Hynes, MJ. (1982). L-Histidine Utilization in *Aspergillus-Nidulans*. *Journal of Bacteriology.* **149**: 931-940.

Popi, FAF., Lopes, JD., & Mariano, M. (2002). Gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. *Cell Immunol.* **218**: 87-94.

Premakumar, R., Sorger, G. J., & Gooden, D. (1979). Nitrogen Metabolite Repression of Nitrate Reductase in *Neurospora-Crassa*. *Journal of Bacteriology.* **137**: 1119-1126.

Premakumar, R., Sorger, G.J., & Gooden, D. (1980). Physiological Characterization of A *Neurospora-Crassa* Mutant with Impaired Regulation of Nitrate Reductase. *Journal of Bacteriology.* **144**: 542-551.

Premakumar, R., Sorger, G.J., & Gooden, D. (1980). Repression of Nitrate Reductase in *Neurospora* Studied by Using L-Methionine-DI-Sulfoximine and Glutamine Auxotroph Gln-1B. *Journal of Bacteriology.* **143**: 411-415.

Puccia, R. & Travassos, LR. (1991a). 43-kilodalton glycoprotein from: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, or Jorge Lobo's disease. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 1610-1615.

Puccia, R. & Travassos, LR. (1991b). The 43-kDa glycoprotein from the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* and its deglycosylated form: excretion and susceptibility to proteolysis. *Arch. Biochem. Biophys.* **289**: 298-302.

Puccia, R., Carmona, AK., Gesztesi, JL., Juliano, L., & Travassos, LR.(1998). Exocellular proteolytic activity of *Paracoccidioides brasiliensis*: cleavage of components associated with the basement membrane. *Med. Mycol.* **36**: 345-348.

Puccia, R., Juliano, MA., Juliano, L., Travassos, LR., & Carmona, AK.(1999). Detection of the basement membrane-degrading proteolytic activity of *Paracoccidioides brasiliensis* after SDS-PAGE using agarose overlays containing Abz-MKALTLQ-EDDnp. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **32**: 645-649.

Puccia, R., Schenkman, S., Gorin, PA., & Travassos, LR. (1986). Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. *Infect. Immun.* **53**: 199-206.

Puccia, R., Takaoka, DT., & Travassos, LR.(1991). Purification of the 43 kDa glycoprotein from exocellular components excreted by *Paracoccidioides brasiliensis* in liquid culture (TOM medium). *J. Med. Vet. Mycol.* **29**: 57-60.

Puccia, R., Travassos, LR., Rodrigues, EG., Carmona, AK., Oliveira, MC., & Juliano, L. (1994). Purification of the specific exocellular antigen gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunological and proteolytic activities. In *Molecular Biology of Pathogenic Fungi. A Laboratory Manual*: 507. Maresca, B. & Kobayashi, G. S. (Ed.). New York: Tellos Press.

Rappleye, CA., Engle, JT. & Goldman, WE. (2004). RNA interference in *Histoplasma capsulatum* demonstrates a role for alpha-(1,3)-glucan in virulence: *Mol Microbiol.* **53**: 153-165.

Restrepo-Moreno, A.(1994). Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*. In *Paracoccidioidomycosis*: 121-130. Franco, M., Lacaz, CS., Restrepo-Moreno, A. & Del Negro, G. (Ed.). London: Boca Raton CRC Press.

Restrepo, A., de Bedout, C., Cano, LE., Arango, MD., & Bedoya, V. (1981). Recovery of *Paracoccidioides brasiliensis* from a partially calcified lymph node lesion by microaerophilic incubation of liquid media. *Sabouraudia.* **19**: 295-300.

Restrepo FM, Restrepo M, Restrepo A.(1983). Blood groups and HLA antigens in paracoccidioidomycosis. *Sabouraudia.* **21**: 35-9.

Restrepo, A., Salazar, ME., Cano, LE., Stover, EP., Feldman, D., & Stevens, DA. (1984). Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect. Immun.* **46**: 346-353.

Restrepo, A., McEwen, JG., & Castaneda, E.(2001). The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med. Mycol.* **39**: 233-241.

Restrepo, A., McEwen, JG., & Castaneda, E.(2001). The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med. Mycol.* **39**: 233-241.

Restrepo, A (2003). Paracoccidioidomycosis. Pp 328-345. In W.E.Dismukes, P.G.Pappas, and J.D.Sobel, eds.Clinical mycology. Oxford University Press, Oxford.

Restrepo, A. & Drouhet, E. (1970). [Study of precipitating antibodies in South American blastomycosis by immunoelectrophoretic analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* antigens]. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* **119**: 338-346.

Restrepo, A. & Moncada, LH. (1974). Characterization of the precipitin bands detected in the immunodiffusion test for paracoccidioidomycosis. *Appl. Microbiol.* **28**: 138-144.

Rodriguez-Pena, JM., Cid, VJ., Arroyo, J., & Nombela, C. (2000). A novel family of cell wall-related proteins regulated differently during the yeast life cycle. *Molecular and Cellular Biology.* **20**: 3245-3255.

Ruiz-Herrera, J., Elorza, MV., Valentin, E., & Sentandreu, R. (2006). Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *Fems Yeast Research*. **6**: 14-29.

Salazar, ME., Restrepo, A., & Stevens, DA.(1988). Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect. Immun.* **56**: 711-713.

Salfeder, K. (1979). Paracoccidioidomycosis., p.33-38. *In*: Salfeder K. (ed.). Atlas en color. Micosis profundas en el hombre. HARLA, Mexico D.F., Mexico.

Salina, MA., Shikanai-Yasuda, MA., Mendes, RP., Barraviera, B., & Mendes Giannini, MJ. (1998). Detection of circulating *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in urine of paracoccidioidomycosis patients before and during treatment. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 1723-1728.

San Blas, F. & San Blas, G.(1994). Biochemistry of *Paracoccidioides brasiliensis* dimorphism. *In Paracoccidioidomycosis*: 49-66. Franco, M., Lacaz, C. S., Restrepo-Moreno, A. & Del Negro, G. (Ed.). London: Boca Raton, CRC Press.

San Blas, G. & San Blas, F.(2000). *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and host response. *In Fungal pathogenesis: principles and clinical applications*: Cihlar, R. L. & Calderone, R. A. (Ed.). New York: Marcel Dekker, Inc.

San Blas, G., Nino-Vega, G., & Iturriaga, T.(2002). *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med. Mycol.* **40**: 225-242.

Sandoval, MP., Del Negro, GMB., Mendes-Giannini, MJS., & Brito, T.(1996). Distribution of exoantigens and a 43-kDa glycoprotein (gp43) in the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Mycol. Med.* **6**: 1-6.

Sambrook, J., Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 1989; New York: Cold Spring Harbor.

Sanger, F., Nicklen S & Coulson AR. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS.* **74**: 5463-67.

Schuller, C., Brewster, JL., Alexander, MR., Gustin, MC., & Ruis, H. (1994). The Hog Pathway Controls Osmotic Regulation of Transcription Via the Stress-Response Element (Stre) of the *Saccharomyces-Cerevisiae* Ctt1 Gene. *Embo Journal.* **13**: 4382-4389.

Silva, CL.(1985), Granulomatous reaction induced by lipids isolated from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **79**: 70-3

Silva, CL., Alves, LM., & Figueiredo, F.(1994). Involvement of cell wall glucans in the genesis and persistence of the inflammatory reaction caused by the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbiology.* **140**: 1189-1194.

Silva, MB., Marques, AF., Nosanchuk, JD., Casadevall, A., Travassos, LR. & Taborda, CP. (2006). Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. *Microbes Infect.* **8**: 197-205.

Silva-Vergara, ML., Martinez, R., Camargo, Z. P., Malta, M. H., Maffei, C. M., & Chadu, J. B. (2000). Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. *Med. Mycol.* **38**: 193-199.

Silva-Vergara, ML., Martinez, R., Chadu, A., Madeira, M., Freitas-Silva, G., & Leite Maffei, C. M. (1998). Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibia, State of Minas Gerais, Brazil. *Med. Mycol.* **36**: 37-42.

Shome, SK. & Batista, A. C. (1963). Occurrence of *Paracoccidioides brasiliensis* in the soil of Recife (Brazil). *Rev. Fac. Med. Uni. Ceará* **3**: 90-94.

Soares, RB., Velho, TA., De Moraes, LM., Azevedo, MO., Soares, CM. & Felipe, MS., (2005). Hygromycin B-resistance phenotype acquired in *Paracoccidioides brasiliensis* via plasmid DNA integration: *Med.Mycol.* **43**: 719-723.

Srikantha, T., Chandrasekhar, A., & Soll, DR. (1995). Functional-Analysis of the Promoter of the Phase-Specific Wh11 Gene of *Candida-Albicans*. *Molecular and Cellular Biology.* **15**: 1797-1805.

Stambuk, BU., Puccia, R., de Almeida, ML., Travassos, LR., & Schenkman, S. (1988). Secretion of the 43 kDa glycoprotein antigen by *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Med. Vet. Mycol.* **26**: 367-373.

Stammers, DK., Ren, J., Leslie, K., Nichols, CE., Lamb, HK., Cocklin, S., Dodds, A., & Hawkins, AR. (2001). The structure of the negative transcriptional regulator NmrA reveals a structural superfamily which includes the short-chain dehydrogenase/reductases. *Embo Journal.* **20**: 6619-6626.

Stover, EP., Loose, DS., Stevens, DA., & Feldman, D.(1983). Ketoconazole binds to the intracellular corticosteroid-binding protein in *Candida albicans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **117**: 43-50.

Straus, AH., Freymuller, E., Travassos, LR., & Takahashi, HK.(1996). Immunochemical and subcellular localization of the 43 kDa glycoprotein antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* with monoclonal antibodies. *J. Med. Vet. Mycol.* **34**: 181-186.

Taborda, CP. & Camargo, ZP.(1993). Diagnosis of paracoccidioidomycosis by passive haemagglutination assay of antibody using a purified and specific antigen-gp43. *J. Med. Vet. Mycol.* **31**: 155-160.

Taborda, CP. & Camargo, ZP.(1994). Diagnosis of paracoccidioidomycosis by dot immunobinding assay for antibody detection using the purified and specific antigen gp43. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 554-556.

Taborda, CP., Juliano, MA., Puccia, R., Franco, M., & Travassos, LR. (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. *Infect. Immun.* **66**: 786-793.

Tao, Y. & Marzluf, GA. (1998). Analysis of a distal cluster of binding elements and other unusual features of the promoter of the highly regulated nit-3 gene of *Neurospora crassa*. *Biochemistry.* **37**: 11136-11142.

Tavares, AH, S S Silva, A Dantas, E G Campos, R V Andrade, A Q Maranhao, M M Brigido, D G Passos-Silva, A L Fachin, S M Teixeira, G A Passos, C M Soares, A L Bocca, M J Carvalho, I Silva-Pereira, M S Felipe. (2007). Early transcriptional response of *Paracoccidioides brasiliensis* upon internalization by murine macrophages: *Microbes.Infect.* **9**: 583-590.

Thireos, G., Penn, MD., & Greer, H. (1984). 5' Untranslated Sequences Are Required for the Translational Control of A Yeast Regulatory Gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences.* **81**: 5096-5100.

Todd, RB., Fraser, JA., Wong, KH., Davis, MA., & Hynes, MJ. (2005). Nuclear accumulation of the GATA factor AreA in response to complete nitrogen starvation by regulation of nuclear export. *Eukaryotic Cell.* **4**: 1646-1653.

Tomsett, AB., Dunncoleman, NS., & Garrett, RH. (1981). The Regulation of Nitrate Assimilation in *Neurospora-Crassa* - the Isolation and Genetic-Analysis of Nmr-1 Mutants. *Molecular & General Genetics*. **182**: 229-233.

Tosco, A., Gargano, S., Kobayashi, GS., & Maresca, B. (1997). An AP1 element is involved in transcriptional regulation of Delta(9)-desaturase gene of *Histoplasma capsulatum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **230**: 457-461.

Travassos, LR., Taborda, CP., Iwai LK., Cunha-Neto, E., Puccia, R. (2003). The gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis*: a major diagnostic antigen and vaccine candidate. The *Micota XVII Human Fungal Pathogens*. Ed. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg. 279-296.

vancorcom, RFM., Punt, P., Timberlake, WE., Vandenbroek, HWJ., Pouwels, H., & Vandenbondel, AMJJ. (1986). Analysis of Regulation Signals in *Aspergillus*. *Heredity*. **57**: 131.

van Helden, J., Andre, B., & Collado-Vides, J. (1998). Extracting regulatory sites from the upstream region of yeast genes by computational analysis of oligonucleotide frequencies. *Journal of Molecular Biology*. **281**: 827-842.

Vicentini, AP., Gesztesi, JL., Franco, MF., de Souza, W., de Moraes, JZ., Travassos, LR., & Lopes, JD.(1994). Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infect. Immun.* **62**: 1465-1469.

Vicentini, AP., Moraes, JZ., Gesztesi, JL., Franco, MF., de Souza, W., & Lopes, JD.(1997). Laminin-binding epitope on gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* is recognized by a monoclonal antibody raised against *Staphylococcus aureus* laminin receptor. *J. Med. Vet. Mycol.* **35**: 37-43.

Yarzabal, LA.(1971). [Specific precipitant antibodies in South American blastomycosis revealed by immunoelectrophoresis]. *Rev. Inst. Med Trop. Sao Paulo* **13**: 320-327.

Yarzabal, LA., Andrieu, S., Bout, D., & Naquira, F.(1976). Isolation of a specific antigen with alkaline phosphatase activity from soluble extracts of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia*. **14**: 275-280.

Yarzabal, LA., Bout, D., Naquira, F., Fruit, J., & Andrieu, S.(1977). Identification and purification of the specific antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* responsible for immunoelectrophoretic band E. *Sabouraudia*. **15**: 79-85.

Wang, LWC. & Marzluf, GA. (1979). Nitrogen Regulation of Uricase Synthesis in *Neurospora-Crassa*. *Molecular & General Genetics*. **176**: 385-392.

Wanke, B., & Londero AT.(1994). Epidemiology and Paracoccidioidomycosis infection., p. 109-120, in: Franco, M. C. S. Lacaz, A. Restrepo and G. Del Negro (eds.). Paracoccidioidomycosis. CRC Press, Boca Raton, Florida. U.S.A.

Yang, SQ., Jiang, ZQ., Yan, QJ., & Zhu, HF. (2008). Characterization of a thermostable extracellular beta-glucosidase with activities of exoglucanase and transglycosylation from *Paecilomyces thermophila*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **56**: 602-608.

Young, JL., Jarai, G., Fu, YH., & Marzluf, GA. (1990). Nucleotide-Sequence and Analysis of Nmr, A Negative-Acting Regulatory Gene in the Nitrogen Circuit of *Neurospora-Crassa*. *Molecular & General Genetics*. **222**: 120-128.

## VIII. ABSTRACT

The present work shows the involvement of NIT2-like binding motifs in transcription modulation of the *PbGP43* gene, which encodes an important antigen from the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. This investigation was motivated by the finding of a high number of GATA (or TATC)-like motifs within the first 2,047 nucleotides of the *PbGP43* 5' intergenic region from Pb339 isolate, which has been presently cloned and sequenced. This fragment contains 23 NIT2-like sites, which form 4 putative clusters, two of them identical. Our analysis was based on electrophoretic mobility shift assay (EMSA) with selected probes and real time reverse transcription (RT)-PCR of *PbGP43* from *P. brasiliensis* cultures exposed to, or depleted of, ammonium sulfate and glutamine. The results suggested that at least some NIT2-like motifs may be functional and that *PbGP43* is modulated by nitrogen primary sources. We have mapped 4 oligonucleotides containing TATC motifs that formed DNA-protein complexes possibly involving a NIT2-like factor. This suggestion is based on the following observations: i) they formed more intense EMSA bands with extracts from ammonium sulfate-depleted cells; ii) a point mutation in the TATC core (to GATC) decreased shifted band intensity; iii) all the complexes migrated similarly. Both ammonium sulfate and glutamine provoked rapid decrease in *PbGP43* mRNA accumulation, but this effect could be reversed upon salt depletion. This kind of modulation was observed not only in Pb339, but also in Pb3 and Pb18. The oligonucleotides that prime amplification of a 2,047-bp *PbGP43* intergenic fragment using Pb339 DNA elongated a fragment of similar size with template from Pb18 and six other isolates, while for Pb2, Pb3, Pb4 and Pb5 the amplicon was ~1,500 bp and for Pb9 and Pb17 it was ~3,000 bp. The Pb18 genome sequence of this amplicon is 98% identical to that of Pb339. In Pb3, the number of NIT2-like motifs and clusters is lower. Gene reporter assays conducted in *Aspergillus nidulans* WG355 showed that the first -480 bp of the *PbGP43* 5' intergenic region are responsible for promoter activation and contains the minimal elements responsible for down regulation of gene when tested in minimal medium containing sodium nitrate as the only nitrogen source. Besides nitrogen sources, alterations in the concentration of glucose and addition of fetal serum bovine (FSB) in the medium were tested. In our conditions, when glucose concentration increased from 0,18 to 1,5%, mRNA accumulation decreased. The opposite was seen when

concentration raised from 1,5 to 3%. FSB, on the other hand, did not alter PbGP43 expression. When the proximal promoter region was mapped by DNase I footprinting and EMSA, we identified three protected regions localized between – 216 and –260 bp far from the initial codon (ATG). This is the first report on PbGP43 transcription modulation with primary nitrogen sources.

## **Figuras**

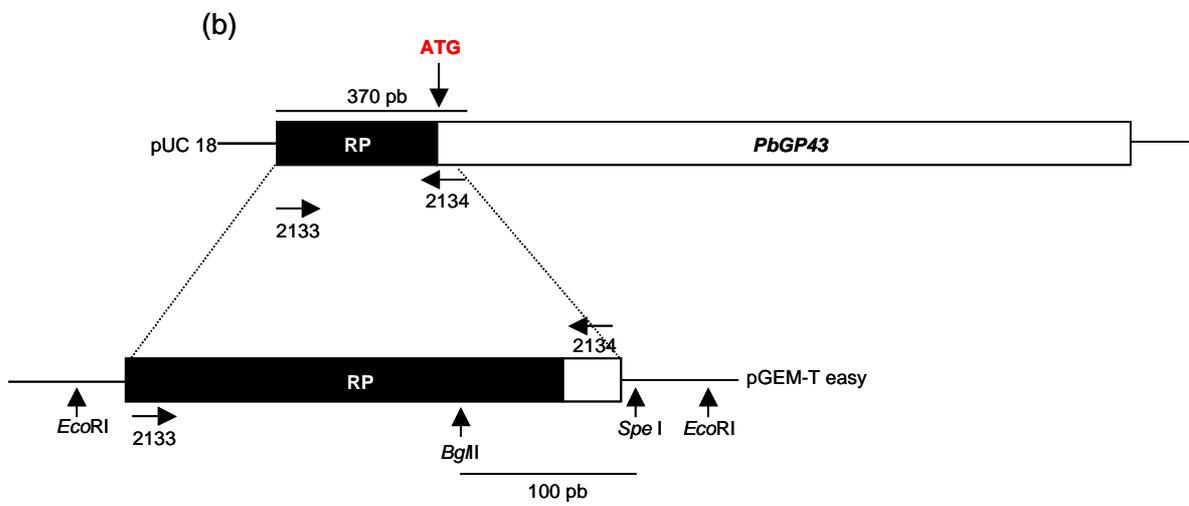
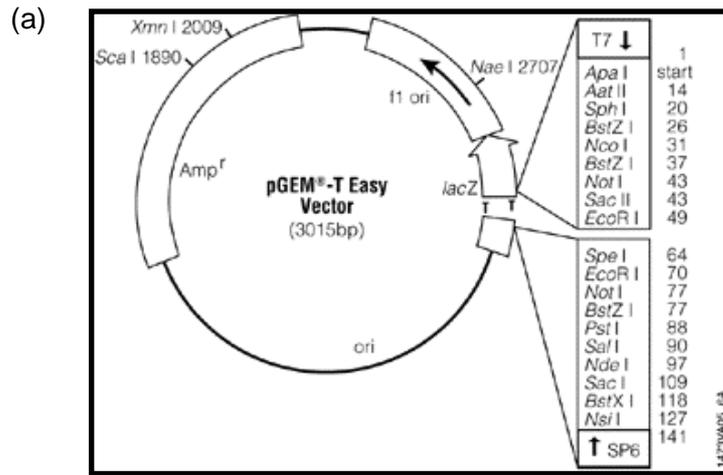


Figura 1. Mapa do vetor pGEM-T easy (a) e esquema mostrando a estratégia usada na clonagem da região promotora (RP) do gene *PbGP43* (b). O sítios das enzimas de restrição utilizadas e a localização de alguns oligonucleotídeos estão indicados.

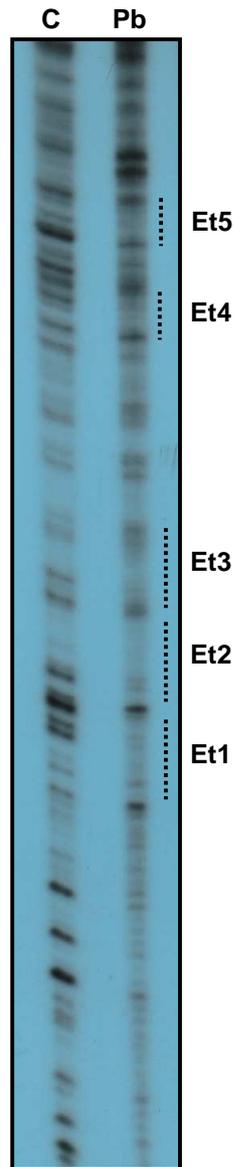


Figura 2. Ensaio de “DNase I footprinting” da RP1 incubada com 90  $\mu\text{g}$  de um extrato proteico total do Pb339. As regiões de proteção estão indicadas à direita com seus respectivos nomes. **C**, sonda digerida com DNase I na ausência de extrato. **Pb**, sonda digerida com DNase I na presença de extrato.

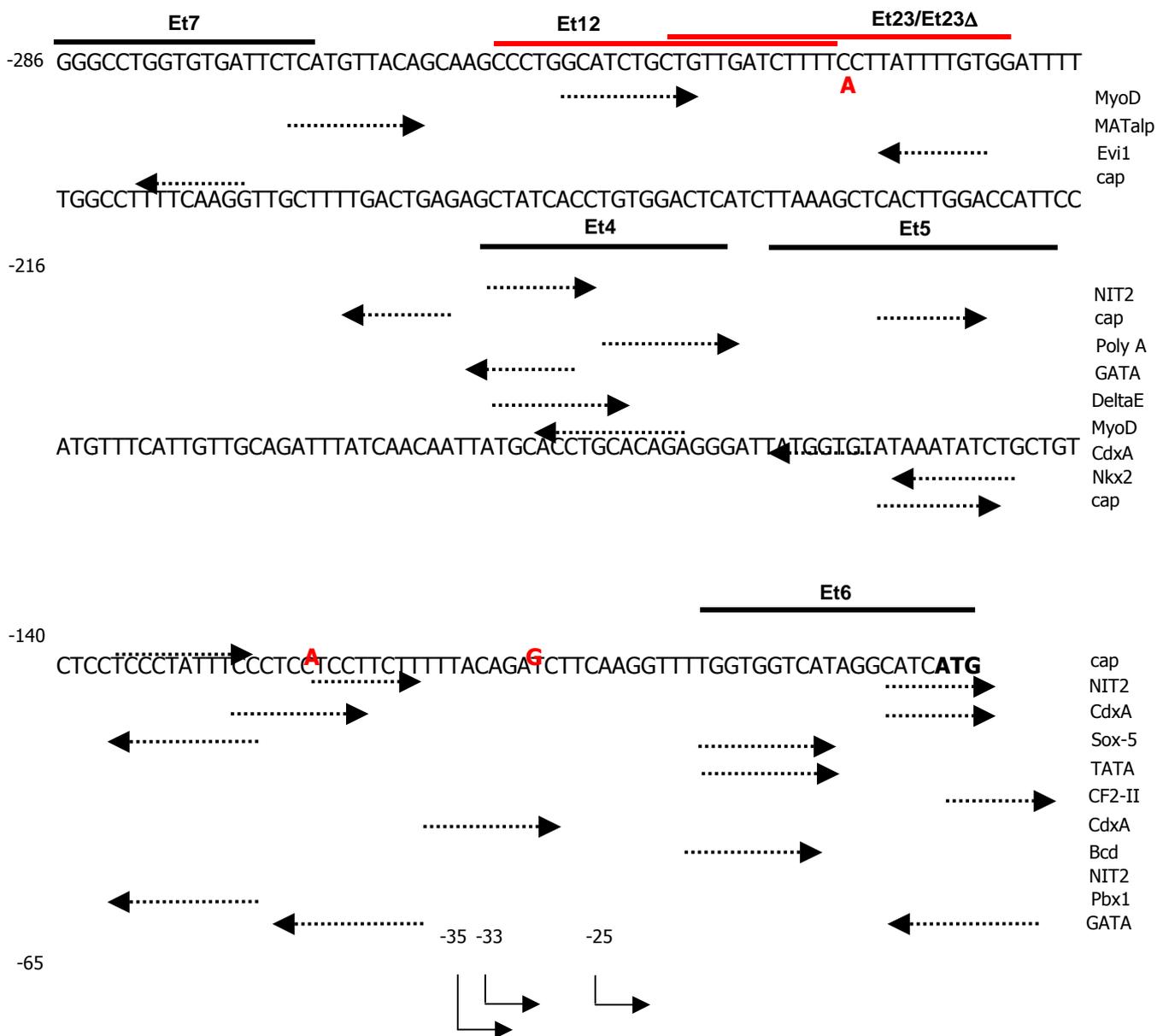


Figura 3. Localização das sondas analisadas dentro da região promotora proximal ao *PbGP43* e análise pelo programa TFSearch. Todas as regiões analisadas neste trabalho estão identificadas (Et1 a Et7). As regiões positivas para os ensaios de EMSA estão marcadas com um traço vermelho. As setas tracejadas indicam os sítios e a orientação dos fatores de transcrição putativos ligantes listados à direita. As setas contínuas indicam os sítios de início de transcrição. As substituições em isolados do grupo PS2 estão indicadas com letras vermelhas.

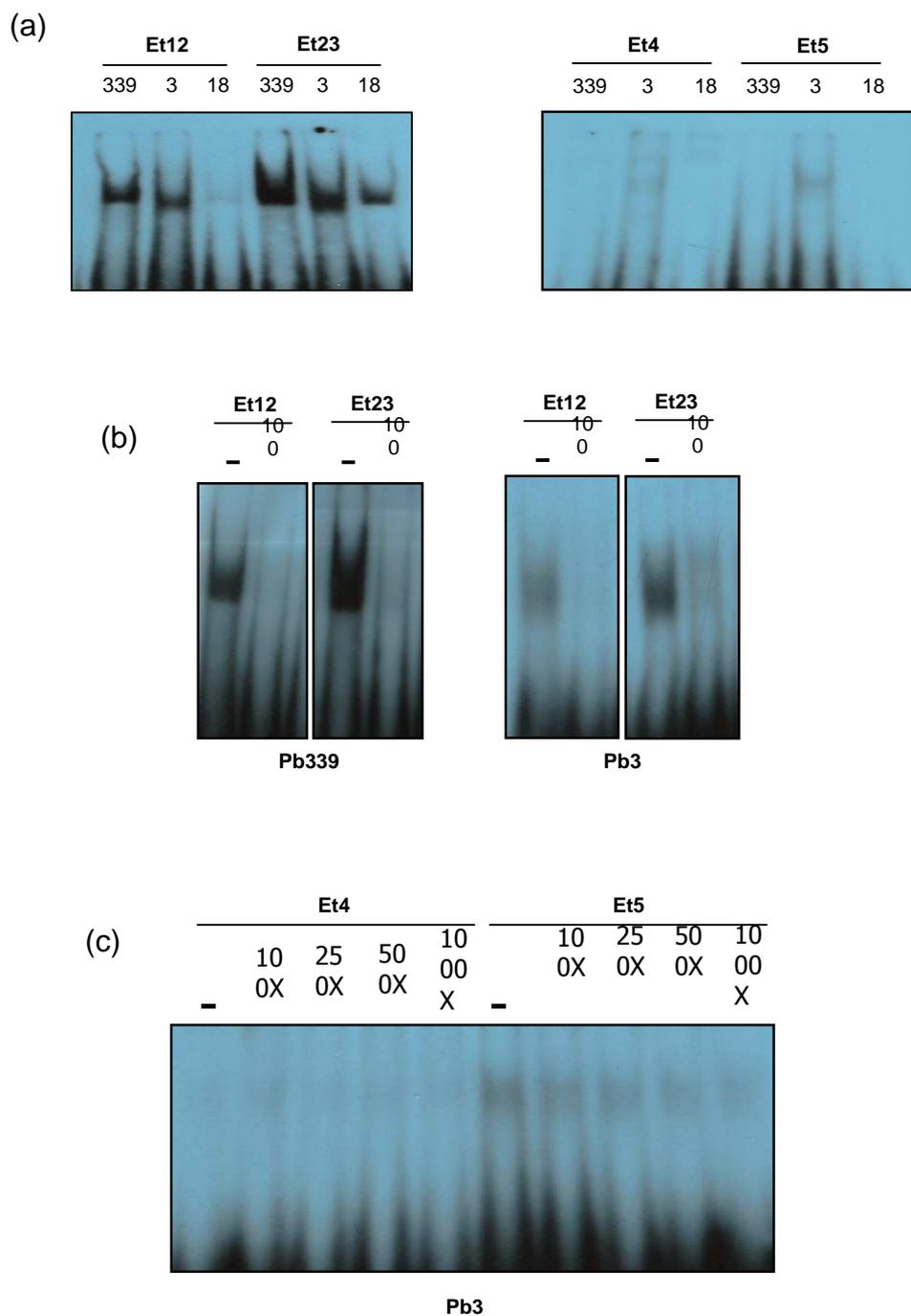


Figura 4. Autorradiogramas mostrando os resultados de EMSA com extratos de proteínas totais da fase leveduriforme dos isolados Pb339, Pb3 e Pb18, conforme indicado pelos números correspondentes. Em (a), incubação dos extratos com as sondas radioativas Et12, Et23, Et4 e Et5. Em (b) e (c), competição específica das sondas indicadas acima. -, ausência de competidor.

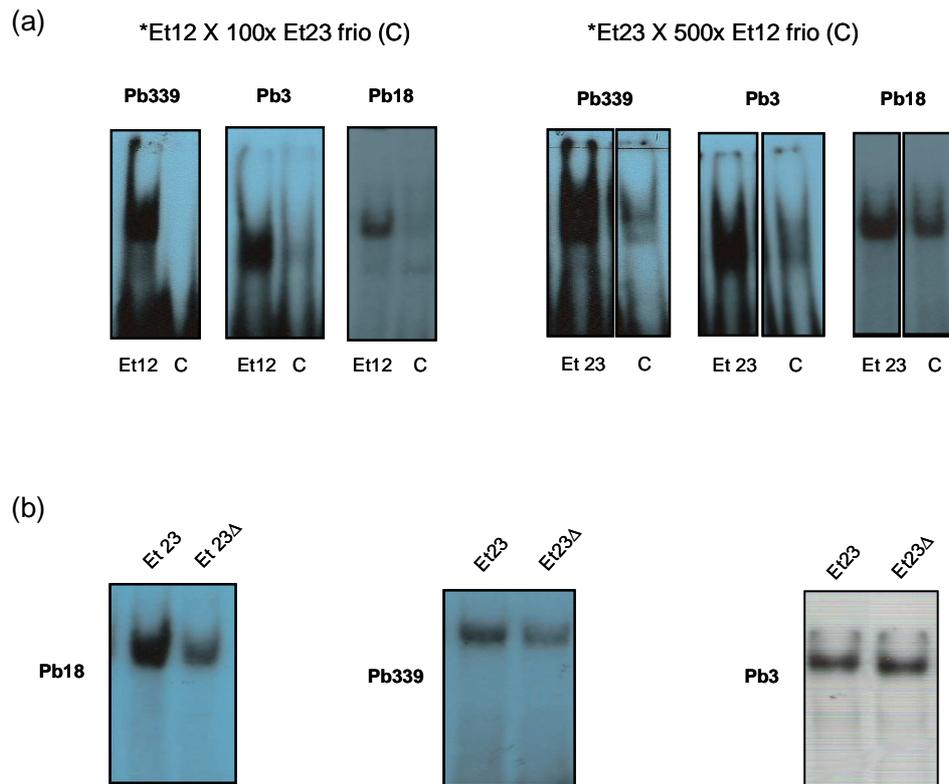


Figura 5. Autorradiograma mostrando os resultados de EMSA com extratos de proteínas totais da fase leveduriforme dos isolados Pb339, Pb3 e Pb18, conforme indicado pelos números correspondentes. Em (a), competição cruzada com as sondas indicadas. (b) EMSA com as sondas radioativas Et23 e Et23Δ.

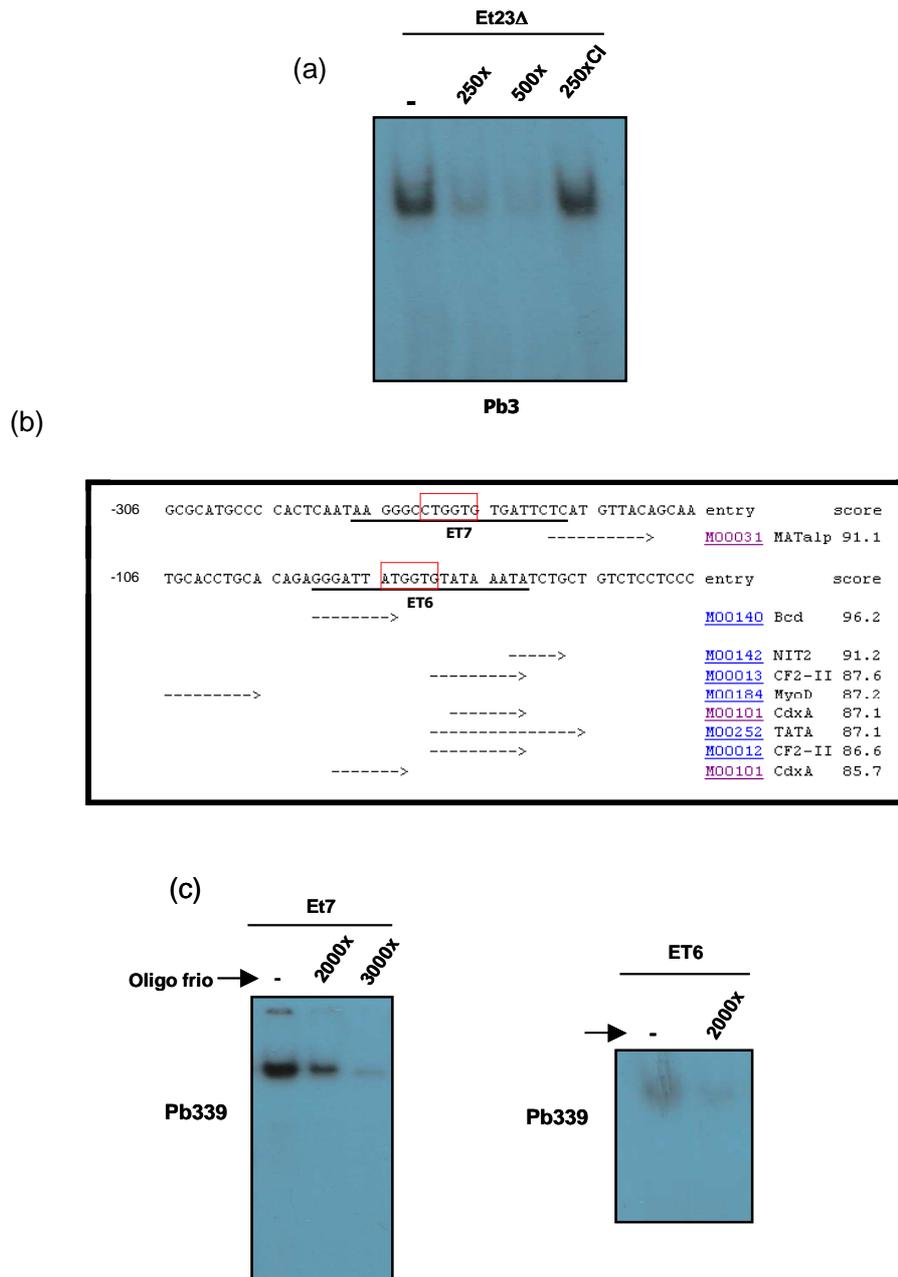


Figura 6. Autorradiograma mostrando resultados de EMSA. Em (a), competição específica com a sonda Et23 Δ. (b), quadro com a posição dos elementos Et6 e Et7 e (c), sondas radioativas Et6 e Et7 com extrato de proteínas totais da fase leveduriforme do isolado Pb339. -, ausência de competidor.

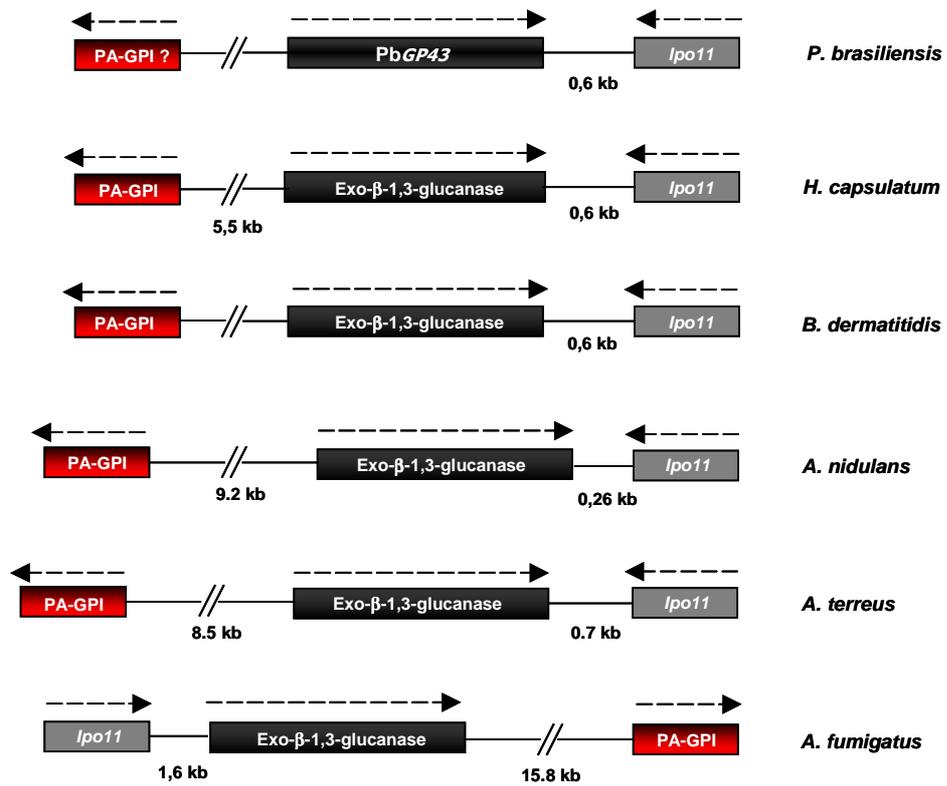


Figura 7. Representação da região cromossômica dos genes para as exo-β-1,3-glucanases em fungos filogeneticamente próximos (indicados) ao *P. brasiliensis*, de acordo com as informações preliminares lançadas em 2006. Genes de mesma cor apresentam elevado grau de identidade.

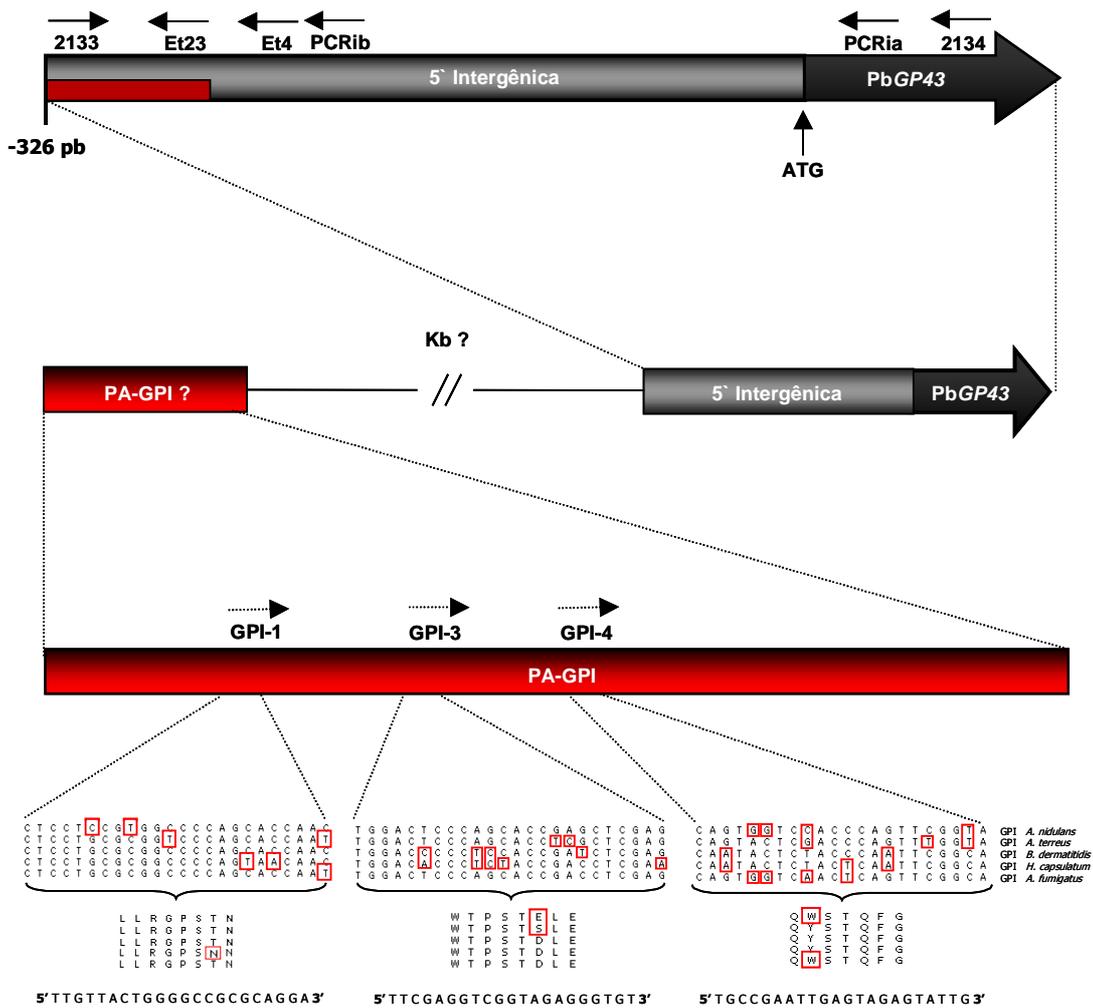


Figura 8. Esquema da estratégia de clonagem da região intergênica do *PbGP43* baseada na possível semelhança do locus, como visto na figura 9. Os oligonucleotídeos usados para as reações de PCR estão indicados, bem como a seqüência dos oligonucleotídeos GPI. À direita estão indicados os organismos usados para o alinhamento dos genes. A barra vermelha mostra a posição da sonda (feita com os oligonucleotídeos 2133 e Et23) usada para fazer o "Southern blotting" mostrado na figura 9.

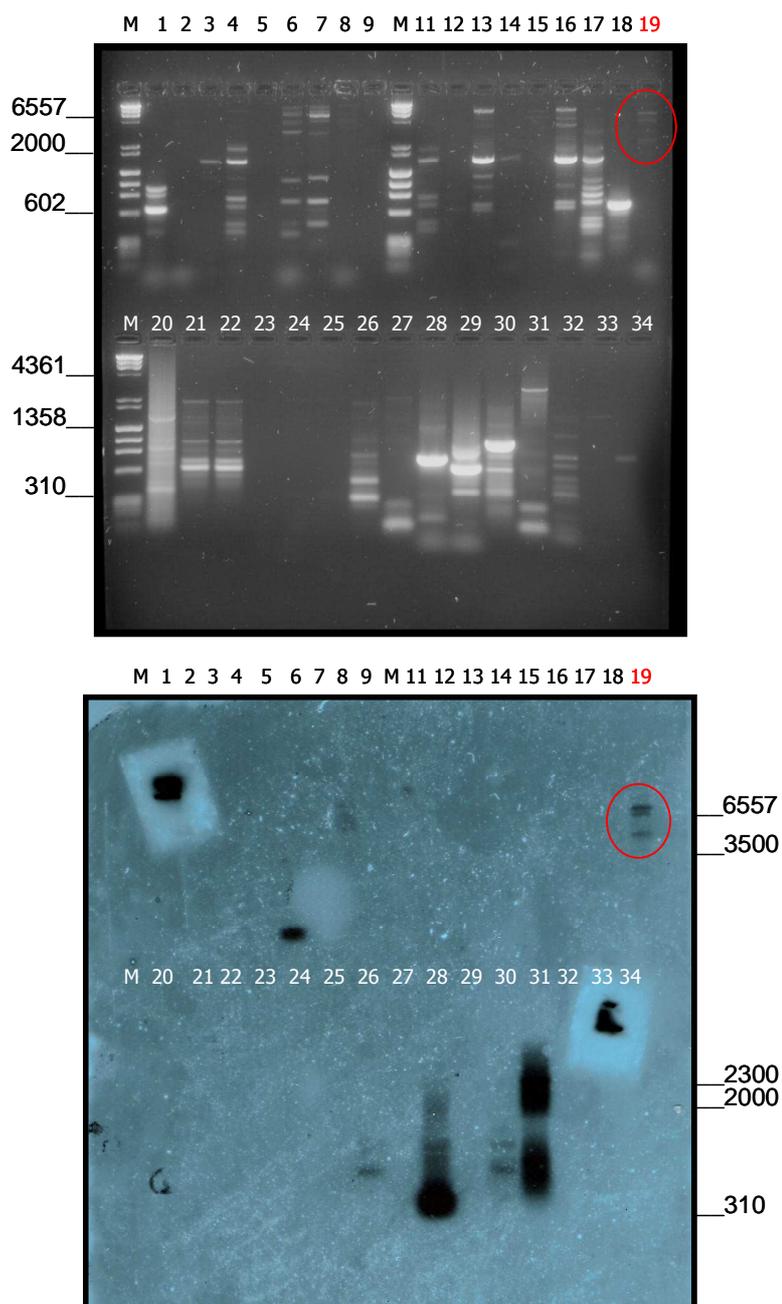


Figura 9. Gel de agarose (foto superior) mostrando o padrão de bandas das reações de PCR usando os oligonucleotídeos GPI. O quadro inferior mostra o resultado do “Southern blot” feito com o DNA do gel da foto superior. O círculo vermelho mostra o DNA da reação 19 sendo reconhecido pela sonda indicada na figura 8 com uma barra vermelha. À esquerda e à direita está indicada a migração dos marcadores de peso molecular. A migração de algumas bandas está indicada em pb. M, marcadores de peso molecular.

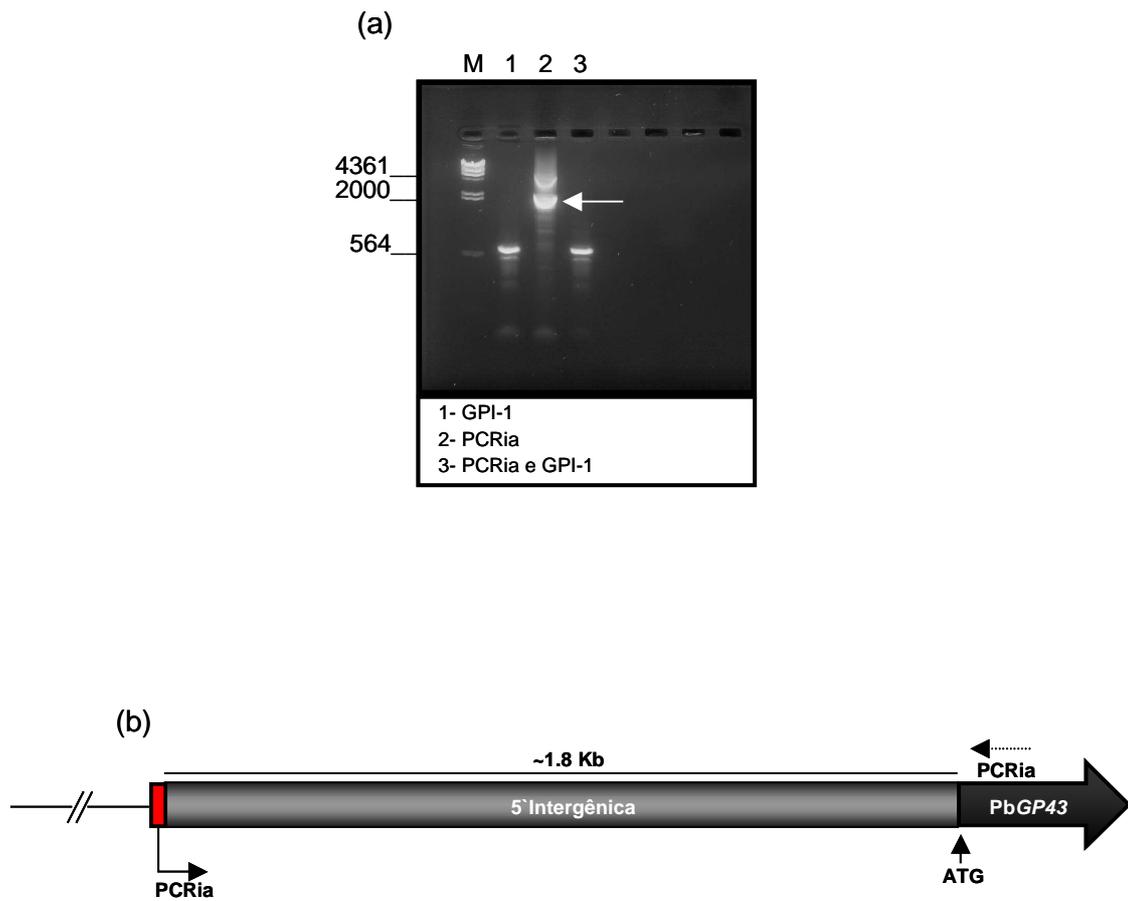


Figura 10. Em (a), gel de agarose mostrando o padrão de bandas da reação de PCR usando o DNA purificado da reação 19 (figura 9) como molde e os oligonucleotídeos PCRia e GPI-1. A seta indica a banda purificada, clonada e sequenciada. Em (b), esquema mostrando o possível ponto de anelamento do oligonucleotídeo PCRia. À esquerda está indicada a migração dos marcadores de peso molecular. A migração de algumas bandas está indicada em pb. M, marcadores de peso molecular.

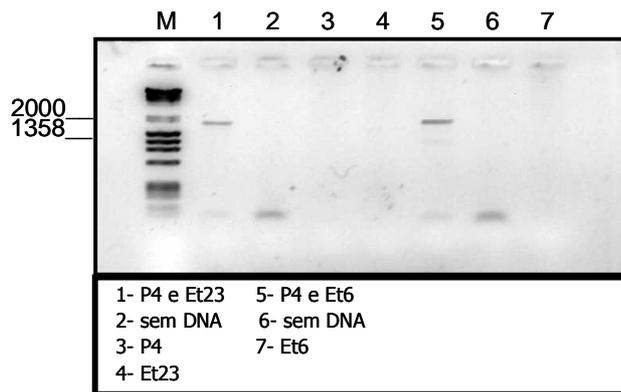
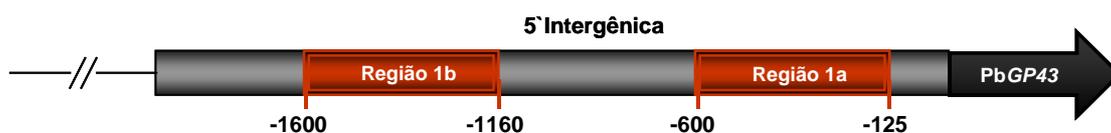


Figura 11. Gel de agarose mostrando as bandas amplificadas pela reação de PCR usando os oligonucleotídeos indicados na parte inferior da foto. P4 foi sintetizado com base no resultado do sequenciamento e sua posição pode ser vista no esquema acima.



-2021 CTAACGGAGCATGGAAAAAACCTGTAACGCTGAACTTTTGCTATTAACCTATTGATTACATCAAAGCCAG  
TATATATATCAAAGGGTGTCTGATGAAAAGATGCAGCAGGATGCAGCCACAGGCTCCAGTTCTTGTA  
-1871 AAGGGGGGCGCCTTACCGGTAGCTCCCTAAATAACGCAGAACGCCCGTCGAGTTTACCCAATAGTTCA  
ACCAAGCCTTATTAAGGGGCTCGGGCTTTTGCGACTTGCAATTTGCCACAATATGTTATCAGCCAACGG  
GAAACTTTGCACAAGATCGAGTTACTTCTGATGCTCACGGATTGTTTCATGGCACATTCTGAAAAAGTCCCTC  
-1661 TCAGGAATCCAGCTTTCTGTTGAGATCAATCCTATTTAGAAGTGGAGTTTGACAGATAGGAAGCTCCTGTT  
ATCTTGAATGCTACAGAGTTCTGGATTGTACATATGCATCCAGCAAATCATTTCATGTCTCAACATGGCTG  
TGTGATGCCTGTTCTTCTGAAAAAATTGACAAATGCATCTCTAAGATGTAGAATAAAAGCTTTTAGAGAAA  
-1441 AAGCAATAACTCACTCAGAAGCTGTCACTAATACATCATTATTTATCTCTTCTTTTATTTATTGATTAATAA  
TTATTTTATTTGTTTATTTTGCTCCTGGAGAAGCTAGCAAGTTTGCCAGAAATCCAGTTGAGAAAAATGCA  
CACACACACCCCACTCAATGAGAGTCTGGTGGGATTCTCACATCACAGCAAGTTCTGACATTCATCATTGA  
-1211 TCTCTTTTCTATTTGCAGATTTTTATCTTTCAAGACTGCTTTTAACTGAGAGCTATCATCTATGAACTTATC  
TTAAAGCTTATTTGAGGTATTTCAAGGTTTTGATAGTTATAGATGTCATGAAATCTTATGTTACTTCTGTTA  
TCTTGAATGCTACAGAGTTCTGGGATCATACTGTGCATTCAATGAAATGTTTGTGTTTTAATGTGGCTGT  
-991 GTGACATCTATTCTTCTGAAAAATTTAGACAAATGCATCTCTAAGATATAGAGTGAAAGCTTTCAGAGAA  
AAAGCAATAACTCACTCAGAAGCTGCTGCTAATACATCATTATTTATCTCTTTGCTGTTTGATTATTGATA  
ATAATTATTTTATTGTTATTTTGCTCCTGGAGAAGCTAGCAAGTTTGCTCAGAATTCTCAGTCGAGAAAAATG  
-775 CACACACACATCTCACTCAATGAGAGTCTGGTGGGATTCTCATATCACAGCAAGTTCTGACATTCATCATT  
GATCTCTTTTCTATTTGCAGATTTTTATCTTTTCAAGACTGCTTTTAAATGAGAGCTATCATCTATGAACTTA  
-635 TCTTAAAGCTTATTTGAGGTATTTTCAAGGTTTTGATAGTTATAGATGTCATGAAATCTTATGTTACTTCTGT  
TATCTTGAATGCTACAGAGTTCTGGGATCATACTGTGCATTCAATGAAATGTTTGTGTTTTAATGTGACT  
GTGTGACATCTATTCTTCTGAAAAATTTGACAAATGCATCTCTGAAATATAGAGTGAAAGCTTTCAGAGAA  
-425 AAAGCAACAACCTCACTCAGAAGCTGCTGCTAATACATCATTATTTATCTCTTCTTTTATTTATTGATTAATA  
ATTATTTTATTGTTTGTCTCCTGGAGAAGCTAGCAAGTTTGCCAGAAATCCAGTTGAAAAAATGCGCAT  
GCCCCACTCAATAAGGGCCTGGTGTGATTCTCATGTTACAGCAAGCCCTGGCATCTGCTGTTGATCTTTTC  
CTTATTTTGTGGATTTTTGGCCTTTTCAAGGTTGCTTTTGAAGTCTGAGAGCTATCACCTGTGGACTCATCTTAA  
-145 AGCTCACTTGGACCATTCCATGTTTCATTGTTGCAGATTATCAACAATTATGCACCTGCACAGAGGGATT  
ATGGTGTATAAATATCTGCTGCTCCTCCCTATTTCCCTCCTCCTTCTTTTACAGATCTTCAAGGTTTTGGT  
GGTCATAGGCATCATG - 3'

Figura 12. Sequência completa da região 5' intergênica do PbGP43 a partir do ATG inicial (indicado na região 3'). Em vermelho estão indicados os fragmentos com ~85% de identidade, Região 1b (-1600 a -1160) e Região 1a (-600 a -125). As posições estão referidas à esquerda.

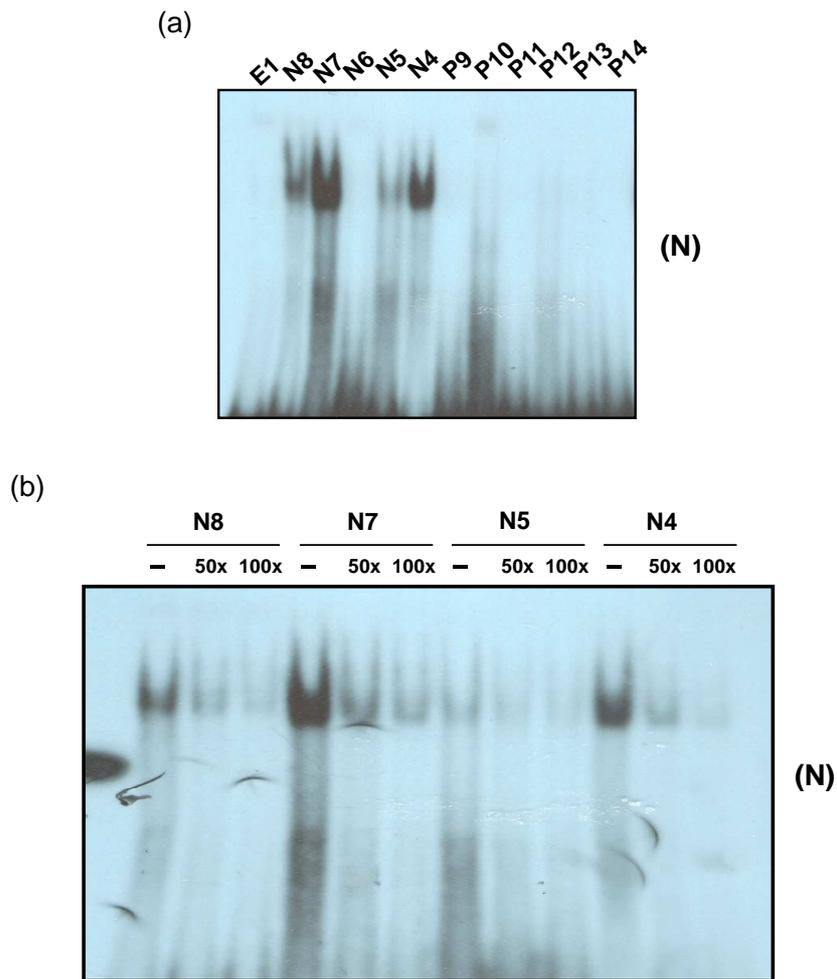


Figura 13. (a) autorradiograma mostrando os resultados de EMSA com as sondas radioativas indicadas (ver posições na Fig. 15) e o extrato de proteínas totais da fase leveduriforme do isolado Pb339 crescido em meio F12+glicose (N) na ausência ou na presença da sonda não marcada em excesso molar de 50 a 100x, como mostrado em (b). Em (b) foram testadas somente as sondas positivas evidenciadas em (a). -, sem competidor.

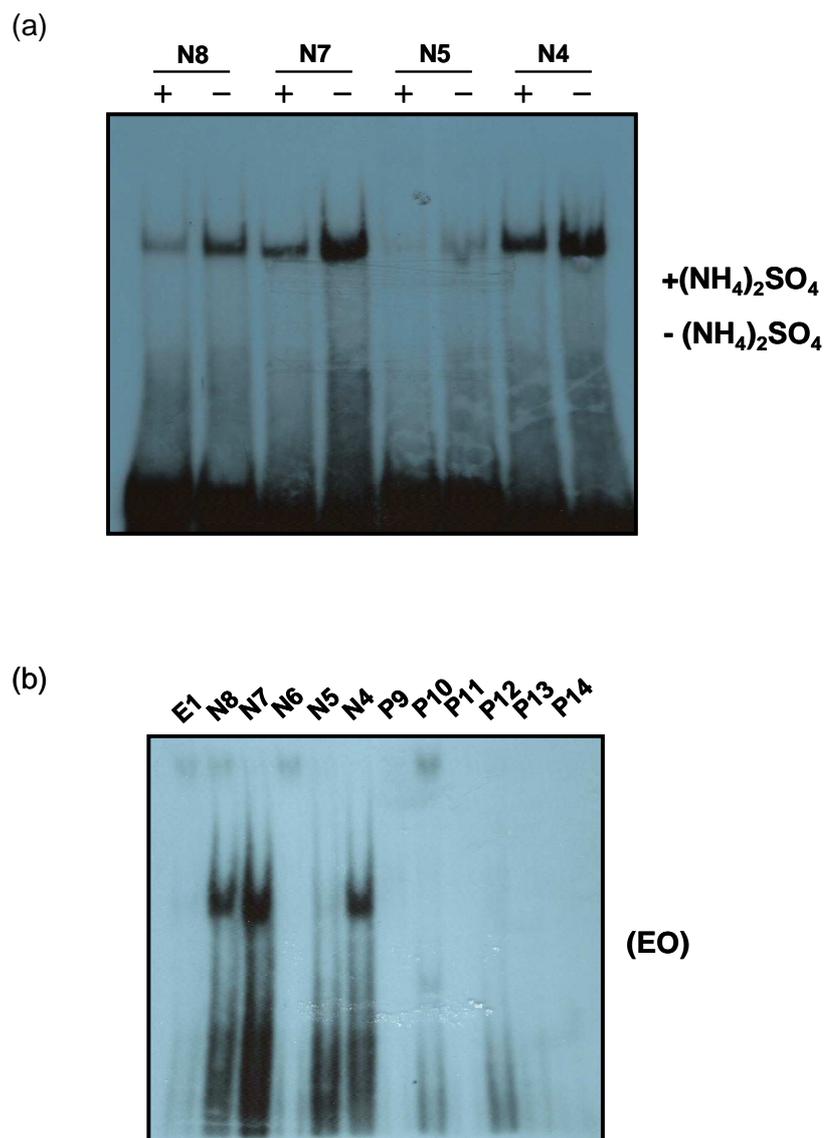
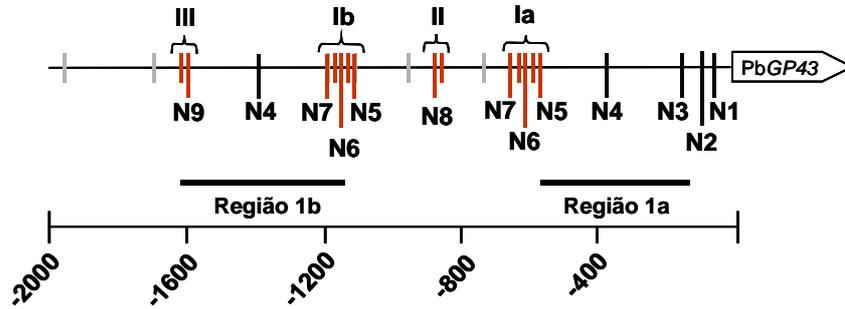


Figura 14. (a) autorradiograma mostrando os resultados de EMSA com as sondas radioativas positivas representadas na figura 13b e o extrato de proteínas totais da fase leveduriforme do isolado Pb339 crescido na presença  $+(NH_4)_2SO_4$  ou ausência de sulfato de amônio  $-(NH_4)_2SO_4$ . (b) Autorradiograma mostrando os resultados de EMSA com as sondas radioativas representadas na figura 13a e o extrato de proteínas totais da fase leveduriforme do isolado Pb339 induzido com 0,6 M de NaCl. O experimento em (a) é uma duplicata de dois extratos independentes.

*P. brasiliensis* (339)



	NIT2	-1943	TATATA TATC CAAAGG	
	NIT2	-1747	ATATGT TATC AGCCAA	
III	NIT2	-1616	TTGACA GATA GGAAGC	
	NIT2	-1606	TCCTGT TATC TTGAAT	N9
	NIT2	-1410	TTTATT TATC TCTTCT	N4
Ib	NIT2	-1215	ATTTTT TATC TTTTCA	N7
	NIT2	-1188	GAGAGC TATC ATCTAT	
	NIT2	-1177	TGAACT TATC TTAA AG	N6
	NIT2	-1145	GGTTTT GATA GTTATA	
	NIT2	-1110	TTCTGT TATC TTGAAT	N5
II	NIT2	-974	CTCTAA GATA TAGAGT	
	NIT2	-903	TTTATT TATC TCTTTG	N8
	NIT2	-884	ATTATT GATA ATAATT	
Ia	NIT2	-766	TTCTCA TATC ACAGCA	
	NIT2	-714	ATTTTT TATC TTTTCA	N7
	NIT2	-687	GAGAGC TATC ATCTAT	
	NIT2	-676	TGAACT TATC TTAAAG	N6
	NIT2	-643	GGTTTT GATA GTTATA	
	NIT2	-608	TTCTGT TATC TTGAAT	N5
	NIT2	-398	TTTATT TATC TCTTCT	N4
	NIT2	-179	GAGAGC TATC ACCTGT	N3
	NIT2	-117	CAGATT TATC AACAAT	N2
	NIT2	-73	TATAAA TATC TGCTGT	N1

**Consenso TATT TATC/GATA TTTA**

Figura 15. Esquema da região 5' intergênica do PbGP43 evidenciando a posição dos elementos NIT2 putativos (barras verticais), bem como dos elementos já testados por EMSA (barras vermelhas). Abaixo estão indicadas a posição e a sequência dos elementos evidenciados no esquema acima. Números vermelhos indicam os “clusters” de elementos NIT2. Os “clusters” foram numerados Ia e Ib, II e III.

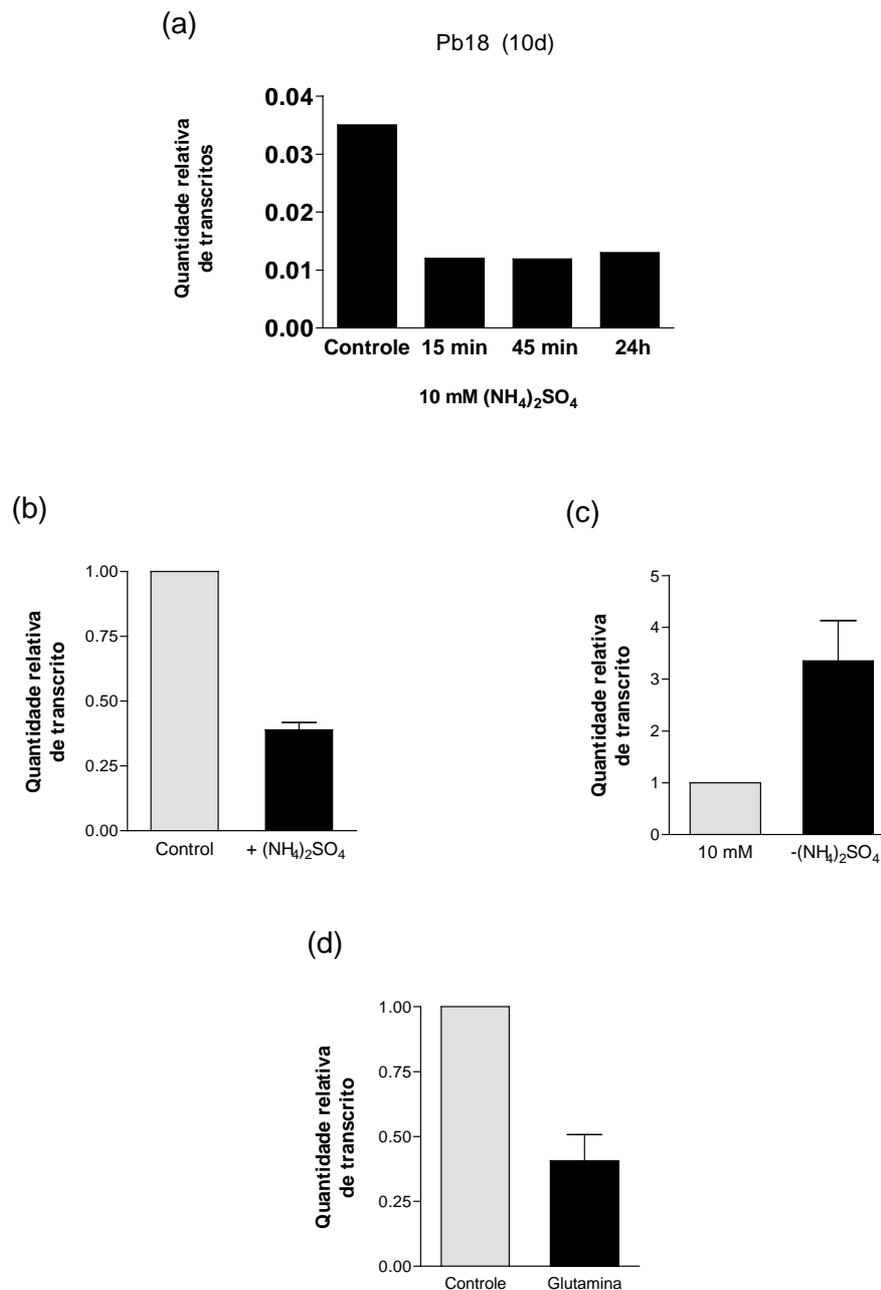


Figura 16. Ensaios de RT-PCR em tempo real do gene *PbGP43* em leveduras do isolado Pb18 e Pb339 de *P. brasiliensis*. Células cultivadas em meio F12/glicose (Controle) foram estimuladas com 10 mM de sulfato de amônio e coletadas pelos tempos indicados (Pb18). Para Pb339, células cultivadas em meio F12/glicose foram estimuladas com 10 mM de sulfato de amônio (b), lavadas para a retirada do sal (c) ou 10 mM de glutamina (d). As colunas mostram a quantidade de transcritos do gene *PbGP43* relativa ao gene de referência da  $\alpha$ -tubulina.

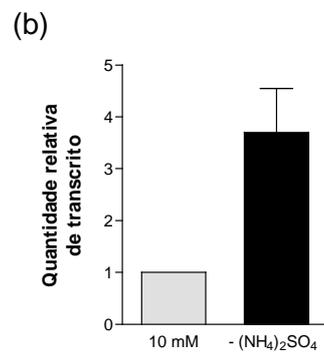
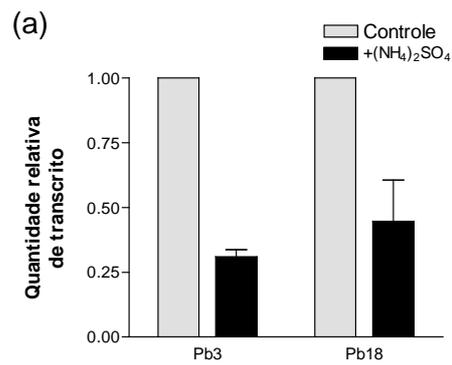
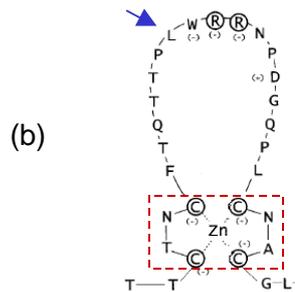
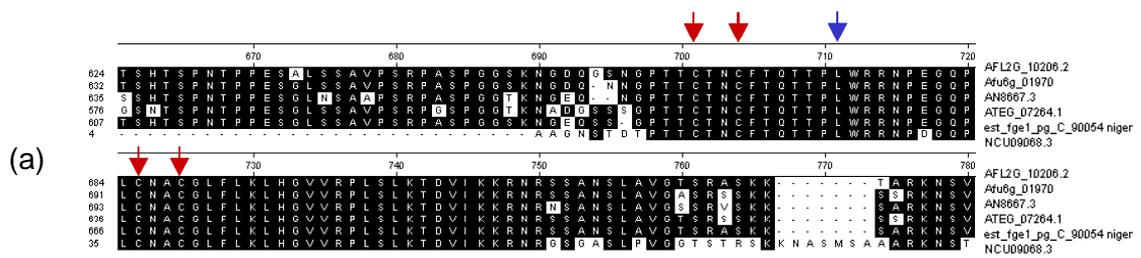


Figura 17. Ensaio de RT-PCR em tempo real do gene *PbGP43* em leveduras do isolado Pb3 (a) e Pb18 (a) e (b) de *P. brasiliensis*. Células cultivadas em meio F12/glicose foram estimuladas com 10 mM de sulfato de amônio (a) e lavadas para a retirada do sal (b). As colunas mostram a quantidade de transcritos do gene *PbGP43* relativa ao gene de referência da  $\alpha$ -tubulina.



### Feature Map: Paracoccidioides brasiliensis Pb03 Supercontig 6

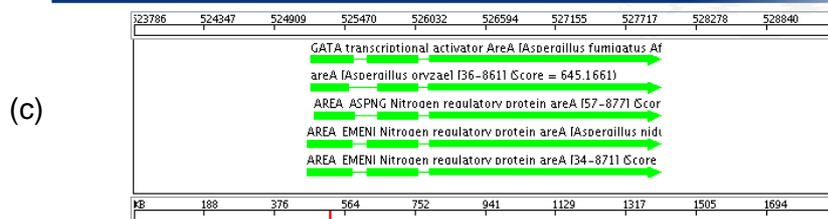


Figura 18. (a) Alinhamento de seqüências AreA de *Aspergillus* e NIT2 de *N. crassa*. Setas vermelhas indicam os resíduos de cisteína (ligantes de Zn) e a seta azul indica o resíduo de leucina, os quais podem ser visualizados no detalhe representativo do “zinc finger” abaixo (b). (c) Posição do fator AreA-like (NIT2-like) encontrado no supercontig 6 do genoma do isolado Pb3.

```

>supercont1.6 of Paracoccidioides brasiliensis (Pb03)
Length = 1882476
Score = 471 bits (1212), Expect (2) = e-151
Identities = 290/643 (45%), Positives = 355/643 (55%), Gaps = 38/643 (5%)
Frame = +1

Query: 272   SRKRPAESSPHVFPVSTSMLAHDPDFSHAVPEYTLDTSHGXXXXXXXXXXXXXXXXXHTS 331
           +RKRPAESSP VPPV  ++ DF  + +Y+LD H HTS
Sbjct: 526144 TRKRPAESSPQVFPVNLTIIPNESDFDITGMADYSLDHPHSAYPLSN-----HTS 526290

Query: 332   PNMAFALDTFNLGDDPILPSAGPYQQQFTFSPSESPMTSGNPFANLYAQTPFIASSLNSTD 391
           + L+TF++GDDPIL SAGP+QQ + FSPSESP+ +G PF ++Y+ TP+ SSLNS +
Sbjct: 526291 STVPSNLETFHIGDDPILTSAGPFQQSYFPSPSESPLVITGGPFQSVYSHTPMGSSLSNSAE 526470

Query: 392   FFSPPPSGYQSTASTPQPAYDGEHSKYFD-MPVDARSQRRVVPAYITQRSSNLSASLQPR 450
           F+SPPPSGYQS ASTPQ +D + F+ VD R+ + SN++ S Q R
Sbjct: 526471 FYSPPPSGYQSVASTPQAGFDNDQIMCFEHSTVDQRTHQSTGNFC---GPSNIAGSSQSR 526641

Query: 451   YMYNQGGSSQDITQQNAHMQSSSMQSPGFSIPQH-VDPTQ-----VLNPNFNGNHAA 504
           Y Y T NA G S+ SPGFSIPQ V PT + P N
Sbjct: 526642 YFYRAANE----TPFNAISGIGGSIPSPGFSIPQQRVGPTHFSSGPLSRPLNLPNNEQH 526809

Query: 505   MFSFGADSDVEDDDGNQFSAGGLAMPAEFG--DDSIDMNSN-MAWETSYPNSFQSLPA- 560
           MFSFGADSD E++DGN F + M + DDS D+N+ + WE+ +P F S
Sbjct: 526810 MFSFGADSDNEEEDGNFPDRSMTMQMDCNPIDDSIDLNNPAVQWESHFPECFNSAANN 526989

Query: 561   FAAQHRKHVTIGSADMDTIPSEWNQGGSLGRTHESAASVSEVRNRDQDFRRQKIARTSST 620
           F HR+H+TIG A+M D +W++G SL RTH SA SVSE+RNRDQDFRRQKI RT ST
Sbjct: 526990 FQGHRRRHITIGGAEMADVSRDWRG-SLDRTHGSATS+VSEIRNRDQDFRRQKIPRTIST 527166

Query: 621   PNTAQLLRQSMQNSHTSPNTPPEGLNSAAPSRLPASPGGTKNGEQNG-PXXXXXXX 679
           PNT QLL QSM +Q HT+PN+PP SG +SA+PSRP+SPGG K EQ+G P
Sbjct: 527167 PNTIQLLHQSMNHQP-HTTPNSPPRSGFSSASPSRPSSPGGAKQTEQSGAPTTCTINCFTQ 527343

Query: 680   XXPLWRRNPEGQPCNACGLFLKLHGVRPLSLKTDVIKKRNRNSANSLAVGSS--RVSK 737
           PLWRRNPEGQPCNACGLFLKLHGVRPLSLKTDVIKKRNR S N+L +G S R +K
Sbjct: 527344 TTPLWRRNPEGQPCNACGLFLKLHGVRPLSLKTDVIKKRNRGSCNNLPIGVSAGRSAK 527523

Query: 738   KSARKNSVQQVIPTAPTSSRAQ-----SNTTSESPP--AMPXXXXXXXXXXVXXXXX 786
           K +RKN +QQ T SS+ Q S +S S P V
Sbjct: 527524 KVSARKNFQQSTSIITSMSSKVQGASDPLSSASGLSSASAPGNTSQVFSGFTKSGVVPPIAA 527703

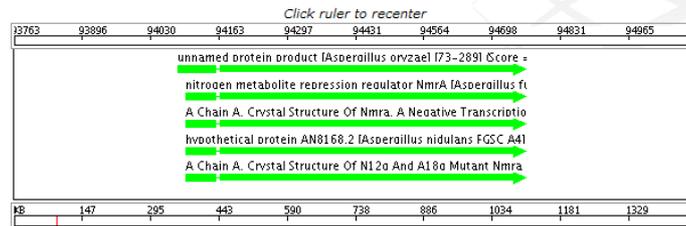
Query: 787   XXXXXXXXXXXXGTNNGCGAVQVAPKRQRLEKA-----SDVDMAEXXXXXXXXXX-- 837
           VQV KR RR EKA + +M +
Sbjct: 527704 APPKPVLTSLAGSLAQVRAPVQVTKRTRRFEKAPSGPQGSQEAEMRDVVDNNDKSSSTPL 527883

Query: 838   --XXXXXXXXXXXXXXXXXNHSIAAG--QGASQEWELTMSL 876
           K +HS+AAG QG SQEWELTMSL
Sbjct: 527884 NRSKPFPTVTTLPPAAENPAHSLAAGSRQGGSQEWELTMSL 528012

```

Figura 19. Sequência do fator AreA-like (NIT2-like) encontrado no supercontig 6 do genoma do isolado Pb3 (PABG\_04266.1). Os retângulos vermelhos indicam os resíduos de cisteína responsáveis por quelar o elemento zinco (Zn). A seta azul indica o resíduo de leucina. A barra indica os 17 resíduos de aminoácidos que formam o “loop” central, este número é extremamente conservado entre os homólogos nos outros organismos.

## Feature Map: Paracoccidioides brasiliensis Pb03 Supercontig 9



```

Score = 221 bits (562), Expect(2) = 2e-61
Identities = 113/191 (59%), Positives = 136/191 (71%), Gaps = 13/191 (6%)
Frame = +1

Query: 38   SLKGLIAEELQAIPNVTLFQGPLLNNVPLMDTLFEGAHLAFINTTSQAGDEIAIGKDLAD 97
           SL+G+IA EL A+PNV+LFQGPLLNN L+ TLFEGA+L      +   +AI  +
Sbjct: 94198 SLEGIASELAALPNVSLFQGPLLNNDKLIATLFEGANLPL*IPRRRPAMRVAIV--VRG 94371

Query: 98   AAKRAGTIQHYYIS--SMPDHSLYG-----PWPAPVPMWAPKFTVENYVRQLGLP 144
           +R      +I      SMPDH+ +                W ++P+W+ KF VENYVRQLGLP
Sbjct: 94372 RMRRCARAP*HIMCIVSMPDHAAHAYGNNGDGNHSQGWISLPLWSCKFAVENYVRQLGLP 94551

Query: 145  STFVYAGIYNNNFTSLPYPLFQMEMLPDGTFEWHAPFDPDIPLPWLDAEHDVGPALLQIF 204
           +TFVYAGIYNNNFTSLPYPLFQME+ +G+FEW APF PDIPLPWLDAEHDVGP+LQIF
Sbjct: 94552 ATFVYAGIYNNNFTSLPYPLFQMELENGSFEWRAPFHPDIPLPWLDAEHDVGP+LQIF 94731

Query: 205  KDGPQKWNGHR 215
           KDGP+KW G R
Sbjct: 94732 KDGPKKWGGRR 94764
    
```

Figura 20. (a) Posição do fator NMR-like encontrado no supercontig 9 do genoma do isolado Pb3. (b) Sequência do fator NMR-like (PABG\_05424.1).

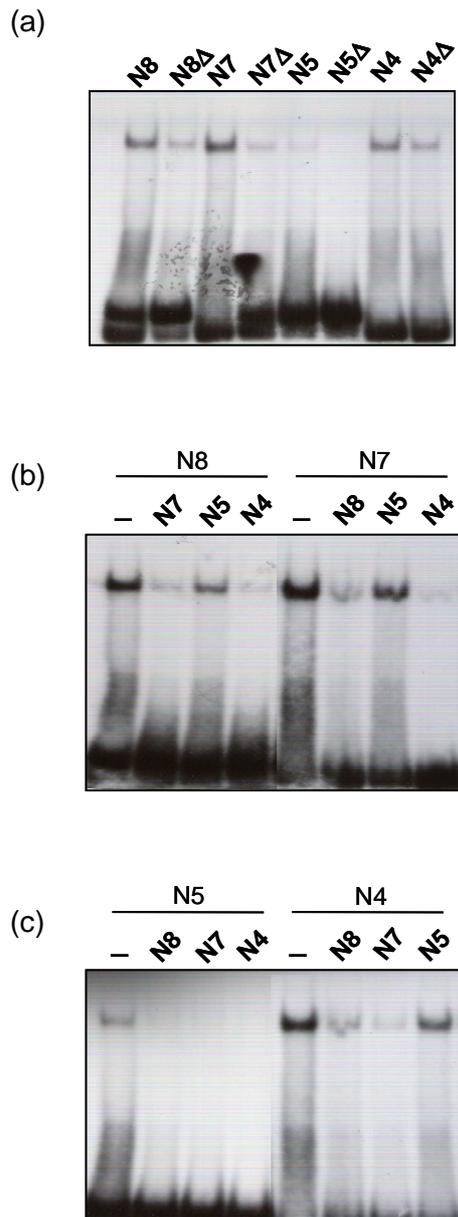


Figura 21. (a) Autorradiograma mostrando os resultados de EMSA com as sondas radioativas indicadas. A notação em triângulo denota as sondas mutadas pontualmente no elemento TATC (GATC). (b) e (c) testes de competição cruzada entre as sondas. Estes EMSAs foram feitos usando extrato de proteínas totais da fase leveduriforme do isolado Pb339 crescido em meio F12/glicose. As sondas não marcadas estavam com 100x de excesso molar. -, sem competidor.

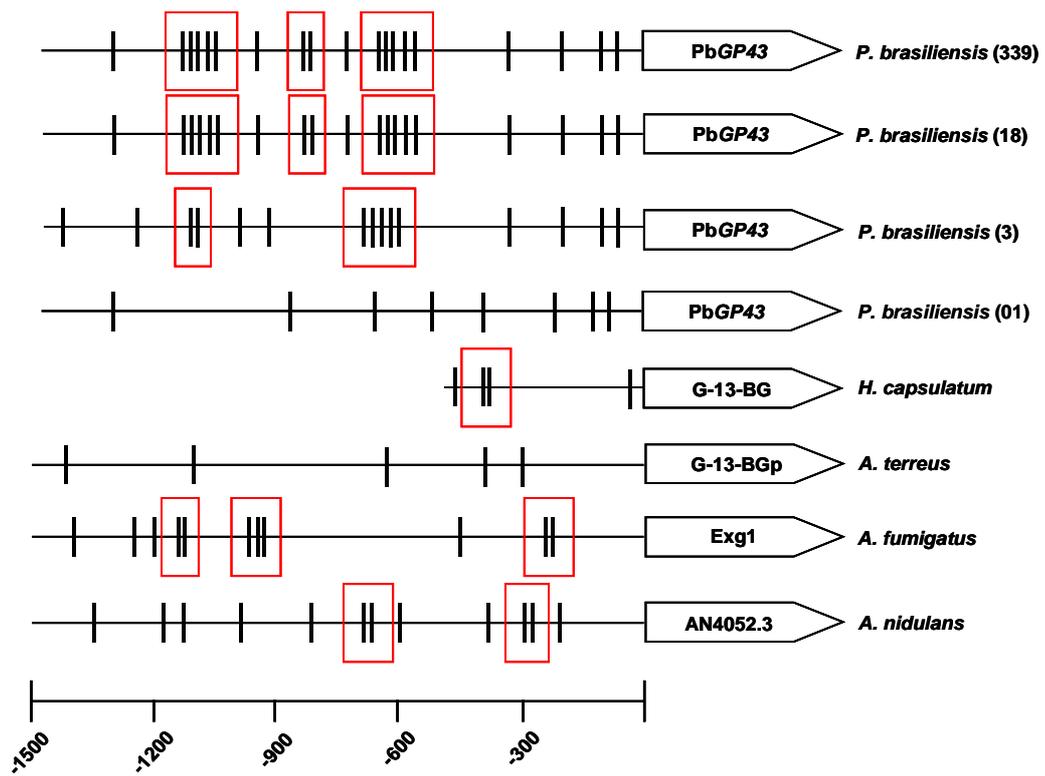


Figura 22. Esquema mostrando a posição de elementos NIT2 putativos na região 5' intergênica do PbGP43 de *P. brasiliensis* e dos homólogos em outros fungos (organismos à direita). As caixas mostram os “clusters” de elementos NIT2 (elementos situados a menos de 40 pb de distância um do outro).

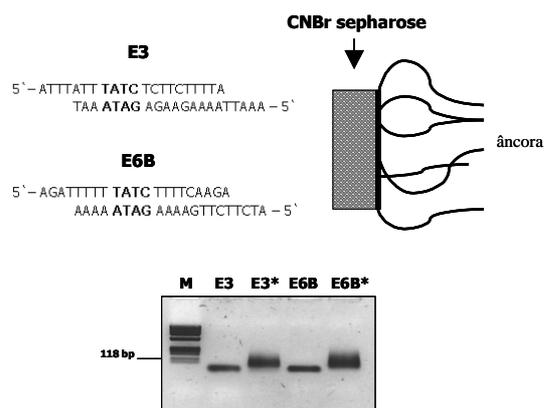
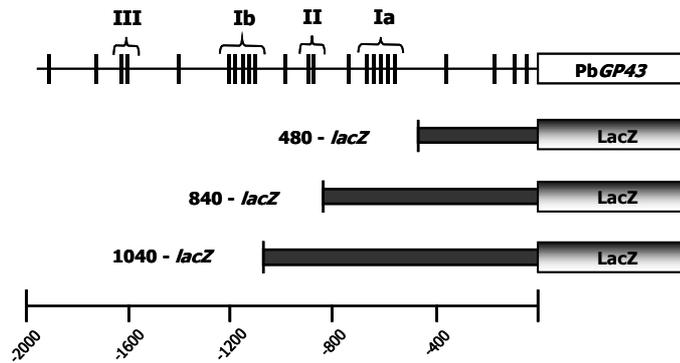
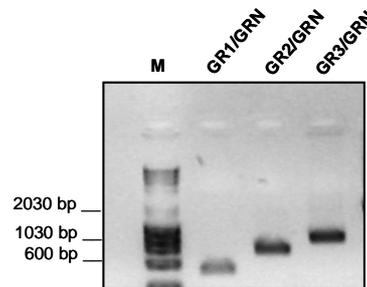


Figura 23. Esquema das colunas de afinidade contendo o DNA em tandem dos oligonucleotídeos N7 e N4. A sequência de cada oligonucleotídeo está indicada. O gel de agarose mostra o aspecto de cada oligonucleotídeo dupla fita com uma única cópia ou ligado em “tandem” (\*). M, marcador de peso molecular. O tamanho de uma das bandas está indicado à esquerda.

(a)



(b)



(c) pAN923-41B digerido com *Bam*HI

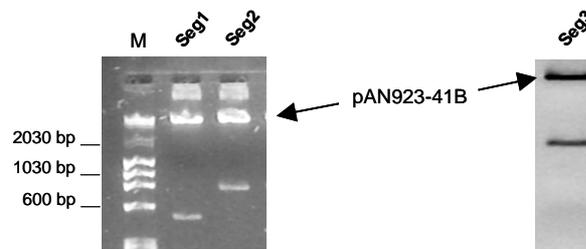


Figura 24. (a) Esquema mostrando o tamanho das construções analisadas nos ensaios de gene repórter. Em (b), gel de agarose mostrando as bandas amplificadas pela reação de PCR usando os pares de oligonucleotídeos indicados. (c) Confirmação da clonagem dos fragmentos mostrados acima em pAN923-41B. M, marcador de peso molecular. O tamanho de algumas bandas está indicado a esquerda.

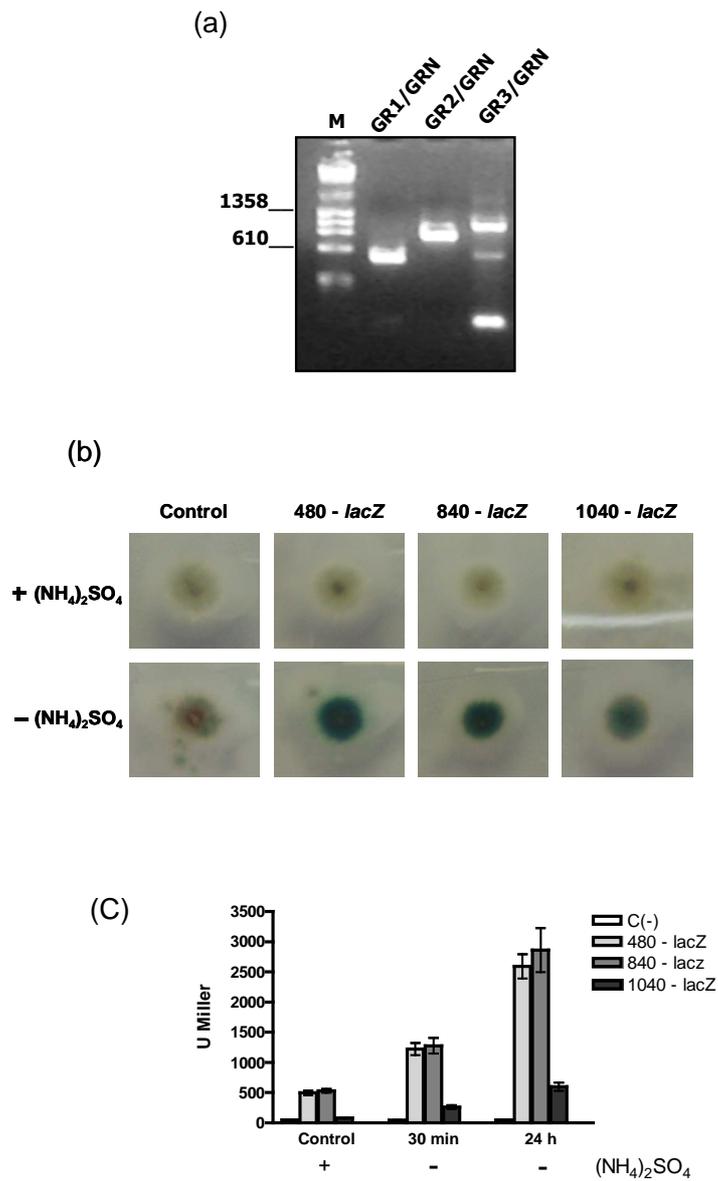


Figura 25. (a) Gel de agarose mostrando as bandas amplificadas na reação de PCR usando os pares de oligonucleotídeos indicados e DNA genômico de colônias transformantes de *A. nidulans* para as construções representadas na figura 24a. (b) Colônias recombinantes carregando cada uma das construções foram crescidas em placas na presença e ausência de sulfato de amônio. Colônias azuis indicam ativação de *lacZ*. (c) Atividade específica de B-galactosidase de cada uma das colônias transformantes crescidas na presença de sulfato de amônio e em seguida depletadas do sal pelos tempos indicados. M, marcador de peso molecular. O tamanho de algumas bandas está indicado a esquerda.

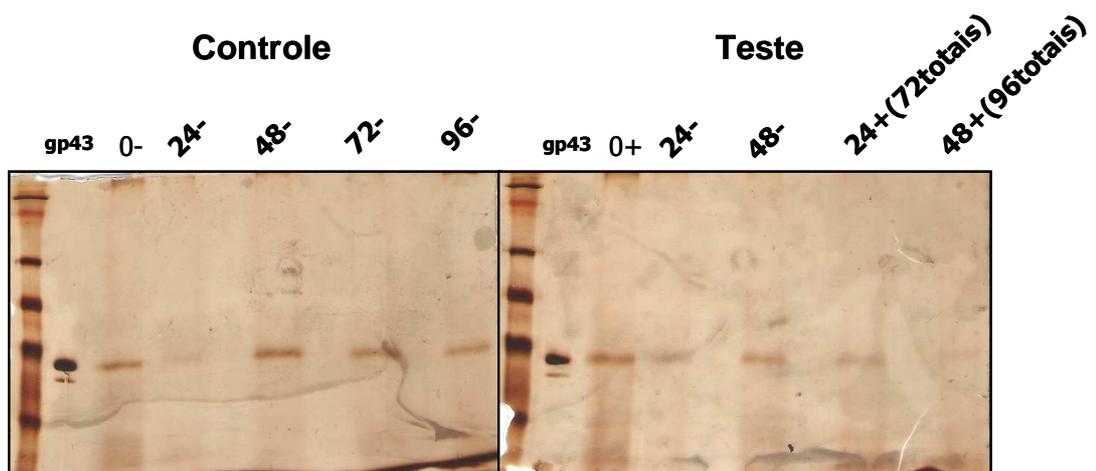
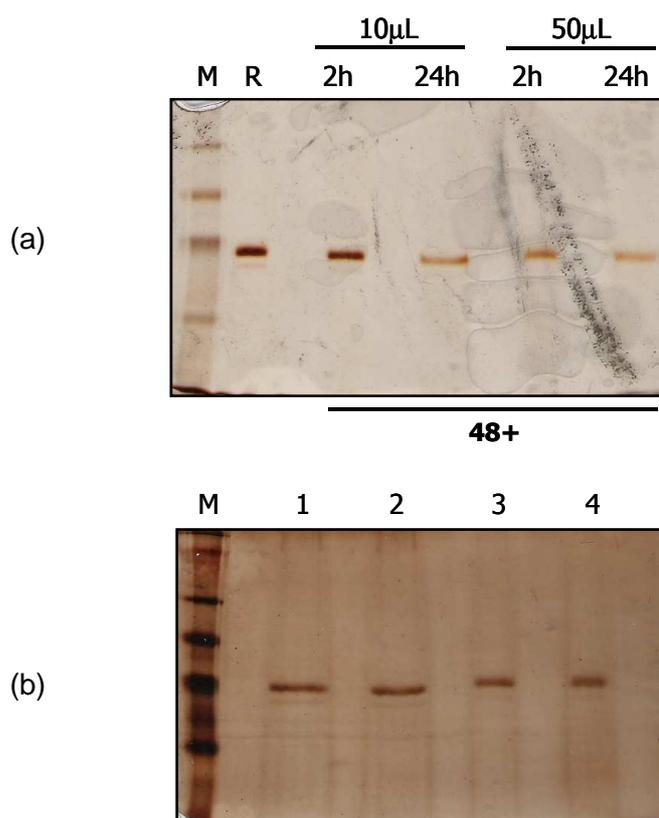


Figura 26. Perfil de sobrenadantes de culturas de leveduras do isolado Pb339 em meio F12/glucose após a adição e retirada de sulfato de amônio 10 mM. Os géis foram corados pela prata. Sinal + indica presença de sulfato de amônio e -, ausência. Controle, cultura sem receber o sulfato de amônio (também foi lavada para a troca de meio nos mesmos pontos que a cultura teste). Teste, cultura que recebeu o sulfato de amônio. 0, ponto zero. gp43, referência (gp43 purificada). Detalhes em Materiais e Métodos.



- 1- gp43 incubada com Sobr. 48h+ congelado e descongelado 5x;
- 2- gp43 incubada com Sobr. 48h+ aquecido 100°C/5 min;
- 3- gp43 incubada com 10 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>;
- 4- gp43 incubada com F12.

Figura 27. (a) Testes de incubação de gp43 purificada com o sobrenadante 48 + (96 horas totais) da cultura teste da figura anterior. Os volumes e o tempo de incubação estão indicados acima. (b) controles para os testes de incubação feitos em a). M, marcador de peso molecular. R, referência (gp43 purificada).

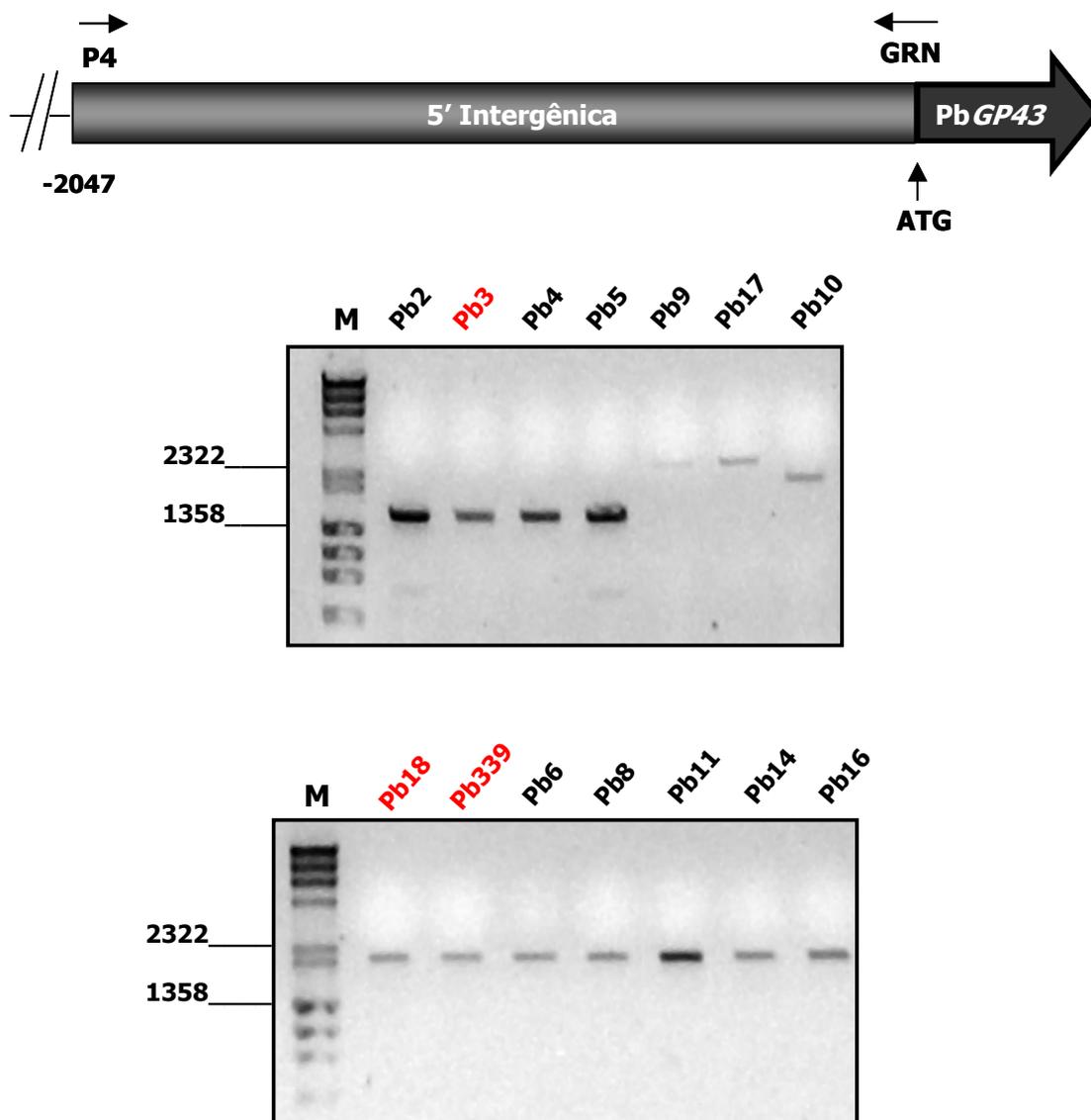


Figura 28. Géis de agarose mostrando os produtos de amplificação por PCR de um fragmento da região intergênica do PbGP43. As reações foram iniciadas com os oligonucleotídeos P4 e GRN, tendo como molde DNA total dos isolados indicados acima. M, marcador molecular, para o qual a dimensão de algumas bandas está à esquerda.

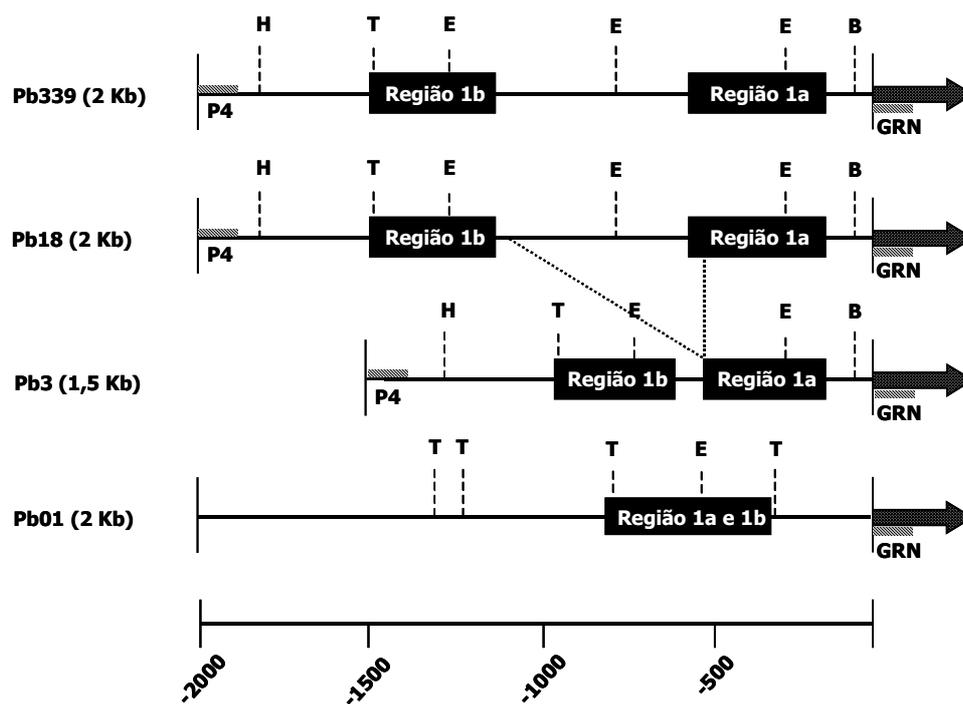


Figura 29. Esquema comparando os produtos de PCR para a região intergênica do PbGP43 do Pb339, Pb18, Pb3 e Pb01, evidenciando as regiões 1a e 1b (~85% idênticas). Sítios para as enzimas de restrição *EcoRI* (E), *HaeIII* (H), *BglII* (B) e *TatI* (T) estão indicados. M, marcador de peso molecular. O tamanho de algumas bandas está indicado à esquerda.



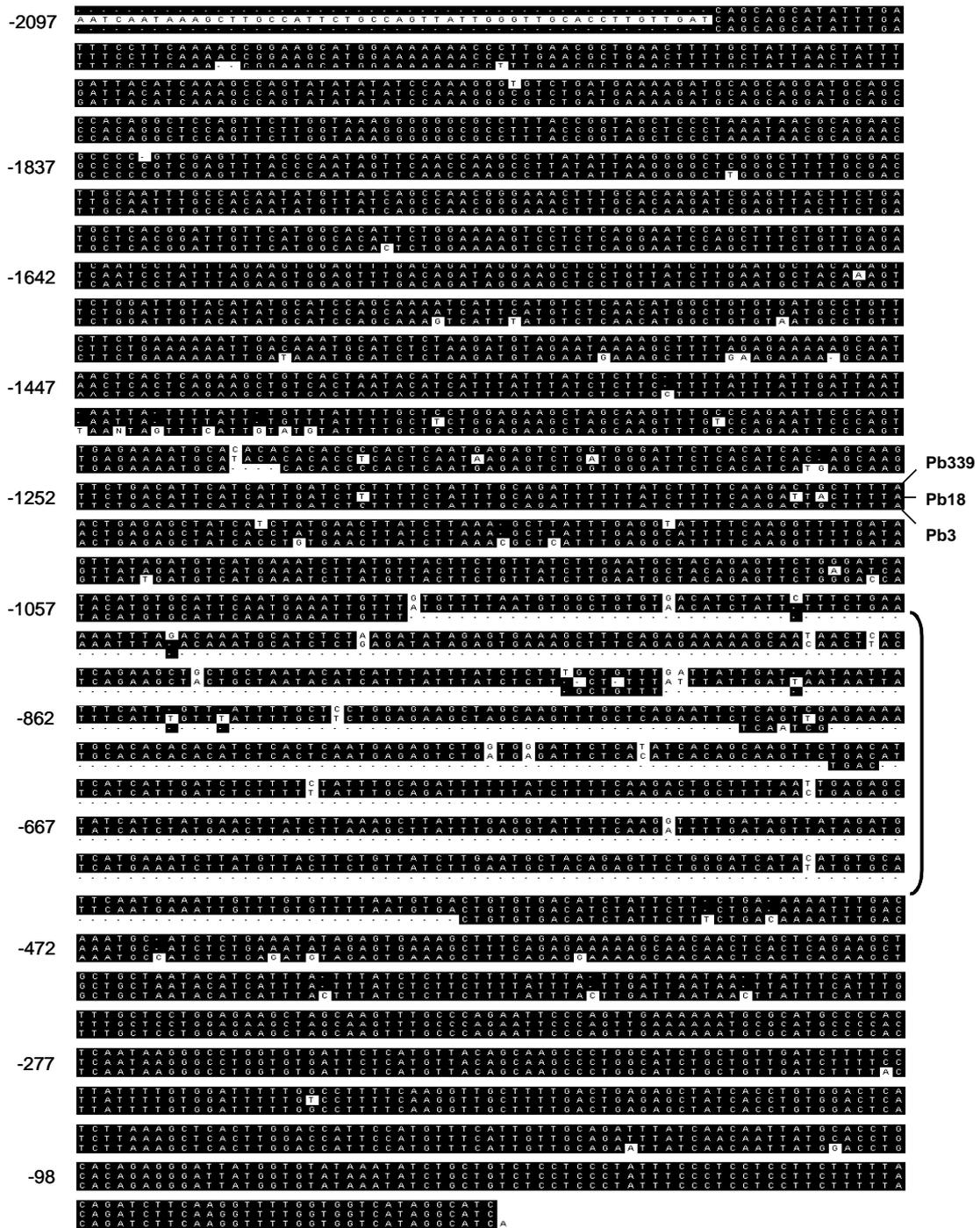


Figura 31. Alinhamento entre as sequências da região 5' intergênica do *PbGP43* dos isolados Pb339 (2047 pb), Pb18 (2097 pb) e Pb3 (1551 pb) representadas na figura 34c. Em preto, nucleotídeos idênticos. O “gap” presente no isolado Pb3 (500 pb) está em marcada com um colchete.

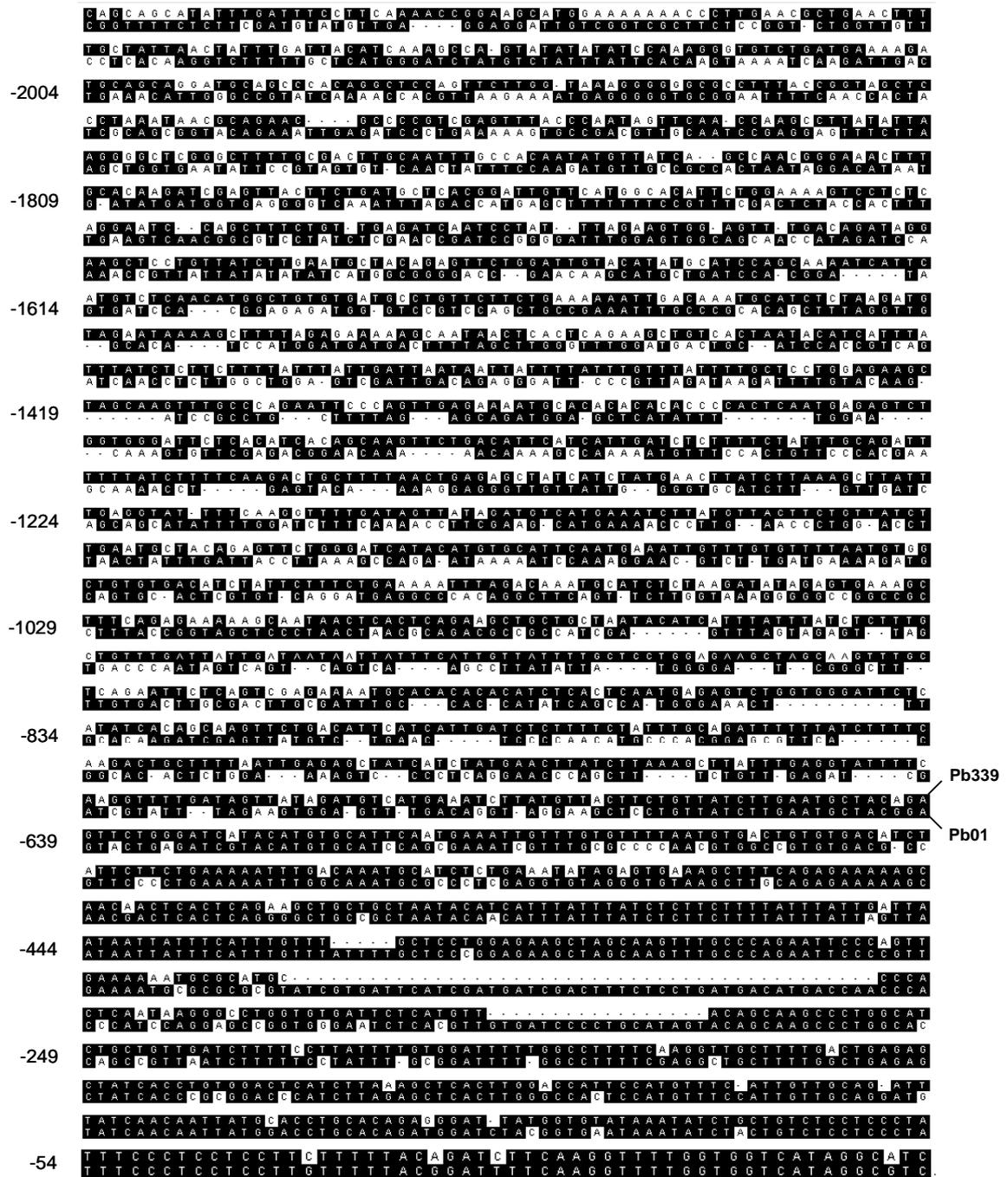
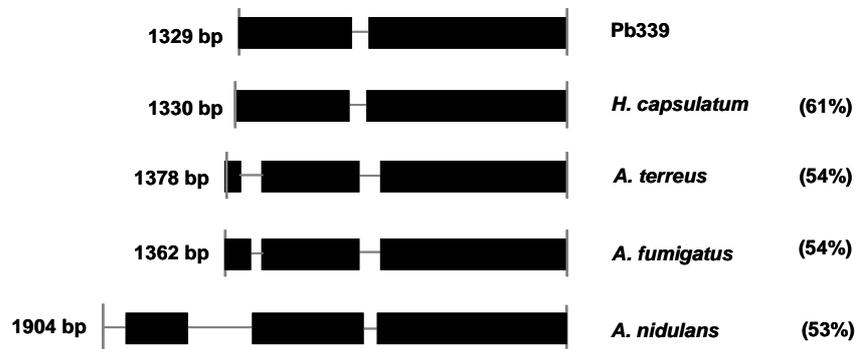


Figura 32. Alinhamento entre as sequências da região 5' intergênica do PbGP43 dos isolados Pb339 e Pb01. Em preto, nucleotídeos idênticos.

(a)



(b)

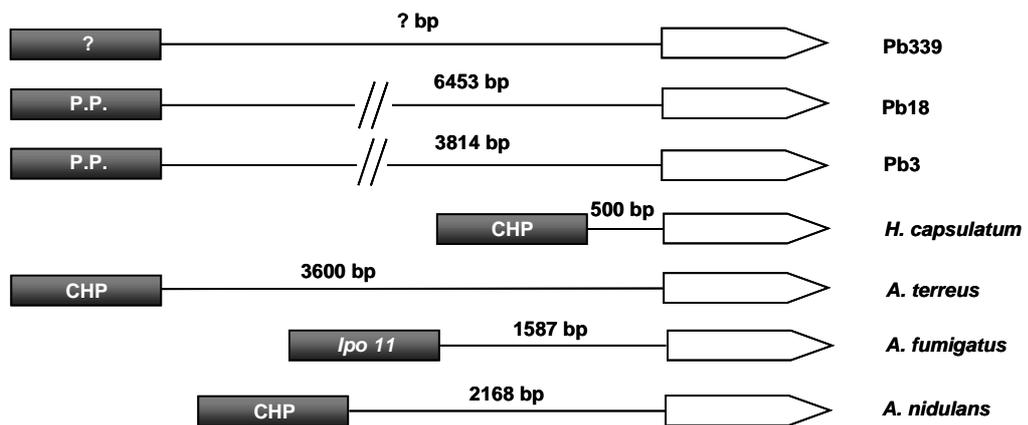
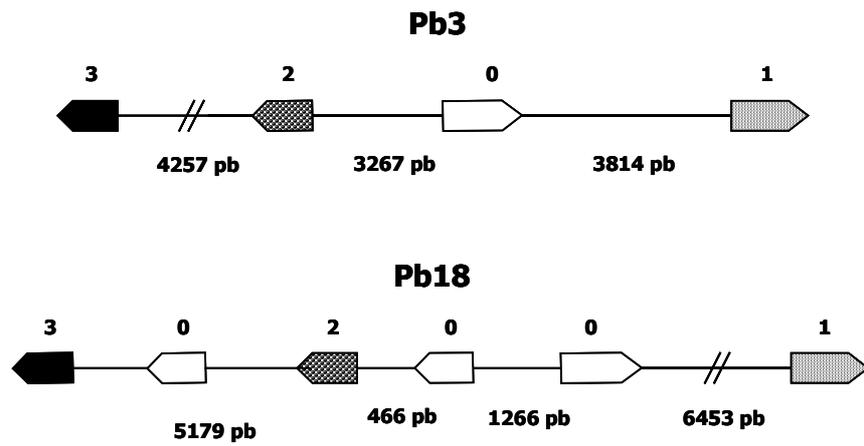


Figura 33. (a) Esquema de comparação entre genes homólogos ao PbGP43, exo- $\beta$ -1,3-glucanases, encontrados nos fungos indicados à direita (identidade de aminoácidos em parêntesis). As ORFs estão representadas por retângulos e os introns por linhas. O tamanho dos genes entre o codon inicial e final estão indicados em bp. (b) Esquema comparando a região 5' intergênica do PbGP43 e dos genes homólogos nos fungos indicados. Em cinza estão indicadas proteínas codificadas pelos genes vizinhos. CHP, conserved hypthetical protein. P.P., predicted protein. Número de acesso ao GenBank dos genes homólogos ao PbGP43: PADG\_07615.1 (Pb18), PABG\_06340.1 (Pb3), HCAG\_04584.1 (*H. capsulatum*), ATEG\_03849.1 (*A. terreus*), Afu1g03600 (*A. fumigatus*) e AN4052.3 (*A. nidulans*).



**Gene 0 – “Predicted Protein”**

**Gene 1 – *PbGP43***

**Gene 2 – succinato desidrogenase**

**Gene 3 – proteína GPI ancorada**

Figura 34. Esquema comparando a distância e os genes localizados a montante do *PbGP43* nos isolados Pb3 e Pb18. Abaixo estão indicados os genes.

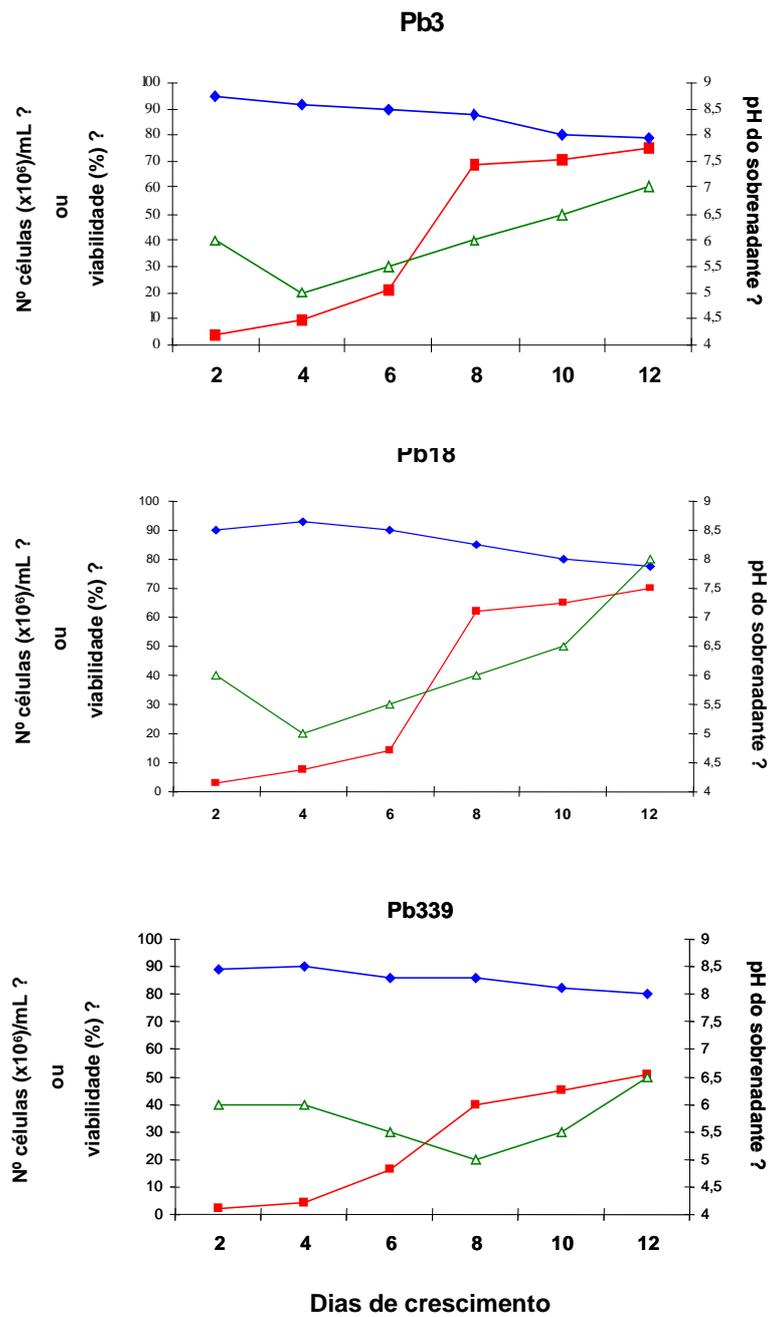


Figura 35. Curvas de crescimento de leveduras dos isolados Pb3, Pb18 e Pb339 (indicados) em meio F12/glicose. Cada gráfico mostra o número (em milhões) e a viabilidade (%) das células em função do tempo de crescimento, além do pH do meio de cultura. O pH inicial do meio F12/glicose é 6,5.

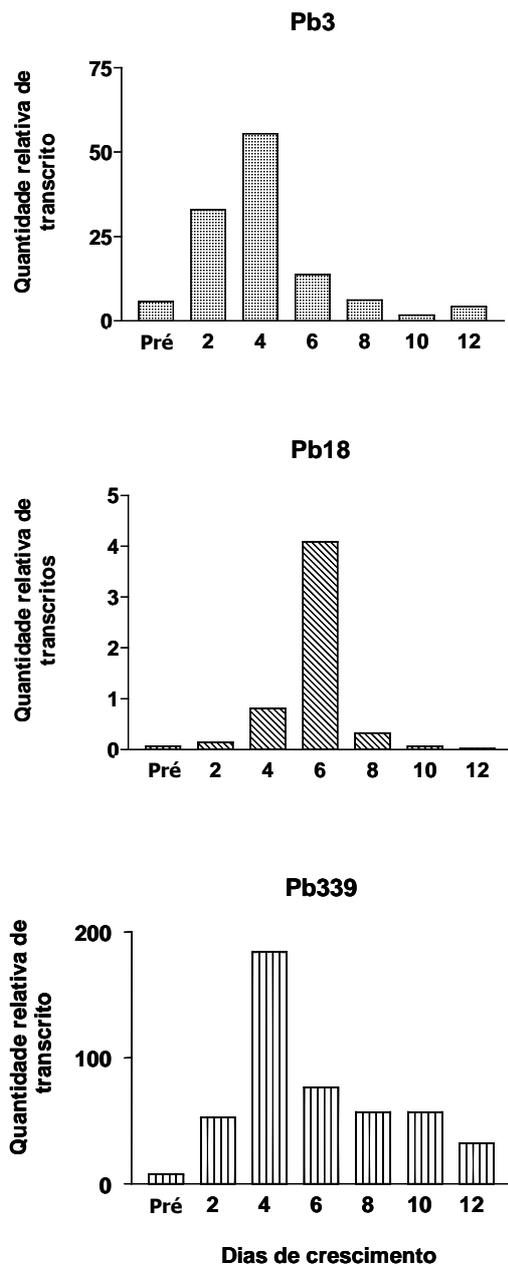


Figura 36. Ensaio de RT-PCR quantitativo em tempo real do gene *PbGP43* com células leveduriformes dos isolados Pb3, Pb18 e Pb339 (indicados) de *P. brasiliensis* durante o crescimento em meio F12/glicose. As colunas mostram a quantidade de transcritos do gene *PbGP43* relativa ao gene de referência da  $\alpha$ -tubulina. Pré, análise relativa às células do pré-inóculo.

### PbGP43 - Estímulo com 2% SFB

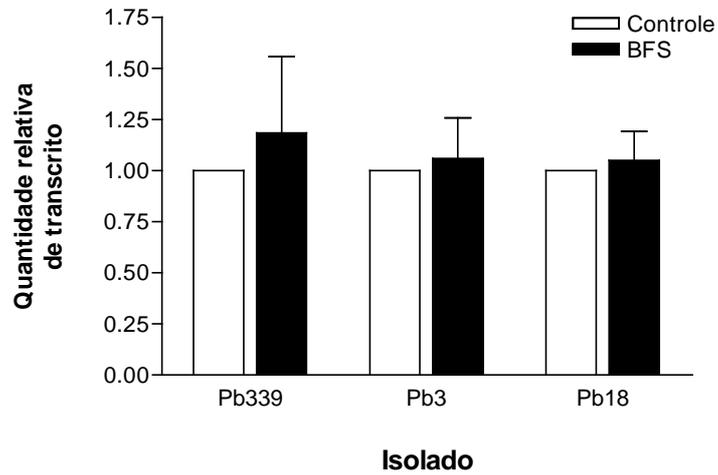


Figura 37. Ensaios de RT-PCR em tempo real do gene *PbGP43* com células leveduriformes dos isolados Pb3, Pb18 e Pb339 (indicados) de *P. brasiliensis*. Culturas crescidas em meio F12/glicose (Controle) foram estimuladas por 30 min com 2% de soro fetal bovino (SFB). As colunas mostram a quantidade de transcritos do gene *PbGP43* relativa ao gene de referência da  $\alpha$ -tubulina.

### PbGP43 - Estímulo com 3% glucose

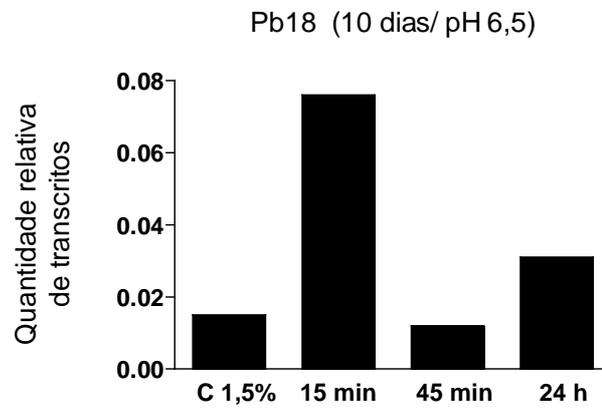


Figura 38. Ensaio de RT-PCR em tempo real do gene *PbGP43* em células leveduriformes do isolado Pb18 de *P. brasiliensis* durante a indução com 3% de glicose de uma cultura de 10 dias (10d) em F12/glicose (C 1,5%). As colunas mostram a quantidade de transcritos do gene *PbGP43* relativa ao gene de referência da  $\alpha$ -tubulina em alíquotas coletadas nos tempos indicados. O pH do sobrenadante do controle está indicado entre parênteses.

## PbGP43 - Estímulo com glicose

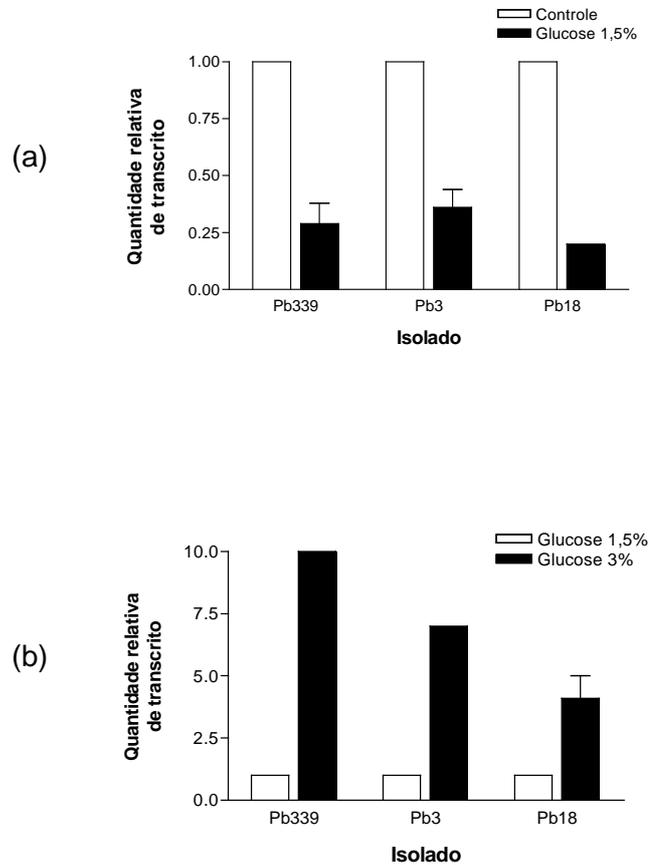


Figura 39. Ensaios de RT-PCR em tempo real do gene *PbGP43* em células leveduriformes dos isolados Pb3, Pb18 e Pb339 (indicados) de *P. brasiliensis*. Culturas crescidas em meio F12 (C 0,18%) foram estimuladas durante 30 min com 1,5 % de glicose (a) ou culturas crescidas em meio F12/glicose foram estimuladas com 3 % de glicose (b). As colunas mostram a quantidade de transcritos do gene *PbGP43* relativa ao gene de referência da  $\alpha$ -tubulina.

## PbGP43 – Efeito da privação de glucose

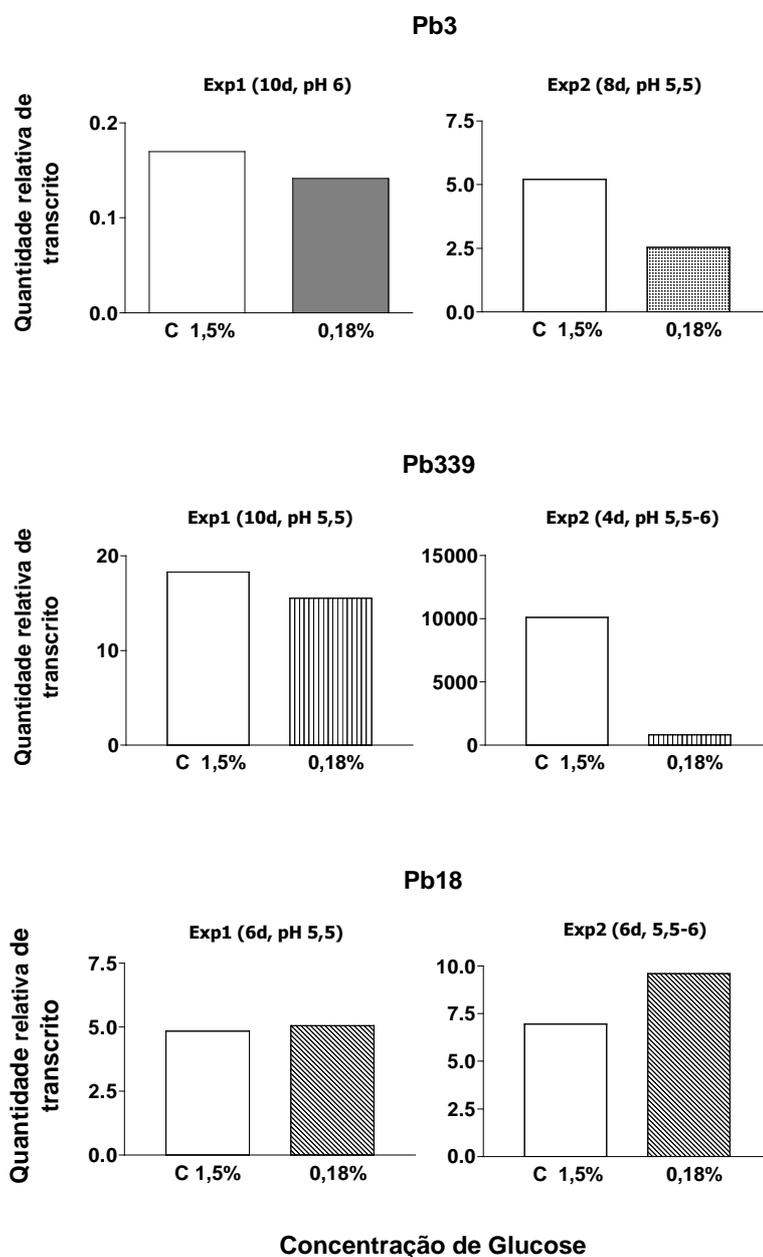


Figura 40. Ensaio de RT-PCR em tempo real do gene *PbGP43* em leveduras dos isolados Pb3, Pb18 e Pb339 (indicados) de *P. brasiliensis* para averiguar o efeito da diminuição para 0,18% de glucose no meio F12/glicose (C 1,5%). As colunas mostram a quantidade de transcritos do gene *PbGP43* relativa ao gene de referência da  $\alpha$ -tubulina. O tempo de crescimento das células controles (C 1,5%) está indicado em dias (d). Exp, experimento. O pH do sobrenadante no momento do estímulo está indicado entre parênteses.

# 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](#)