

Leticia Araujo Menezes Sant'Ana

**Análise estrutural e funcional da região promotora
do gene quitina sintase 4 de *Paracoccidioides
brasiliensis*.**

Brasília, 2008

Leticia Araujo Menezes Sant'Ana

**Análise estrutural e funcional da região promotora
do gene quitina sintase 4 de *Paracoccidioides
brasiliensis*.**

Dissertação apresentada ao Departamento
de Patologia Molecular da Faculdade de
Medicina da Universidade de Brasília,
como requisito parcial à obtenção do grau
de mestre em Patologia Molecular.

Orientadora: Prof. Dra. Ildinete Silva Pereira
Co-Orientador: Prof. Dr. Marcio José Poças Fonseca

Brasília, 2008

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular, da Universidade de Brasília, sob orientação da Prof. Dra. Ildinete Silva Pereira e co-orientação do Prof. Dr. Marcio José Poças Fonseca.

Banca Examinadora:

Dra. Janice Lisboa de Marco

Faculdade de Ciências da Saúde - Ceilândia

Universidade de Brasília

Dr. Túlio César Ferreira

Pesquisador do Laboratório de Biologia Molecular

Universidade de Brasília

Dra. Ildinete Silva Pereira

Departamento de Biologia Celular – IB

Universidade de Brasília

Dr. Marcio José Poças Fonseca

Departamento de Biologia Celular – IB

Universidade de Brasília

Dr. Marcelo de Macedo Brígido (Suplente)

Departamento de Biologia Celular

Universidade de Brasília

Dedico este trabalho aos meus pais, Guilherme e Vânia, e aos meus irmãos, por tudo o que fizeram e ainda fazem por mim e pelo apoio à minha longa jornada de estudante. À essa querida família meu eterno amor e gratidão. Dedico também àquele que iluminou meus dias nublados e me permitiu chegar até aqui, ao Tiago pelo amor e encorajamento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos Drs. Túlio, Janice e Marcelo, pelo aceite em compor minha banca e pelo tempo dispensado à leitura e correção do meu trabalho.

Aos queridos orientadores, Ildinete e Marcio pelos ensinamentos, dedicação, e compreensão, permitindo-me superar todas as dificuldades. Meus eternos agradecimentos por esta experiência.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos os professores do Laboratório de Biologia Molecular, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos colegas do Lab. 3 que sempre estiveram dispostos a ajudar, e pelas longas conversas nas horas de espera, tornando assim o trabalho mais prazeroso. Em especial à Dani, e à Luana, que me ajudaram muito na fase mais difícil. À Calliandra pela ajuda na língua inglesa e suprimentos... Ao Thiago, Lorena e Marciano, pelos conhecimentos transmitidos. À vocês a àqueles que eu não citei o nome, que participaram do trabalho no Lab 3 durante estes 2 anos, obrigada pelo carinho e amizade!

À Fátima e D. Ivanilde pela dedicação ao trabalho que fazem, essencial ao funcionamento do laboratório.

Aos meus pais, Vânia, Guilherme, por serem exemplos de dedicação e amor. Por me permitir voar até onde minhas asas alcançassem. Aos meus irmãos Vanessa, Priscila, Henrique e Rafael, pelo apoio e carinho. A essas pessoas queridas, agradeço por terem tornado a saudade menos dolorida, fazendo-me perceber que não há distância que separe uma família. Aos meus cunhados e sobrinhas, que tornaram minha família maior, mais alegre e muito barulhenta!

Ao Tiago pelo amor, carinho e dedicação que recebo diariamente. Muito obrigada pelas palavras de estima e encorajamento. Por me fazer acreditar, quando as dificuldades me faziam desistir. Aos sogros e cunhados pelo apoio durante todos esses anos.

À minha avó, Zenir, pelo apoio e moradia durante a minha formação. Ao meu tio Bira, que sempre me deu forças nos momentos difíceis e também por sua presença nos momentos alegres. À minha avó Denise e meus tios Gui, Gláucia e Gerson, por me lembrarem que a família está constantemente por perto.

A todos os meus amigos, de longe e de perto, que estiveram torcendo por mim. Muito obrigada!

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
RESUMO	XII
ABSTRACT	XIII
INTRODUÇÃO.....	1
1. <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e Paracoccidioidomocose	1
2. Fatores de Virulência.....	3
3. Parede celular – Quitina sintase.....	5
4. Regulação da Expressão de Genes	7
5. Métodos de análise da regulação da expressão gênica	10
OBJETIVO	14
MATERIAIS	15
1. Células.....	15
2. Meios de Cultura.....	16
3. Antibióticos	19
4. Soluções de Suplementos	20
5. Soluções Tampão utilizadas para Transformação de <i>Aspergillus nidulans</i>	21
6. Soluções para preparação do Extrato Protéico de <i>P. brasiliensis</i>	22
7. Soluções utilizadas no Ensaio de Retardo de Mobilidade Eletroforética.....	23
8. Soluções utilizadas para eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante – SDS-PAGE	24
9. Soluções utilizadas para extração de DNA cromossomal de <i>A. nidulans</i>	25

10. Soluções utilizadas para teste em placa da atividade de β -galactosidase.....	26
MÉTODOS.....	27
1. Cultivo do fungo <i>A. nidulans</i>	27
2. Preparação de células de <i>Escherichia coli</i> termo-competentes	27
3. Transformação de <i>E. coli</i>	27
4. Preparação de plasmídeos em larga escala	28
5. Digestão do DNA plasmidial.....	28
6. Preparação de protoplastos e transformação genética de <i>A. nidulans</i>	29
7. Ensaio de Estabilidade Mitótica	30
8. Cultivo do Fungo <i>P. brasiliensis</i> nas formas de micélio e de levedura para obtenção do extrato protéico	30
9. Preparação do extrato protéico	31
10. Desenho dos oligonucleotídeos utilizados como sonda no ensaio de retardo de mobilidade eletroforética.....	31
11. Ensaio de retardo de mobilidade eletroforética (EMSA)	32
RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
1. Análise da construção molecular contendo o gene repórter <i>lacZ</i> de <i>E. coli</i> sob controle da seqüência promotora do gene <i>CHS4</i> de <i>P. brasiliensis</i>	35
2. Análise funcional da seqüência promotora do gene <i>CHS4</i> de <i>P. brasiliensis</i> em <i>Aspergillus nidulans</i>	36
3. Análise estrutural da seqüência promotora do gene <i>CHS4</i>	44
CONCLUSÃO.....	49
PERSPECTIVAS	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 - Caracterização das seqüências descritas pela análise do transcriptoma de <i>P. brasiliensis</i>	4
Figura 2 – Etapas de controle da expressão de gene eucariótico.....	7
Figura 3 – Estrutura típica de um promotor eucariótico..	8
Figura 4 – Conformação <i>head-to-head</i> dos genes <i>CsmA</i> e <i>CsmB</i> de <i>A. nidulans</i>	10
Figura 5 – Árvore filogenética do filo Ascomycota.....	12
Figura 6 – Mapa de restrição dos vetores da série pAN 923	16
Figura 7 – Confirmação da construção molecular 42B- <i>PbrCHS4</i>	35
Figura 8– Fotomicrografia de células de <i>A. nidulans</i> durante o processo de protoplastização.	36
Figura 9 – Confirmação da presença da construção molecular 42B- <i>PbrCHS4</i> em transformantes de <i>A. nidulans</i>	37
Figura 10 – Seqüência nucleotídica da região promotora do gene <i>CHS4</i> destacando os motivos para ligação para fatores de transcrição encontrados por análise <i>in silico</i> . ..	38
Figura 11 – Produção de β -Gal pela linhagem <i>argB</i> ⁻ transformada com a construção molecular 42B- <i>PbrCHS4</i>	39
Figura 12 – Produção de β -Gal pela linhagem <i>argB</i> ⁻ transformada com a construção molecular 42B- <i>PbrCHS4</i>	40
Figura 13 – Via da biossíntese de UDP-N-acetilglicosamina.	41
Figura 14 – Oligonucleotídeo utilizado como sonda para experimentos de retardo de mobilidade eletroforética.....	44
Figura 15 – Perfil eletroforético em SDS-PAGE (12%) das proteínas obtidas a partir da lise celular do fungo <i>P. brasiliensis</i>	45
Figura 16 – Ensaio de Retardo de Mobilidade Eletroforética	46
Figura 17 –Ensaio de Retardo de Mobilidade Eletroforética.....	47
Tabela 1. Dados gerais dos oligonucleotídeos sintetizados. Em destaque, a seqüência do elemento de resposta analisado.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosina trifosfato
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
C-terminal	Extremidade carbóxi-terminal
DEAE	Dietilaminoetil
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ERN	Espécie reativa a nitrogênio
ERO	Espécie reativa a oxigênio
EST	Pequena seqüência expressa
FAM	Fluoróforo carboxifluoresceína
g	Grama
<i>g</i>	gravidade
GlcN	Glicosamina
GlcNAc	N-acetilglicosamina
h	Hora
HSE	Elemento de choque térmico
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
kb	Quilobase
KDa	Quilodalton

L	Litro
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
PABA	Ácido paraminobenzóico
PbAEST	Conjunto de pequenas sequencias expressas de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
pb	Pares de base
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial hidrogeniônico
PIC	Complexo de pré iniciação
PKC	Proteína C quinase
PMSF	Fluoreto fenil metil sulfonil
p/v	Peso/volume
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RNA	Ácido ribonucléico
RNAPII	RNA polimerase II
RNase	Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto

STRE	Elemento de resposta a estresse
TAF	Fator associado ao TATA
TBP	Proteína de ligação ao TATA
TE	Tampão Tris-EDTA
TEB	Tampão Tris-EDTA-borato
TEMED	N,N,N', N'-tetrametil etilenodimetilamina
U	Unidade enzimática
V	Volts
v/v	Volume/volume
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo
μ g	Micrograma
μ m	Micrômetro
$^{\circ}$ C	Graus Celsius
1X	Concentração para uso
10X	Dez vezes concentrado
50X	Cinquenta vezes concentrado
100X	Cem vezes concentrado

RESUMO

O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da paracoccidioidomicose, a micose sistêmica com maior prevalência na América Latina. A patogenia deste fungo parece estar diretamente ligada ao processo dimórfico. A expressão diferencial de genes é essencial em diversos processos biológicos como resposta ao estresse, diferenciação celular, interação hospedeiro-patógeno, entre outros. *P. brasiliensis*, é capaz de sobreviver e se replicar no interior dos macrófagos do hospedeiro. Nesse sentido, genes ortólogos a potenciais fatores de virulência de outros microrganismos patogênicos são encontrados em *P. brasiliensis*. Nesse contexto, esse trabalho analisa a regulação do gene quitina sintase 4 (*CHS4*), responsável pela polimerização da quitina, um polímero que atua na biosíntese da parede celular. Visando a análise da função promotora do gene *CHS4*, um fragmento de DNA contendo a região promotora deste gene foi clonado e transformado em *A. nidulans* utilizando o gene repórter *lacZ*. Os transformantes foram cultivados em meios contendo diferentes fontes de carbono. Os resultados sugerem que o precursor de quitina, N-acetilglicosamina, ativa o promotor de *CHS4*. Também foi realizada uma busca por regiões consenso a sítios de ligação para fatores de transcrição. Foram encontrados vários sítios para fatores de transcrição diversos e selecionado uma região que continha um elemento consenso ao sítio de ligação a PacC e dois sítios consenso para STRE. Para essa região foi sintetizado um oligonucleotídeo utilizado como sonda para o experimento de retardo de mobilidade eletroforética (EMSA). Os resultados do EMSA sugerem uma interação DNA-proteína específica em ambas as fases e outra interação micélio específica. Esses resultados nos mostram que a região utilizada como sonda pode estar atuando na regulação transcricional do gene *CHS4*, mas ainda são dados insuficientes para determinar qual proteína está interagindo com a região promotora deste gene.

ABSTRACT

The fungus *Paracoccidioides brasiliensis* is the etiological agent of the paracoccidioidomycosis, the major systematic mycosis prevalent in Latin America. This fungus is able to survive and replicate in the interior of the host macrophages, and its pathogenesis seems to be directly correlated with its dimorphism for which differential gene expression is essential. The differential gene expression is also crucial in different biological processes such as stress-response, cellular differentiation, host-pathogen interactions, and others. Furthermore, orthologs genes to potential virulence factors in other pathological microorganisms are found in *P. brasiliensis*. In this context, this work analyses the regulation of chitin synthase 4 (*CHS4*), responsible for the polymerization of chitin - a polymer which acts in the biosynthesis of the cellular wall. In the attempt to analyse the promoter function of the *CHS4* gene, a DNA fragment containing the promoter region of this gene was cloned and transformed in *Aspergillus nidulans*, using *lacZ* as the gene reporter. The transformants were cultivated in broth containing different sources of carbon. The results from these experiments suggest that the chitin precursor, N-acetylglucosamine, activates the promoter of *CHS4* gene. A search for consensus regions to transcriptional factors' binding sites was also performed and assorted sites for diverse transcriptional factors were found. A region which contained a consensus element to the binding site of PacC and two consensus sites for STRE was selected for further investigation. An oligonucleotide, for this region, was synthesized to be used as a probe for the electro mobility shift assay (EMSA). The results suggest two specific protein-DNA interactions, one in both phases and another peculiar to the mycelium phase. This would suggest the region used as a probe may act in the transcriptional regulation of the *CHS4* gene; nevertheless the results so far are insufficient to determine which protein is interacting with the promoter region.

INTRODUÇÃO

1. *Paracoccidioides brasiliensis* e Paracoccidioidomicose

Os fungos constituem um complexo e fascinante grupo de organismos, tão grande que se calcula entre 100 a 300 mil espécies, vivendo nos mais variados ambientes. Dentre estes, apenas aproximadamente 100 espécies são patogênicas aos mamíferos (Guzmán, 2003). Ao contrário de *Histoplasma capsulatum* e *Blastomyces dermatitidis* que possuem um microhabitat bem conhecido, o habitat de *Paracoccidioides brasiliensis* ainda não está bem elucidado (Marques, 2003). Os fungos de importância médica reconhecidos como fungos dimórficos são *H. capsulatum*, *B. dermatitidis*, *P. brasiliensis*, *Coccidioides immitis* e *Coccidioides posadasii*, *Sporothrix schenckii* e *Penicillium marneffeii*, sendo seu dimorfismo controlado pela temperatura e cada forma com estilo de vida completamente distinto (Rappleye e Goldman, 2006). O fungo dimórfico *P. brasiliensis* é o modelo biológico de estudo neste presente trabalho.

Descrito por Adolfo Lutz em 1908, *P. brasiliensis* inicialmente foi classificado como um deuteromiceto por não ter sido observado uma fase sexual em seu ciclo de vida. Após estudos comparativos de seqüências de RNAs ribossomais 18S, foi incluído no grupo dos ascomicetos (revisado por Silva Júnior, 2000), tendo sido classificado como um provável membro da ordem Onygenales juntamente com *H. capsulatum* e *B. dermatitidis* (Guarro *et al.*, 1999). *P. brasiliensis* é um fungo termo-dimórfico apresentando-se no hospedeiro, ou *in vitro* a 37°C, na forma de levedura enquanto a forma de micélio é observada à temperatura ambiente, ou *in vitro* a 26°C (San-Blas e Niño-Vega, 2001).

Ambas as formas apresentam células multinucleadas. A hifa de *P. brasiliensis* possui poro septal e uma bicamada de parede celular (San-Blas, 1993). A parede celular do micélio possui espessura variando de 80 a 150 nm, é formada por uma camada externa eletro-densa constituída por β -1,3-glucana, e uma camada interna espessa constituída por fibrilas de quitina. A forma de levedura também possui duas camadas mais espessas, de 200 – 600 nm, sendo a camada externa formada basicamente por α -1,3-glucana e a interna formada por quitina (Queiroz-Telles, 1994)

P. brasiliensis é o agente etiológico da paracoccidiodomicose (PCM), a mais prevalente micose sistêmica na América do Sul. De acordo com Coutinho *et al.* (2002), o Brasil é a maior área endêmica da PCM no mundo, atingindo particularmente os trabalhadores rurais, com uma média anual de 198,81 mortes no período de 1980 a 1995. Por esse fato, a PCM destacou-se como a oitava causa de morte mais comum entre as infecções crônicas e doenças parasitárias. Ainda segundo Coutinho *et al.* (2002), a PCM atinge predominantemente homens, em uma taxa de 562 para 100 mulheres com idade acima de 15 anos. Sugere-se que esta maior incidência em homens possa ser atribuída às diferenças hormonais. Neste sentido, vale ressaltar os resultados de experimentos onde foi observado que o hormônio feminino estrogênio inibe a transição dimórfica *in vitro* (Restrepo *et al.*, 1984) e *in vivo* (Aristizabal *et al.*, 1998). Por muito tempo achou-se que o homem era o único hospedeiro de *P. brasiliensis*, até que Naif *et al.* (1986) isolaram o fungo de vísceras de tatu (*Dasypus novemcinctus*) e em 2004 foi relatado um caso de infecção em um cão adulto com lesões características da manifestação clínica da PCM (Ricci *et al.*, 2004).

Muitos indivíduos são resistentes ao *P. brasiliensis* e desenvolvem uma infecção assintomática enquanto outros são altamente suscetíveis, desenvolvendo a PCM que pode apresentar-se como forma aguda, comprometendo o sistema retículo-endotelial, ou como forma crônica que afeta principalmente homens adultos com uma alta frequência de complicação pulmonar e/ou mucocutânea (Borges-Walmsley *et al.*, 2002, revisado por Felipe *et al.*, 2005). Estudos histológicos mostram que os conídeos convertem-se a forma de levedura nos pulmões do hospedeiro sendo os neutrófilos polimorfonucleares e macrófagos residentes incapazes de matar o fungo *in vitro* (McEwen *et al.*, 1987). Brummer *et al.* (1989) observaram que macrófagos residentes são permissivos à multiplicação intracelular de *P. brasiliensis* fagocitado, principalmente os macrófagos peritoneais, enquanto os macrófagos ativados são fungicidas a esse patógeno.

A patogenia parece estar intimamente ligada à morfogênese devido ao fato de que linhagens de *P. brasiliensis*, e também de outros fungos patogênicos como *H. capsulatum* e *B. dermatitidis*, incapazes de realizar a transição dimórfica, não serem virulentas (San-Blas e Niño-Vega, 2001; revisado por Klein e Tebbets, 2007).

A expressão diferencial de genes é essencial em diversos processos biológicos tais como: ciclo celular; resposta ao estresse; diferenciação celular; interação hospedeiro-

patógeno; transição dimórfica, entre outros. A habilidade de *P. brasiliensis* iniciar a infecção, invadir o tecido do hospedeiro e sobreviver perante suas defesas está ligada à indução de genes específicos, que tornam possível sua sobrevivência e o eventual estabelecimento da infecção. A expressão diferencial de genes é, portanto, essencial para os processos patológicos. A identificação desses genes pode levar ao entendimento dos mecanismos moleculares da patogênese, bem como apontar para futuras novas estratégias de tratamento da paracoccidiodomicose (San-Blas *et al.*, 2002).

2. Fatores de Virulência

Antigamente o conceito de virulência estava centrado na idéia de ser uma característica microbiana intrínseca e invariável. Este conceito tem sido redefinido a fim de incorporar os fatores imunes do hospedeiro. Ferramentas de biologia molecular tem tornado possível encontrar evidências diretas de se avaliar se um dado fator é requerido para a virulência fúngica. Baseado nos postulados de Koch, originalmente descrito para bactéria e adaptado por Falkow (1988, 2004), o protocolo padrão para estudos moleculares da patogênese em fungos é a técnica de mutagênese sítio-dirigida seguido pelo estudo de tais genes em linhagens mutantes e nas respectivas linhagens reconstituídas em um modelo animal relevante. Para um gene ser considerado parte da virulência, a infecção causada pelo mutante deve ser atenuada quando comparada com a linhagem selvagem e a reconstituída (revisado por Tavares *et al.*, 2005)

Dessa forma, cada gene expresso durante a infecção que resulta no estabelecimento da doença é definido como um potencial fator de virulência. Fatores de virulência amplamente descritos na literatura estão relacionados com a biogênese da parede celular, adesinas, processo de dimorfismo, resposta ao estresse, metabolismo celular, entre outros (Klein e Tebbets, 2007, Rappleye e Goldman, 2006).

Através dos dados obtidos nos projetos transcriptoma citados anteriormente, foi possível identificar 30 genes ortólogos a genes descritos como fatores de virulência de outros patógenos. Dentre estes, destacam-se genes relacionados ao metabolismo, remodelagem da parede celular e detoxificação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN), além de outros fatores de virulência (Felipe *et al.*, 2005; Tavares *et al.*, 2005; revisado por Derengowski, 2006). Dos genes relacionados ao metabolismo destacamos isocitrato liase

ICL1 e malato sintase *MLS1* que possibilitam a sobrevivência do fungo no interior do fagolisossoma por permitirem a produção de energia a partir de compostos de 2 carbonos (C₂) como o acetato (Finlay e Falkow, 1997; Lorenz e Fink, 2002 revisado por Tavares *et al.*, 2005). Das 6.022 PbAEST obtidas, 69,4% mostraram similaridade com seqüência de outros fungos pela utilização de ferramentas de bioinformática. As PbAESTs foram funcionalmente classificadas em 12 grupos, conforme mostrado na figura 1.

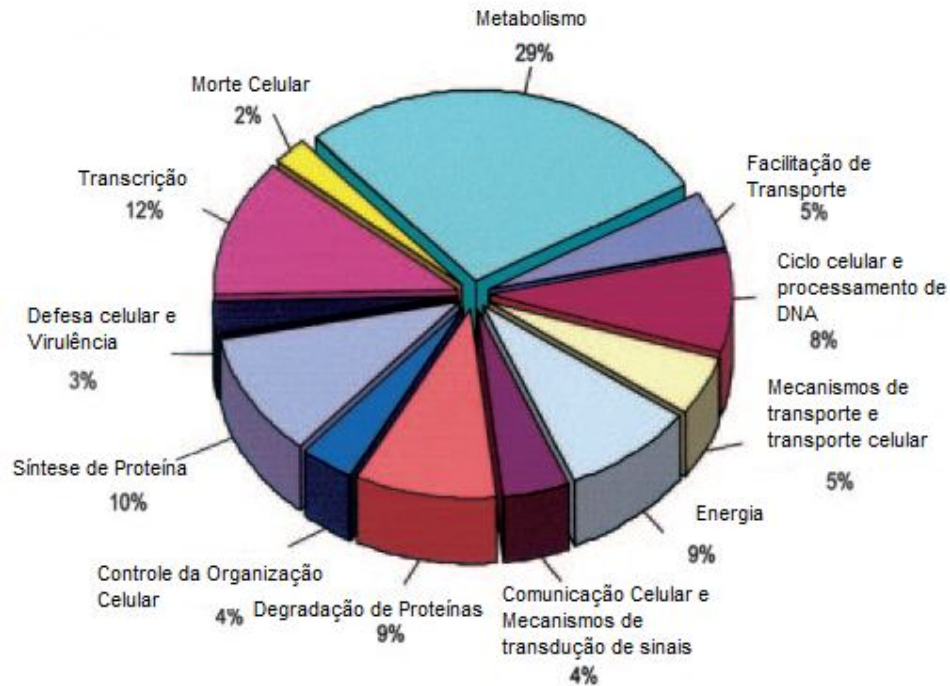


Figura 1 - Caracterização das seqüências descritas pela análise do transcriptoma de *P. brasiliensis*. Categorias para classificação funcional da PbAESTs obtidas pelo Projeto Genoma Funcional e Diferencial de *P. brasiliensis* (Modificado de Felipe *et al.*, 2005).

Dentre a classificação funcional dos transcritos ortólogos a fatores de virulência de outros fungos, o grupo de maior interesse para este trabalho são os genes relacionados à síntese de parede celular, com especial atenção ao gene quitina sintase 4 (*CHS4*). Além do aumento do conteúdo de quitina na transição de micélio para levedura, também destaca-se a presença de β -1,3-glucana na fase de micélio e α -1,3-glucana na fase de levedura. No interior dos macrófagos do hospedeiro, a expressão de β -1,3-glucana sintase é regulada negativamente. A

β -1,3-glucana é um polissacarídeo de atividade imunoestimulatória capaz de estimular a produção de mediadores inflamatórios, como TNF- α . Essa regulação negativa de β - 1,3-glucana sintase pode ser um importante mecanismo de adaptação de *P. brasiliensis* para reduzir a resposta inflamatória do hospedeiro (Tavares *et al.*, 2007).

3. Parede celular – Quitina sintase

A parede celular é uma rede tridimensional de polissacarídeos que dá suporte estrutural às células fúngicas e permite interações de tais células com o ambiente. Sua integridade é essencial para sobrevivência do fungo em ambiente hostil, sendo possível a manutenção de protoplastos – células desprovidas de parede celular – somente em laboratório, onde as condições osmóticas que previnem a lise celular podem ser mantidas (Latgé, 2007 e Roncero, 2002). Quitina e β -1,3-glucana são os polissacarídeos mais abundantes da parede celular de leveduras e fungos filamentosos (Latgé, 2007, Beauvais *et al.*, 2001).

Quitina é um homopolímero constituída por N-acetilglicosamina (GlcNAc) unidas por ligações β -1,4. Quitina sintase é uma proteína de membrana que catalisa a polimerização de GlcNAc a partir de UDP-GlcNAc como substrato (Takeshita, 2006). O número de genes de quitina sintase varia de acordo com a espécie do fungo, variando desde um gene no fungo ancestral *Encephalitozoon cuniculi* a mais de 20 genes em *Rhizopus oryzae*. Sua importância também é variável, uma vez que em *Saccharomyces cerevisiae* (espécie em que a quitina sintase é bem caracterizada) nenhum dos três genes é essencial. Em *Candida albicans*, que possui quatro genes para quitina sintase, o gene *CHS1* é primordial para a viabilidade celular, enquanto que em *Aspergillus fumigatus* nenhum dos genes de quitina sintase é essencial (Latgé, 2007). Segundo este autor, esse fato sugere que diferentes genes *CHS* de fungos realizam funções distintas e específicas, mesmo tendo seqüências similares. Em *P. brasiliensis* são descritos cinco diferentes genes de quitina sintase.

Niño-Vega *et al.* (1998) descreveram que em *P. brasiliensis* a quitina representa 43% do peso seco da parede da forma patogênica levedura e 13% da parede celular de micélio. O mesmo grupo em 2000 avaliou a expressão dos diferentes genes *CHS* de *P. brasiliensis* através da análise dos níveis dos respectivos mRNAs presentes na célula das diferentes formas. Foi observado que o gene *CHS4* relacionava-se com o desenvolvimento de micélio, descrevendo que os níveis do respectivo mRNA diminui a níveis indetectáveis após 4 horas

da indução da transição de micélio para levedura e atinge o nível máximo após 4 horas da indução de levedura para micélio mantendo-se em altos níveis nessa forma. Esses resultados parecem conflitantes com os dados que descrevem a maior abundância de quitina em leveduras, o que mostra que a atividade de quitina sintase pode ser regulada por ambos os níveis transcricionais e pós transcricionais, não existindo relação direta entre concentração e atividade da enzima com o respectivo conteúdo de quitina. Embora níveis maiores de expressão de *CHS1*, *CHS2* e *CHS5* estejam correlacionados com os níveis de mRNA no tipo celular de micélio, é possível que a transcrição destes genes respondam a mudanças de temperatura ou outras mudanças ambientais, tais como produção de metabólitos pelo fungo. É também possível que elementos de choque térmico dentro dos promotores dos genes *CHS* tenham uma função direta na ativação de sua expressão a mudanças de temperatura associadas com a colonização de mamíferos (Niño-Vega *et al.*, 2000).

Baseado nas diferenças das regiões de sequência altamente conservadas, as quitina sintases foram organizadas em seis diferentes classes, (classificação de Bowen, 1992). Dentre elas, as classes III, V e VII têm sido identificadas somente em fungos filamentosos sugerindo que essas enzimas apresentem uma importante função no crescimento de hifas (Niño-Vega *et al.*, 2004, Mellado *et al.*, 2003). Além desse agrupamento, outra divisão foi proposta recentemente baseado na homologia de 60 quitina sintases, no qual, de acordo com esta classificação, as classes I, II e III pertenceriam à divisão 1 e as classes IV e V à divisão 2 (classificação proposta por Ruiz-Herrera *et al.*, 2002), a classe VI não foi considerada.

De acordo com Niño-Vega *et al.* (2004), *CHS2* apresenta alta similaridade de sequência com outras quitinas sintases de classe II da classificação de Bowen *et al.* (1992), sendo esta classe responsável pela síntese da porção quitinolítica do septo em *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*. As enzimas Chs4 e Chs5 foram classificadas na classe V, baseado na presença de dois resíduos de triptofano, característicos da classe V, embora a identidade de Chs5 com ChsD de *Aspergillus nidulans* tenha sido de 88% enquanto Chs4 foi apenas 63% idêntica a AnChsD.

Em 2004, Niño-Vega *et al.* demonstraram que Chs4 possui dois domínios, um C-terminal com alta similaridade a quitina sintase e um N-terminal que possuía alguma similaridade ao domínio *myosin motor-like* das quitina sintases classe V. Entretanto esta era desprovida de algumas assinaturas como os sítios de ligação ao ATP, P-loop ou Switch I e

Switch II, presentes em todas as quitina sintases da classe V. Chigira *et al.* (2002) comparou as seqüências de PbrChs4 usando seqüências deduzidas de aminoácidos de ChsZ de *A. oryzae* e Chs6 de *U. maydis* e concluiu também que eles poderiam ser reagrupados e juntamente com Niño-Vega *et al.* propuseram uma nova classe para o grupo de quitinas sintases. Essa nova classe (classe VII) foi composta pelas enzimas PbrChs4, AoChsZ e UmChs6. Em 2006, Takeshita *et al.*, incluíram o gene *CSMB* de *A. nidulans* nesta classe e Martín-Urdíroz (2008) acrescentou à classe, o gene *CHSVb* de *Fusarium oxysporum*.

Portanto, atualmente as quitina sintases são classificadas em duas divisões que se ramificam em sete classes. Os genes *CHS* de *P. brasiliensis* estão classificados como classe I (*PbrCHS1*), classeII (*PbrCHS2*), classe IV (*PbrCHS3*), classe V (*PbrCHS5*) e classe VII (*PbrCHS4*).

A ausência desse polissacarídeo, bem como as enzimas responsáveis por sua síntese nas células humanas, faz de quitina sintase um alvo atrativo para o desenvolvimento de novos antimicrobianos contra esse fungo de grande importância médica.

4. Regulação da Expressão de Genes

Há muitas etapas na expressão de genes que vão desde a transcrição de mRNA até a proteína ativa, sendo que todas podem ser reguladas. Nesse sentido, podemos citar vários pontos de controle da expressão de genes (Figura 2). Controle transcricional, processamento de RNA, transporte de RNA, tradução, degradação de mRNA, a tradução e atividade da proteína.

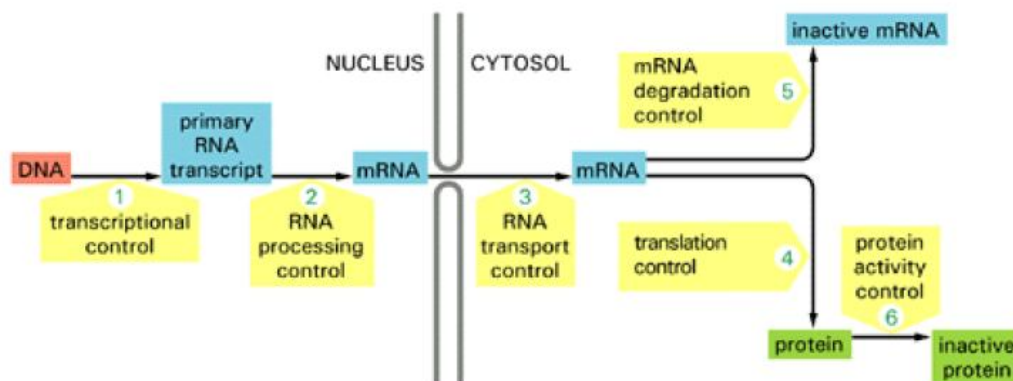


Figura 2 – Etapas de controle da expressão de gene eucariótico (adaptado de Alberts, *et al.*, 2008).

O processo de transcrição em eucariotos se inicia com a ligação do fator TFIID ao TATA *Box* – uma região consenso na maioria dos promotores eucarióticos, localizada aproximadamente a 25 pares de base a montante do sítio de início da transcrição. TFIID é um fator geral de transcrição composto por TBP (do inglês, *TATA-binding protein*) e TAF (do inglês, *TATA-associated factors*). Além desse fator, existem outros que se ligam a RNA polimerase II, formando o complexo de pré iniciação. Estes são fatores gerais requeridos para o início da transcrição, mas, de modo geral, não exercem papel na regulação específica da expressão de genes (Alberts *et al*, 2008; Lewin, 2008; Sadhale *et al.*, 2007)

A regulação da expressão de genes em nível transcricional é principalmente mediada através de interações específicas entre os fatores de transcrição e elementos de resposta presentes na sequência promotora. Entretanto, a presença dos elementos no promotor não indica a atividade transcricional do gene. São necessários sinais regulatórios adicionais para a produção do transcrito, como co-ativadores tais como remodeladores de cromatina e enzimas modificadoras de histonas. Esta reestruturação permite e estabiliza a ligação da maquinaria basal de transcrição e fatores de transcrição, conforme esquematizado na figura 3 (Alberts *et al*, 2008; Lewin, 2008; Smale e Kadonaga, 2003; Heintzman e Ren, 2007).

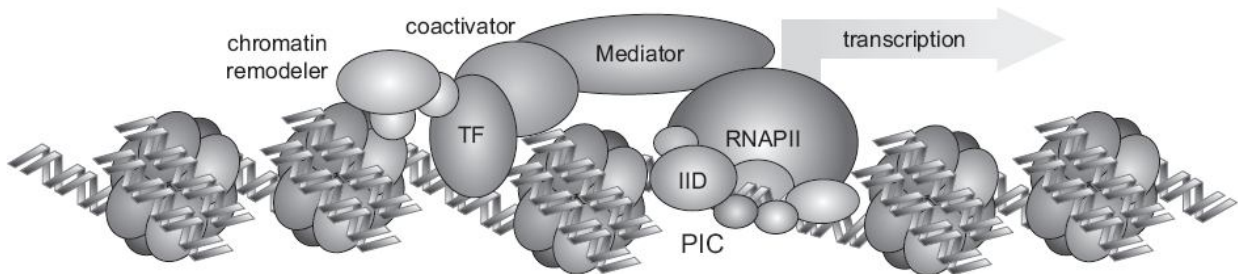


Figura 3 – Estrutura típica de um promotor eucariótico. RNA polimerase II (RNAPII) juntamente com fatores de transcrição (FT) formam o complexo de pré iniciação (PIC) ao redor do sítio de início da transcrição. Outros fatores transcricionais como Mediadores, remodeladores de cromatina, coativadores estão envolvidos na etapa de regulação da iniciação. Adaptado de Heintzman e Ren (2007).

Todas as etapas de controle mostradas na fig. 2 que se encontram após a transcrição são inseridas no contexto de regulação pós-transcricional. Frequentemente encontramos os dados de níveis de transcritos de mRNA sendo usados para inferir a quantidade da proteína

presente na célula. Entretanto, essa relação direta nem sempre ocorre. Segundo Greenbaum *et al.* (2003) uma das razões para essa incoerência na relação de níveis de transcritos e quantidade de proteína são os mecanismos de regulação pós-transcricionais envolvidos nas etapas que ocorrem a partir da migração do mRNA do núcleo da célula até a etapa final da tradução. Em leveduras, tendo como modelo principal *S. cerevisiae*, os estudos de regulação de expressão gênica em nível pós transcricional envolve principalmente as etapas de degradação do mRNA e atividade protéica (Beyer *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 1994).

A regulação de genes quitinas sintase (*CHS*) em fungos tem sido estudada em nível transcricional. Em *P. brasiliensis*, o que se tem publicado até o presente momento é a expressão diferencial de genes avaliada pela determinação dos níveis dos respectivos transcritos (Silva *et al.*, 2008; Tavares *et al.*, 2005; Tomazett *et al.*, 2005; Niño-Vega *et al.*, 2000). Em *A. nidulans* foi estudado a expressão de genes quitina sintase da classe V (*CSMA*) e VII (*CSMB*), em nível transcricional (Takeshita *et al.*, 2006). Essas duas classes estão presentes somente em fungos filamentosos, uma vez que todos os fungos filamentosos que possuem o genoma publicado, com exceção de *Ashbya gossypii*, possuem dois genes que codificam quitina sintase das classes V e VII, e *S. cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* não possuem nenhum destes genes. Segundo Takeshita *et al.* (2006), os genes *CSMA* e *CSMB* de *A. nidulans* estão arrançados em uma configuração *head-to-head* no genoma. De acordo com a representação desta configuração mostrada na Figura 4, observa-se uma distância entre os sítios de início da transcrição destes genes de 2,4Kb, sendo esta configuração conservada entre os respectivos genes ortólogos de outros ascomicetos. Esta configuração implica em uma regulação transcricional comum para *CSMA* e *CSMB*.

Takeshita *et al.* (2002), mostraram que transcritos de *CSMA* eram mais abundantes nas hifas crescendo em meio sob baixa concentração osmótica. Baseados nos dados da conformação *head-to-head* de *CSMA* e *CSMB*, Takeshita *et al.* (2002) testaram as mesmas condições osmóticas em *CSMB* e observaram o mesmo resultado, corroborando a idéia de regulação transcricional comum entre os dois genes. Esses resultados sugerem que ambos os genes têm função na manutenção da integridade da parede celular.

A remodelagem da parede celular é regulada pela via de sinalização da integridade celular controlada pela proteína Rho1GTPase. Uma função de Rho1 é se ligar e ativar a proteína quinase C (PKC), componente da cascata MAP quinase. Essa via é induzida em

resposta a diversos estímulos ambientais como temperaturas elevadas, em torno de 37 – 39 °C (Kamada *et al.*, 1995) e baixa osmolaridade (Davepont *et al.*, 1995; Kamada *et al.*, 1995). Neste contexto, o fator de transcrição Rlm1 (*resistant to lethality of MKK1*) participa da regulação de todos os genes de *S. cerevisiae*, com exceção de 1,3- β -glucana (*FKS2*), que respondem à via de sinalização da integridade celular em resposta à baixa concentração osmótica (Jung e Levin, 1999). Diversas seqüência consenso ao sítio de ligação reconhecido pelo fator de transcrição Rlm1 estão presentes na região promotora dos genes *CSMA* e *CSMB* de *A. nidulans*, conforme mostrado na figura 4.

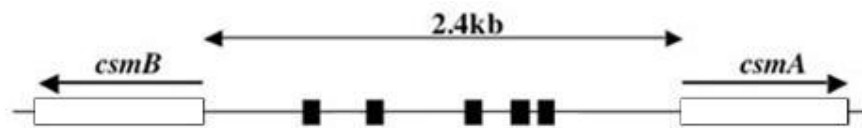


Figura 4 – Conformação *head-to-head* dos genes *CsmA* e *CsmB* de *A. nidulans*, ortólogos a *CHS4* e *CHS5* de *P. brasiliensis*. Em caixas sólidas encontram-se os sítios de ligação ao fator de transcrição Rlm1. (Modificado de Takeshita *et al.*, 2006).

Em *P. brasiliensis*, os genes *CHS4* e *CHS5* parecem apresentar a mesma conformação *head-to-head* e o grupo de San-Blas está analisando os níveis de transcrito sob as mesmas condições de estresse osmótico. Até o presente momento não há dados sobre regulação pós transcricional desses genes, mas a presença abundante de transcritos na forma de micélio e a presença de quitina em maiores níveis na forma de levedura sugere que os genes quitina sintase também sejam regulados em nível pós-transcricional.

5. Métodos de análise da regulação da expressão gênica

Existem diversos protocolos para se analisar a regulação da expressão gênica. Dentre eles, foi utilizado neste trabalho o ensaio de retardo de mobilidade eletroforética com o intuito de avaliar interações DNA-proteína. Foi também empregada a técnica de construção molecular com gene repórter a fim de se avaliar a atividade do gene *lacZ* sob o controle do promotor em estudo.

5.1 Ensaio de Retardo de Mobilidade Eletroforética (EMSA)

O ensaio de retardo de mobilidade eletroforética (EMSA ou *bandshift*) é um método de alta sensibilidade que é amplamente usado no estudo de interações DNA-proteína. A técnica baseia-se no princípio de que proteínas de diferentes tamanhos, massa molecular e cargas terão diferentes mobilidades eletroforética em uma matriz não desnaturante. Em um complexo DNA-proteína, a proteína ligada ao DNA causa um retardo na migração quando comparado ao DNA livre. A escolha do extrato protéico é dependente do objetivo do estudo. Assim, um extrato protéico nuclear (obtenção da fração nuclear seguido da lise desta estrutura) ou total (lise da célula) é muito usado na análise de elementos regulatórios presentes em um dado fragmento de DNA. A utilização da purificação parcial da proteína que se liga ao DNA permite a caracterização da interação DNA-proteína, sendo que o emprego de proteínas recombinantes é de grande importância para o melhor entendimento das características das interações. O extrato protéico usado é fator essencial na qualidade do EMSA (revisado por Laniel, *et al.*, 2001). A análise da migração por eletroforese pode ser feita por autoradiografia no caso do fragmento de DNA marcado radioativamente, ou por revelação fluorescente, utilizando-se o *scanner* Typhoon[®], no caso do fragmento marcado por fluorescência. A marcação fluorescente é a mais recomendada por diminuir o *background* que ocorre com a marcação radioativa.

5.2 Construções moleculares com gene repórter

Com o intuito de se caracterizar elementos regulatórios em promotores de genes de fungos filamentosos é necessária uma análise funcional da seqüência. Neste sentido, é muito utilizada a metodologia de fusão de possíveis seqüências promotoras com um gene repórter como o gene *lacZ*, desenvolvida para fungos filamentosos por Van Gorcom *et al.* (1986). Esse método permite avaliar o efeito que uma seqüência regulatória de um determinado gene inserido a montante do gene repórter sobre o nível de transcrição deste último. O gene *lacZ* de *E. coli* é o sistema de gene repórter mais versátil e amplamente usado, tendo visto que os níveis da proteína repórter β -galactosidase podem ser detectados em células vivas na presença do substrato X-gal (Lin e Barbosa, 2002). Diferentes sistemas de gene repórter mais modernos e sensíveis já foram desenvolvidos. No entanto, o sistema *lacZ* é de fácil utilização, não requer equipamentos específicos e tem um custo relativamente baixo.

Por causa das dificuldades experimentais para transformação de *P. brasiliensis*, foi escolhido o modelo *A. nidulans*, cuja eficiência de transformação já foi relatado utilizando o gene repórter *lacZ* (Tilburn *et al.*, 1983). *A. nidulans* pertence ao grupo dos ascomicetos, classificado na ordem Eurotiales (Geiser *et al.*, 2006, Guarro *et al.*, 1999), sendo filogeneticamente próximo (Fig.5) de *P. brasiliensis*. O metabolismo celular e a genética de *A. nidulans* são bastante elucidados (revisado por Poças-Fonseca, 2000).

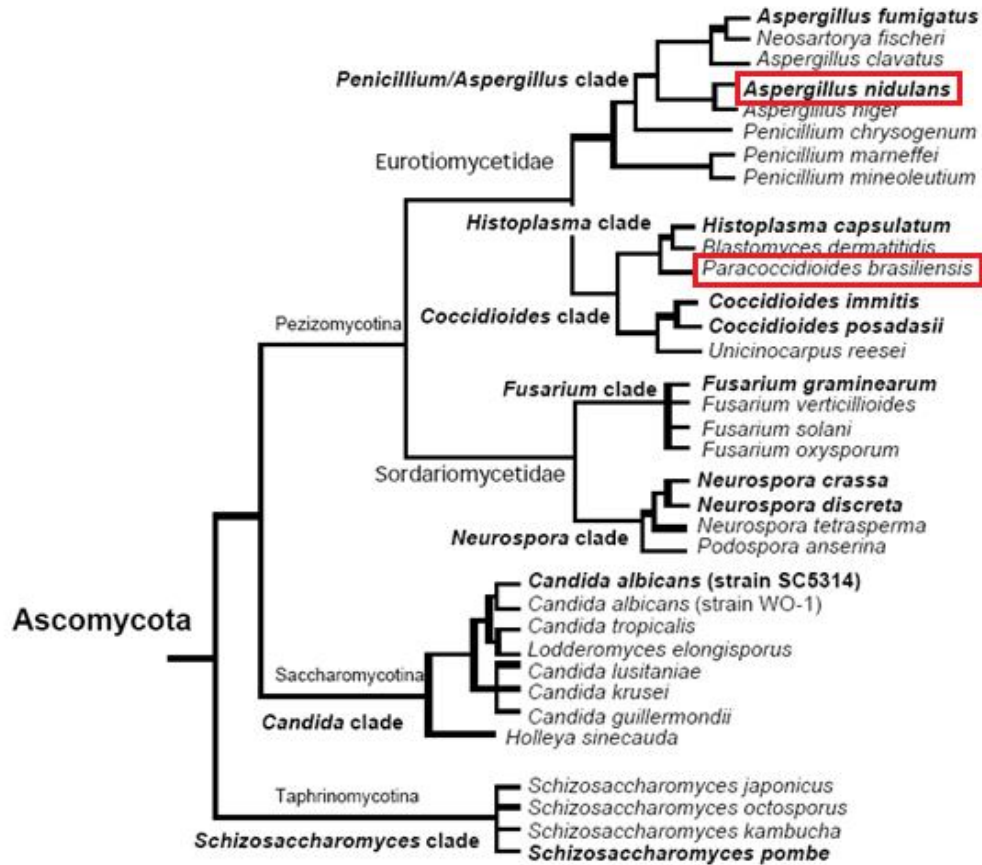


Figura 5 – Árvore filogenética do filo Ascomycota. Em destaque encontram-se as duas espécies utilizadas neste trabalho, mostrando a distância filogenética relativamente pequena entre elas (Modificado de Birren *et al.*, 2003).

Nosso grupo de pesquisa possui interesse no estudo da regulação da expressão gênica durante o processo de infecção, dimorfismo bem como entre os dois tipos morfológicos, micélio e levedura. Nesse sentido, têm sido utilizadas diversas estratégias relacionadas ao

isolamento e caracterização de genes que são diferencialmente expressos entre as duas formas morfológicas de *P. brasiliensis*.

Outra abordagem que permite estabelecer de maneira mais abrangente os genes que são diferencialmente expressos entre os dois tipos celulares de *P. brasiliensis* tem sido utilizada por nosso grupo desde o ano 2001 com o Projeto Genoma Funcional de *Paracoccidioides brasiliensis*, cujo objetivo foi a geração de ESTs (do inglês *Expressed Sequence Tags*) a partir de bibliotecas de cDNA das formas de micélio e de levedura de *P. brasiliensis*. Nesse projeto foram geradas 19.718 seqüências dentre as quais 16.351 foram agrupadas em 2.655 *contigs* e o restante descrito como seqüências únicas (Felipe *et al.*, 2005). É importante ressaltar que em paralelo, um outro projeto genoma da forma levedura de *P. brasiliensis*, também em condições de cultivo *in vitro*, foi empreendido (Goldman *et al.*, 2003).

OBJETIVO

Um dos interesses de nosso grupo de pesquisa é o estudo da biologia molecular de *P. brasiliensis*, especialmente o conhecimento dos aspectos envolvidos na regulação da expressão gênica durante o processo de infecção, dimorfismo, bem como a expressão específica aos dois tipos morfológicos, micélio e levedura desse fungo. Nesse contexto, torna-se de grande relevância o estudo dos mecanismos de regulação da expressão desses genes. Assim, a caracterização das respectivas seqüências promotoras é de grande importância para o entendimento dos sinais do hospedeiro que irão modular a expressão desses genes, com importante função quando no contexto do hospedeiro.

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo a análise funcional e estrutural da seqüência promotora do gene de parede celular quitina sintase 4 de *P. brasiliensis* com o intuito de compreender os mecanismos de regulação da expressão diferencial deste gene.

MATERIAIS

1. Células

1.1 Linhagem Bacteriana Termo Competente

A linhagem de *E. coli* utilizada para amplificar os plasmídeos foi a XL10-Gold.

1.2 Isolado de *Paracoccidioides brasiliensis*

O isolado de *Paracoccidioides brasiliensis* utilizado neste trabalho foi o *Pb 01*, mantido em nosso laboratório na forma levedura em meio Fava Neto a 36°C.

1.3 Linhagem de *Aspergillus nidulans*

Para este trabalho foi utilizada a linhagem de *Aspergillus nidulans argB⁻*: *pabaA1*, *biA1*, *methG1*, *argB*. Linhagem incapaz de crescer na ausência de arginina.

1.4 Plasmídio utilizado para transformação de *Aspergillus nidulans*

O plasmídio (Figura 6) utilizado como vetor gene repórter, foi construído por van Gorcom *et. al.* (1986) e descrito por Punt *et. al.* (1990). Contém um único sítio *Bam* HI a montante do gene *lacZ* de *E.coli* e possui o gene *argB* de *Aspergillus nidulans* como marca de seleção autotrófica. Esse vetor é denominado pAN 923 – 42B. O vetor permite a fusão de qualquer gene em fase ao *lacZ*. Depois da transformação de linhagem *argB⁻* de *Aspergillus nidulans*, o vetor integra com uma alta eficiência ao locus *argB* do genoma, geralmente como uma cópia única (van Gorcom, 1986).

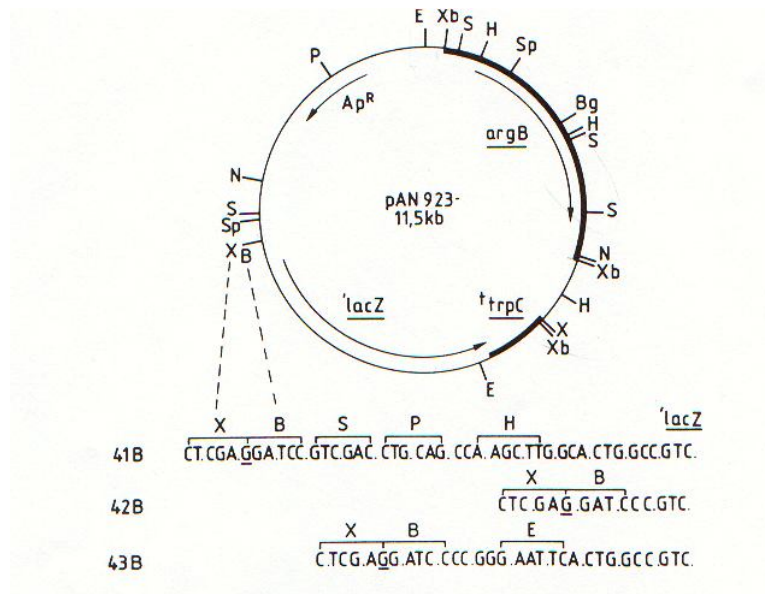


Figura 6 – Mapa de restrição dos vetores da série pAN 923 (van Gorcom *et al.*, 1986). Linhas espessas representam DNA de *Aspergillus*; linhas finas representam DNA de *E. coli*. B, *Bam* HI; Bg, *Bgl* II; E, *Eco* RI; H, *Hind* III; N, *Nru* I; P, *Pst* I; S, *Sal* I; Sp, *Sph* I; X, *Xho* I; Xb, *Xba* I.

2. Meios de Cultura

Todos os meios de cultura tiveram os volumes ajustados com água destilada e foram esterilizados em autoclave a 120°C durante 15 minutos.

2.1 Meio LB

Extrato de Levedura	0,5 % (p/v)
Peptona de Caseína	1,0 % (p/v)
NaCl	1,0 % (p/v)

Ajustou-se o pH para 7,0. Para meio LB sólido, foram adicionados 1,4% de ágar bacteriológico.

2.2 Meio YPD

Extrato de levedura	1 % (p/v)
Glicose	2 % (p/v)
Bacto-peptona	2 % (p/v)

Ajustou-se o pH para 7,5

2.3 Meio Fava-Neto

Protease peptona	0,3 % (p/v)
Peptona	1,0 % (p/v)
Extrato de carne	0,5 % (p/v)
NaCl	0,5 % (p/v)
Dextrose	4,0 % (p/v)
Extrato de levedura	0,5 % (p/v)
Ágar	1,6 % (p/v)

Ajustou-se o pH para 7,0

2.4 Meio Mínimo para *Aspergillus nidulans*

Solução de Sais	2 % (v/v)
Glicose	1 % (p/v)

Ajustou-se o pH para 6,8.

Para fazer o meio mínimo sólido, acrescentou-se 2 % (p/v) de ágar.

Solução de Sais

KCl	0,35 M
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,04 M
KH ₂ PO ₄	0,56 M
Sol. Elementos Traço	50,00 mL
Água destilada	q.s.p. 1 L

Solução de Elementos Traço

Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	104,80 µM
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1,60 mM
FeSO ₄ ·7H ₂ O	2,57 mM
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	3,30 mM
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	27,80 µM
Água destilada	q.s.p. 1 L

Ajustou-se o pH para 2,0 com HCl.

2.5 Meio Completo para *Aspergillus nidulans*

Solução de Sais	2,00 % (v/v)
Glicose	1,00 % (p/v)
Caseína hidrolisada	0,15 % (v/v)
Peptona	2,00 % (v/v)
Extrato de levedura	0,05 % (v/v)

Ajustou-se o pH para 6,5.

2.6 Meio Mínimo Base para transformação de *A. nidulans*

Meio Mínimo para <i>A. nidulans</i>	10 % (v/v)
Sacarose	1 M
Ágar	2 % (p/v)

Ajustou-se o pH para 6,8.

2.7 Meio Mínimo de Cobertura para transformação de *A. nidulans*

Meio Mínimo para <i>A. nidulans</i>	10,00 % (v/v)
Sacarose	1,00 M
Agarose	0,35 %

Ajustou-se o pH para 6,8.

O meio mínimo para *Aspergillus nidulans* necessita de suplementos que foram preparados separadamente e acrescentados antes do uso.

3. Antibióticos

3.1 Ampicilina

Solução estoque de 50 mg/mL diluída em água destilada.

Concentração final de uso: 100 µg/mL

Esterilizou-se a solução em membrana de nitrocelulose com poros de 0,2 µm (Millipore®).

3.2 Penicilina

Solução estoque de 10 mg/mL diluída em água destilada.

Concentração final de uso: 0,05 U/mL

Esterilizou-se a solução em membrana de nitrocelulose com poros de 0,2 μm (Millipore[®])

3.3 Neomicina

Solução estoque de 100 mg/mL diluída em água destilada.

Concentração final de uso: 20 $\mu\text{g/mL}$

Esterilizou-se a solução em membrana de nitrocelulose com poros de 0,2 μm (Millipore[®])

4. Soluções de Suplementos

Todas as soluções de suplementos foram esterilizadas em membrana de nitrocelulose com poros de 0,2 μm (Millipore[®]).

4.1 Solução de Tartarato de Amônio (100X)

Dissolveram-se 9,2 g de tartarato de amônio em 100 mL de água destilada.

4.2 Solução de Ácido Paraminobenzóico – PABA (100X)

Dissolveram-se 20 mg de PABA em 100 mL de água destilada.

4.3 Solução de D-biotina (100X)

Dissolveram-se 10 mg de D-biotina em 100 mL de água destilada.

4.4 Solução de L-metionina (100X)

Dissolveram-se 2,98 g de L-metionina em 100 mL de água destilada.

4.5 Solução de Arginina (100X)

Dissolveram-se 5,3 g de arginina em 100 mL de água destilada.

5. Soluções Tampão utilizadas para Transformação de *A. nidulans*.

Todos os tampões foram esterilizados em membrana de nitrocelulose com poros de 0,2 μm (Millipore®).

5.1 Solução A (Tampão de Transformação 1)

MgSO ₄	1,2 M
Na ₂ HPO ₄	10,0 mM

5.2. Solução B (para Tampão de Transformação 1)

MgSO ₄	1,2 M
NaH ₂ PO ₄	10,0 mM

5.3 Tampão de Transformação 1

MgSO ₄	1,2 M
Na ₂ PO ₃	10,0 mM

Acrescentou-se 80 mL da solução A com aproximadamente 20 mL da solução B atingindo-se pH 5,8. A solução foi esterilizada por filtração.

5.4 Tampão de Transformação 2

Sorbitol	0,6 M
Tris-HCl ph 7,5	100,0 mM

Ajustou-se o pH para 7,0 e a esterilizou-se a solução por filtração.

5.5 Tampão de Transformação 3

Sorbitol	1 M
Tris-HCl pH 7.5	10 mM

Ajustou-se o pH para 7,0 e a esterilizou-se a solução por filtração.

5.6 Tampão de Transformação 4

Sorbitol	1 M
Tris-HCl pH 7.5	10 mM
CaCl ₂	10 mM

Ajustou-se o pH para 7,0 e a esterilizou-se a solução por filtração.

5.7 Tampão de Transformação 5

PEG 8000 (p/v)	60 %
Tris-HCl pH 7,5	10 mM
CaCl ₂	10 mM

Esterilizou-se a solução por filtração.

6. Soluções para preparação do Extrato Protéico de *P. brasiliensis*

6.1 Tampão de Lise

HEPES pH 7,5	25,0 mM
KCL	50,0 mM
MgCl ₂	5,0 mM
EDTA	0,1 mM
Glicerina (v/v)	10,0 %

DTT	0,5 mM
PMSF	1,0 mM
Pepstatina	1,0 μ M
Leupeptina	0,6 μ M

DTT e os inibidores de protease PMSF, pepstatina e leupeptina foram adicionados no momento do uso.

6.2 Tampão de Eluição do Extrato Protéico

HEPES pH 7,9	25 mM
KCl	50 mM
MgCl ₂	50 mM
EDTA	1 mM
DTT	1 mM

7. Soluções utilizadas no Ensaio de Retardo de Mobilidade Eletroforética

7.1 TEB 10X

Tris Base	54,0 g
Ácido Bórico	27,5 g
EDTA 0,5M	20,0 mL

Ajustou-se o pH para 8.

7.2 Solução de Alto Sal para Purificação da Sonda

Tris Base	0,06 g
EDTA	0,02 g

NaCl	4,30 g
Água MilliQ	q.s.p. 50 mL

7.3 Solução estoque de Espermidina – 80 mM

Diluir 0,1162g de Espermidina (Sigma[®]) em 10mL de água.

7.4 Solução estoque de P(dIdC)

Diluiu-se P(dIdC) (Roche[®]) em água para a concentração de 1 µg/µL.

7.5 Solução estoque de KCl – 1 M

Diluiu-se 0,7455 g KCl em 10 mL de água destilada.

7.6 Solução estoque de ZnCl₂ - 50 µM

Diluiu-se 0,0007 g de ZnCl₂ em 100 mL de água destilada.

7.7 Solução de Poliacrilamida

Diluiu-se em água destilada acrilamida e bisacrilamida na proporção de 30,00 : 0,36 (p/v), respectivamente.

7.8 Solução de Persulfato de Amônio – 25mM

Diluiu-se 0,570 g de persulfato de amônio em 10 mL de água destilada.

8. Soluções utilizadas para eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante – SDS-PAGE

8.1 Solução de Policrilamida

Diluiu-se em água destilada acrilamida e bisacrilamida na proporção de 29 : 1 (p/v), respectivamente.

8.2 Tampão de corrida (5X)

Tris Base	125,00 mM
Glicina	0,96 M
SDS	0,50 % (p/v)

8.3 Solução corante

Azul brilhante de Comassie	0,25 % (p/v)
Metanol	30,00 % (v/v)
Ácido acético glacial	7,00 % (v/v)

Dilui-se em água destilada e filtrou-se em papel de filtro.

8.4 Solução descorante

Metanol	30 % (v/v)
Ácido acético glacial	7 % (v/v)

9. Soluções utilizadas para extração de DNA cromossomal de *A. nidulans*

9.1 Clorofane

Fenol (equilibrado em pH 7,6)	1,00 v
Clorofórmio	1,00 v
β-hidroxiquinolina	0,05% (p/v)

Equilibrou-se a solução com Tris-HCl 100 mM pH 7,6 e estocada a -20°C protegido da luz. A manipulação foi feita com luvas e o descarte sempre em recipiente próprio, separado dos demais materiais, por se tratar de solvente orgânico (Sambrook e Russel, 2001).

9.2 Solução estoque de RNase A - 20 mg/mL

Preparou-se a solução em água Milli Q e aqueceu-a a 100 °C durante 20 minutos. A solução foi estocada a -20 °C.

9.3 Tampão TE

Tris-HCl pH 8,0	10 mM
EDTA	1 mM

10. Soluções utilizadas para teste em placa da atividade de β -galactosidase

10.1 X-Gal

Diluiu-se o X-gal em N-N-dimetilformamida a concentração de 40 mg/mL.

A solução foi esterilizada em membrana de nitrocelulose com poros de 0,2 μ m (Millipore®).

10.2 Solução de N-acetilglicosamina 10 %

Solução estoque de N-acetilglicosamina 10 % (p/v) em água destilada.

Concentração final de uso: 0,1%

10.3 Solução de Glicose 10 %

Solução estoque de glicose 10 % (p/v) em água destilada.

Concentração final de uso: 0,1 %

MÉTODOS

1. Cultivo do fungo *Aspergillus nidulans*

A linhagem *argB*⁻ de *Aspergillus nidulans* foi cultivada em meio mínimo ágar suplementado com tartarato de amônio, ácido paraminobenzóico (PABA), D-biotina, L-metionina e arginina na concentração final de 1X cada e incubada a 30°C durante aproximadamente 4 dias para esporulação.

A linhagem escolhida para este trabalho foi *argB*⁻ a qual possui uma mutação no gene *argB* que impossibilita o crescimento do fungo na ausência de arginina. Dessa forma, arginina é usada nessa linhagem como marca de seleção auxotrófica.

2. Preparação de células de *E. coli* termo-competentes

Foi preparado um pré-inóculo de colônia individual de *E. coli* em 5 mL de meio LB suplementado com ampicilina 100 µg/mL, incubado por 18h a 37°C sob agitação de 250 rpm. A partir do pré-inóculo foi feito um inóculo em 50 mL e incubado nas mesmas condições até atingir OD₆₀₀ de 0,2 a 0,3 (início da fase exponencial de crescimento bacteriano). Coletou-se a cultura por centrifugação a 2930 g a 4°C por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante e ressuspendendo-se, com uma suave agitação, o sedimento em 10 mL de solução de 100 mM CaCl₂ e 15% de glicerol gelada. A partir desse momento todo o procedimento foi realizado mantendo-se resfriado. Novamente coletou-se a cultura por centrifugação nas mesmas condições anteriores e ressuspendeu-se o pellet em 1 mL da solução de CaCl₂ e glicerol. Foram feitas alíquotas de 100 µL para estocagem a -80°C.

3. Transformação de *E. coli*

Realizou-se uma transformação por choque térmico de *E. coli*, linhagem XL10-Gold a fim de se amplificar o vetor gene repórter contendo a, provável região promotora do gene em estudo (*PbrCHS4*).

A 100 µL de células termo-competentes foram adicionados gentilmente 50 ng do plasmídeo (no volume máximo de 10 µL) e incubou-se no gelo durante 1 hora. As células

foram submetidas a choque térmico de 42°C por 90 segundos, e transferidas imediatamente para o gelo. Foi adicionado 1 mL de meio LB às células transformadas e incubadas a 37°C sob agitação de 250 rpm durante 1 hora para permitir sua recuperação. 200 µL das células transformadas foram plaqueados e o restante do material foi centrifugado a 5000 g por 10 minutos para concentração das células. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 350 µL de meio LB, sendo plaqueados 200 µL e 150 µL. Três placas foram feitas com meio LB ágar contendo ampicilina a 100 µg/mL, IPTG (0,02 mM) e X-Gal (0,004 %) e incubadas a 37°C durante a noite. Os clones selecionados foram armazenados em glicerol 70 %.

4. Preparação de plasmídeos em larga escala

A partir de um pré-inóculo de 10 µL das células armazenadas em glicerol 70 % (item 2) em 5 mL de meio LB contendo ampicilina a 100 µg/mL, incubado a 37°C sob agitação de 250 rpm durante a noite, foi feito um inóculo em 500 mL de meio LB (37°C sob agitação de 250 rpm durante a noite). A preparação de plasmídeos em larga escala foi feita utilizando-se o Plasmid Maxi Kit (QIAGEN®), de acordo com o protocolo do fabricante.

5. Digestão do DNA plasmidial

O plasmídeo contendo a possível região promotora do gene *CHS4* de *P. brasiliensis* foi digerido com a enzima de restrição *Bam* HI (Promega®) para confirmação do perfil de restrição. A reação de digestão foi realizada em um volume final de 20 µL, contendo 1 µg do vetor, 10 unidades da enzima *Bam* HI e tampão da enzima 1 X. A reação foi incubada a 37°C por 3 horas e analisada por eletroforese.

6. Preparação de protoplastos e transformação genética de *Aspergillus nidulans*

A transformação de *Aspergillus nidulans* foi feita segundo o protocolo de Tilburn *et al.*, 1983, a partir da protoplastização das células.

Os esporos de *A. nidulans* foram coletados com Tween 80 (0,01 %). Foi feito um inóculo de 10^8 esporos em 250 mL de meio mínimo suplementado com as soluções de tartarato de amônio, PABA, D-biotina, L-metionina e arginina na concentração final de 1 X, a 30 °C sob agitação de 250 rpm durante a noite. O micélio foi coletado por filtração em tecido estéril, lavado com água de torneira autoclavada gelada e ressuscitado em 10 mL de tampão de transformação 1 pré-resfriado. O micélio foi submetido a uma vigorosa agitação em tubo Falcon[®] a fim de desfazer os aglomerados e otimizar o acesso das enzimas às células na etapa posterior. Após ser transferido para frasco *Erlenmeyer*, adicionou-se 2 mL de solução estéril de enzimas hidrolíticas de *Trichoderma harzianum* (Lysing Enzymes from *Trichoderma harzianum* - SIGMA[®]) a 20 mg/mL em tampão de transformação 1 e 300 µL de solução de albumina sérica bovina estéril a 10 mg/mL em tampão de transformação 1. Após incubação de 5 minutos no gelo, o micélio foi incubado a 30°C sob agitação de 250 rpm por 2 horas, sendo ressuscitado a cada 30 minutos, para otimização da lise da parede celular. A formação dos protoplastos foi observada ao microscópio óptico. Após o período de incubação foram feitas duas filtrações, a primeira com gaze e a segunda com lã de vidro estéreis, para aumentar o grau de pureza da solução de protoplastos. Os protoplastos foram então transferidos para tubo Corex[®] e adicionou-se cuidadosamente 10 mL de tampão de transformação 2, formando-se duas fases no tubo. As centrifugações foram realizadas em rotor *swing-out* na centrífuga Sorvall[®] (RC-5 Super Speed Refrigerated). Foi realizada uma centrifugação a 670 g por 10 minutos a 4°C para formação de um gradiente, de forma a obter-se os protoplastos na interface do tampão. Os protoplastos foram coletados utilizando-se pipeta *Pasteur* e transferidos para um novo tubo Corex[®]. Foram adicionados 15 mL de tampão de transformação 3 e realizou-se uma centrifugação a 1200 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado duas vezes em 15 mL de tampão de transformação 4. Seguiu-se centrifugação de 1200 g por 10 minutos a 4°C. Posteriormente, os protoplastos foram ressuscitados em 600 µL de tampão de transformação 4, obtendo-se uma concentração de 10^5 a 10^6 protoplastos/µL.

Dez µg do DNA plasmidial previamente dissolvidos em tampão de transformação 4 foram misturados cuidadosamente com 100 µL de protoplastos. Foram adicionados 50 µL de tampão de transformação 5, misturando-se gentilmente e incubando-se no gelo por 20 minutos. Mais 0,5 mL de tampão de transformação 5 foram adicionados cuidadosamente, incubando-se por 20 minutos a temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada a 13000 g por 5 minutos, e o sobrenadante removido por aspiração. Uma nova centrifugação a 13000 g por 1 minuto foi realizada para remoção do tampão remanescente. O sedimento foi ressuspensionado em 200 µL de tampão de transformação 4 e adicionado a 3 mL de meio mínimo de cobertura fundido e mantido a 45°C. O meio foi vertido sobre placas de Petri contendo meio mínimo base. As placas foram então incubadas a 30°C durante 4 dias para crescimento dos transformantes. Para transformação do plasmídeo com a construção do sistema gene repórter e também para o vetor sem inserto como controle, o meio mínimo de cobertura e o meio mínimo base foram suplementados com as soluções de tartarato de amônio, PABA, D-biotina e L-metionina na concentração final de 1X. Para teste da viabilidade de protoplastos, o protocolo de transformação foi realizado sem adição de DNA, e os meios suplementados com todos os requerimentos auxotróficos descritos acima, acrescentando-se arginina.

7. Ensaio de Estabilidade Mitótica

Para serem considerados mitoticamente estáveis, os transformantes de *A. nidulans* foram submetidos a três passagens em meio mínimo sem a suplementação com arginina intercaladas por passagens em meio mínimo contendo este aminoácido.

8. Cultivo do Fungo *Paracoccidioides brasiliensis* nas formas de micélio e de levedura para obtenção do extrato protéico

Para obtenção de culturas de levedura e de micélio, foi utilizado o estoque de levedura do isolado Pb01 disponível em nosso laboratório.

Foi feito um inóculo de leveduras na concentração final de 10⁶ células/mL em meio YPD suplementado com penicilina (0,05 U/mL) e neomicina (20 µg/mL) crescido a 36°C por uma semana sob agitação de 200 rpm para a preparação do extrato protéico. Para obtenção de micélio, o mesmo inóculo de leveduras foi realizado, mantendo-se a cultura a 24°C sob

agitação de 200 rpm por uma semana para a transição dimórfica. Posteriormente, foi realizado um cultivo adicional de uma semana para o crescimento do micélio para a preparação do extrato protéico.

9. Preparação do extrato protéico

As culturas de levedura e de micélio foram centrifugadas a 3000 g por 5 minutos, e o sobrenadante descartado. As células foram maceradas com nitrogênio líquido e imediatamente foram adicionados 4 mL de Tampão de Extração do Extrato Protéico. O material foi sonificado na potência de 70% com 2 pulsos de 59 segundos, com 3 repetições, mantendo a preparação sempre no gelo. Posteriormente, foi realizada uma centrifugação a 25000 g por 90 minutos a 4°C. Em seguida, foi adicionado (NH₄)₂SO₄ na concentração final de 0,4 M, e o material submetido a uma nova centrifugação a 25000 g por 60 minutos a 4°C. Após a centrifugação, foi adicionado (NH₄)₂SO₄ em pó a 0,405 g/mL, seguindo-se uma nova centrifugação a 7600 g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em 2 mL de Tampão de Eluição do Extrato Protéico. A PD 10 column (Pharmacia Biotech®) foi equilibrada com 25-30 mL de Tampão de Lise, tomando-se o cuidado de não deixar a coluna secar. Os 2 mL da preparação de extrato protéico foram então aplicados na coluna. O material foi eluído com 3,5 mL do Tampão de Lise e as frações coletadas em tubo Eppendorf® com 350 µL de glicerol 70 % estéril.

10. Desenho dos oligonucleotídeos utilizados como sonda no ensaio de retardo de mobilidade eletroforética.

A partir dos dados obtidos na busca realizada no *software* TRANSFAC, disponível na internet (<http://www.gene-regulation.com/pub/databases.html>), para análise de seqüências consenso para ligação de fatores transcricionais foram desenhados oligonucleotídeos específicos para serem utilizados como sonda para o teste de retardo de mobilidade eletroforética. Os oligonucleotídeos foram desenhados utilizando-se o *software* Primer 3, disponível *on-line* (<http://www-genome.wi.mit.edu>) e sintetizados pela IDT (*Integrated DNA Technologies*), conforme seqüência mostrada na tabela 1. Foram sintetizadas sondas marcadas com fluoróforo carboxifluoresceína (FAM) cuja emissão a 535 nm é detectada em um fluoroscanner (Typhoon 8600 Mershan, Buckinghamshire-England), sondas não marcadas

para serem utilizadas como competidores específicos e sondas não marcadas com seqüência complementar à sonda marcada.

Tabela 1. Dados gerais dos oligonucleotídeos sintetizados. Em destaque, a seqüência do elemento de resposta analisado.

Oligonucleotídeo	Seqüência	Tamanho (MER)
f/FAM CHS1	5' - CCCTCC TCCCCCCT TTTTTTC CCCTC GCCAGGG G <div style="display: flex; justify-content: center; gap: 20px; margin-top: -5px;"> <div style="text-align: center;">STRE</div> <div style="text-align: center;">STR</div> <div style="text-align: center;">Pac</div> </div> CTAAAGG - 3'	40
rCHS1	5' - CCTTTAGCCCTGGCGAGGGGAAAAAAGGGGG GAGGAGGG - 3'	40

11. Ensaio de retardo de mobilidade eletroforética (EMSA)

11.1 Anelamento dos oligonucleotídeos a serem empregados como sonda

Os oligonucleotídeos foram ressuspensos em água a uma concentração de 1µg/µL e foi feita a reação de anelamento da forma a seguir:

Oligonucleotídeo <i>forward</i>	0,5 µL
Oligonucleotídeo <i>reverse</i>	0,5 µL
Tampão de anelamento (Tris-HCl 1M, pH 7,7)	6,0 µL
Água	23,0 µL

Essa mistura foi fervida por cinco minutos e deixada em repouso até cair à temperatura ambiente.

11.2 Purificação das Sondas

Para remoção de possíveis contaminações com oligonucleotídeos de fita simples, auto-anelados, ou mesmo de produtos de degradação, os oligonucleotídeos anelados foram purificados por eletroforese em gel de poliacrilamida nas mesmas condições descritas em 11.4 – Corrida Eletroforética.

Após a corrida, foram feitas marcas no gel utilizando-se uma lâmina de bisturi. O gel foi analisado em *scanner* Typhoon® para identificar a região que continha a sonda anelada. Cortou-se o pedaço do gel onde estavam as sondas dupla-fita. Este pedaço do gel foi colocado sobre uma camada de aproximadamente 3 mm de gel de agarose 1% em TEB 1X e coberto com agarose fundida. Após a solidificação da agarose, foi feito um corte logo abaixo dos fragmentos de acrilamida em formato de trapézio, onde encaixou-se um fragmento de membrana DEAE celulose. Foi utilizada agarose fundida para selar os pedaços de agarose cortados. A migração da sonda da poliacrilamida para a membrana foi feita por uma corrida eletroforética a 90 V por 80 minutos.

Após a migração para a membrana, esta foi transferida para um tubo Eppendorf® de 1,5 mL e submersa em 250 µL de solução de alto sal e incubada a 45°C durante 20 minutos. A solução de sais contendo a sonda eluída foi transferida para um novo tubo Eppendorf® repetindo-se a eluição com a mesma membrana e nova solução de alto sal. Os dois volumes foram reunidos em um único tubo para a precipitação da sonda com etanol 100% gelado, incubando-se a -20°C durante a noite. Após incubação, centrifugou-se a 17500 g durante 30 minutos, lavou-se com etanol 70% e centrifugou-se novamente nas mesmas condições. O etanol foi descartado e o pellet secado ao ar e ressuspendido em 30 µL de água bidestilada.

11.3 Reação do EMSA

Para preparar a reação de interação DNA-proteína a ser analisada neste ensaio, foi feita a mistura conforme descrito abaixo.

Sonda anelada	1 µL
KCl 1M	2 µL
ZnCl ₂ 50µM	1 µL
p(dIdC) 1µg/mL	2 µL
Espermidina 80mM	1 µL
Oligonucleotídeos inespecíficos (CKT067 e CKT068)	2 µL
Água	1 µL

À essa reação foi adicionado 1 µg do extrato protéico no volume máximo de 10µL. Incubou-se no gelo durante 10 minutos e aplicou-se no gel de poliacrilamida para a corrida eletroforética.

11.4 Corrida Eletroforética

O gel de poliacrilamida foi feito de acordo com o protocolo apresentado a seguir.

Poliacrilamida 30,36%	15,00 mL
Glicerina 50%	15,00 mL
TEB 10X	2,25 mL
Água	45,00 mL
Persulfato de amônio 25%	200,00 µL
TEMED	50,00 µL

Os géis foram feitos com o sistema *SE 600 Electroforesis Unit* (Amersham Biosciences®) utilizando-se pentes de 10 poços. Para a separação eletroforética a cuba de eletroforese foi preenchida com TEB 0,25X e os poços do gel lavados exaustivamente com o tampão de corrida. Antes da aplicação das amostras foi feita uma pré corrida a 500 V durante 15 minutos. Posteriormente, as amostras foram aplicadas com uma pipeta Hamilton® sendo o primeiro poço preenchido com azul de bromofenol para acompanhamento visual da corrida. Esta foi feita a 500 V até que o azul de bromofenol migrasse cerca de 10 cm. Após a corrida, o gel foi analisado no *scanner* Typhoon® de acordo com os seguintes parâmetros.

Filtro: Fluoresceína 526SP

Intensidade: 1000 (máxima)

Sensibilidade: alta

Pixel size: 200 microns

Plano focal: *plane*

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Análise da construção molecular contendo o gene repórter *lacZ* de *E.coli* sob controle da seqüência promotora do gene *CHS4* de *P. brasiliensis*.

A construção molecular com o gene repórter *lacZ* e o promotor do gene *CHS4* (42B-*PbrCHS4*) foi realizada anteriormente em nosso grupo de pesquisa por Thiago Daison e Carine Pessoa. Foi inserido sítio de *Bam*HI na extremidade 5' dos oligonucleotídeos empregados na amplificação da seqüência promotora do gene *CHS4* de *P. brasiliensis*. O produto gerado foi posteriormente clonado no vetor PAN 923-42B, que possui um sítio de restrição para esta enzima. Para a confirmação da construção molecular foi feita digestão com a enzima *Bam*HI (Promega®), liberando-se o inserto correspondente a um fragmento de DNA de aproximadamente 1 kb correspondendo à região promotora do gene *CHS4*, conforme mostrado na figura 7.

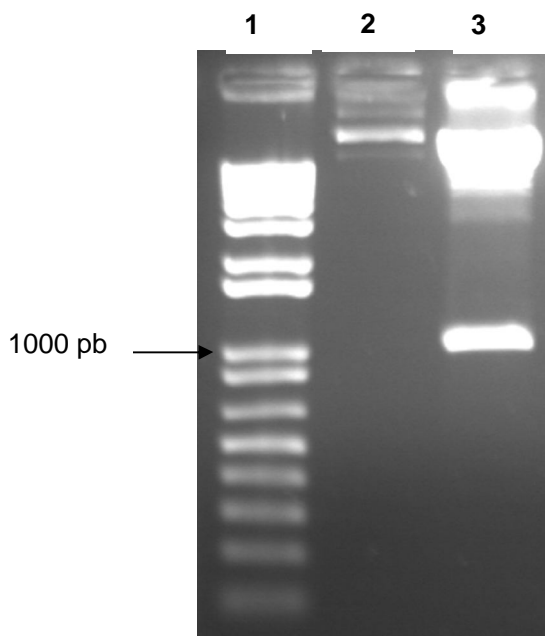


Figura 7 – Confirmação da construção molecular 42B-*PbrCHS4*. Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo 0,5 µg/mL dos produtos da digestão do plasmídeo 42B-*PbrCHS4* com a enzima *Bam* HI (Promega®). 1 – marcador de massa molecular 1Kb plus DNA Ladder (Gibco®); 2 – Plasmídeo intacto; 3- Plasmídeo digerido liberando o vetor de 11,5 Kb e um fragmento de DNA de aproximadamente 1 kb correspondendo à região promotora do gene de *CHS4*.

2. Análise funcional da seqüência promotora do gene *CHS4* de *P. brasiliensis* em *Aspergillus nidulans*

Os fungos filamentosos possuem um ciclo de vida complexo, análogo ao dos eucariotos superiores. Esse fato torna-os organismos atrativos para estudo da relação estrutural e funcional de elementos genéticos (Punt *et al.*, 1990). Dentre estes organismos podemos destacar o fungo *Aspergillus nidulans*, muito empregado em estudos de regulação gênica por ter seu metabolismo celular e sua genética bastante elucidados (revisado por Arst e Scazzocchio, 1985, Davis e Hynes, 1991 e Poças-Fonseca, 2000).

Devido as dificuldades de padronização de um protocolo eficiente para transformação de *P. brasiliensis*, e em função das vantagens descritas acima, escolhemos *A. nidulans* como modelo heterólogo para a análise da função promotora do gene *CHS4* de *P. brasiliensis*. Utilizamos a linhagem *argB⁻* de *A. nidulans* para experimentos de transformação com a construção molecular denominada de 42B-*PbrCHS4*. Seguimos o protocolo de transformação por protoplastização das células fúngicas. Protoplastos (Fig.8) são as células desprovidas de parede celular, as quais são mais facilmente transformadas.

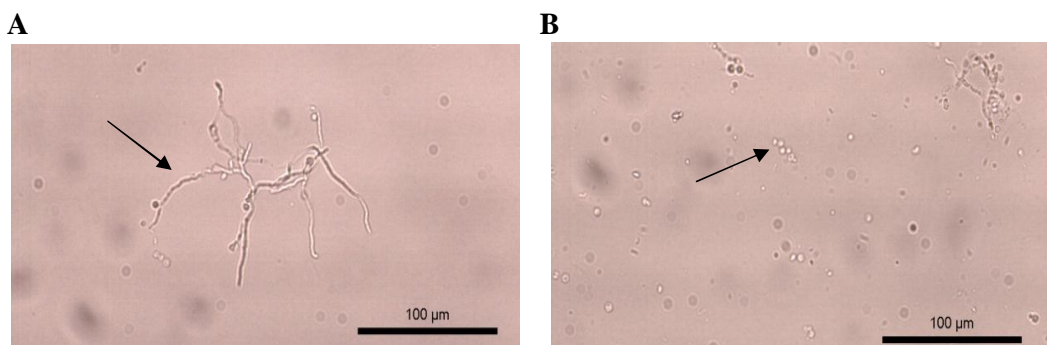


Figura 8– Fotomicrografia de células de *A. nidulans* durante o processo de protoplastização. A) Tempo 0 h mostrando células intactas. B) Tempo de 2 h de incubação na presença de enzimas hidrolíticas de *Trichoderma harzianum*, protoplastização completa.

A transformação procedeu-se conforme protocolo descrito na sessão de métodos. Dentre oito transformantes mitoticamente estáveis obtidos, três foram escolhidos aleatoriamente para o prosseguimento dos estudos. Foi extraído o DNA genômico dessas três amostras e confirmada a presença da construção molecular 42B-*PbrCHS4* pelo emprego da técnica de PCR, utilizando-se oligonucleotídeos específicos para o gene *lacZ* de *E. coli*,

presente no vetor. A figura 9 mostra o resultado dessa análise, com todos os transformantes positivos, amplificando um fragmento de DNA de aproximadamente 600 pb, conforme o esperado.

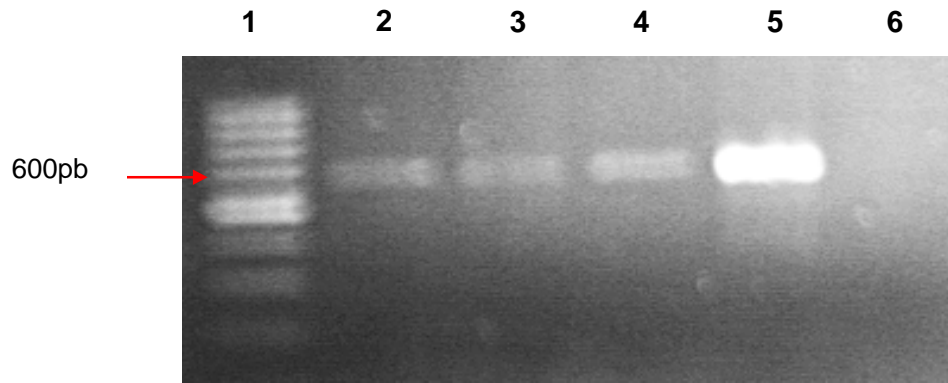


Figura 9 – Confirmação da presença da construção molecular 42B-*PbrCHS4* em transformantes de *A. nidulans*. Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo 0,5µg/mL dos produtos de PCR obtidos a partir do DNA genômico dos transformantes utilizando-se oligonucleotídeos específicos para o gene *lacZ* de *E. coli*. 1 - Marcador de massa molecular 100 bp ladder (VJR Comercial Ltda). 2 –Controle 42B 1 (sem a seqüência promotora do gene *CHS4*). 3 – Transformante I. 4 – Transformante II. 5 – Transformante III. 6 – DNA genômico de *A. nidulans* não transformado como controle negativo.

A seqüência promotora do gene de *CHS4* de *P. brasiliensis* (gb|AF107624 *gene bank* do NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) foi analisada *in silico* utilizando-se o *software* TRANSFAC (<http://www.gene-regulation.com/pub/databases.html>) em busca de motivos de seqüência que possam ser reconhecidas por fatores de transcrição. Na figura 10 mostramos a seqüência analisada, destacando as possíveis seqüências consenso de ligação para alguns fatores de transcrição.

```

attccaataaagacaacacccgggccttgggggttgtgtatgtgctgttttc
gcccggtccaagcgtcattggtttattacgggagtcgtgggaataagattcag
ccaaactgcgatgaagagagagagagtctgacacaggaacaagcccattcgc
gggatgcggggggttttaaacgcacattcgtcccggttacagcccagcctggg
aaaccacgctttgttcccacagattcacttgagtccccaacagaatcatttg
atgttgatcccaagttctccagagcatgtggtgaaagtatccatgggtgcgt
tgtaactataatthaatttactttggtttacactctgtaactagaagtatggt
ttgtttgccggtactaagccggtgtttacaaaaccgcccctgtctctggacg
cgtaccgtacagtaccatacacacagcacttgatgtatcctgctgtttgtgct
ttacctaccccttcaacttttcttcctccagttcagttgctcccaccaacct
cctccttggctctcttttttcgtgggttcgctataactggctctttgcatcttgc
tgtgctcgcgaggaggtgctcatcacacattcgtttgggctgaccgctcct
cgtctctcgctattgtttacaccatcgccttcgaacccttgtttcgctccg
tgaagctcaatttgttcaaccaaccaacaaccacaccgggcgcgagattg
taaacgggggtccggatctctcagcaagtcgggttgctttgtctttgct
agggaaacggccctccccccccctttttttcccctgccagggctaaggtta
taccggaaccaagtgttggtggtgggcccggataaagtatccctattctcacct
gttcgcgccggttcgcaagggcctcctttggtaatccgccataatcttcgtgcc
gtataagatacgaattcgcgaagctatcATG

```

Figura 10 – Sequência nucleotídica da região promotora do gene *CHS4* destacando os motivos para ligação para fatores de transcrição encontrados por análise *in silico*. O sítio de início da tradução está sublinhado (ATG). Os sítios de ligação para os fatores de transcrição encontram-se destacados: em amarelo STRE , em verde PacC, azul CreA, em vermelho HSE. Encontram-se em negrito as sequências consenso.

Neste sentido, foram identificados os seguintes motivos de sequência: elemento de resposta a estresse (STRE), elemento de resposta a alteração de pH (PacC), elemento de repressão por glicose (CreA), elemento de resposta a choque térmico (HSE).

A análise da sequência nos motivou a realizar um teste de atividade do gene *lacZ* sob o controle do promotor *CHS4* de *P. brasiliensis* nos transformantes de *A. nidulans* cultivados em meio mínimo suplementado com diferentes fontes de carbono. A variação da fonte de carbono é justificada por terem sido encontrados vários sítios para o fator de transcrição CreA, que reprime a transcrição na presença de fontes de carbono prontamente utilizáveis. A figura 11 apresenta o teste-piloto realizado com apenas um transformante em várias fontes de carbono nas diferentes concentrações.

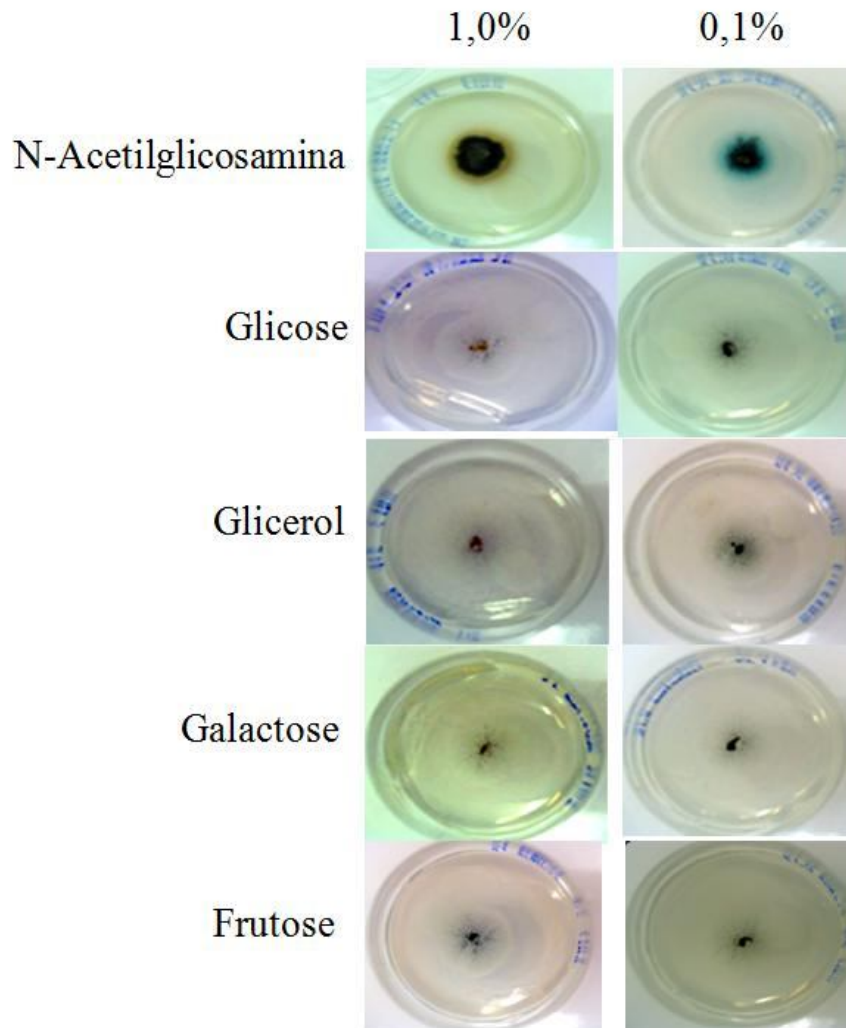


Figura 11 – Produção de β -Gal pela linhagem *argB*⁻ transformada com a construção molecular 42B-*PbrCHS4*, em placas de meio mínimo sólido contendo X-Gal e suplementado com diferentes fontes de carbono. Transformante 42B-*PbrCHS4*I utilizando como fonte de carbono N-acetilglicosamina, glicose, glicerol, galactose, frutose. A concentração das fontes de carbono variam de 1% e 0,1%.

Conforme pode ser observado, apenas na condição de cultivo em meio mínimo suplementado com N-acetilglicosamina 0,1 % detectou-se a atividade do gene *lacZ*. Neste sentido, selecionamos glicose e N-acetilglicosamina, ambos em concentração 0,1%, como fontes de carbono para testar os três transformantes selecionados para este trabalho. A repressão da atividade do gene *lacZ* sob o controle do promotor do gene de *CHS4* de *P.brasiliensis* na presença de glicose é justificada pela possível regulação pelo fator de transcrição CreA. A proteína CreA se liga a sítios de ligação específicos, inibindo a transcrição de um gene alvo na presença de fontes de carbono prontamente metabolizáveis

(Ruijter e Visser, 1997). Essa repressão é muito difundida em fungos filamentosos (Ilyés *et al.*, 2004).

A indução da atividade do gene repórter por N-acetilglicosamina também é um resultado plausível sendo este o monômero da quitina, em cuja biossíntese da qual está envolvido o produto da expressão do gene *CHS4*.

A figura 12 mostra os resultados do ensaio da detecção da atividade do gene *lacZ* sob o controle do promotor *CHS4* de *P. brasiliensis* nos três transformantes selecionados de *A. nidulans* cultivados em meio mínimo suplementado com glicose e N-acetilglicosamina.

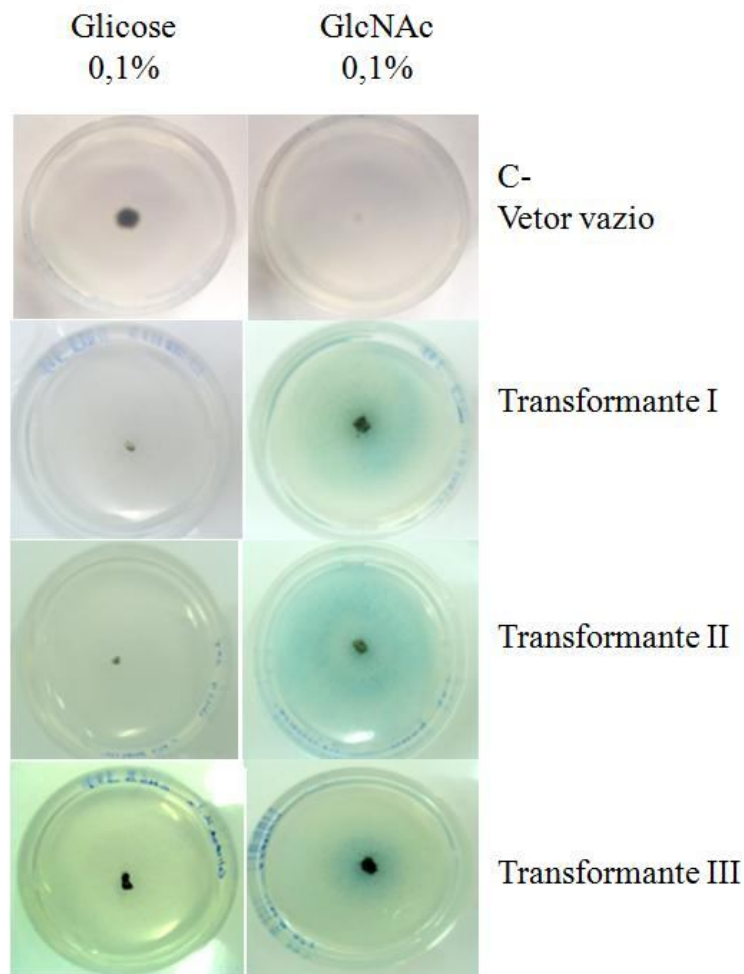


Figura 12 – Produção de β -Gal pela linhagem *argB*⁻ transformada com a construção molecular 42B-*PbrCHS4*, em placas de meio mínimo sólido contendo X-Gal utilizando como fontes de carbono a glicose 0,1% e N-acetilglicosamina 0,1%. Controle negativo, 42B vetor sem o inserto, transformantes 42B-*PbrCHS4*I, 42B-*PbrCHS4*II, 42B-*PbrCHS4*III.

Os resultados obtidos mostram a atividade do gene *lacZ* dos três transformantes quando cultivados em meio mínimo suplementado com N-acetilglicosamina (GlcNAc). Quando os transformantes foram cultivados em meio mínimo suplementado com glicose não foi observada a atividade do gene *lacZ*.

Os resultados apresentados nas figuras 11 e 12 mostram que N-acetilglicosamina ativa o promotor de *CHS4*. Estudos realizados com leveduras (Cabib, 1972) e *A. nidulans* (Borgia e Dodge, 1992) demonstram que *in vitro* a síntese de quitina é fortemente estimulada por GlcNAc. Lagorce *et al.* (2002) e Bulik *et al.* (2003) demonstraram que os níveis de quitina em *S. cerevisiae* aumentam em resposta à adição de glicosamina (GlcN) no meio de cultivo.

A quitina atravessa da membrana plasmática para a parede celular após a polimerização resultante da atividade enzimática de quitina sintase utilizando UDP-GlcNAc como substrato. A biossíntese de UDP-GlcNAc ocorre no citoplasma a partir de frutose-6-fosfato, conforme esquematizado na figura 13.

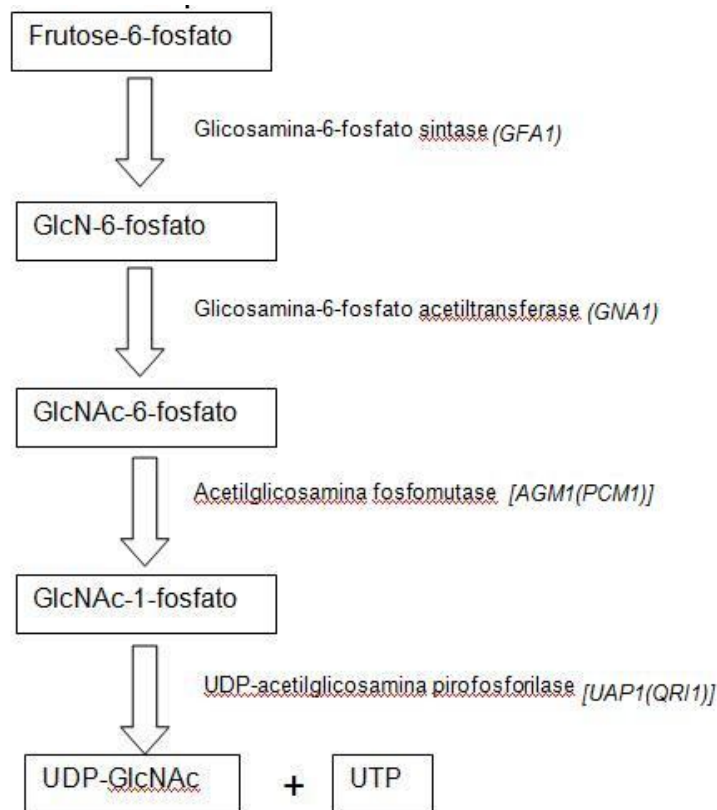


Figura 13 – Via da biossíntese de UDP-N-acetilglicosamina.

Lagorce *et al.* (2002) demonstraram que o aumento do fluxo através da via de biossíntese do precursor de quitina leva a um aumento na síntese de quitina da parede celular. Posteriormente, Bulik *et al.* (2003) demonstraram que a ativação da via de manutenção da integridade da parede celular leva a um aumento na síntese de quitina e à regulação positiva de enzimas que sintetizam os precursores metabólicos de quitina, destacando-se a enzima glicosamina-6-fosfato sintase, codificada pelo gene *GFA1*.

Com base nos resultados observados em *S. cerevisiae*, Bulik *et al.* (2003) sugeriram que a taxa da síntese de quitina pode ser modulada em resposta a diferentes condições metabólicas sem que haja alteração nos níveis transcricionais dos genes cujos produtos são relacionados à síntese deste polímero.

Embora haja evidências de que a presença dos precursores de quitina não altere os níveis transcricionais dos genes envolvidos neste processo em *S. cerevisiae*, nossos resultados demonstram que GlcNAc adicionado ao meio de cultivo ativa o promotor de *CHS4* de *P. brasiliensis*, cujo mecanismo molecular é ainda desconhecido.

Em relação a uma possível regulação pós transcricional dos genes de quitina sintase, Choi *et al.* (1994) propõem que esta enzima pode ser acumulada de forma inativa na célula. Essa hipótese é corroborada pela descoberta de que as proteínas Chs1, Chs2 e Chs3 de *S. cerevisiae* estão presentes na célula na forma de zimogênio e que podem ser ativadas *in vitro* por proteólise parcial (Choi *et al.*, 1994; Sburlati e Cabib, 1986). Uma segunda hipótese é que a quitina sintase pode ser destruída quando necessário, como as ciclinas durante o ciclo celular vegetativo, bem como podem ser ativadas em condições de alterações na estrutura da parede celular. Para sustentar essa hipótese, Choi *et al.* (1994) realizaram um experimento com construções moleculares contendo, cada uma, um dos três genes de quitina sintase *CHS1*, *CHS2* e *CHS3* de *S. cerevisiae* sob o controle do promotor *GALI* do mesmo microrganismo. O promotor *GALI* foi utilizado nesse experimento com o intuito de controlar a transcrição dos genes *CHS*, visto que é um promotor fortemente ativado na presença de galactose e reprimido em meio contendo glicose (West *et al.*, 1984). O experimento objetivava monitorar os níveis de mRNA de *CHS* concomitante com a atividade da enzima quitina sintase quando os transformantes foram cultivados em meio suplementado com galactose e depois transferido para meio suplementado com glicose. Os resultados demonstram que após parada a transcrição, para Chs1 e Chs3 os níveis de mensageiros caíram rapidamente, enquanto que a

quantidade de proteína inativa (zimogênio) caiu lentamente. Já para Chs2, após a transferência para glicose, os níveis de proteína caíram rapidamente enquanto que a queda dos níveis de mensageiro foi lenta. Esses dados sugerem que além da regulação transcricional, diferentes processamentos pós-transcricionais tomam parte na regulação de diferentes genes de quitina sintase.

Adicionalmente, para *CHS3* foi observado um aumento na atividade da enzima, sugerindo que a regulação ocorre depois da síntese, possivelmente por interações com produtos de outros genes (Bulawa 1992, 1993; Valdivieso *et al.*, 1991)

Em *P. brasiliensis* o que se tem publicado até o presente momento é a expressão de genes *CHS* em termos de abundância de transcritos. Niño-Vega *et al.* (2000) analisaram a expressão diferencial dos cinco genes *CHS* de *P. brasiliensis* durante a transição dimórfica induzida pela temperatura. Essa análise foi feita monitorando-se os níveis de mRNA presentes na célula. A expressão de *PbrCHS4* foi correlacionada com o desenvolvimento de micélio, sendo que os níveis de transcritos foram indetectáveis após 4 horas de indução para a forma de levedura. Ao contrário, na indução do desenvolvimento de hifas, a abundância de mRNA de *CHS4* atingiu o nível máximo após 4 horas de indução e manteve-se durante a forma de micélio. Para o gene *CHS5* foi observado um padrão similar, com uma abundância de transcritos 4 h após a indução para a forma de micélio, declinando com o passar do tempo. *PbrCHS3* não apresentou níveis detectáveis de transcritos em ambas as formas. Os transcritos de *PbrCHS1* e *PbrCHS2* foram detectados em ambas as formas, sendo preferencialmente expressos em micélio. Neste contexto, pode-se sustentar a hipótese de que a atividade de quitina sintase é regulada em níveis transcricionais e pós transcricionais, podendo não existir relação direta entre abundância de transcritos e atividade da enzima.

Esses dados impulsionam as pesquisas direcionadas à regulação do gene *CHS4* de *P. brasiliensis*. Neste contexto, nosso grupo busca compreender as condições de cultivo que induzem a manutenção da integridade da parede celular através da expressão do gene *CHS4*. Visando elucidar os mecanismos moleculares que ocorrem na interação hospedeiro-patógeno, torna-se necessário também a compreensão dos processos regulatórios ocorridos durante a transcrição. Neste sentido, iniciamos no presente trabalho a análise estrutural da seqüência promotora do gene *CHS4*, de forma a compreender quais são as proteínas envolvidas na regulação transcricional.

3. Análise estrutural da seqüência promotora do gene *CHS4*

A partir da seqüência analisada *in silico* (Fig. 4), com o intuito de identificar possíveis sítios de ligação de fatores de transcrição na seqüência da região promotora do gene *CHS4*, utilizamos os *softwares* disponíveis na internet primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) e *Oligo Analyzer* (<http://www.idtdna.com>) para desenhar oligonucleotídeos marcados com fluoresceína que atuam como sonda para nosso experimento de retardo de mobilidade eletroforética.

Temos particular interesse em investigar os sítios de ligação para o fator de transcrição PacC, envolvido na regulação da expressão gênica pelo pH ambiental. Nosso grupo de pesquisa demonstrou que este fator participa da regulação dos genes de celulase de *Humicola grisea* var. *thermoidea* (Poças-Fonseca *et al.*, 2000). Genes *pacC* de *P. brasiliensis* (Poças-Fonseca *et al.*, 2008) e de *H. grisea* (Thiago de Mello, projeto de doutorado, em andamento) foram recentemente clonados e caracterizados. Por esse motivo, a região escolhida como sonda possui uma seqüência consenso para sítio para PacC além de conter mais dois sítios para STRE (elemento de resposta a estresse), conforme mostrado na figura 14.



```
ccctcctcccccttttttcccctgccagggctaaagg
```

Figura 14 – Oligonucleotídeo utilizado como sonda para experimentos de retardo de mobilidade eletroforética. Em azul destacam-se os prováveis sítios de ligação de fatores de transcrição STRE. Em verde destaca-se o provável sítio de ligação do fator de transcrição PacC.

Motivados pela expressão diferencial micélio-específica do gene em estudo (Felipe *et al.*, 2005 e Niño-Vega *et al.*, 2000), foi preparado o extrato protéico total de *P. brasiliensis* nas formas de micélio e levedura crescidos em meio YPD em condições normais de cultivo. A figura 15 apresenta o perfil protéico de ambas as formas.

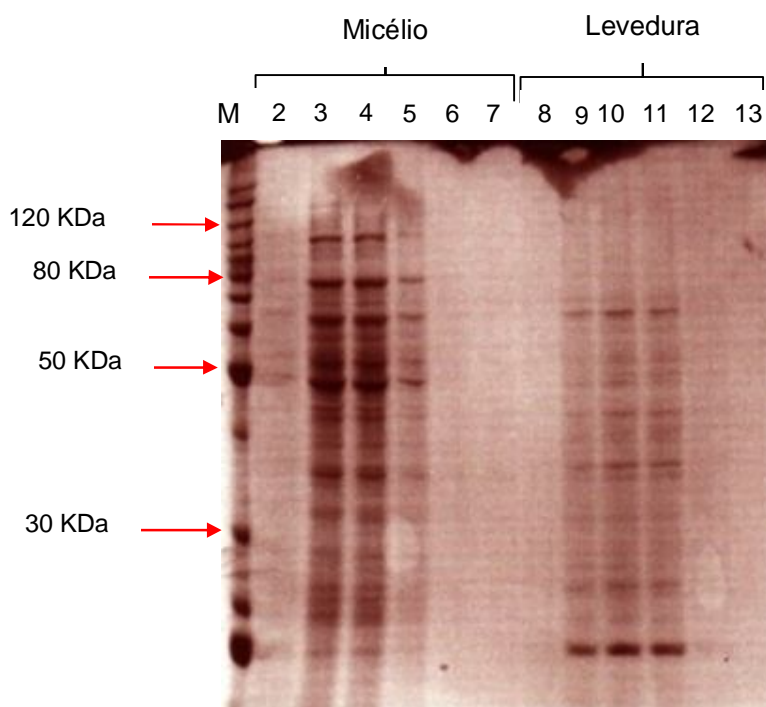


Figura 15 – Perfil eletroforético em SDS-PAGE (12%) das proteínas obtidas a partir da lise celular do fungo *P. brasiliensis* nas formas de micélio e levedura, corado com *Comassie Blue*. Marcador Bench Mark™ Protein Ladder (Invitrogen®). Poços 2 -13: frações de cromatografia em coluna de sepharose dos extratos de micélio (2-7) e levedura (8-13).

Na figura 15 pode-se observar um perfil protéico diferenciado das formas de micélio e levedura. Neste sentido, torna-se pertinente a análise da interação DNA-proteína com o extrato protéico das duas formas morfológicas de *P. brasiliensis*.

A confirmação da ligação de proteínas presentes no extrato total com o oligonucleotídeo utilizado como sonda foi obtida pelo ensaio de mobilidade eletroforética, conforme mostrado na figura 16.

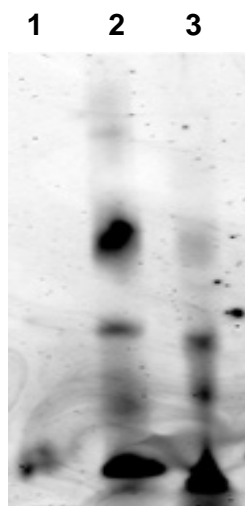


Figura 16 – Ensaio de Retardo de Mobilidade Eletroforética utilizando o extrato protéico das formas de micélio e levedura com a sonda desenhada para o promotor do gene *CHS4*. 1-Sonda livre; 2 – Sonda + Extrato protéico de micélio; 3 – Sonda + Extrato protéico de levedura.

De acordo com o resultado apresentado na figura 16 podemos observar o retardo eletroforético distinto entre as formas de micélio e levedura.

Com o intuito de otimizar o protocolo, fizemos a purificação da sonda para eliminar possíveis *backgrounds*. Para avaliar a especificidade das interações observadas acima, repetimos o experimento com competidor específico. Esse competidor é o próprio oligonucleotídeos em excesso molar de 50 X, não marcado com fluoresceína. O resultado pode ser observado na figura 17.

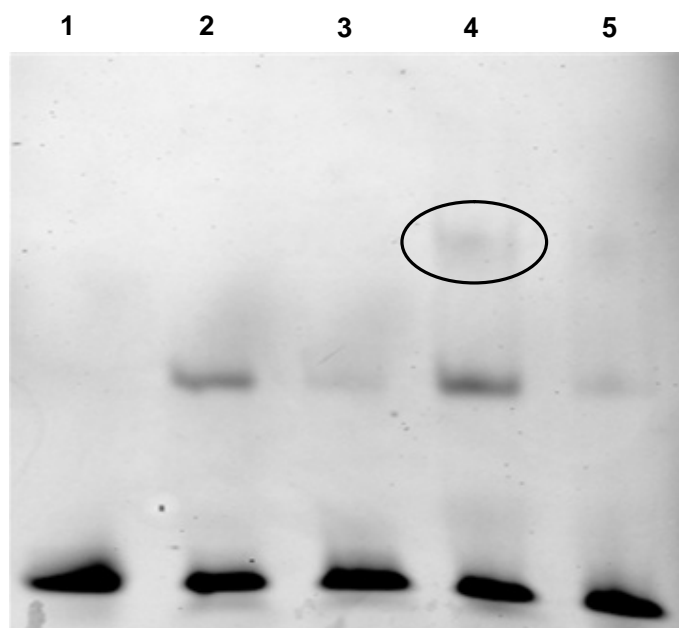


Figura 17 –Ensaio de Retardo de Mobilidade Eletroforética utilizando a sonda esquematizada na figura 14 e extrato protéico total das formas levedura e micélio. 1- Sonda livre; 2 – Sonda + Extrato protéico da forma de levedura; 3 – Sonda + Extrato protéico da forma de levedura + competidor específico; 4 – Sonda + Extrato protéico da forma de micélio; 5 – Sonda + Extrato protéico da forma de micélio + competidor específico. Em destaque encontra-se a banda diferencial.

Observamos na figura 17 que há um retardo de mobilidade eletroforética ocorrendo nas duas formas, e um segundo retardo micélio específico. Podemos afirmar que as interações observadas são específicas, visto que a intensidade das mesmas diminui na presença do competidor específico. Entretanto, não podemos concluir quais proteínas estão interagindo e em quais regiões da nossa sonda. Para isso, deve-se dar continuidade às pesquisas a fim de refinar os experimentos de retardo de mobilidade eletroforética, por exemplo, usando sondas cuja seqüência foi mutagenizada na possível região de interação com os fatores de transcrição.

A sonda utilizada para os experimentos de retardo de mobilidade eletroforética contém uma seqüência consenso ao sítio de ligação do fator de transcrição PacC. Esse fator de transcrição, descrito inicialmente em *A. nidulans*, constitui um sistema regulatório pelo pH ambiental (revisado por Denison, 2000). Em condições ácidas PacC é uma proteína com 72KDa (PacC⁷²), mas em condições neutras a alcalinas é processado por duas sucessivas clivagens proteolíticas. A primeira clivagem é dependente da transdução de sinal por pH e

remove aproximadamente 180 resíduos de aminoácidos da extremidade C-terminal, resultando em PacC⁵³. Desta via de transdução de sinal participam os produtos dos genes *pacC*, *palA*, *palB*, *palC*, *palF*, *palH* e *palI*. A segunda clivagem é independente do pH e é catalisada pelo proteossoma 26S e remove aproximadamente 245 resíduos de aminoácidos produzindo PacC²⁷, que possui a região de ligação dedo de zinco intacta. PacC²⁷ é repressor dos genes expressos em condições ácidas e ativador dos genes expressos sob condições alcalinas (revisado por Peñalva *et al.*, 2008).

Em estudos realizados em nosso laboratório por Aguiar (2006), analisando-se a expressão do gene *pacC* de *P. brasiliensis*, foi observado que o nível do transcrito *pacC* deste organismo é abundante tanto em condições de pH ácido quanto básico ou neutro, sendo possível que o controle da ativação desse fator transcricional ocorra em nível pós traducional. A proteína PacC possivelmente ficaria em uma conformação inativa em pH ácido mudando para uma forma ativa em pH neutro ou alcalino, como descrito para *A. nidulans* (Espeso *et al.*, 2000 revisado por Aguiar, 2006).

O experimento de retardo de mobilidade eletroforética realizado neste trabalho foi feito apenas com o extrato protéico total para analisar uma possível interação DNA-proteínas. Verificamos que há uma interação, mas não podemos ainda concluir qual é o sítio de ligação que está interagindo e com qual proteína. Entretanto com as informações apresentadas acima, há uma hipótese de que o sítio de ligação a PacC esteja ativo, uma vez que aparece um *shift* específico apenas na forma de micélio que apresenta os transcritos de *CHS4* em abundância.

Entretanto, para comprovar tal hipótese devemos refinar os experimentos de EMSA realizando-o somente com a proteína PacC isolada ou ainda mutagenizando as seqüência consenso aos sítios de ligação para obter dados de qual seqüência está envolvido na interação.

CONCLUSÃO

No presente trabalho analisamos um fragmento da região promotora do gene quitina sintase 4, da classe VII (*CHS4*) de *P. brasiliensis*. Ao analisarmos a atividade deste promotor por meio do gene repórter *lacZ* em transformantes crescendo em meio com fontes de carbono diversas, como frutose, galactose, glicerol, glicose e N-acetilglicosamina, observamos uma especificidade na regulação da expressão gênica pois só foi observada a atividade de *lacZ* em meio contendo N-acetilglicosamina, o monômero precursor de quitina. Em meio contendo glicose, a atividade não foi observada, nos permitindo inferir que as seqüências consenso ao fator de transcrição CreA presentes ao longo do fragmento do promotor analisado possam ser funcionais.

No que diz respeito à análise estrutural, podemos concluir que há uma interação de alguma proteína presente no extrato protéico total que ocorre em ambas as formas do fungo, e outra interação ocorrendo somente com o extrato protéico da forma de micélio. Provavelmente a ocorrência desta última interação está regulando a transcrição gênica, visto que altos níveis de transcritos *CHS4* são observados na forma de micélio de *P. brasiliensis* (Niño-Vega *et al.*, 2000).

Os dados obtidos neste trabalho iniciam um estudo pioneiro na caracterização estrutural e funcional de promotor de *P. brasiliensis*. Juntamente com futuras pesquisas, o presente trabalho poderá determinar os fatores transcricionais e condições de cultivo que regulam o processo de transcrição do gene *CHS4* de *P. brasiliensis*. Por se tratar de um gene cujo produto está envolvido na síntese de um dos componentes da parede celular, estrutura ausente em células de mamíferos, é de grande importância a continuidade das pesquisas para futuras formas de combate a doença.

PERSPECTIVAS

- Avaliar a expressão do gene repórter *lacZ* em diferentes formas de cultivo, como choque osmótico e alteração de pH, visando observar o comportamento do gene *CHS4* nas condições ambientais das células do hospedeiro em que o patógeno sobrevive, particularmente os macrófagos.
- Realizar estudos quantitativos da atividade do gene *lacZ* em meio líquido de modo a comparar acuradamente o efeito de diferentes condições de cultivo (fonte de carbono e pH) sobre a função do promotor do gene de *CHS4*.
- Avaliar qual é o sítio de ligação presente na sonda está interagindo com proteínas do extrato protéico total em ambas as formas, assim como aquele que interage exclusivamente com micélio. Para isso, pode-se proceder de duas formas. Uma delas é utilizar a proteína recombinante que possa ser nosso alvo. Outra forma é a mutagenização da sonda de várias formas diferentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arst, Jr, H. N. and Scazzocchio, C.** Formal genetics and molecular biology of the control of gene expression in *Aspergillus nidulans*. In: Gene manipulations in fungi. Bennett, J. W. & Lasure, L. L. (eds). New York, Academic Press, pp. 309-343, 1985.
- Alberts, B. Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts K. and Watson, J.D.** (2008) Molecular biology of the cell. 5th ed. Published by Garland Science. New York.
- Aguiar, S.M.** (2006) Análise estrutural e de expressão do gene *pacC* de *Paracoccidioides brasiliensis*. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília
- Aristizabal, B.H., Clemons, K.V., Stevens, D.A. and Restrepo, A.** (1998) Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: in vivo inhibition in females. *Infection and immunity* **66 (11)**: 5587-5591
- Beauvais, A., Bruneau, J.M., Mol, P.C., Buitrago, M.J., Legrand, R. and Latgé, J.P** (2001) Glucan synthase complex of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of bacteriology*, apr. 2001, 2273-2279
- Beyer, A., Hollunder, J., Nasheuer, H.P. and Wilhelm, T.** (2004) Post-transcriptional expression regulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* on a genomic scale. *Molecular and cellular proteomics* **23**: 1083-1092
- Birren, B., Fink, G. and Lander, E.** (2003) A white paper for fungal comparative genome. Submitted by The Fungal Genome Initiative Steering Committee
- Borges-Walmsley, M.I., Chen, D., Shu, X. and Walmsley, A.R.** (2002) The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends in microbiology* **10 (2)**: 80-87
- Borgia, P.T. and Dodge, C.L.** (1992) Characterization of *Aspergillus nidulans* mutants deficient in cell wall chitin or glucan. *J. Bacteriol.* **174 (2)**: 377-383

- Bowen, A., Chen-Wu, J., Momamy, M., Young, R., Szaniszlo, P. and Robbins, P.W.** (1992) Classification of fungal chitin synthases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 519-523 IN Niño-Vega *et al.*, 2004.
- Brummer, E., Hanson, L.H., Restrepo, A. and Stevens, D.A.** (1989) Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. *Infection and immunity* Aug. 2289-2294
- Bulawa, C.E.** (1993) Genetics and molecular biology of chitin synthesis in fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**: 505-534
- Bulawa, C.E.** (1992) CSD2, CSD3 and CSD4 genes required for chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the CSD2 gene product is related to chitin synthases and to developmentally regulated proteins in *Rhizobium* species and *Xenopus laevis*. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 1764-1776
- Bulik, D.A., Olczak, M., Lucero, H.A., Osmond, B.A., Robbins, P.W. and Specht, C.A.** (2003) Chitin Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* in response to supplementation of growth medium with glucosamine and cell wall stress. *Eukaryotic Cell* **2** (5): 886-900
- Cabib, E.** (1972) Chitin synthase system from yeast. *Methods Enzymol.* **28**: 572-580 IN Bulik *et al.*, 2003
- Chigira, Y., Abe, K., Gomi, K. and Nakajima, T.** (2002) *CHSZ*, a gene for a novel class of chitin synthase from *Aspergillus oryzae*. *Curr. Genet.*, **41**: 261-267
- Choi, W.J., Santos, B., Duran, A. and Cabib, E.** (1994) Are yeast chitin synthase regulated at the transcriptional or the posttranslational level? *Molecular and Cellular Biology* Dec. 7685-7694.
- Coutinho, Z.F., da Silva, D., Lazéra, M., Petri, V., Oliveira, R.M., Sabroza, P.C. and Wanke, B.** (2002) Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro* **18** (5): 1441-1454
- Davepont, K.R., Sohaskey, M., Kamada, Y., Levin, D.E. and Gustin, M.C.** (1995) A second osmosensing signal transduction pathway in yeast. *J. Biol. Chem.* **270**: 30157 - 30161

- Davies, G. T.; and Hynes, M. J.** Regulatory circuits in *Aspergillus nidulans*. In: More gene manipulations in fungi. Bennet, J. W. & Lasure, L. L. (eds). San Diego, Academic Press, pp. 151 - 189, 1991.
- Denison, S.H.** (2000) pH regulation of gene expression in fungi. *Fungal Genetics and Biology* **29**: 61-71
- Derengowski, L.S.** (2006). Análise da expressão gênica de potenciais fatores de virulência do fungo *Paracoccidioides brasiliensis* submetido a diferentes condições experimentais. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília.
- Espeso, E.A., Roncal, T., Diéz, E., Rainbow, L. and Bignell, E.** (2000) On how a transcription factor can avoid its proteolytic activation in the absence of signal transduction. *EMBO J.* **19**: 719-728
- Falkow, S.** (2004) Molecular Koch's postulates applied to bacterial pathogenicity – a personal recollection 15 years later. *Nature Reviews Microbiology* **2**: 67-72
- Falkow, S.** (1988) Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity. *Rev. Infect. Dis. Suppl.* **2**:S274-276
- Felipe, M.S., Andrade, R.V., Arraes, F.B.M., Nicola, A.M., Maranhão, A.Q., Torres, F.A.G., Silva-Pereira, I., Fonseca, M.J.P., Campos, E.G., Moraes, L.M.P., Andrade, P.A., Tavares, A.H.F.P., Siva, S.S., Kyaw, C.M., Souza, D.P., Pereira, M., Jesuíno, R.S.A., Andrade, E.V., Parente, J.A., Oliveira, G.S., Barbosa, M.S., Martins, N.F., Fachin, A.S., Cardoso, R.S., Passos, G.A.S., Almeida, N.F., Walter, M.A.M.T., Soares, C.M.A., Carvalho, M.J.A and Brígido, M.M.** (2005) Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *Journal of biological chemistry* **280** (26): 24706-24714
- Finlay, B.B. and Falkow, S.** (1997). Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 136-169. IN Tavares et al., 2005
- Geiser, D.M., Gueidan, C., Miadlikowska, J., Lutzoni, F., Kauff, F., Hofstetter, V., Fraker, E., Schoch, C.L., Tibell, L., Untereiner, W.A. and Aptroot, A.** (2006) Eurotiomycetes: Eurotiomycetidae and Chaetothyriomycetidae. *Mycologia* **98** (6): 1053-1064

- Goldman, G.H., Marques, E.R., Ribeiro, D.C.D., Bernardes, L.A.S., Quiapin, A.C., Vitorelli, P.M., Savoldi, M., Semighini, C.P., Oliveira, R.C., Nunes, L.R., Travassos, L.R., Puccia, R., Batista, W.L., Ferreira, L.E., Moreira, J.C., Bogossian, A.P., Tekaia, F., Nobrega, M.P., Nobrega, F.G. and Goldman, M.H.S.** (2003). Expressed sequence tag analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence and pathogenicity genes. *Eukar. Cell*, **2**:34–48.
- van Gorcom, R.F.M., Punt, P.J., Pouwels, P.H. and van den Hondel, C.A.M.J.J.** (1986) A system for the analysis of expression signals in *Aspergillus*. *Gene* **48**: 211-217
- Greenbaum, D., Colangelo, C., Williams, K. and Gerstein, M.** (2003) Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biology* **4**: 117
- Guarro, J., Gené, J. and Stchigel, A.M.** (1999). Developments in fungal taxonomy. *Clin. Microbiol. Rev.*, **12**(3): 454-500.
- Guzmán, R.A.** Micología Médica ilustrada. Segunda Edición. Ed. McGraw-Hill – Interamericana de España, 2003.
- Heintzman, N.D. and Ren, B.** (2007) The gateway to transcription: identifying, characterizing and understanding promoters in the eukaryotic genome. Review. *Cell. Mol. Life Sci.* **64** 386-400
- Ilyés, H., Fekete, E., Karaffa, L., Fekete, E., Sandór, E., Szentirmai, A. and Kubicek, C.P.** (2004) Cre-A mediated carbon catabolite repression of β – galactosidase formation in *Aspergillus nidulans* is growth rate dependent. *FEMS Microbiology Letter* **235**: 147-151
- Jung, U.S. and Levin, D.E.** (1999) Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signaling pathway. *Molecular Microbiology* **34** (5): 1049-1057

- Kamada, Y., Jung, U.S., Piotrowski, J. and Levin, D.E.** (1995) The protein kinase C activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response. *Genes* **9**: 1559-1571
- Klein, B.S. and Tebbets, B.** (2007) Dimorphism and virulence in fungi. *Current opinion in microbiology* **10**: 1-6
- Lagorce, A., Le Berre-Anton, V., Aguilar-Uscanga, B., Martin-Yken, H., Dagkessamanskaia, A. and François, J.** (2002) Involvement of *GFAI*, which encodes glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase, in the activation of chitin synthesis pathway in response to cell wall defects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **269**: 1697-1707
- Laniel, M.A., Béliveau, A. and Guérin, S.L.** (2001) In **Moss, T.** DNA-protein interactions: principles and protocols. 2nd ed. Human Press Inc. New Jersey.
- Latgé, J.P.** (2007) The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. Micro review. *Molecular Microbiology*, **66** (2):279-290
- Lewin, B.** (2008) Genes XII. 11 th ed. Ed. Jones and Bartlett Publishers. Canada.
- Lin, C.J. and Barbosa, A.S.** (2002) Técnica de análise da regulação da transcrição gênica e suas aplicações na endocrinologia molecular. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* **46**: 330-340
- Lorenz, M.C. and Fink, G.R.** (2002). Life and death in a macrophage: role of the glyoxylate cycle in virulence. *Eukaryotic Cell*. **1**: 657-662
- Martín-Urdíroz, M., Roncero, M.I.G., González-Reyes, J.A. and Ruiz-Roldán, C.** (2008) ChsVb, a Class VII Chitin Synthase Involved in Septation, Is Critical for Pathogenicity in *Fusarium oxysporum*. *Eukaryotic Cell*, Jan. 2008, 112-121
- Marques, A.** (2003) Paracoccidioidomicose: atualização epidemiológica, clínica e terapêutica. *An. Bras. Dermatol.* Rio de Janeiro **78** (2): 135-150

- McEwen, J.G., Bedoya, V., Patino, M.M., Salazar, M.E. and Restrepo, A.** (1987) Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by inhalation of conidia. Em Brummer *et al.*, 1989
- Mellado, E., Dubreucq, G., Mol, P., Sarfati, J., Paris, S., Diaquin, M., Holden, D.W., Rodriguez-Tudela, J.L. and Latgé, J.P.** (2003) Cell wall biogenesis in a double chitin synthase mutant (chsG⁻/chsE⁻) of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genetics and Biology* **38**: 98–109
- Naif, R.D., Ferreira, L.C.L. and Barret, T.V** (1986) Paracoccidioidomicose em tatus (*Dasypus novemcinctus*) no Estado do Pará. *Ins. Med. Trop. São Paulo* **28** (1):19-27
- Em Marques, A. (2003) Paracoccidioidomicose: atualização epidemiológica, clínica e terapêutica. *An. Bras. Dermatol.*Rio de Janeiro **78** (2): 135-150
- Niño-Vega, G.A., Carrero, L. and San-Blas, G.** (2004) Isolation of the CHS4 gene of *Paracoccidioides brasiliensis* and its accommodation in a new class of chitin synthases. *Medical Micology*, **42**: 51-57
- Niño-Vega, G.A., Munro, C.A., San-Blas, G., Gooday, G.W. and Gow, N.A.R.** (2000) Differential expression of chitin synthase genes during temperature-induced dimorphic transitions in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Medical Micology* **38**: 31-39
- Niño-Vega, G.A., Buurman, E.T., Goodau, G.W., San-Blas, G. and Gow, N.A.R.** (1998) Molecular cloning and sequencing of chitin synthase gene (CHS2) of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast*, **14**: 181-187.
- Peñalva, M.A., Tilburn, J., Bignell, E. and Arst, H.N.Jr.** (2008) Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. *Trends Microbiol.* **16** (6): 291-300 Review
- Poças-Fonseca, M.J., Mello-de-Sousa, T.M. and Aguari, S.M.** (2008) pH related transcriptional regulation of lignocellulolytic enzymes and virulence factors gene in fungi. IN Current Advances in Molecular Mycology. ISBN 978-1-60456-909-4 Editors: Y. Gherbawy, R. L. Mach and M. Rai Nova Science Publishers, Inc.

- Poças-Fonseca, M.J.** (2000). Regulação da expressão dos genes de celobiohidrolase de *Humicola grisea* var. *thermoidea*. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília.
- Punt, P.J., Dingemanse, M.A., Kuyvenhoven, A., Soede, R.D.M., Pouwels, P.H. and van den Hondel, C.A.M.J.J.** (1990) Functional elements in the promoter region of the *Aspergillus nidulans gdpA* gene encoding glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase. *Gene* **93**: 101-109
- Queiroz-Telles, F.** Paracoccidioides brasiliensis ultrastructural findings. Capítulo 3 In Del Negro, G., Lacaz, C.S., Franco, M., Restrepo-Moreno, A. (1994) Paracoccidioidomycosis. CRC Press, Inc. Florida-USA Em da Silva Júnior, J.M.C.(2002) Caracterização do cDNA M51, diferencialmente expresso na forma miceliana de *Paracoccidioides brasiliensis*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biologia da Universidade de Brasília.
- Rappleye, C.A. and Goldman, W.E.** (2006) Defining virulence genes in the dimorphic fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**: 281-303
- Restrepo, A., Salazar, M.E., Cano, L.E., Stover, E.P., Feldman, D. and Stevens, D.A.** (1984) Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect Immun.* **46** (2): 346-353
- Ricci, G., Mota, F.T., Wakamatsu, A., Serafim, R.C., Borra, R.C. and Franco, M.** (2004) Canine paracoccidioidomycosis. *Med. Mycol.* **42** (4): 379-383
- Roncero, C.** (2002) The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. Review. *Curr. Genet.* **41**: 367-378
- Ruijter, G.J.G. and Visser, J.** (1997) Carbon repression in *Aspergilli*. *FEMS Microbiology Letter* **151**: 103-114
- Ruiz-Herrera, J., González-Prieto, J.M. and Ruiz-Medrano, R.** (2002) Evolution and phylogenetic relationships of chitin synthases from yeast and fungi. *FEMS Yeast Res.* **1**: 247-256 IN Niño-Vega *et al.*, 2004.

- Sandhale, P., Verma, J. and Naorem, A.** (2007) Basal transcription machinery: role in regulation of stress response in eukaryotes. *J. Biosci.* **32(3)**: 569-578.
- Sambrook, J. and Russel, D.W.** (2001) *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*. 3th ed. Cold Spring Harbor, New York
- San-Blas, G.** (1993) Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* **31** 99-113
- San-Blas, G. and Niño-Vega, G.** (2001). *Paracoccidioides brasiliensis*: Virulence and Host Response. Em: Cihlar R.L., Calderone R. A., eds. *Fungal Pathogenesis Principles and Clinical Applications*. pp. 205-226. Marcel Dekker. New York.
- San-Blas, G., Niño-Vega, G. and Iturriaga, T.** (2002) *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Medical Mycology* **40**, 225-242.
- Sburlati, A. and Cabib, E.** (1986) Chitin synthase 2, a presumptive participant in septum formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **261**: 15147-15152
- Silva, S., Tavares, A.H.F.P., Passos-Silva, D.G., Fachin, A.L., Teixeira, S.M.R., Soares, C.M.A., Carvalho, M.J.A., Bocca, A.L., Silva-Pereira, I., Passos, G.A.S. and Felipe, M.S.S.** (2008) Transcriptional response of murine macrophages upon infection with opsonized *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. *Microbes and Infection* **10** (1): 12-20
- Silva Júnior, J.M.C. da.** (2000) Caracterização do cDNA M51, diferencialmente expresso na forma miceliana de *Paracoccidioides brasiliensis*. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) Instituto de Biologia da Universidade de Brasília.
- Smale, S.T. and Kadonaga, J.T.** (2003) The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev. Biochem.* **72**: 449-479
- Takeshita, N., Yamashita, S., Ohta, A. and Horiuchi, H.** (2006) *Aspergillus nidulans* class V and VI chitin synthases CsmA and CsmB, each with a myosin motor-like domain, perform compensatory functions that are essential for hyphal tip growth. *Molecular Microbiology* **59**: 1380-1394.

- Takeshita, N., Yamashita, S., Ohta, A. and Horiuchi, H.** (2002) *csmA*, a gene encoding a class V chitin synthase with a myosin motor like domain of *Aspergillus nidulans* is translated as a single polypeptide and regulated in response to osmotic conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **298**: 103-109.
- Tavares, A.H.F.P., Silva, S.S., Dantas, A., Campos, E.G., Andrade, R.V., Maranhão, A.Q., Brígido, M.M., Passos-Silva, D.G., Fachin, A.L., Teixeira, S.M.R., Passos, G.A.S., Soares, C.M.A., Bocca, A.L., Carvalho, M.J.A., Silva-Pereira, I. and Felipe, M.S.S.** (2007) Early transcriptional response of *Paracoccidioides brasiliensis* upon internalization by murino macrophages. *Microbes and Infection* **9**: 583-590.
- Tavares, A.H., Silva, S.S., Bernardes, V.V., Maranhão, A.Q., Kyaw, C.M., Poças-Fonseca, M. and Silva-Pereira, I.** (2005) Virulence insights from the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome. *Genetics and Molecular Research.* **4 (2)**: 358-371
- Tilburn, J., Scazzocchio, C., Taylor, G.G., Zabicky-Zissman, J.H., Lockington, R.A. and Davies, R.W.** (1983) Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **26**: 205-221
- Tomazett, P.K., Cruz, A.H.S., Bonfim, S.M.R.C., Soares, C.M.A. and Pereira, M.** (2005) The cell wall of *Paracoccidioides brasiliensis*: insights from its transcriptome. *Genet. Mol. Res.* **4 (2)**: 309-325.
- Valdivieso, M.H., Mol. P.C., Shaw, J.A., Cabib, E. and Duran, A.** (1991) *CAL1*, a gene required for activity of chitin synthase 3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Biol.* **114**: 101-109
- West, R.W., Yocum, R.R.Jr. and Ptashne, M.** (1984) *Saccharomyces cerevisiae* GAL1-GAL10 divergent promoter region location and function of the upstream activating sequence UASG. *Mel. Cell. Biol.* **4 (11)**: 2467-2478