

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

**Análise Estrutural e de
Expressão do Gene *pacC* de
*Paracoccidioides brasiliensis***

Sérgio Martin Aguiar

**Brasília
2006**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**Análise Estrutural e de
Expressão do Gene *pacC* de
*Paracoccidioides brasiliensis***

Sérgio Martin Aguiar

Orientação: Prof. Dr. Marcio Jose Poças Fonseca

Dissertação apresentada ao
Departamento de Biologia
Celular do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade de
Brasília, como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em
Biologia Molecular.

**Brasília
2006**

Banca examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Fabrícia Paula de Faria – Universidade Federal de Goiás

Prof^ª. Dr^ª. Ildinete Silva Pereira – UnB/CEL

Prof. Dr. Marcio José Poças Fonseca – UnB/GEM

Prof^ª. Dr^ª. Andréa Queiroz Maranhão – UnB/CEL (Suplente)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, meu guia e salvador, sem o qual não poderia alcançar tantas vitórias na vida.

Aos meus pais, pelo apoio, carinho e dedicação. Sem vocês nunca teria chegado até aqui. À Taissa, eterna companheira, pela compreensão e ajuda nos momentos difíceis e pelo amor e carinho que recebo. Amo todos vocês.

Ao orientador e amigo Marcio que concordou em me orientar, mesmo sem me conhecer bem a princípio, e teve bastante paciência e compreensão para as dificuldades que passei nesses últimos anos. Obrigado pelo apoio e ensinamentos. Eles foram essenciais em minha jornada profissional.

À professora Sueli, pela colaboração e por disponibilizar a infraestrutura do Projeto Genoma Pb.

À professora Ildinete, pelos ensinamentos, tanto na parte experimental quanto na qualificação. Ainda agradeço pelo aceite em compor a minha banca.

À professora Andréa, pelas várias vezes que pacientemente ensinou-me vários procedimentos experimentais. Ao professor Marcelo, por se dispor a ajudar nas análises de bioinformática.

Aos demais professores da BioMol, Elida, Marco, Lídia e Fernando, que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

À professora Fabricia, pelo aceite em compor minha banca.

Aos companheiros de trabalho e amigos do Lab3. À Lorena, pela sua essencial ajuda nos experimentos de expressão; ao Luciano, pela paciência em me ensinar as análises

de bioinformática; ao Thiago e ao Marciano, pelas conversas, amizade e companherismo; à Carine, grande amiga. Ainda gostaria de agradecer à companhia dos demais colegas de Lab. Luciana, Mariana, Oscar Junior, Plínio, Antônio Leonardo e Leandro.

À grande companheira de bancada Nádia, que me agüentou durante quase um ano de experimentos.

À Camila, que se dispôs a me ajudar nas eletroforeses em gel de poliacrilamida dos experimentos de expressão.

Aos demais colegas e amigos do laboratório de Biologia Molecular: Alê Dantas, Saulo, Gaúcho, Cecília, Pedro, Alex, Flava, Chrisinha, Patty Lu, Túlio, Mauro, Fabrício, Hernandez, Vanilce, Aldo, Gina, Patty Vet, Izabel, Hugo, Rose, Marcus, Loise, Patty Girl, Simoneide, André, Larissa, Vera, Luanne, João Ricardo, Livônios, Janice, Gabriela, Carolina, Viviane, David, Tiago, Cristiano. Obrigado pelo companheirismo e ajuda.

À Fátima e à Dona Ivanilde, pela amizade e trabalho essencial ao funcionamento do laboratório.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| ÍNDICE DE FIGURAS | vii |
| ÍNDICE DE TABELAS | xi |
| RESUMO | xii |
| ABSTRACT | xiii |
| ABREVIATURAS | xiv |
| INTRODUÇÃO | 1 |
| 1. O FATOR TRANSCRICIONAL PacC | 4 |
| 2. ATIVAÇÃO FUNCIONAL DA PROTEÍNA PacC | 7 |
| 3. O MECANISMO DE AÇÃO DE PacC | 10 |
| 4. VIA DE TRANSDUÇÃO DE SINAL ATIVADA PELO pH AMBIENTAL | 11 |
| 5. GENES REGULADOS POR pH | 14 |
| 5. O FUNGO <i>P. brasiliensis</i> E A PARACOCCIDIOIDOMICOSE | 15 |
| 6. O FATOR TRANSCRICIONAL PacC E A PATOGÊNESE FÚNGICA | 20 |
| OBJETIVOS | 23 |
| MATERIAL | 25 |
| 1. MEIOS DE CULTURA | 26 |
| 2. ANTIBIÓTICOS | 28 |
| 3. SOLUÇÕES-TAMPÃO | 29 |
| 4. SOLUÇÕES | 30 |
| 5. ENZIMAS E RESPECTIVOS TAMPÕES | 33 |
| 6. LINHAGENS DE <i>Escherichia coli</i> | 37 |
| 7. OLIGONUCLEOTÍDEOS SINTÉTICOS | 38 |
| 8. MARCADORES DE MASSA MOLECULAR PARA DNA | 38 |
| 9. PLASMÍDEOS | 39 |
| 10. KITS COMERCIAIS UTILIZADOS | 39 |
| MÉTODOS | 42 |
| 1. PREPARO DAS CÉLULAS DE <i>E. coli</i> P2 392 PARA INFECÇÃO COM BACTERIÓFAGO LAMBDA – CÉLULAS COMPETENTES | 43 |
| 2. PROPAGAÇÃO E EXTRAÇÃO DE DNA DE FAGO LAMBDA | 44 |
| 3. IDENTIFICAÇÃO, ISOLAMENTO E CLONAGEM DOS FRAGMENTOS DO GENE <i>pacC</i> DE <i>P. brasiliensis</i> | 45 |
| 4. DIGESTÃO DE DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO | 46 |
| 5. ELETROFORESE DE ÁCIDOS NUCLÉICOS EM GEL DE AGAROSE | 46 |
| 6. PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTO DE DNA EM GEL DE AGAROSE | 47 |
| 7. CLONAGENS NOS VETORES pTZ19U E pGEM-T EASY | 47 |
| 8. TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS DE <i>E. coli</i> | 48 |
| 8.1 Choque térmico com $CaCl_2$ | 48 |
| 8.2 Eletroporação | 49 |
| 9. PREPARAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL EM PEQUENA ESCALA | 50 |
| 10. QUANTIFICAÇÃO DE AMOSTRAS DE ÁCIDOS NUCLÉICOS | 51 |
| 11. SEQÜENCIAMENTO DE DNA | 51 |
| 12. ESTRATÉGIA DE SEQÜENCIAMENTO DO GENE <i>pacC</i> DE <i>P. brasiliensis</i> | 52 |
| 12.1 Estratégia de Shot-Gun | 52 |
| 12.2 Seqüenciamento da Sonda | 53 |
| 12.3 Seqüenciamento dos Gaps da Seqüência de <i>pacC</i> de <i>P. brasiliensis</i> | 54 |
| 13. ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DA SEQÜÊNCIA COMPLETA DO GENE <i>pacC</i> DE <i>P. brasiliensis</i> | 55 |

| | |
|---|------------|
| 14. ANÁLISE DE EXPRESSÃO DO GENE <i>pacC</i> DE <i>P. brasiliensis</i> | 56 |
| 14.1 <i>Condição de manutenção e cultivo do fungo P. brasiliensis</i> | 56 |
| 14.2 <i>Condição de pré-cultivo do fungo P. brasiliensis</i> | 56 |
| 14.3 <i>Cultivo do fungo P. brasiliensis para obtenção de RNA total</i> | 57 |
| 14.4 <i>Extração de RNA total de P. brasiliensis</i> | 57 |
| 14.5 <i>Tratamento do RNA total com DNase I livre de RNases</i> | 58 |
| 14.6 <i>Transcrição Reversa acoplada a Reação de Polimerização em Cadeia (RT-PCR)</i> | 59 |
| 14.7 <i>Eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante 10%</i> | 60 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO | 62 |
| 1. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS FAGOS RECOMBINANTES CONTENDO SEQÜÊNCIAS DE DNA DE <i>P. brasiliensis</i> HOMÓLOGAS AO GENE <i>pacC</i> | 63 |
| 2. SEQÜENCIAMENTOS DAS EXTREMIDADES DOS FRAGMENTOS DE DNA ISOLADOS DA BIBLIOTECA DE <i>P. brasiliensis</i> | 69 |
| 3. OBTENÇÃO DA SEQÜÊNCIA COMPLETA DO GENE <i>pacC</i> DE <i>P. brasiliensis</i> | 71 |
| 3.1 <i>Estratégia de Shot-Gun</i> | 71 |
| 3.2 <i>Seqüenciamento da Sonda</i> | 76 |
| 3.3 <i>Seqüenciamento dos Gaps da Seqüência de <i>pacC</i> de <i>P. brasiliensis</i></i> | 77 |
| 4. ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DA SEQÜÊNCIA COMPLETA DE <i>pacC</i> DE <i>P. brasiliensis</i> | 80 |
| 5. ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE <i>pacC</i> EM <i>P. brasiliensis</i> | 91 |
| CONCLUSÕES | 97 |
| PERSPECTIVAS | 99 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 101 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|-----------|
| Figura 1: Modelo de regulação por pH. | 4 |
| Figura 2: Regiões conservadas de PacC. | 7 |
| Figura 3: Interação entre domínios de PacC. | 9 |
| Figura 4: Características estruturais relevantes de PacC. | 10 |
| Figura 5: Especificidade de ligação de PacC ao DNA. | 12 |
| Figura 6: Papel proposto para as diferentes proteínas Pal na ativação de PacC. | 13 |
| Figura 7: Representação esquemática do mapa físico do vetor para clonagem de produto de PCR pGEM [®] -T Easy (Promega). | 40 |
| Figura 8. Representação esquemática do mapa físico do vetor para clonagem de fragmentos de digestões de DNA pTZ19R. | 41 |
| Figura 9: Análise eletroforética em gel de agarose 0,8 %, corado com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL, de produtos de digestão com endonucleases de restrição, do DNA de fagos recombinantes. | 64 |
| Figura 10: Análise radiográfica correspondente à eletroforese da figura 5 após experimento de <i>Southern blot</i> . | 65 |

- Figura 11:** Análise eletroforética em gel de agarose 0,8 %, corado com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL, de produtos de digestão com endonucleases de restrição, do DNA do clone recombinante 7. **66**
- Figura 12:** Análise auto-radiográfica correspondente à eletroforese da figura 7, após experimento de *Southern blot*. **66**
- Figura 13:** Identificação dos sítios de clivagem para endonucleases de restrição presentes na extremidade dos fragmentos selecionados para subclonagem. Análise eletroforética em gel de agarose 0,8 %, corado com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL, de produtos de digestão com endonucleases de restrição do DNA dos clones 2 e 5. **68**
- Figura 14:** Análise Eletroforética em gel de agarose 0,8 %, corado com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL, de plasmídeos recombinantes contendo fragmentos do gene *pacC* putativo de *P. brasiliensis*. **69**
- Figura 15:** Esquema demonstrativo da região de alinhamento das seqüências parciais de *pacC* de *P. brasiliensis* com a seqüência do gene de *pacC* de *T. rubrum*. **70**
- Figura 16:** Análise eletroforética em gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL do perfil de restrição do clone *pac1Pb*. **72**

- Figura 17:** Análise eletroforética em gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL do perfil de restrição do clone pac8Pb. 73
- Figura 18:** Análise eletroforética em gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL confirmando a clonagem dos fragmentos de pac1Pb digerido com *Pst* I. 74
- Figura 19:** Análise eletroforética em gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL confirmando a clonagem dos fragmentos de pac1Pb digeridos com *Sal* I. 75
- Figura 20:** Análise eletroforética em gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL confirmando a clonagem dos fragmentos de pac1Pb digerido com *Xba* I / *Hind* III. 75
- Figura 21:** Seqüência do gene *pacC* de *P. brasiliensis* (*pacC/Pb*). 79
- Figura 22:** Seqüências protéicas de traduções *in silico* de *pacCPb*. 83
- Figura 23:** Alinhamento parcial da porção n-terminal de seqüências de PacC predito de *P. brasiliensis* com PacC de *T. rubrum*. 84
- Figura 24:** Alinhamento parcial entre as de seqüências PacC preditas de *P. brasiliensis* e proteínas PacC de outros organismos. 87

- Figura 25:** Gráfico de valores de pH da cultura por tempo de crescimento de *P. brasiliensis*. 92
- Figura 26:** Análise eletroforética em gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL dos produtos de RT-PCR de amostras de RNA total de *P. brasiliensis* crescido em diferentes valores de pH e tempos. 94
- Figura 27:** Análise eletroforética em gel de poliacrilamida 10 % corado com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL dos produtos de RT-PCR a partir de RNA total de *P. brasiliensis* crescido em pH 7 por 5h. 96

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|---|-----------|
| Tabela 1: Oligonucleotídeos sintéticos utilizados nesse trabalho. | 38 |
| Tabela 2: Identidade da seqüência <i>pacCPb</i> com seqüências de genes <i>pacC</i> de outros fungos. | 80 |
| Tabela 3: Identidade das seqüências protéicas preditas de <i>pacCPb</i> com seqüências de proteínas PacC de outros fungos. | 89 |

RESUMO

O pH ambiental desempenha um papel importante na fisiologia de inúmeros microrganismos, determinando níveis de transcrição de genes cujos produtos funcionam na fronteira celular ou em seu exterior. Na adaptação de *Aspergillus nidulans* a diferentes valores de pH o fator transcricional PacC tem um papel importante, sendo ativado por uma via de transdução de sinal em resposta a pH neutro/básico. Homólogos ao gene *pacC* foram isolados em diversos outros fungos. Em fungos como a *Candida albicans* e *Fusarium oxysporum*, foi demonstrado que PacC está envolvido em mecanismos de patogenicidade. *Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo dimórfico, endêmico na América Latina, podendo provocar severa micose sistêmica em humanos.

No presente trabalho foi isolado e seqüenciado um gene de *P. brasiliensis* ortólogo ao *pacC* de *A. nidulans*. A seqüência obtida foi avaliada, *in silico*, quanto a sua organização estrutural. O gene apresenta 2837 nucleotídeos e quatro íntrons. A proteína predita é composta de 676 resíduos de aminoácidos, possuindo massa molecular de aproximadamente 72,4 kDa. Foi demonstrado que a proteína predita a partir do gene em estudo possui regiões conservadas presentes na maioria das seqüências orólogas já descritas na literatura científica, apresentando maior identidade com a proteína de *Trichophyton rubrum* (50,2%). O perfil de expressão do gene *pacC* após crescimento de *P. brasiliensis* em meios de cultura com pH ácido, neutro e básico, revelou a presença do transcrito nas três condições de cultivo., por meio de experimento de RT-PCR.

ABSTRACT

Environmental pH is important for several microorganisms' physiology, intervening at the transcriptional level of gene products which act at the cellular surface or outside the cell. In the ascomycete *Aspergillus nidulans*, cellular adaptation to different pH values is provided by the PacC transcriptional factor, which is activated by a signal transduction pathway triggered by neutral or basic pH. Homologues to the *pacC* gene were isolated from different fungi. In *Candida albicans* and *Fusarium oxysporum*, the PacC factor is related to pathogenicity mechanisms. *Paracoccidioides brasiliensis* is a dimorphic fungus, endemic in Latin America, and cause a severe systemic mycosis in humans.

In this work, a *P. brasiliensis* gene, homologous to *A. nidulans pacC*, was isolated and sequenced. DNA sequence was evaluated, *in silico*, concerning its structural organization. *P. brasiliensis pacC* gene presents 2937 nucleotides and four introns. The predicted protein is composed of 676 amino acid residues, with a molecular mass of 72.4 kDa. The putative PacC protein presents motifs conserved in the majority of the published homologous sequences. The highest identity is with *Trichophyton rubrum* PacC (50.2%). Expression analyses of *P. brasiliensis pacC* gene, after fungal growth in acidic, neutral and alkaline pH, demonstrated that it is transcribed in all the conditions assayed.

ABREVIATURAS

| | |
|------------|--|
| BSA | -Albumina sérica bovina |
| ° C | -Graus Celsius |
| cDNA | -Ácido desoxirribonucléico complementar |
| cm | -Centímetro |
| C-terminal | -Extremidade cabóxi-terminal |
| DEPC | -Dietil-pirocarbonato |
| DNA | -Ácido desoxirribonucléico |
| DNase | -Desoxirribonuclease |
| dNTP | -Desoxirribonucleotídeo trifosfato |
| DTT | -Ditiotreitol |
| EDTA | -Ácido etilenoaminotetracético |
| g | -Grama |
| <i>g</i> | -Velocidade de sedimentação em unidade gravitacional |
| h | -Hora |
| IPTG | -Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo |
| kb | -Kilobase |
| kDa | -Kilodalton |
| kV | -Kilovolt |
| L | -Litro |
| M | -Molar |
| Mb | -Mega base |

| | |
|------------|--|
| mA | -Miliampere |
| mg | -Miligrama |
| min | -Minuto |
| mL | -Mililitro |
| mM | -Milimolar |
| mm | -Milímetro |
| MOPS | -Ácido 3-N-morfolino-propanosulfônico |
| mRNA | -Ácido ribonucléico mensageiro |
| nm | -Nanômetro |
| N-terminal | -Extremidade amino-terminal |
| OD | -Densidade óptica |
| pb | -Pares de bases |
| PCR | -Reação em cadeia da polimerase |
| PEG | -Polietilenoglicol |
| pfu | -Unidade formadora de partículas virais |
| pH | -Potencial hidrogeniônico |
| pmol | -Picomol |
| p/v | -Peso/volume |
| q.s.p. | -Quantidade suficiente para |
| RNA | -Ácido ribonucléico |
| RNase | -Ribonuclease |
| rpm | -Rotações por minuto |
| RT-PCR | -Transcrição reversa- reação de polimerização em cadeia |
| s | -Segundo |

| | |
|----------------|---|
| SDS | -Sódio dodecil sulfato |
| TEMED | -N,N, N', N' – tetrametil etilenodimetilamina |
| T _m | -Temperatura de desnaturação |
| Tris | -Tri (hidroximetil) aminometano |
| U | -Unidade enzimática |
| V | -Volts |
| v | -Volume |
| v/v | -Volume/volume |
| XGal | -5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo |
| μF | -Micro Faraday |
| μg | -Micrograma |
| μm | -Micrometro |
| μL | -Microlitro |
| Ω | -Ohms |
| 1X | -Concentração para uso |
| 5X | -Cinco vezes concentrado |
| 10X | -Dez vezes concentrado |
| 100X | -Cem vezes concentrado |

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Todo microrganismo deve adaptar-se a diversas alterações do ambiente. Essa adaptação pode ocorrer pela variação do padrão de expressão de seus genes, podendo desencadear uma resposta adaptativa nas vias metabólicas intracelulares ou refletir-se na síntese de moléculas de exportação capazes de modificar o meio ambiente (Espeso *et al.*, 1993). Fungos filamentosos podem crescer em diferentes condições ambientais, tais como temperatura e pH. Como descrito por San-Blas & San-Blas (1985), o fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* cresce a 26 °C na forma miceliana e a 37 °C na forma de levedura, tanto *in vitro* como *in vivo*. Quanto aos valores de pH, extremos podem ser tolerados por fungos como o *Aspergillus nidulans* capaz de crescer em culturas com pH variando de 2,5 até 10,5 (Rossi & Arst, 1990).

O pH ambiental desempenha um papel importante na fisiologia de inúmeros microrganismos, determinando níveis de transcrição de genes cujos produtos funcionam na fronteira celular ou em seu exterior. Dentre os genes regulados pelo pH ambiental, devem estar presentes alguns envolvidos em um mecanismo homeostático capaz de restringir a variação do pH intracelular, protegendo a integridade do organismo (revisto por Portillo, 2000). Moléculas localizadas no nível da barreira de permeabilidade da célula e exportadas para seu exterior, como permeases e enzimas secretadas para o meio extracelular, normalmente perdem a atividade em extremos de pH, conforme verificado no fungo *A. nidulans* por Espeso e colaboradores (1993). Desta maneira, a síntese de macromoléculas deve ocorrer apenas no pH apropriado ao seu funcionamento (van den Hombergh *et al.*, 1996).

Na adaptação de *Aspergillus nidulans* a diferentes valores de pH o fator transcricional PacC tem um papel importante, sendo ativado por uma via de transdução de sinal em resposta a pH neutro/básico. Nesse microrganismo essa regulação vem sendo amplamente caracterizada do ponto de vista genético e molecular (revisto Peñalva & Arst 2004). Genes homólogos a *pacC* de diferentes fungos e leveduras, dentre os quais pode-se citar o *Aspergillus niger* (MacCabe *et al.*, 1996), *Penicillium chrysogenum* (Suarez & Peñalva, 1996), *Sclerotinia sclerotiorum* (Rollins & Dickman, 2001), *Fusarium oxysporum* (Caracuel *et al.*, 2003) e *Candida albicans* (Ramon *et al.*, 1999), foram clonados e seqüenciados.

Em 1994, Arst e colaboradores propuseram que, em ambiente básico ou neutro produtos dos genes *palA*, *palB*, *palC*, *palF*, *palH* e *pall* desencadeariam um sinal que ativaria a expressão do gene *pacC*. Seu produto, por sua vez, ativaria a transcrição de genes expressos em condições básicas e reprimiria a transcrição daqueles expressos em condições ácidas (Figura 1). Essa hipótese foi corroborada por diferentes estudos com linhagens mutantes de *A. nidulans* (Tilburn *et al.*, 1995; revisto Peñalva & Arst, 2004).

Linhagens de *A. nidulans* que possuem mutações no gene *pacC* podem simular crescimento miceliano em pH alcalino, independente do pH do meio de cultura. Isto é, o fungo sintetiza proteínas codificadas por genes geralmente expressos em condições alcalinas, mesmo estando em pH ácido (Caddick *et al.*, 1986). Mutações em outros genes, como *palA*, *palB*, *palC* e *palF*, podem produzir o efeito inverso. Esses mutantes simulam crescimento em pH ácido, tanto em ambientes neutros como alcalinos (Caddick *et al.*, 1986). Mutações nos genes *palH* e *pall*, identificados por Arst e colaboradores (1994), geram linhagens com o mesmo fenótipo dos outros mutantes *pal*, ou seja, mimetizam crescimento em ambiente ácido. Tilburn e colaboradores (1995) isolaram, posteriormente, novas mutações do gene *pacC*. Foi demonstrado que alterações desse locus podem resultar

em mutantes com fenótipos distintos. O mutante *pacC^C* simula crescimento em ambiente básico, enquanto o *pacC⁻*, crescimento em ambiente ácido.

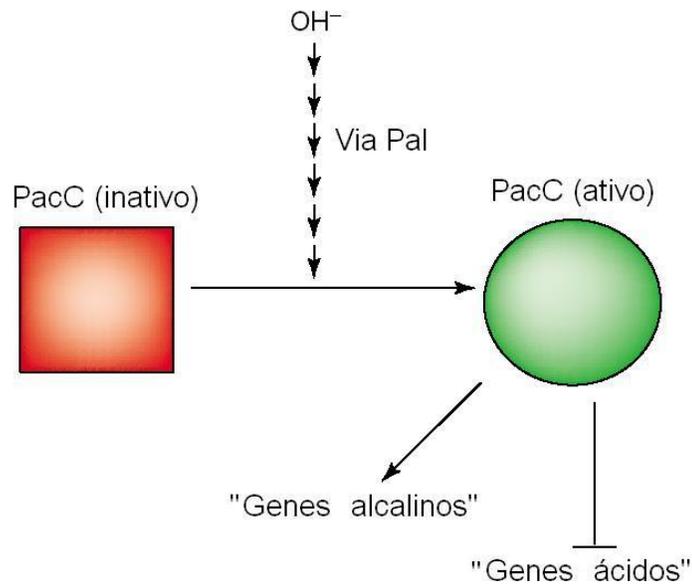


Figura 1: Modelo de regulação por pH. PacC age ativando genes expressos em ambiente alcalino (“genes alcalinos”) e reprimindo genes expressos em ambiente ácido (“genes ácidos”). Em condições de crescimento ácidas, PacC está em sua forma inativa, não havendo repressão de “genes ácidos” e ativação de “genes alcalinos”. Em pH alcalino, uma via de transdução de sinal mediada pelas proteínas Pal leva a ativação de PacC, o que resulta no aumento da expressão de “genes alcalinos” e diminuição da expressão de “genes ácidos” (figura adaptada de Arst & Peñalva, 2003).

1. O Fator Transcricional PacC

O gene *pacC*, isolado de diferentes fungos filamentosos e leveduras, possui tamanho médio de 3500 pb. A maioria dos genes *pacC* descritos em artigos científicos ou

depositados em bancos de dados internacionais possui entre dois e três íntrons (Tilburn *et al.*, 1995; MacCabe *et al.*, 1996; Ferreira-Nozawa, 2001; Pinero & Keller 2001; Sano & Machida 2001; Meyer *et al.*, 2005), com exceção apenas do *P. chrysogenum* que possui apenas um íntron (Suarez & Peñalva, 1996). Em média, os íntrons de genes *pacC* variam de 50-90 pb, podendo chegar a 138-149 pb como no caso de *A. niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus giganteus* (MacCabe *et al.*, 1996; Pinero & Keller, 2001; Sano & Machida, 2001; Meyer *et al.*, 2005).

Em *A. nidulans*, a proteína PacC foi predita por Tilburn e colaboradores (1995) a partir da caracterização molecular do gene correspondente, o que permitiu sua análise estrutural. A proteína PacC apresenta características de fatores transcricionais, é formada por 674 resíduos de aminoácidos e possui massa molecular de 72 kDa. Em sua região N-terminal, rica em resíduos de alanina e estruturas em α -hélice, existem três domínios em dedos-de-zinco da classe Cis₂His₂.

Os dedos-de-zinco são motivos clássicos que possuem duas cisteínas e duas histidinas conservadas coordenando um íon de zinco. Formados por cerca de 30 resíduos de aminoácidos, esses motivos apresentam em sua estrutura o padrão #-X-C-X₁₋₅-C-X₃-#-X₅-#-X₂-H-X₃₋₆-[H/C], onde “#” é um resíduo hidrofóbico, “H” uma histidina, “C” uma cisteína, “X” pode ser qualquer resíduo de aminoácido e os números representam à quantidade de resíduos de aminoácidos. A última posição pode ser ocupada por um resíduo de cisteína ou histidina (revisto por Klug & Schwabe, 1995). Esses motivos são compostos por duas fitas beta seguidas de uma alfa-hélice. A parte amino-terminal da alfa-hélice liga-se ao sulco maior do DNA, em regiões conservadas. Foi demonstrado experimentalmente que motivos em dedo-de-zinco devem estar dispostos em *tandem*, com a presença de pelo menos dois desses para que a afinidade ao DNA seja específica a determinadas seqüências (Bohm *et al.*, 1997).

Foi proposta uma classificação geral para regiões de dedos-de-zinco em leveduras, levando-se em consideração o número de motivos e sua disposição (dispersos ou em *tandem*), resultando em três categorias: A, B e C (Bohm *et al.*, 1997). O grupo A é formado por seqüências de pelo menos dois dedos-de-zinco em *tandem*, ligados por dois a seis resíduos de aminoácidos. Bohm *et al.* ainda dividem o grupo A em dois subgrupos: A1, composto por seqüências de três ou mais dedos-de-zinco, e A2, composto apenas por um par desses motivos. Do grupo C fazem parte os dedos-de-zinco únicos e os dispersos (separados por mais de 10 resíduos). No grupo B encontram-se dedos-de-zinco ligados por sete a nove resíduos de aminoácidos.

De acordo com o esquema apresentado na figura 2, verifica-se que a proteína PacC, já descrita em diversos fungos filamentosos e leveduras, possui algumas regiões conservadas que podem estar envolvidas em funções importantes nesse fator transcricional. Suárez & Peñalva (1996) sugerem que uma região N-terminal ao sítio da protease de processamento, denominada região I, pode estar envolvida na ativação transcricional. Em *A. nidulans*, essa região é composta pelos resíduos de aminoácidos N-P-S-Y-G-N-V/L-Y-Y-A-L, sendo a mesma relativamente conservada nas proteínas PacC de outros fungos. Um sinal de localização nuclear (SKKR...KRRQ) é encontrado na região central da proteína (Fernández-Martínez *et al.*, 2003). Essa região, mais conservada que a citada anteriormente, é denominada região II e corresponde a região onde PacC é processado pela segunda protease de sua via de ativação (MacCabe *et al.*, 1996; Mingot *et al.*, 1999). Ainda nessa região, encontram-se, em *A. nidulans*, os resíduos conservados Leu259 e Leu266, os quais devem interagir com partes carbóxi-terminais da proteína (Schmitt *et al.*, 2001).

Acredita-se que a região III, rica em glicina e relativamente conservada, funcione como uma dobradiça flexível (Suárez & Peñalva, 1996). Não se pode afirmar, no entanto, que essa região desempenhe papel crucial na atividade de PacC, uma vez que existem

algumas espécies de fungos cujos fatores transcricionais PacC não possuem a citada região (Schmitt *et al.*, 2001). A região IV contém um resíduo Leu340 (*A. nidulans*) bastante conservado. Sabe-se que esse resíduo interage com porções carbóxi-terminais da proteína. Ainda pode ser observada na porção C-terminal de PacC, a região V, relativamente conservada e cuja função ainda é desconhecida (Schmitt *et al.*, 2001). É uma região rica em resíduos de prolina, devendo assumir papel estrutural importante.

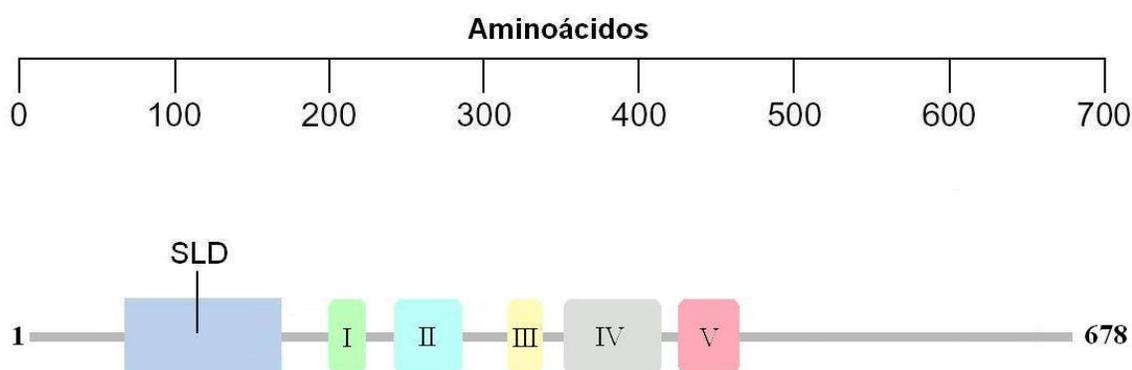


Figura 2: Regiões conservadas de PacC de diversos fungos filamentosos e leveduras. I, II, III, IV e V referem-se às regiões conservadas de PacC. O sítio de ligação ao DNA (SLD) está representado pela caixa azul. Maiores detalhes no texto.

2. Ativação Funcional da Proteína PacC

Mutantes *pacC^C* não possuem a região gênica codificadora do C-terminal de PacC (Tilburn *et al.* 1995). Essa consideração, associada a estudos fenotípicos do mutante, permitiu que se concluísse que a região C-terminal tem função inibitória sobre a ação de PacC. Orejas e colaboradores (1995) demonstraram experimentalmente que a ativação de PacC de fato requer a clivagem proteolítica dessa porção C-terminal. Nesse processo, é

gerada uma proteína de aproximadamente 245 resíduos de aminoácidos (27 kDa) que seria a forma ativa do fator transcricional.

Em estudos posteriores, Espeso e colaboradores (2000) demonstraram que três regiões de PacC interagem entre si, mantendo a proteína aparentemente inerte e impedindo o processamento proteolítico em pH ácido. Duas regiões de interação, denominadas A e B, localizam-se logo após o domínio de ligação ao DNA, que envolve os três dedos-de-zinco da estrutura predita por Tilburn *et al.* (1995). A interação entre essas duas cria uma estrutura que, ao interagir com a região C, na porção C-terminal, configura a proteína na conformação “fechada”. Em pH alcalino, essas regiões deixam de interagir, ficando a proteína na conformação “aberta”, sensível a ação de proteases. (Figura 3).

Posteriormente, estudos vieram a detalhar o processo de ativação de PacC. Foi demonstrado que, inicialmente, uma protease de sinalização cliva PacC em um sítio de 24 resíduos de aminoácidos conservados, o “sítio da protease de sinalização” (*signaling protease box*), removendo aproximadamente 180 resíduos da região C-terminal e gerando um intermediário de aproximadamente 495 resíduos (Díez *et al.*, 2002). Esse primeiro passo no processamento do fator transcricional é dependente de pH, só ocorrendo em condições neutras ou alcalinas. Em seguida, uma segunda protease, denominada protease de processamento, remove, em uma reação independente de pH, uma porção de aproximadamente 245 resíduos carbóxi-terminais, liberando uma porção N-terminal de aproximadamente 250 resíduos que é a forma funcional de PacC (Díez *et al.*, 2002) (Figura 4). Mutações *pacC^c* ocorrem por remoção ou substituição de aminoácidos que inativam uma ou mais regiões de interação entre os domínios de PacC, permitindo que o fator transcricional em questão seja clivado pela protease de processamento, independentemente do pH (Arst *et al.*, 1990).

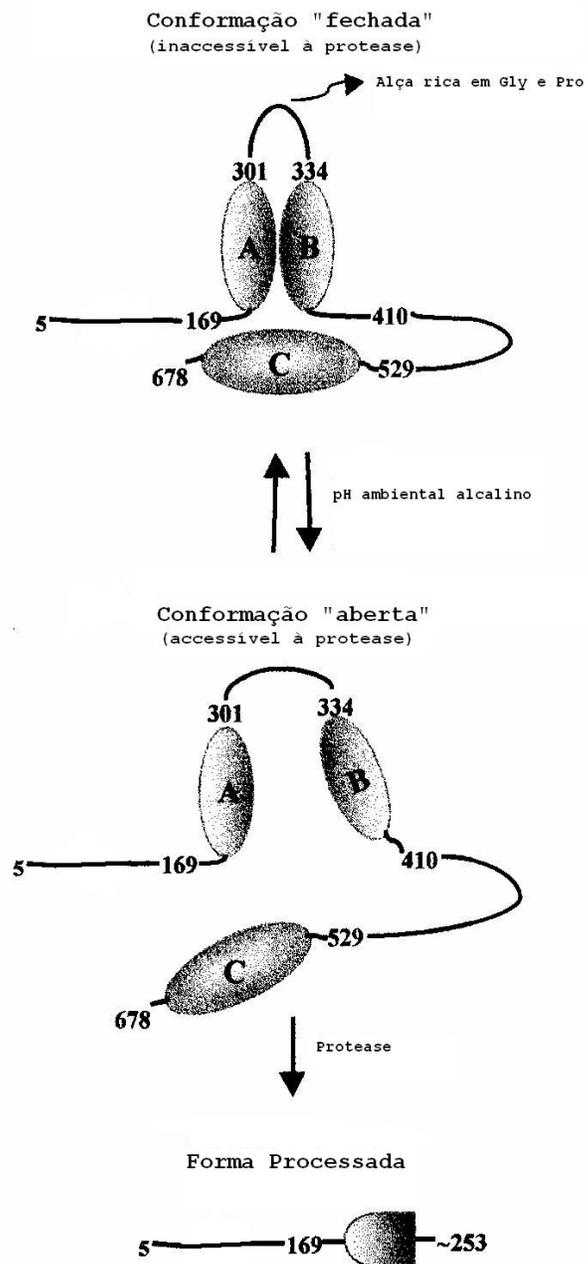


Figura 3: Interação entre domínios de PacC. Em ambiente ácido a proteína permanece empacotada em sua forma “fechada”. Em pH alcalino há uma mudança conformacional que dá acesso à ação de proteases que, ao processar PacC, geram a forma ativa. O passo de formação do intermediário está suprimido nessa figura (figura adaptada de Espeso *et al.*, 2000).

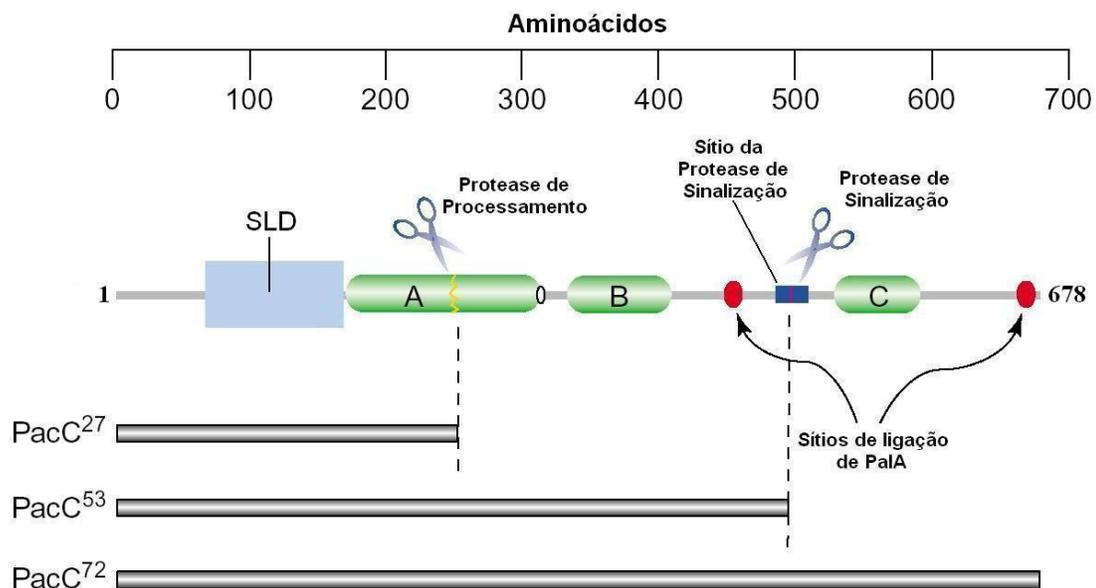


Figura 4: Características estruturais relevantes de PacC. A, B e C referem-se às regiões que interagem entre si, tornando PacC⁷² resistente à ação da protease de processamento. O sítio de ligação ao DNA (SLD) está representado pela caixa azul. PacC⁷², PacC⁵³ e PacC²⁷ representam o produto da tradução de 72-kDa, o intermediário de 53-kDa e a forma ativa do PacC de 27-kDa, respectivamente. (Figura adaptada de Arst & Peñalva 2003).

3. O Mecanismo de Ação de PacC

A proteína PacC inativa é preferencialmente citosólica. Porém, a forma ativa e o intermediário da ativação de PacC têm localização nuclear preferencial (Mingot *et al.*, 2001). Análises de mutação associadas ao uso da proteína repórter GFP (*green fluorescent protein*) mostraram que o sinal de localização nuclear (SKKR...KRRQ) está relacionado à região conservada II (Mingot *et al.*, 2001; Fernández-Martínez *et al.*, 2003) (Figura 1).

A forma ativa de PacC liga-se a região de DNA consensual de seqüência 5'-GCCARG-3', onde "R" equivale a uma purina, pela região dos dedos-de-zinco. Análises de mutação, de *footprinting* e de modelagem molecular indicam que o primeiro dedo-de-zinco interage com o segundo, estabilizando sua estrutura, mas não interage diretamente com o DNA. Apenas o segundo e o terceiro dedos-de-zinco entram em contato efetivo com as seqüências alvo (Tilburn *et al.*, 1995; Espeso *et al.*, 1997; Fernández-Martínez *et al.*, 2003) (Figura 5). A forma ativa do fator transcricional liga-se a sítios alvo em promotores de genes expressos preferencialmente em ambientes alcalinos para ativar sua transcrição e a promotores de genes expressos em ambientes ácidos para inibi-los. Além disso, os próprios promotores dos genes *pacC* de diferentes fungos filamentosos apresentam números variáveis desses motivos consensuais, sugerindo que a expressão de proteínas PacC seja, ao menos em parte, auto-regulável (Tilburn *et al.*, 1995; Mingot *et al.*, 1999; Peñalva & Arst, 2002; Fernández-Martínez *et al.*, 2003).

4. Via de Transdução de Sinal Ativada pelo pH Ambiental

Os produtos de seis genes, *palA*, *palB*, *palC*, *palF*, *palH* e *pall* estão envolvidos na via de transdução de sinal que transmite o sinal que ativa PacC (Orejas *et al.*, 1995; Denison *et al.*, 1995; Denison *et al.*, 1998) (Figuras 1 e 6). No entanto, ainda não foi definido o mecanismo que dispara essa transdução de sinal, tampouco o papel específico de cada uma das proteínas Pal.

PalH e PalI possuem, respectivamente, sete e quatro possíveis domínios transmembrânicos, estando possivelmente localizados na membrana plasmática. Entretanto, estudos de citolocalização ainda não comprovaram essa hipótese (Denison *et*

al., 1998). Provavelmente, essas são as proteínas responsáveis pela captação do sinal extracelular. Os papéis de PalC e PalF não estão determinados. Entretanto, PalC é o único produto dos genes *pal* que não possui homólogo em *Sacharomyces cerevisiae* ou em qualquer outro genoma de levedura descrito. No entanto, apresenta homólogos em todos os genomas já seqüenciados de fungos filamentosos (revisto por Peñalva & Arst, 2002).

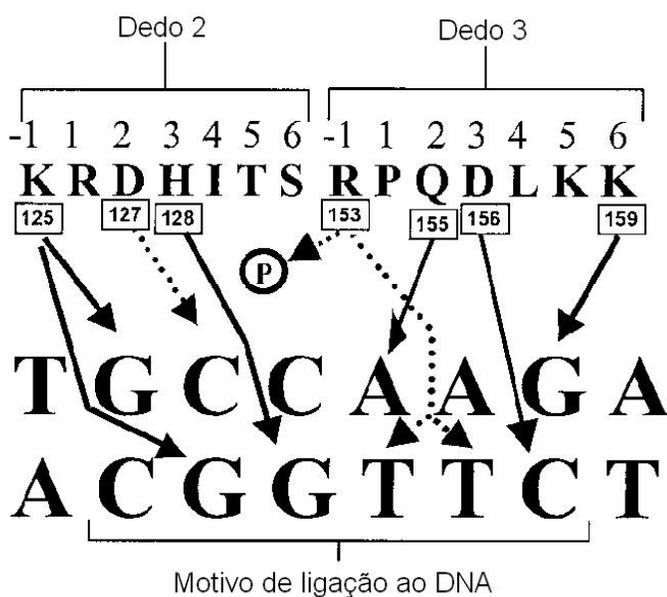


Figura 5: Especificidade de ligação de PacC ao DNA. Predição de contatos específicos entre os resíduos de aminoácidos das α -hélices dos dedos-de-zinco 2 e 3 de PacC com os nucleotídeos da sequência alvo de DNA. Evidências experimentais e modelagem sugerem que os contatos ocorram como indicado pelas linhas sólidas. Linhas pontilhadas representam possíveis contatos dos resíduos 127 e 153. A letra “P” circulado representa um grupo fosfato da cadeia de DNA. O dedo-de-zinco 1 aparentemente não está envolvido em contatos com o DNA (figura adaptada de Peñalva & Arst, 2002).

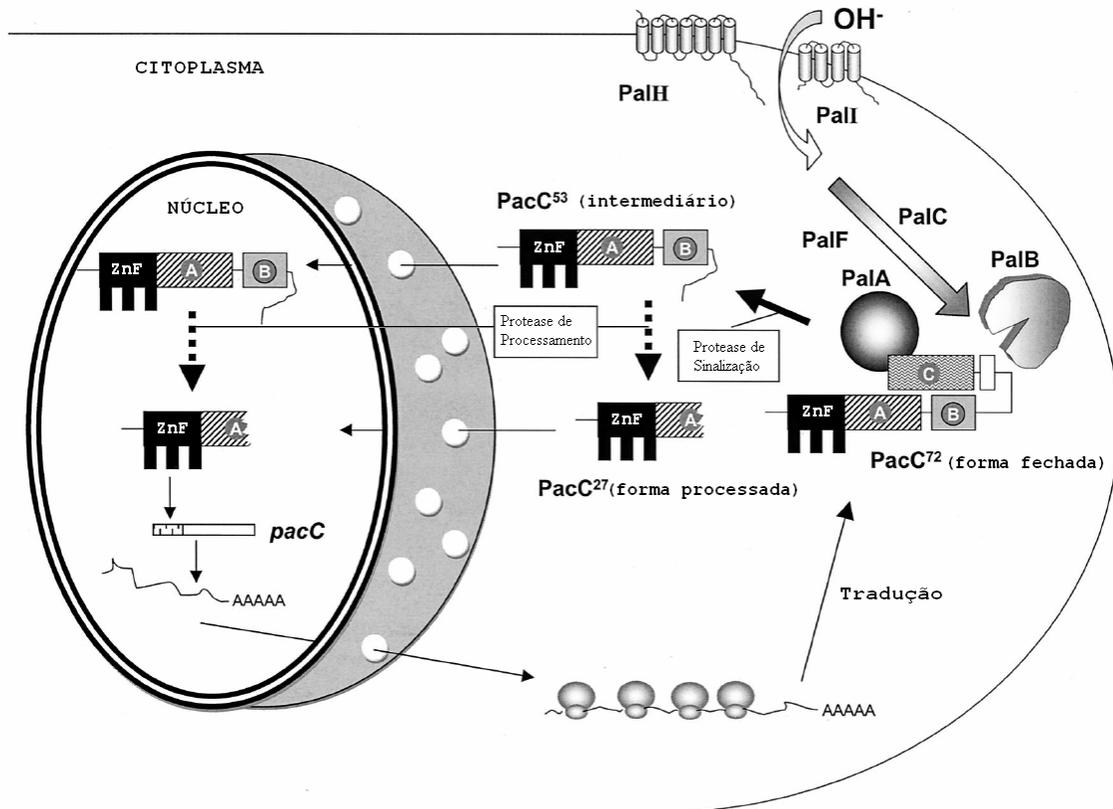


Figura 6: Papel proposto para as diferentes proteínas Pal na ativação de PacC. A clivagem pela protease de sinalização (possivelmente PalB) é citosólica e requer transdução de sinal do pH alcalino externo pela via Pal. PacC72, PacC53 e PacC27 referem-se à forma não processada (72 kDa), ao intermediário (53 kDa) e à forma processada (27 kDa), respectivamente. A região dos dedos-de-zinco está representada por “ZnF”. Pal A seria necessária para a clivagem de PacC pela protease de sinalização. Pal H e Pal I teriam a possível função de receptores de sinal transmembrânicos. Não se sabe ainda as funções de PalC e PalF (figura adaptada de Peñalva & Arst, 2002).

Para que a transdução de sinal ocorra de maneira a clivar PacC, liberando seu intermediário, é necessário que PalA se ligue a dois motivos em PacC, localizados em ambos os lados do sítio de ligação da protease de sinalização (Vincent *et al.*, 2002). Em análises estruturais da proteína deduzida a partir da seqüência gênica de *pala*, foi

verificado que essa possui um sinal de sinalização nuclear (Negrete-Urtasun *et al.*, 1997). PalB, uma protease da família das calpaínas (Denison *et al.*, 1995; Futai *et al.*, 1999; Sorimachi & Suzuki, 2001), é provavelmente a protease de sinalização, sendo o elo entre a via de transdução e a ativação de PacC.

Não se sabe ao certo se o processamento do intermediário de PacC pela protease de processamento, independente de pH e após a ação da protease de sinalização, ocorre no citosol ou no núcleo, já que tanto o intermediário quanto a forma ativa possuem localização preferencial nuclear (revisto por Peñalva & Arst, 2002) (Figura 6).

5. Genes Regulados por pH

Para que a expressão de um gene seja considerada regulável pelo pH ambiental, alguns critérios formais, determinados por Arst e Peñalva (2003), devem ser verificados:

- i) A expressão do gene deve variar, em um organismo selvagem, na medida em que o pH ambiental seja progressivamente alterado.
- ii) As mutações que geram fungos que mimetizam crescimento em ambiente ácido ou básico devem afetar a expressão do gene em direções opostas. Ou seja, em mutações que mimetizam ambiente básico, o gene deve ser expresso como se o organismo selvagem estivesse crescendo em ambiente alcalino, enquanto nas outras mutações citadas, o gene deve ser expresso como se o organismo estivesse em ambiente ácido.

iii) A maioria das mutações de *pacC* deve ser epistática sobre as mutações da via *pal*. Isto quer dizer que o fenótipo mutante é, geralmente, provocado por alterações diretas no fator transcricional e não em sua via de ativação.

Se algum dos critérios acima não for satisfeito, a expressão do gene alvo não deve ser considerada como regulada por PacC. O pH ambiental pode afetar permeases e enzimas extracelulares cujos substratos ou produtos podem estar envolvidos na regulação gênica, o que não deve ser confundido com regulação por pH.

5. O fungo *P. brasiliensis* e a Paracoccidioidomicose

O fungo *P. brasiliensis*, dimórfico e patogênico ao homem, tem sido objeto de muito interesse e discussão desde que foi descrito em 1908 por Adolpho Lutz. Esse organismo, pertencente à ordem Onygenales, família Onygenaceae, filo Ascomycota, possui proximidade filogenética a outros fungos patogênicos tais como *Blastomyces dermatitidis*, *Emmonsia parva* e *Histoplasma capsulatum* (Peterson & Sigler, 1998).

O fungo *P. brasiliensis* apresenta-se em duas formas: micélio e levedura. A forma miceliana, encontrada no meio ambiente, é composta por hifas septadas e ramificadas, com células uninucleadas, enquanto a forma de levedura, presente em hospedeiros, é multinucleada. Desde 1912, as condições de cultivo desse fungo foram estabelecidas por Alfonso Splendore, sendo possível a transição da forma miceliana à forma de levedura *in vitro*, pela simples mudança da temperatura de 22 °C para 36 °C, o que torna esse organismo um bom modelo para estudos de expressão gênica diferencial (San-Blas & San-Blas, 1985). Na forma de levedura é possível observar-se uma estrutura característica constituída por uma célula-mãe circundada por múltiplos brotamentos (Restrepo, 1978).

Pouco se sabe sobre a organização cromossômica, tamanho de genoma e composição genética de *P. brasiliensis*. Estima-se que o tamanho de seu genoma deva ser aproximadamente 30 Mb, distribuídos entre quatro ou cinco cromossomos, possuindo entre 7.500 e 9.000 genes (Reinoso *et al.*, 2005). Fatores transcricionais relacionados ao ciclo sexual de ascomicetos, além de transcritos envolvidos em recombinação meiótica, foram descritos por Felipe e colaboradores (2003 e 2005) no transcriptoma de *P. brasiliensis*, fornecendo fortes evidências para a existência de um ciclo sexual nessa espécie. Contudo, esse ciclo ainda não foi observado experimentalmente, o que gera dificuldade em estudos relacionados à reprodução e ciclo de vida do fungo.

O fungo *P. brasiliensis* vem sendo considerado como uma espécie única, apesar da notável diversidade genética entre diferentes isolados (Matute *et al.*, 2006), além da grande variação nos níveis de virulência desses isolados em modelos experimentais estabelecidos (Singer-Vermes *et al.*, 1989). Matute e colaboradores (2006) propuseram, com base em estudos filogenéticos de 65 isolados de *P. brasiliensis*, a existência de três diferentes espécies decorrentes de dois eventos independentes de especiação, correlacionados ao padrão de distribuição dessas potenciais espécies. O isolado Pb01, utilizado nesse trabalho, foi caracterizado filogeneticamente pela análise de RAPD, que sugeriu que este isolado possui perfis genotípicos diferentes dos demais analisados e está localizado em grupo excludente pela análise de UPGMA (“*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*”) (Soares, *et al.*, 1995; Molinari-Madlum *et al.*, 1999).

O fungo dimórfico *P. brasiliensis* é o agente etiológico da micose sistêmica de maior prevalência na América Latina, a paracoccidioidomicose (PCM) (Franco, 1987; Restrepo *et al.*, 2001). No entanto, pouco se sabe acerca do habitat e ciclo biológico do *P. brasiliensis*, acreditando-se que esse se encontre na forma miceliana, saprobiótica, no solo, produzindo propágulos assexuais que podem infectar o homem por sua inalação. Depois de

inalados, os conídios atingiriam os pulmões, onde sofreriam a transição para a forma de levedura, fundamental para o estabelecimento da infecção (revisto por Rooney & Klein, 2002). Posteriormente, a infecção poderia ser disseminada para os demais tecidos do hospedeiro, tornar-se latente, ou ser erradicada, dependendo da resposta imunológica do hospedeiro e da virulência do fungo (Franco, 1987; San-Blas *et al.*, 2002). A infecção pode dar-se ainda por trauma na mucosa bucal, anal ou cutânea (Restrepo, 1978).

Em estudos feitos por Bagagli e colaboradores (1998), esse fungo foi isolado em espécimes de tatus silvestres (*Dasyus novemcinctus*) em área endêmica de paracoccidioidomicose (PCM), acreditando-se que o animal tratava-se de um reservatório natural do fungo, pois aparentemente não desenvolvia doença. Entretanto, Restrepo e colaboradores em 2001 observaram a formação de granulomas epitelióides, lesões características da manifestação clínica da PCM, circundando o fungo em diversos órgãos do animal, o que sugere que o tatu deva ser um hospedeiro. Ricci e colaboradores (2004) relataram um caso de infecção de um cão adulto doméstico no qual também foi verificada a formação de granuloma epitelióide.

A PCM ocorre em diversas áreas desde o México até a Argentina, sendo os países de maior incidência o Brasil (com 80% dos casos), Venezuela e Colômbia (Restrepo, 1985). A doença predomina em temperaturas que variam de 17 a 24 °C, índices pluviométricos de 900 a 1800 mm/ano, florestas abundantes, inverno curto e verão chuvoso (Restrepo, 1985). Estimativas apontam para 10 milhões de pessoas que tiveram contato com o fungo, sendo que cerca de 2 % dessas desenvolverão a doença (Restrepo *et al.*, 2001). No Brasil, a taxa de mortalidade em virtude da PCM é de aproximadamente 200 mortes por ano, sendo que a maioria dos casos ocorre em estados das regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul (Coutinho *et al.*, 2002).

Apesar de indivíduos de ambos os sexos terem o mesmo grau de exposição ao fungo, é predominante a incidência de PCM em adultos do sexo masculino. Segundo Brummer e colaboradores (1993), há um caso de infecção de indivíduo do sexo feminino para cada 13 do sexo masculino. Em algumas áreas endêmicas, essa taxa pode chegar a 78 homens para cada mulher (Restrepo *et al.*, 1984). Tal incidência da PCM, associada ao fato de que indivíduos que ainda não atingiram a puberdade desenvolvem a doença independentemente do sexo, indicaram que componentes hormonais do hospedeiro poderiam atuar na patogenicidade do *P. brasiliensis*. Essa hipótese foi confirmada por Restrepo e colaboradores (1984) que mostraram que o hormônio feminino β -estradiol inibe a transição de *P. brasiliensis* da forma de micélio para levedura *in vitro*. Corroborando com Restrepo e colaboradores (1984), outros estudos mostraram que esse hormônio também impede a transição do conídio à levedura (Loose *et al.*, 1983; Salazar *et al.*, 1988; Stover *et al.*, 1986). É importante ressaltar que linhagens incapazes de realizar processo de transição micélio-levedura não apresentam virulência (San-Blas & Niño-Vega, 2001).

A maioria dos indivíduos infectados por *P. brasiliensis* desenvolve apenas infecção assintomática, definida como paracoccidiodomicose-infecção, a qual acomete principalmente indivíduos sadios que vivem em áreas endêmicas. Outros indivíduos podem apresentar progressão da infecção dando origem à doença, que possui manifestações clínicas diversas, sendo caracterizadas principalmente por granulomas crônicos com alta frequência de lesões pulmonares e muco-cutâneas (Franco, 1987; Franco *et al.*, 1993). No último caso, a PCM pode dar origem a duas formas que se diferenciam quanto a características clínicas, imunológicas e histopatológicas: a forma aguda (tipo juvenil) ou a forma crônica (tipo adulto).

A PCM aguda, que acomete principalmente jovens, é geralmente de caráter bastante severo, estando associada a taxas de mortalidade significativas. Ela desenvolve-se

de forma rápida (semanas a meses), atinge primariamente os pulmões, e progride por disseminação linfática e sangüínea, comprometendo principalmente o sistema retículo-endotelial (baço, fígado, linfonodos e medula óssea). Essa forma responde por 3 a 5 % dos casos. A forma crônica, que ocorre principalmente em adultos do sexo masculino, desenvolve-se de maneira mais lenta (meses a anos). As lesões causadas são restritas a alguns órgãos, sendo na maioria dos casos unifocal (lesão apenas no pulmão) e em outros multifocal, com as lesões extrapulmonares atingindo as mucosas bucal e nasal, pele, linfonodos, fígado e glândulas adrenais. Esse tipo da doença pode acarretar seqüelas pulmonares e subcutâneas e, em casos mais graves, ou na ausência de tratamento adequado, pode vir a causar a morte do indivíduo. Cerca de 90 % de todos os casos correspondem à forma crônica (Franco, 1987; Brummer *et al.*, 1993; Camargo & Franco, 2000).

A PCM é caracterizada por ser uma doença de padrão granulomatoso. O granuloma resulta de uma reação de hipersensibilidade tardia contra antígenos do agente infeccioso, ocorrendo também em outras doenças infecciosas, como tuberculose, hanseníase e histoplasmose. Essa lesão apresenta-se como componente essencial na defesa anti *P. brasiliensis*, permitindo a contenção do patógeno pelo impedimento de sua disseminação pelo organismo (Romani, 1997). O macrófago é a principal célula integrante do granuloma, possuindo atividades microbidas e de apresentador de antígeno, além de, juntamente com linfócitos T, produzir citocinas. Plasmócitos, eosinófilos e fibroblastos também estão presentes no granuloma (de Brito & Franco, 1994).

A resistência do hospedeiro à infecção por *P. brasiliensis* está relacionada à formação de um granuloma epitelióide compacto e à capacidade de desenvolver uma resposta imunológica celular efetiva (Franco, 1987; Franco *et al.*, 1993). A resistência também tem sido associada ao papel do interferon gama (IFN- γ) (Cano *et al.*, 1998),

importante na ativação dos macrófagos para a produção de óxido nítrico (NO), que atua como principal agente microbicida (Bocca *et al.*, 1998). O IFN- γ também estimula macrófagos infectados por *P. brasiliensis* a secretar fator de necrose tumoral (TNF- α), necessário para a persistência do granuloma (Souto *et al.*, 2000).

6. O fator transcricional PacC e a Patogênese Fúngica

A patogênese de fungos está associada à expressão de múltiplos genes em diferentes estágios do processo de infecção, sendo a adesão e a sobrevivência do patógeno no interior do hospedeiro são essenciais a seu estabelecimento. Nesse contexto, fatores importantes para o estabelecimento da infecção por fungos patogênicos vêm sendo descritos, embora apenas recentemente os mecanismos genéticos e moleculares envolvidos na expressão desses genes de virulência começaram a ser investigados (Odds *et al.*, 2001).

C. albicans, o patógeno fúngico oportunista mais prevalente na população humana e causador de infecções em indivíduos imunodeprimidos, é um fungo dimórfico que sofre transição entre a forma de levedura e a de hifa em resposta a diferentes sinais ambientais. A habilidade de se adaptar ao pH extracelular é necessária a sua patogênese (Davis, 2003). As proteínas de parede celular Phr1p e Phr2p são expressas diferencialmente em resposta ao pH ambiental. Phr1p é expressa em pH 5,5 ou superior, enquanto Phr2p em pH 5 ou inferior (Saporito-Irwin *et al.*, 1995; Muhlshlegel & Fonzi, 1997). Ambas as proteínas são essenciais à patogênese desse fungo nos locais onde são expressas: Phr1p é essencial à candidíase sistêmica (pH 7,4) e Phr2p à candidíase vaginal (pH 4) (Ghannoum *et al.*, 1995; De Bernardis *et al.*, 1998). A expressão dependente de pH dos genes *PHR1* e *PHR2* é regulada por um fator transcricional homólogo ao PacC, o

Rim101p (Davis *et al.*, 2000a; Ramon *et al.*, 1999). Rim101p induz a expressão de *PHR1* e reprime *PHR2* em ambiente alcalino. Davis *et al.* (2000b) mostram que Rim101p é necessário a candidíase sistêmica em murinos.

P. brasiliensis apresenta diferença na composição da parede celular entre as formas de micélio e levedura. A parede celular da forma miceliana é mais rica em constituintes protéicos (24 a 41 %) que a parede das leveduras (7 a 14 %) (Kanetsuna *et al.*, 1969). A forma de levedura possui maior quantidade de quitina (37 a 48 %) que a forma miceliana (7 a 18 %) (Kanetsuna *et al.*, 1969). Outro polissacarídeo que difere nas duas fases é a glicana. O micélio é composto preferencialmente por β -glicana enquanto na levedura a α -glicana é o principal polímero de glicose presente (95 %), indicando um possível papel desse polissacarídeo na virulência do fungo (Kanetsuna & Carbonell, 1970). De forma semelhante ao que ocorre com os genes *PHR1* e *PHR2* de parede celular em *C. albicans*, as enzimas de biossíntese de quitina e de α -glicana de *P. brasiliensis* poderiam ser reguladas por um fator transcricional homólogo a PacC.

Sabe-se que a formação de hifa em *C. albicans* é essencial para a sua patogenicidade. Ramon e colaboradores (1999) mostraram que Rim101p induz a formação dessa estrutura. Se de forma semelhante, PacC estivesse envolvido na regulação da transição micélio-levedura de *P. brasiliensis*, esse fator teria papel importante na patogenicidade desse organismo.

Em estudos feitos por Rollins em 2003, observou-se uma virulência drasticamente reduzida em infecções a tomateiros e a *Arabidopsis* com o uso de mutantes ácidos de *S. sclerotiorum*. Em experimentos de infecção de raízes de tomateiros, o gene *pacC* de *F. oxysporum* regulou negativamente a virulência, situação inversa à regulação em *S. sclerotiorum*. Uma mutação que gera fenótipo que simula crescimento fúngico em ambiente ácido, a *pacC*^{+/-}, resulta na interrupção de PacC logo após a região de ligação ao

DNA. Tal mutação, aumentou os sintomas de infecção, enquanto uma mutação básica, a *pacC^C*, que resulta na interrupção de PacC no sítio de ligação da protease de sinalização, retardou o desenvolvimento da infecção (Caracuel *et al.*, 2003). Acredita-se que nesse último caso, PacC age como inibidor de genes importantes para virulência em plantas, prevenindo sua transcrição durante o processo de infecção. Hipoteticamente, PacC poderia estar reprimindo genes importantes à virulência de *P. brasiliensis* que, em um ambiente ácido como o interior de um macrófago, seriam expressos na ausência desse fator transcricional, semelhantemente ao que ocorre com *F. oxysporum*.

Em 2005, Bignell e colaboradores mostraram virulência atenuada de mutantes de *A. nidulans* com perda de função de *pacC* e *palB* em infecções ao pulmão de camundongos imunocomprometidos. Infecções causadas por esses mutantes se caracterizavam por crescimento fúngico limitado *in vivo*. De forma contrastante, mutantes com ativação constitutiva de PacC causam taxas de mortalidade aumentada, com crescimento fúngico invasivo extenso. Desta forma, ficou demonstrado que a ação do fator transcricional PacC é necessária à virulência desse patógeno, tendo importância essencial na instalação da aspergilose pulmonar. De forma semelhante, um homólogo a PacC em *P. brasiliensis* poderia estar atuando na instalação da infecção desse patógeno nos pulmões de pessoas afetadas, podendo também desempenhar algum papel na virulência desse patógeno.

Assim sendo, é possível que o fungo *P. brasiliensis* possua genes regulados por pH ambiental, podendo os produtos desses genes estar envolvidos na transição dimórfica micélio-levedura e/ou na interação patógeno-hospedeiro, justificando o estudo de um sistema análogo ao PacC de *A. nidulans* nesse patógeno humano.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Investigar em *P. brasiliensis* a existência de um mecanismo de regulação da expressão gênica mediada pelo pH ambiental, análogo ao verificado em *A. nidulans*.

Objetivos Específicos

- Determinar a seqüência de nucleotídeos de clones genômicos isolados de biblioteca de *P. brasiliensis* e que apresentaram similaridade, em experimentos de *Southern blot*, com o gene *pacC* de *A. nidulans*.
- Analisar as seqüências obtidas quanto à similaridade com genes *pacC* de outros fungos.
- Estudar a organização estrutural (região regulatória, exons, íntrons, região 3', etc.) do gene *pacC* de *P. brasiliensis*.
- Avaliar o perfil de expressão do gene *pacC* após crescimento de *P. brasiliensis* em meios de cultura com diferentes valores de pH.

MATERIAL

MATERIAL

1. Meios de cultura

Todos os meios foram esterilizados em autoclave a 120 °C por 15 min.

Meio Lúria (L)

| | |
|---------------------|-------------|
| Extrato de levedura | 0,5 % (p/v) |
| Peptona de caseína | 1,0 % (p/v) |
| NaCl | 1,0 % (p/v) |

O pH deve ser ajustado para 7,2.

Ao meio sólido foram adicionados 1,5 % de agar bacteriológico (p/v).

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) |

O pH deve ser ajustado para 7,0.

Meio SB

Extrato de levedura 2,0 % (p/v)

Peptona de caseína 3,0 % (p/v)

MOPS 1,0 % (p/v)

O pH deve ser ajustado para 7,0.

Meio SOB

Triptona 2,0 % (p/v)

Extrato de levedura 0,5 % (p/v)

NaCl 10,0 mM

KCl 2,5 mM

O pH deve ser ajustado para 7,0.

Meio SOC

Meio SOB suplementado com:

MgCl₂ 10 mM

MgSO₄ 10 mM

Glicose 20 mM

Meio 2XYT

Extrato de levedura 1,0 % (p/v)

Peptona de caseína 1,6 % (p/v)

NaCl 0,5 % (p/v)

O pH deve ser ajustado para 7,2.

Ao meio sólido, foram adicionados 1,5 % de agar bacteriológico (p/v).

Meio YPD

Extrato de levedura 1 % (p/v)

Glicose 2 % (p/v)

Bacto-peptona 2 % (p/v)

O pH deve ser ajustado para 7,5, exceto quando especificado de outra forma.

2. Antibióticos

As soluções de antibióticos foram esterilizadas por filtração usando-se membranas de nitrocelulose com poros de 0,2 μm (*milipore*), e estocados em ambiente protegido da luz, a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Ampicilina

Solução estoque: 10 mg/mL em água destilada estéril.

Concentração final de uso: 100 $\mu\text{g/mL}$.

Neomicina

Solução estoque: 200 mg/mL em água destilada estéril.

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

3. Soluções-Tampão

Tampão E (TE)

| | |
|-------------------|-------|
| Tris-HCl (pH 8,0) | 25 mM |
| EDTA | 20 mM |

Tampão de Corrida para Eletroforese Tris-EDTA-borato (TEB) 10X

| | |
|--------------|--------|
| Trizma base | 0,89 M |
| Ácido bórico | 0,89 M |
| EDTA | 0,02 M |

O pH deve ser ajustado para 8,0 com ácido bórico.

Tampão de Amostra para DNA/RNA (10X)

| | |
|--------------------|--------------|
| Glicerol | 50,0 % (v/v) |
| Azul de bromofenol | 0,1 % (p/v) |
| Xileno cianol | 0,1 % (p/v) |

Tampão fosfato (PBS) 10X

| | |
|----------------------------------|--------|
| NaCl | 1,50 M |
| Na ₂ HPO ₄ | 0,10 M |
| NaN ₃ | 0,02 % |

O pH deve ser ajustado para 7,2.

Tampão SM

| | |
|--------------------------------------|--------------|
| NaCl | 0,58 % (p/v) |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,20 % (p/v) |
| Tris-HCl 1M (pH 7,5) | 5,00 % (v/v) |
| Gelatina 2 % (p/v) | 5,00 % (v/v) |

Deve ser autoclavado a 120 °C por 15 min.

4. Soluções**Solução de Brometo de Etídeo**

Solução estoque: 10 mg/mL em água destilada.

Concentração final de uso: 0,5 µg/mL.

Solução de Equilíbrio

| | |
|-------------------|--------|
| Tris-HCl (pH 8,0) | 100 mM |
| NaCl | 100 mM |

Fenol Saturado

| | |
|--------------------|-------------|
| Fenol | 1,0 v |
| 8-hidroxiquinolina | 0,1 % (p/v) |
| β-mercaptoetanol | 0,2 % (v/v) |

Homogeneizar repetidas vezes com Solução de Equilíbrio.

Clorofane

| | |
|-------------------------|--------------|
| Fenol | 1,00 v |
| Clorofórmio | 1,00 v |
| 8-hidroxiquinolina | 0,05 % (v/v) |
| β -mercaptoetanol | 0,50 % (v/v) |

Homogeneizar repetidas vezes com solução de equilíbrio.

Clorofil

| | |
|-------------------|------|
| Clorofórmio | 24 v |
| Álcool isoamílico | 1 v |

Homogeneizar repetidas vezes com solução de equilíbrio.

Solução de dietil pirocarbonato (DEPC)

| | |
|------|-------------|
| DEPC | 0,1 % (p/v) |
|------|-------------|

Solução II

| | |
|------|-------------|
| NaOH | 0,2 M |
| SDS | 1,0 % (p/v) |

Preparada logo antes do uso.

Solução III pH 4,8 - 5,0

| | |
|------------------|-------|
| Acetato de sódio | 3,0 M |
| Ácido acético | 2,0 M |

Solução de 5-bromo-4-cloro-3indoxil- β -D-galactopiranosídeo (X-gal)

| | |
|-------------------------|-------|
| X-gal | 20 mg |
| N, N - dimetilformamida | 1 mL |

Solução de IPTG

| | |
|------|--------|
| IPTG | 100 mM |
|------|--------|

Esterilizar por filtração.

Solução de RNase A

| | |
|-------------------------|----------|
| RNase A | 10 mg/mL |
| Acetato de sódio pH 4,8 | 50 mM |

Ferver em banho-maria por 10 minutos.

Solução corante Verde-Janus

Solução estoque: 0,5 % (p/v) em água destilada estéril.

Concentração final de uso: 0,05 % (p/v).

A solução estoque do corante vital Verde-Janus foi esterilizada por filtração usando-se membranas de nitrocelulose com poros de 0,2 μ m (milipore)

Persulfato de Amônia (APS) 10 % (p:v)

| | |
|-----------------------------------|-------|
| Persulfato de Amônia | 1 g |
| H ₂ O destilada q.s.p. | 10 mL |

Esta solução é fotosensível.

Acrilamida-Bisacrilamida 30 %, 29:1 (v/v)

| | |
|-----------------------------------|--------|
| Acrilamida | 87 g |
| Bisacrilamida | 5 g |
| H ₂ O destilada q.s.p. | 500 mL |

A solução de acrilamida foi filtrada usando-se membranas de nitrocelulose com poros de 0,45µm (milipore). Esta solução é fotosensível e deve ser estocada em geladeira.

5. Enzimas e respectivos tampões***Not I* (10 U/µL) (Promega)**

Utilizada 1 unidade para cada 100 ng de DNA, juntamente com o tampão D.

***Sal I* (10 U/µL) (Promega)**

Utilizada 1 unidade para cada 100 ng de DNA, juntamente com o tampão D.

***Xba I* (10 U/µL) (Promega)**

Utilizada 1 unidade para cada 100 ng de DNA, juntamente com o tampão D.

***Xho I* (10 U/µL) (Promega)**

Utilizada 1 unidade para cada 100 ng de DNA, juntamente com o tampão D.

Tampão D 10X (Promega)

| | |
|-------------------|----------|
| Tris-HCl (pH 7,9) | 6,0 mM |
| MgCl ₂ | 6,0 mM |
| NaCl | 150,0 mM |

***Bam*H I (10 U/μL)** (Promega)

Utilizada 1 unidade para cada 100 ng de DNA, juntamente com o tampão E.

***Hind* III (10 U/μL)** (Promega)

Utilizada 1 unidade para cada 100 ng de DNA, juntamente com o tampão E.

Tampão E 10X (Promega)

| | |
|-------------------|----------|
| Tris-HCl (pH 7,5) | 6,0 mM |
| MgCl ₂ | 6,0 mM |
| NaCl | 100,0 mM |
| DTT | 1,0 mM |

***Eco*R I (12 U/μL)** (Promega)

Utilizada 1 unidade para cada 100 ng de DNA, juntamente com o tampão H.

***Pst* I (10 U/μL)** (Promega)

Utilizada 1 unidade para cada 100 ng de DNA, juntamente com o tampão H.

Tampão H 10X (Promega)

| | |
|-------------------|---------|
| Tris-HCl (pH 7,5) | 90,0 mM |
| MgCl ₂ | 10,0 mM |
| NaCl | 50,0 mM |

Taq DNA Polimerase (5 U/μL) (CENBIOT)**Tampão da *Taq DNA Polimerase* 10X (CENBIOT)**

| | |
|-------------------|-----------------|
| Tris-HCl (pH 8,3) | 100,0 mM |
| KCl | 500,0 mM |
| BSA | 0,1 % (p/v) |
| MgCl ₂ | 15,0 ou 20,0 mM |

DNase I (1 U/μL) (Promega)

Utilizada conforme especificações do fabricante.

Tampão da DNase I 10X (Promega)

| | |
|-------------------|---------|
| Tris-HCl (pH 7,8) | 0,4 M |
| MgSO ₄ | 0,1 M |
| CaCl ₂ | 10,0 mM |

Transcriptase reversa M-MLV (200 U/ μ L) (Invitrogen)**Tampão da Transcriptase Reversa 5X**

| | |
|-------------------|---------|
| Tris-HCl (pH 8,3) | 0,250 M |
| KCl | 0,375 M |
| MgCl ₂ | 0,015 M |

T4 DNA ligase (1 U/ μ L) (Invitrogen)

Utilizada conforme especificações do fabricante.

Tampão da T4 DNA ligase 5X (Invitrogen)

| | |
|-------------------------|------------|
| Tris-HCl (pH 7,6) | 250 mM |
| MgCl ₂ | 50 mM |
| DTT | 5 mM |
| ATP | 5 mM |
| Polietileno glicol-8000 | 25 % (p/v) |

Fosfatase alcalina (CIAP) (Promega)

Utilizada 0,02 unidade para cada 1 pmol de DNA.

Tampão de parada da CIAP 1X (Promega)

| | |
|-------------------|----------|
| Tris-HCl (pH 7,5) | 10,0 mM |
| EDTA (pH 7,5) | 1,0 mM |
| NaCl | 200,0 mM |
| SDS | 0,5 % |

6. Linhagens de *Escherichia coli*

A seguir são descritas as linhagens de *E. coli*, com seus respectivos genótipos, utilizadas durante a realização desse trabalho. As linhagens celulares foram estocadas a – 80 °C em meio L contendo 25 % de glicerol.

| Linhagem | Genótipo | Referência |
|-----------------|---|--------------------------|
| DH5α | <i>endA1 recA1 hsdR17 supE44 gyrA96 thi-1 relA1 ΔlacU169 (φ80lacZΔM15)</i> | Sambrook & Russel (2001) |
| XL 1 Blue | <i>SupE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻ F' [proAB⁺ lacI^q lacZ ΔM15 Tn10(tet^r)]</i> | Sambrook & Russel (2001) |
| P2 392 | <i>rpsL (Strr) thr leu thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ(lacproAB) [F' traD36 proAB lacIqZΔM15]</i> | Sambrook & Russel (2001) |

7. Oligonucleotídeos sintéticos

Os oligonucleotídeos utilizados como iniciadores em reações de polimerização em cadeia (PCR) estão descritos na tabela 1, com suas respectivas seqüências e TM.

Tabela 1: Oligonucleotídeos sintéticos utilizados nesse trabalho.

| Oligonucleotídeo | Seqüência | TM |
|------------------|-----------------------------------|------|
| pacF | 5' CGT.CAC.GTA.GGG.CGC.AAG 3' | 50°C |
| pacR | 5'GTG.GGA.GGT.ACG.ATA.ACT.C 3' | 46°C |
| pac8 | 5' AGA.CTA.CGA.GGA.GGA.TAC 3' | 54°C |
| pac9 | 5' AGC.AGT.GGG.CAA.CCT.TTC 3' | 59°C |
| pac10 | 5' TGA.CTT.GAT.GAA.CAT.TGA.CC 3' | 54°C |
| pac11 | 5' GTT.ATG.GTT.ATG.GTT.GTG.G 3' | 53°C |
| pacPbEXF | 5' CTT.GTC.TTA.TCC.TGT.CTT.GTC 3' | 66°C |
| pacPbEXR | 5' AGA.TTT.AGG.TTA.TTG.GTG.CTC 3' | 64°C |
| M13 Universal | 5' GTT.TTC.CCA.GTC.ACG.AC 3' | 52°C |
| M13 Reverso | 5' CAG.GAA.ACA.GCT.ATG.AC 3' | 50°C |

8. Marcadores de massa molecular para DNA

Foram utilizados os seguintes marcadores para DNA em experimentos de eletroforese: 1 kb DNA Ladder (Invitrogen), 100 bp DNA Ladder (Invitrogen), DNA de fago λ digerido com *Hind* III (λH) e DNA de fago λ digerido com *EcoR* I e *Hind* III ($\lambda E/H$).

9. Plasmídeos

Os vetores para clonagem de produtos de PCR (pGEM[®]-T Easy - Promega) e para fragmentos de DNA obtidos por digestão com endonucleases de restrição (pTZ19U - Pharmacia) estão representados nas figuras 7 e 8. As células contendo os plasmídeos recombinantes foram estocadas a – 80 °C em meio L acrescido de 25 % (v/v) de glicerol.

10. Kits Comerciais Utilizados

Concert[™] Rapid PCR Purification System (Gibco). Usado para purificação de produtos de PCR.

pGEM[®]-T Easy Vector System I (Promega). Vetor para clonagem de produtos de PCR.

QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Usado para eluição de bandas de DNA em gel de agarose.

Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). Usado para purificação de plasmídeos para o seqüenciamento automático.

MegaBACE Dye Terminator. Utilizado em reações de seqüenciamento automático no aparelho MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences).

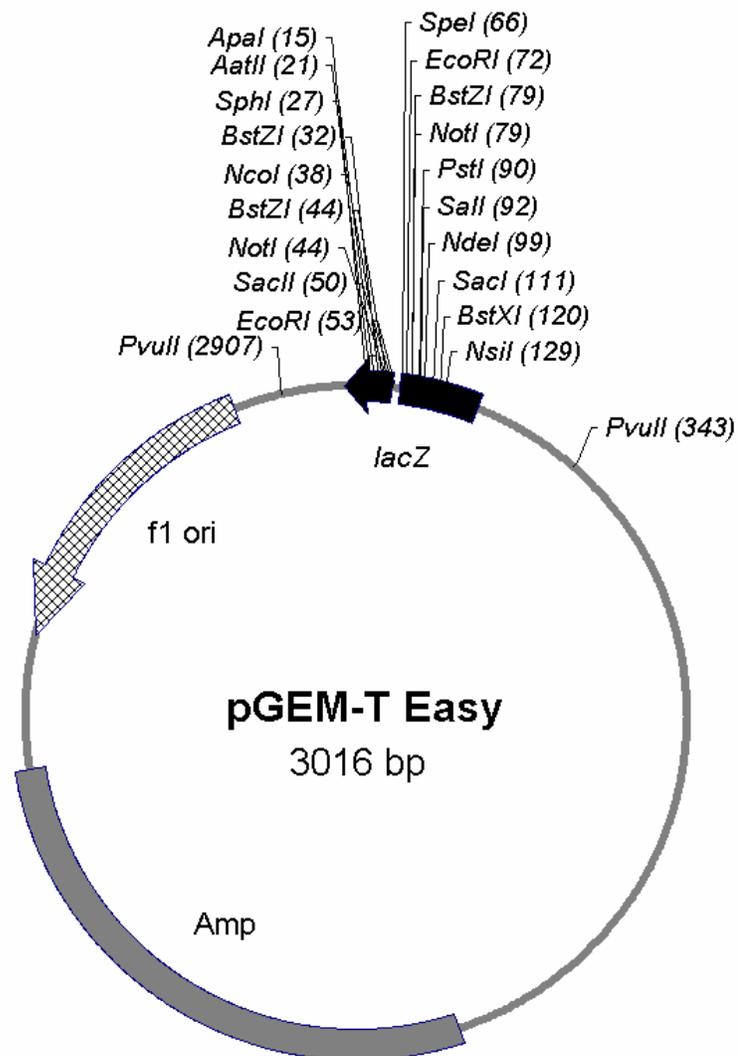


Figura 7: Representação esquemática do mapa físico do vetor para clonagem de produto de PCR

pGEM[®]-T Easy (Promega). Esse vetor de 3,0 kb possui o gene de resistência a ampicilina como marca de seleção, a origem de replicação do fago f1, parte do gene *lacZ* que codifica o fragmento amino-terminal da enzima β -galactosidase, múltiplos sítios de clonagem na região codante do *lacZ*, e os promotores T7 e SP6 flanqueando a região de clonagem. A seleção dos recombinantes é feita pela ausência da atividade da β -galactosidase na presença de X-gal.

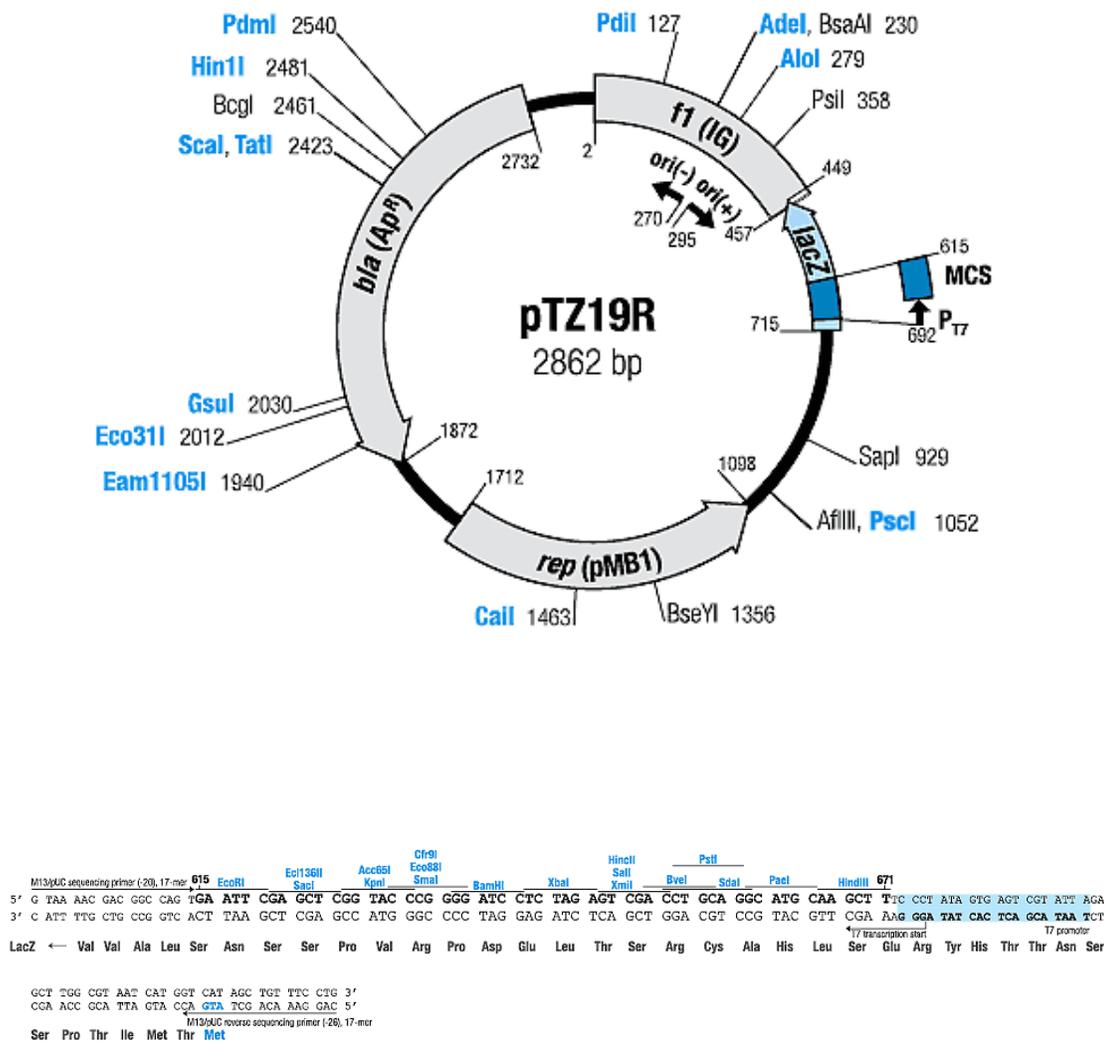


Figura 8: Representação esquemática do mapa físico do vetor para clonagem de fragmentos de digestões de DNA pTZ19R. O pTZ19U difere do pTZ19R no sentido da seqüência de f1(IG). Esse vetor de aproximadamente 3,0 kb possui o gene de resistência a ampicilina como marca de seleção, a origem de replicação pMB1, parte do gene *lacZ* que codifica o fragmento amino-terminal da enzima β -galactosidase, múltiplos sítios de clonagem na região codante do *lacZ*, e o promotor T7 5' ao sítio múltiplo de clonagem. A seleção dos recombinantes é feita pela ausência da atividade da β -galactosidase na presença de X-gal.

MÉTODOS

MÉTODOS

Os procedimentos descritos a seguir foram realizados essencialmente segundo Sambrook & Russel (2001).

1. Preparo das Células de *E. coli* P2 392 para Infecção com Bacteriófago Lambda – Células Competentes

Para tornar as células competentes para posterior infecção com fagos recombinantes do banco genômico de *P. brasiliensis*, foi crescido pré-inóculo de células de *E. coli* P2 392 durante a noite em meio 2XYT líquido, acrescido das concentrações finais de 0,2 % (p/v) de maltose e 10 mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, a 37 °C sob agitação. O pré-inóculo foi transferido a 50 mL de meio 2XYT líquido, também acrescido das concentrações finais de 0,2 % (p/v) de maltose e 10 mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, e incubado a 37 °C sob agitação até atingir a OD_{610} de 0,3-0,6. As células foram submetidas à centrifugação de 3000 X g por 5 min a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 20 mL de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mM a 4 °C. Repetiu-se a centrifugação e as células foram ressuspensas agora em 16,7 mL de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mM a 4 °C, estando então consideradas competentes.

2. Propagação e Extração de DNA de Fago Lambda

O DNA dos fagos selecionados por *screening* da biblioteca genômica de *P. brasiliensis* foi propagado e extraído conforme descrito a seguir.

Para infecção, a uma alíquota de 200 μL de bactérias *E. coli* P2 392 competentes (10^8 células) adicionou-se de 50-100 μL de fagos (10^7 pfu) das bibliotecas genômicas. Incubou-se a mistura a 37 °C por 20 minutos com agitação de 200 rpm. Após, adicionou-se 10 mL de meio 2XYT contendo a concentração final de 10 mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e incubou-se sob agitação a 37 °C por 18 horas, sob vigorosa aeração. Depois de crescida a cultura, adicionou-se 0,2 mL de clorofórmio e agitou-se fortemente por 10 minutos. A cultura foi centrifugada a 10.000 X g por 5 minutos, recuperando-se o sobrenadante. Adicionou-se 10 mL de solução de PEG 8.000 20 % / NaCl 2 M em tampão SM.

Homogeneizou-se bem e incubou-se por uma hora no gelo. Feito isto, centrifugou-se a 5.000 X g por 20 minutos, desprezou-se o sobrenadante e secou-se o sedimento, evitando-se contaminação com PEG. O sedimento foi ressuspendido cuidadosamente em 500 μL de Tampão SM. Após adição de DNase I e RNase A para uma concentração final de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, deixou-se o preparado por 10 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se 1 μL de proteinase K (1 mg/mL) e 21 μL de SDS 10 % e deixou-se por 10 minutos à temperatura ambiente. O volume do preparado foi aumentado para 1,5 mL com SM e fez-se uma purificação com 1 volume de fenol saturado, uma com 1 volume de clorofane e uma com 1 volume de clorofórmio. Centrifugando-se a 10.000 X g por 5 minutos após cada extração e coletando-se a fase aquosa.

À fase aquosa final adicionou-se 0,1 volume de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 1 volume de isopropanol e deixou-se a -20 °C durante a noite. Após isto, centrifugou-se a

15.000 X g por 10 minutos, lavou-se duas vezes com 500 µL de etanol 70 % gelado e centrifugou-se a 10.000 X g por 5 minutos. Secou-se e ressuspendeu-se o sedimento em 100 µL de TE. O DNA foi em seguida analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8 %.

3. Identificação, Isolamento e Clonagem dos Fragmentos do gene *pacC* de *P.*

brasilensis

O DNA dos fagos selecionados pelo *screening* das bibliotecas genômicas foi submetido a digestões com as endonucleases de restrição *EcoR* I, *Sal* I, *Pst* I, *Hind* III, *Not* I e *BamH* I da Promega. Os fragmentos resultantes das digestões foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8 % e transferidos por capilaridade para membrana de nitrocelulose, sendo fixados por pulsos de ultravioleta. Foram feitas análises de *Southern blot* empregando-se, como sonda, os mesmos fragmentos utilizados nos *screenings* dos bancos genômicos, com o objetivo de identificar os fragmentos específicos que continham seqüências homólogas ao gene *pacC*.

Os fragmentos de hibridação positiva nos experimentos de *Southern blot*, realizados conforme descrito por Sambrook & Russel (2001), foram isolados por eluição de gel de agarose (*QIAquick Gel Extraction Kit* - Qiagen) e clonados no vetor pTZ19U (Pharmacia), conforme descrito a seguir. As clonagens foram confirmadas por digestões com enzimas de restrição, seguidas de eletroforese em gel de agarose para verificação da presença do inserto no vetor.

4. Digestão de DNA com enzimas de restrição

Os sistemas de digestão simples ou dupla com enzimas de restrição foram montados utilizando-se uma unidade de cada enzima por 100 ng de DNA e tampão de reação apropriado para a concentração final de 1X. Em cada sistema, o volume de enzima não ultrapassou 10 % do volume total, de modo a evitar que o excesso de glicerol provocasse digestão inespecífica. Os sistemas de digestão foram incubados a 37 °C por 2 a 4 horas ou durante a noite.

5. Eletroforese de ácidos nucléicos em gel de agarose

O gel de agarose na concentração desejada (0,8 a 1,0 %) foi feito em tampão TEB 1X. A solução de agarose em TEB foi aquecida até a completa dissolução. Após resfriamento, adicionou-se 0,5 µg/mL de brometo de etídeo. A agarose fundida foi vertida em forma com pentes apropriados. Esperou-se, então, a total solidificação da solução.

As amostras a serem analisadas foram preparadas adicionando-se tampão de amostra em uma concentração final de 1X. Após a aplicação das amostras, o gel foi submetido a campo elétrico em tampão de corrida TEB 1X utilizando-se uma voltagem não superior a cinco V/cm. A detecção dos ácidos nucléicos foi feita por meio de transiluminador de luz ultravioleta.

6. Purificação de fragmento de DNA em gel de agarose

Os produtos de digestão com enzimas de restrição foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (0,8-1,0 %) corado com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL. A região do gel que continha o fragmento de interesse foi excisada e submetida à purificação utilizando-se o *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen), seguindo-se as recomendações do fabricante.

7. Clonagens nos vetores pTZ19U e pGEM-T Easy

Os fragmentos isolados por eluição de gel de agarose (*QIAquick Gel Extraction Kit* - Qiagen) foram clonados no vetor pTZ19U com o uso da T4 DNA Ligase (Invitrogen). As reações de ligação, incubadas a 16 °C durante a noite, foram feitas em um volume final de 10 µL contendo 1 U da enzima, Tampão da T4 DNA Ligase (1X), 0,1 pmol de vetor e 0,3-0,5 pmol de inserto, gerando uma razão vetor/inserto variando de 1:3 a 1:5.

O vetor pTZ19U digerido por mais de uma enzima de restrição era purificado por eluição de gel de agarose (*QIAquick Gel Extraction Kit* - Qiagen) previamente às ligações.

Quando digerido apenas por uma enzima de restrição, o vetor pTZ19U era defosforilado antes das ligações. As reações de defosforilação ocorreram a 37 °C, por 30 min, em um volume total de 50 µL, sendo 40 µL de vetor linearizado (até 5 pmol), 5 µL do tampão de reação da CIAP e 5 µL de CIAP diluída (0,01 U/µL). Após a incubação inicial, uma nova alíquota de CIAP, equivalente a primeira, era adicionada a reação que permanecia a 37 °C por mais 30 min. Adicionava-se 300 µL de tampão de parada da CIAP e, em seguida, 355 µL de clorofane. A solução era homogeneizada vigorosamente por 2

min e centrifugada por 5 min a 10.000 X g. Separava-se a fase aquosa que era acrescida de 0,5 volume de acetato de amônio 7,5 M (pH 5,5) e 2 volumes de etanol 100 %. A mistura era incubada a -20 °C por 1 h e centrifugada por 30 min a velocidade máxima. Seguiam-se duas lavagens com etanol 70 %.

Os produtos de PCR foram purificados com o uso do kit (*Concert™ Rapid PCR Purification System*-Gibco) e clonados no vetor pGEM-T Easy (Promega), seguindo-se as recomendações dos fabricantes.

Todas os sistemas de ligação foram utilizados em transformações com células de *E. coli* DH5α ou XL 1 Blue competentes. Foram feitas extrações plasmidiais dos transformantes, conforme descrito a seguir. Para confirmação da ligação, os plasmídeos extraídos foram submetidos a reações com enzimas de restrição e tiveram seus perfis analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8 %.

8. Transformação de células de *E. coli*

8.1 Choque térmico com CaCl₂

Para a transformação de *E. coli* DH5α por choque térmico foi adotado o protocolo proposto por Cohen *et al.* (1972), com adaptações. As células da linhagem de *E. coli* a serem transformadas foram inoculadas em 5 mL de meio L e incubadas a 37 °C, sob agitação (200 a 250 rpm), durante a noite. No dia seguinte, 1 mL do pré-inóculo foi adicionado a 30 mL de meio L. A cultura de células foi incubada a 37 °C sob agitação (200 a 250 rpm) até atingir a OD₆₀₀ de 0,2 a 0,3. As células foram coletadas por centrifugação (5000 X g/ 10 min/ 4 °C). O sedimento foi ressuspensão em 10 mL de CaCl₂ 100 mM e

submetido a uma nova centrifugação. As células foram então ressuspensas em 1 mL de CaCl_2 100 mM e glicerol 15 %. Aliquotas de 100 μL de células foram estocadas a -80°C .

Uma alíquota de 50 a 100 μL de células competentes foi utilizada para cada sistema de ligação. As células foram descongeladas no gelo e a elas adicionou-se 50 % do sistema de ligação. As células com o DNA foram incubadas no gelo por 30 minutos. Após esse período, foram submetidas a um choque térmico de 42°C por 90 segundos e, depois de se adicionar 500 a 1000 μL de meio L, foram incubadas a 37°C por uma hora. Foram semeadas de 50 a 200 μL de células em placas de Petri contendo 20 mL de meio L agar com antibiótico (ampicilina a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), X-gal (0,004%) e IPTG (0,2mM).

8.2 Eletroporação

As células da linhagem de *E. coli* XL 1 Blue a serem transformadas foram inoculadas em 50 mL de meio SB. A cultura de células foi submetida a uma agitação de 100 a 150 rpm a 37°C durante a noite. No dia seguinte, 500 μL dessa cultura foram adicionados a 200 mL de meio SB, seguindo-se incubação nas mesmas condições descritas anteriormente até uma OD_{600} de 0,8. As células foram centrifugadas (5000 X g / 10 min / 4°C) e o sedimento foi ressuspenso em 40 mL de glicerol 10 % gelado. Foi feita nova centrifugação, repetindo-se o processo uma vez mais. Por fim, as células foram ressuspensas em 1 mL de glicerol 10 %, sendo aliquotadas e estocadas a -80°C .

Uma alíquota de 50 μL de células competentes foi utilizada para cada sistema de ligação. As células foram descongeladas no gelo e a elas adicionou-se 10 a 20 % do sistema de ligação. Em seguida, foram colocadas na cubeta própria para eletroporação e submetidas a pulso elétrico em eletroporador. Os parâmetros utilizados foram: 25 μF , 200 Ω e 2,5 kV. As células foram lavadas da cubeta três vezes com 1 mL de meio SOC. O

sistema foi incubado a 37 °C por uma hora. Foram semeadas de 50 a 200 µL de células em placas de Petri contendo 20 mL de meio L agar com antibiótico (ampicilina a 100 µg/mL), X-gal (0,004%) e IPTG (0,2mM).

9. Preparação de DNA plasmidial em pequena escala

Colônias individuais de *E. coli* foram inoculadas em 5 mL de meio L com antibiótico apropriado (ampicilina a 100 µg/mL). As células foram crescidas a 37 °C, sob agitação de 200 a 250 rpm durante 18 horas. A cultura de células foi centrifugada (10000 X g / 2 min), descartando-se o sobrenadante. O sedimento foi ressuspensão em 200 µL de TE, em seguida foram adicionados 360 µL de solução II, invertendo-se o tubo delicadamente várias vezes e incubando-se à temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados 300 µL de solução III, invertendo-se o tubo gentilmente várias vezes e incubando-se no gelo por 5 minutos. O material foi centrifugado (10000 X g / 5 min) e o sobrenadante foi transferido para novo tubo ao qual foram adicionados 750 µL de isopropanol, procedendo-se nova centrifugação nas condições descritas anteriormente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensão em 20 µL de TE. Adicionou-se então 110 µL de acetato de amônia 7,5 M homogeneizando-se vigorosamente em agitador. A solução foi centrifugada (10000 X g / 5 min) e o sobrenadante transferido para novo tubo. O DNA foi precipitado pela adição de 750 µL de etanol 100 % e centrifugado (10000 X g / 5 min). O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 70 %, sendo novamente centrifugado (10000 X g / 2 min). O sobrenadante foi descartado e, após secagem, o precipitado foi ressuspensão em 50 µL de TE com 0,5 µL de RNase A a 10 mg/mL.

Quando era necessário seqüenciar o material, a purificação de DNA plasmidial foi realizada utilizando-se o *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), seguindo-se as recomendações do fabricante.

10. Quantificação de Amostras de Ácidos Nucléicos

Para estimar-se a concentração de ácidos nucleicos de diferentes amostras, procedeu-se à leitura da absorbância a 260 nm, assumindo-se que uma unidade de absorbância correspondesse a 50 µg/mL de DNA fita dupla, 40 µg/mL de DNA fita simples ou de RNA e a 33 µg/mL de oligonucleotídeos sintéticos. A razão entre a leitura a 260 nm e a leitura a 280 nm forneceu uma estimativa do grau de pureza da preparação, sendo utilizadas neste trabalho amostras que apresentassem razão igual ou superior a 1,8. Alternativamente, concentrações de ácidos nucleicos foram estimadas em gel de agarose com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL, por comparação visual com amostras de concentração previamente conhecida.

11. Seqüenciamento de DNA

Os plasmídeos recombinantes obtidos no decorrer desse trabalho foram seqüenciados automaticamente no aparelho MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences), utilizando-se o kit *MegaBACE Dye Terminator*. A quantidade de amostra submetida ao seqüenciamento automático foi de 100 ng de DNA, utilizando-se 0,5 µL de solução do oligonucleotídeo sintético (*primer*) adequado, dependendo da reação. A análise da

qualidade do seqüenciamento foi realizada pelos programas Phrad e Phred (<http://adenina.biomol.unb.br/phph>) e a análise das seqüências foi feita por comparação de seqüências depositadas em banco de dados, com o auxílio do programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

12. Estratégia de Seqüenciamento do Gene *pacC* de *P. brasiliensis*

12.1 Estratégia de *Shot-Gun*

O sistema de seqüenciamento automático Megabace 1000 tem a capacidade de seqüenciar até 500 pb com qualidade. Dessa forma, seria impossível a obtenção da seqüência completa dos fragmentos de DNA devido aos seus tamanhos serem superiores a esse limite de resolução.

Para a obtenção da seqüência completa dos fragmentos em questão optou-se pela estratégia de “shot-gun”. Os insertos homólogos a *pacC* clonados em pTZ19U foram digeridos pelas enzimas de restrição *Not* I, *Sal* I, *Xba* I, *Xho* I, *Bam*H I e *Eco*R I (Promega), escolhidas de forma que não digerissem o vetor, exceto em seu sítio múltiplo de clonagem. As digestões foram feitas de forma simples, com as várias enzimas escolhidas, e duplas, com as mesmas enzimas associadas à enzima que libera o inserto do vetor. Os sítios de restrição presentes nas extremidades dos fragmentos foram determinados por análise do perfil de restrição por eletroforese em gel de agarose 0,8 %.

Os fragmentos foram isolados por eluição de gel de agarose e ligados ao vetor pTZ19U. Os sistemas de ligação foram submetidos à transformação de células de *E. coli* competentes, seguido de extração de DNA plasmidial, conforme descrito anteriormente.

Após a clonagem, os fragmentos foram seqüenciados com os oligonucleotídeos sintéticos universal e reverso. As seqüências foram alinhadas *in silico* com seqüências depositadas nos bancos de dados internacionais (GenBank, EMBL, DDBJ e PDB), pelo uso dos programas BLASTn e BLASTx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), de forma a se observar identidades a outros genes *pacC* depositados.

12.2 Seqüenciamento da Sonda

Para completar a seqüência do gene *pacC* de *P. brasiliensis*, foi necessário o seqüenciamento de um fragmento interno correspondente à sonda utilizada nos experimentos de *Southern blot* (Resultados e Discussão). Para tanto, o fragmento de aproximadamente 900 pb foi obtido por ampliações em reação de PCR. Nessa reação, de 30 µL de volume total, foram utilizados tampão *Taq* DNA Polimerase 1X; 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM dNTPs; 2 U da enzima *Taq* DNA Polimerase (Cenbiot); 0,3 µM de cada oligonucleotídeo sintético, sendo utilizados o *pacF* e o *pacR*. Foi utilizado como molde o plasmídeo recombinante *pac1Pb*.

Os parâmetros de amplificação adotados foram:

- 1- Desnaturação inicial: 94 °C / 2 minutos.
- 2- Desnaturação: 94 °C / 1 minuto.
- 3- Anelamento: 45 °C / 1 minuto.
- 4- Extensão: 72 °C / 1 minuto.
- 5- Repetição das etapas de 2 a 4 por 30 vezes.
- 6- Extensão final: 72 °C / 10 minutos.

Os fragmentos relativos à amplificação foram isolados por eluição de DNA em gel de agarose e ligados ao vetor pGEM-T Easy (Promega). O sistema de ligação foi

utilizado em transformações por eletroporação de células de *E. coli* XL1Blue. O clone de interesse foi selecionado por perfil de digestão com a endonuclease *Eco* RI (Promega).

O vetor com o fragmento clonado foi então submetido à seqüenciamento automático das extremidades de seu inserto, com o uso dos oligonucleotídeos de iniciação Universal e Reverso. As seqüências obtidas foram alinhadas com o programa CAP3 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>), formando um contig denominado **Contig da Sonda**.

A seqüência do Contig da Sonda foi alinhada a seqüências depositadas nos bancos de dados internacionais GenBank, EMBL, DDBJ e PDB com o uso dos programas BLASTn e BLASTx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), de forma a se observar identidades a outros genes *pacC* depositados.

12.3 Seqüenciamento dos Gaps da Seqüência de *pacC* de *P. brasiliensis*

Para tal objetivo, foram desenhados oligonucleotídeos que alinhariam nas extremidades das seqüências já conhecidas.

Os oligonucleotídeos sintéticos *pac8*, *pac9*, *pac10* e *pac11* foram utilizados em reações de seqüenciamento automático do plasmídeo *pac1Pb*. As seqüências obtidas foram submetidas a análises de alinhamento no programa CAP3 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>) nas quais, juntamente com as seqüências já conhecidas, visando à obtenção da seqüência completa do *pacC* de *P. brasiliensis*.

13. Análise *in silico* da Sequência Completa do Gene *pacC* de *P. brasiliensis*

A sequência completa de *pacC* de *P. brasiliensis* foi submetida a alinhamentos com seqüências depositadas nos bancos de dados internacionais GenBank, EMBL, DDBJ e PDB com o uso dos programas BLASTn e BLASTx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), de forma a se observar identidades com outros genes *pacC* depositados.

Essa seqüência também foi analisada quanto a possível presença de íntrons pelo uso do programa Wise 2 (<http://www.ebi.ac.uk/Wise2/index.html>), utilizando-se como padrão protéico a seqüência de PacC de *Trichophyton rubrum* (*Accession Number*: gi|73921568|sp|Q9C1A4) pelo fato dessa apresentar a maior homologia com a proteína predita de *P. brasiliensis*.

Com a finalidade de se avaliar a similaridade das várias seqüências de PacC de *P. brasiliensis*, obtidas a partir da tradução da seqüência completa de *pacC* após a retirada dos íntrons sugeridos pelo programa Wise 2, foram feitos alinhamentos com bancos de dados internacionais com o uso do programa BLASTp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Análises de conservação de motivos protéicos específicos foram feitas por alinhamentos, utilizando-se o programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>), com seqüências de PacC de *T. rubrum* (gi|73921568|sp|Q9C1A4), *A. parasiticus* (gi|73921541|sp|Q96UW0), *A. oryzae* (gi|94730405|sp|Q9HFB3), *Emericella nidulans* (gi|68052401|sp|Q00202), *Aspergillus fumigatus* (gi|73921537|sp|Q4WY67), *A. giganteus* (gi|73921538|sp|Q5XL24), *P. chrysogenum* (gi|73921561|sp|Q01864), *Botryotinia fuckeliana* (gi|55669161|gb|AAV54519.1), *S. sclerotiorum* (gi|73921564|sp|Q9P413) e *Magnaporthe grisea* (gi|73921555|sp|Q52B93).

O peso molecular das seqüências protéicas preditas foram obtidos por análises com o programa ProtParam (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>).

14. Análise de Expressão do Gene *pacC* de *P. brasiliensis*

Para o estudo das condições de expressão dos genes *pacC* de *P. brasiliensis*, optamos pela técnica de RT-PCR, tendo em vista que essa se encontra bem padronizada em nosso grupo de pesquisa.

14.1 Condição de manutenção e cultivo do fungo *P. brasiliensis*

O isolado *Pb01* do fungo *P. brasiliensis* na forma leveduriforme foi mantido regularmente em meio sólido Fava-Neto, em estufa à temperatura de 36,5 °C. O fungo era repicado semanalmente, sendo passado para novo tubo contendo meio de cultura.

14.2 Condição de pré-cultivo do fungo *P. brasiliensis*

As condições de pré-cultivo a serem utilizadas nos experimentos foram estabelecidas a partir de uma curva de crescimento em meio YPD, contando-se o número de células viáveis diariamente em Câmara de *Neubuer* por um período de 10 dias. Nesse sentido, inoculou-se $2,5 \times 10^7$ células leveduriformes do isolado *Pb01* de *P. brasiliensis* em 100 mL de meio complexo YPD contendo 0,05 U/mL de penicilina e 20 µg/mL de neomicina. O fungo foi cultivado por 10 dias a 36,5 °C sob agitação (130 rpm). Para a contagem do número de células viáveis utilizou-se o corante vital Verde-Janus (0,05 %), descrito por Gohman-Yahr *et al.* (1980), na razão de 1:1 amostra-corante. Esses experimentos, realizados em triplicata, tiveram como objetivo determinar o tempo ideal de

cultivo do fungo, assegurando que todos os tratamentos fossem feitos partindo-se de um inóculo de células na fase logarítmica (fase log) de crescimento.

14.3 Cultivo do fungo *P. brasiliensis* para obtenção de RNA total

Após crescimento pelo período estabelecido de seis dias em meio YPD (pré-cultivo), as células leveduriformes foram coletadas por centrifugação de 10 mL da cultura (1550 X g / 3 min / temperatura ambiente). O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas duas vezes com tampão PBS 1X estéril, centrifugando-se como descrito acima. Posteriormente, as células foram ressuspensas em 10 mL de meio YPD tamponados em três valores distintos de pH: 5,0; 7,0 e 9,0. As culturas com diferentes valores de pH foram incubadas sob agitação de 150 rpm, a 36,5 °C, tendo suas células coletadas após 5 h e 18 h. Para todos os experimentos, verificou-se, após o tempo de cultivo determinado, o número de células viáveis e a integridade morfológica. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Após a coleta das células, o pH do sobrenadante foi aferido para averiguar se esse se mantinha constante ao inicial.

14.4 Extração de RNA total de *P. brasiliensis*

Todos os reagentes e água utilizados no preparo de soluções para o uso em experimentos com RNA estavam em condições livres de RNase. Material plástico de uso rotineiro, como ponteiros e tubos tipo *Eppendorf*, eram novos e livres de RNase, com garantia do fabricante. Plásticos recicláveis e vidrarias foram tratados com solução de DEPC (dietil pirocarbonato) e com calor (180 °C por 12 horas), respectivamente, de modo a ficar em condições livres de RNase.

As células cultivadas nas condições descritas foram coletadas por centrifugação (1550 X g / 3 min / temperatura ambiente) e o sobrenadante reservado para aferição do pH do meio. Cerca de 180 mg de células (peso úmido) foram empregados para extração de RNA total. A essa massa de células foi adicionado 1 mL do reagente Trizol[®] (Invitrogen) e micro pérolas de vidro (Sigma). A lise das células foi realizada por continuada agitação em “vortex” por 30 min a temperatura ambiente. Em seguida, a extração do RNA total foi realizada conforme especificado pelo fabricante do reagente Trizol[®] (Invitrogen). Centrifugou-se a amostra por 1 min a 10000 X g (temperatura ambiente), transferindo-se o sobrenadante para novo tubo e descartando-se os restos celulares sedimentados (repetiu-se esse procedimento). À amostra coletada adicionou-se 200 µl de clorofórmio, misturando-se vigorosamente. Posteriormente, a mistura foi centrifugada (12.000 X g / 15 min / 4 °C) e a fase aquosa resultante foi transferida para novo tubo. Adicionou-se 500 µl de isopropanol e, após 10 min de incubação à temperatura ambiente, a amostra foi novamente centrifugada (12.000 X g / 10 min / 4 °C). O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado duas vezes com etanol 70 % (7500 X g / 5 min / 4 °C). Em seguida, deixou-se o sedimento secando a temperatura ambiente e, posteriormente, o mesmo foi ressuspensionado em 100 µl de água Milli Q.

14.5 Tratamento do RNA total com DNase I livre de RNases

Após quantificação por espectrofotometria e verificação da integridade do RNA total por eletroforese em gel de agarose 1 %, em condições livre de RNase (Sambrook & Russel, 2001), cerca de 10 µg do RNA total obtido foram submetidos a tratamento com DNase I livre de RNase (Promega) a fim de se eliminar qualquer traço residual de contaminação por DNA genômico. As condições de tratamento com DNase I, para um volume final de 25 µL de reação, foram: Tampão da DNase I 1X; 10 U da enzima DNase I

livre de RNase (Promega). O tratamento foi realizado a 37 °C por 30 minutos, parando-se a reação pela adição de EDTA 2,5 mM (concentração final) e aquecendo-se a 65 °C por 10 minutos. Após precipitação padrão com etanol, o RNA total tratado com DNase I livre de RNase foi novamente quantificado e analisado por eletroforese em gel de agarose 1 %.

14.6 Transcrição Reversa acoplada a Reação de Polimerização em Cadeia (RT-PCR)

14.6.1 Síntese da Primeira Fita de cDNA

A reação de síntese da primeira fita de cDNA foi realizada a partir de 2 µg das diferentes amostras de RNA total livre de DNA. A essa quantidade de RNA total foi adicionado 0,5 µg do oligonucleotídeo sintético pacPbEXR, sendo a mistura incubada a 70 °C / 10 minutos, e imediatamente colocada no gelo por cerca de 1 minuto. Em seguida, para um volume final de 25 µL, os seguintes reagentes foram adicionados (para as concentrações finais indicadas): tampão da transcriptase reversa 1X; DTT 8 mM; dNTPs 0,4 mM cada. Em seguida, 200 U da enzima transcriptase reversa foram adicionadas para cada sistema, seguindo-se incubação a 37 °C por 1 h. Finalmente, a enzima foi desnaturada aquecendo-se a 94 °C por 2 minutos. Para todos os sistemas foi feito controle da RT-PCR omitindo-se a enzima transcriptase reversa, para verificar uma possível contaminação por DNA genômico.

14.6.2 Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

Uma alíquota correspondente a 1/5 (5 µL) da reação de síntese de cDNA foi submetida à reação de amplificação em um volume final de 25 µL contendo os seguintes reagentes em quantidade suficiente para as concentrações finais especificadas: tampão *Taq* DNA Polimerase 1X; 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM dNTPs; 2 U da enzima *Taq* DNA

Polimerase (Cenbiot); 0,3 μM de cada oligonucleotídeo sintético, sendo utilizados o pacPbEXF e o pacPbEXR.

Os parâmetros de amplificação adotados foram:

- 1- Desnaturação inicial: 94 °C / 2 minutos.
- 2- Desnaturação: 94 °C / 1 minuto.
- 3- Anelamento: 60 °C / 1 minuto.
- 4- Extensão: 72 °C / 1 minuto.
- 5- Repetição das etapas de 2 a 4 por 30 vezes.
- 6- Extensão final: 72 °C / 10 minutos.

A reação de PCR foi também realizada empregando-se como molde o plasmídeo pac1Pb, como controle de amplificação e para comparação com os *amplicons* obtidos nas reações de RT-PCR. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0 % e gel de poliacrilamida 10 %.

14.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante 10%

O gel de poliacrilamida 10% foi utilizado para analisar os produtos da RT-PCR e seu controle genômico. Os volumes usados para a montagem do gel foram:

| | |
|---------------------|----------------------|
| Acrilamida-Bis 30 % | 2,67 mL |
| Água destilada | 4,53 mL |
| TBE 10 X | 800,00 μL |
| APS 10 % | 56,00 μL |
| TEMED | 6,40 μL |
| Volume final | 8,00 mL |

As amostras foram preparadas adicionando-se 1 μL de tampão de amostra 10X a 5 μL do produto da RT-PCR ou ao seu controle genômico, sendo o volume completado para 10 μL com água destilada. O tampão de corrida usado foi TBE 1X e a corrida foi feita à temperatura ambiente, a 120 V e a amperagem variando entre 20 mA e 25 mA. O gel foi desmontado e corado com EtBr. Para tanto, foram colocados 3 μL de EtBr 10 mg/mL em aproximadamente 200 mL de tampão de corrida TBE 1X e deixado sob agitação por 20 minutos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa (Diretório CNPq – Biologia Molecular de Fungos Filamentosos), a partir do alinhamento da seqüência de nucleotídeos dos genes *pacC* de *A. nidulans*, *A. niger*, *A. oryzae*, *S. cerevisiae* e *P. chrysogenum*, desenhamos oligonucleotídeos degenerados (*pacF* e *pacR*) que pudessem ser empregados para a amplificação da região codificadora dos três domínios em dedos-de-zinco do gene *pacC*, que é a região mais conservada dentre as seqüências desse gene disponíveis em bancos de dados.

Tais oligonucleotídeos foram empregados como iniciadores em reações de PCR típicas, tendo-se como molde o DNA genômico de *Humicola grisea*, *P. brasiliensis*, *A. fumigatus* e *Penicillium echinulatum*. Para todos esses microrganismos foram obtidos *amplicons* de tamanho compatível com o esperado.

A utilização dos *amplicons* de *P. brasiliensis* como sonda homóloga no *screening* de biblioteca genômica desse fungo permitiu o isolamento dos diferentes clones que são objeto do presente estudo.

1. Caracterização Molecular dos Fagos Recombinantes Contendo Seqüências de DNA de *P. brasiliensis* Apresentando Similaridade de Seqüência com o Gene *pacC*

Após “*screening*” terciário de biblioteca genômica de *P. brasiliensis*, cinco clones de hibridação positiva com a sonda homóloga foram identificados. Os quatro diferentes

clones foram então amplificados e tiveram seu DNA extraído. Feito isto, o DNA foi submetido a digestões simples ou duplas com as endonucleases de restrição *Eco* RI, *Bam* HI, *Hind* III, *Sal* I, *Not* I e *Pst* I, gerando fragmentos de diferentes tamanhos (Figura 9).

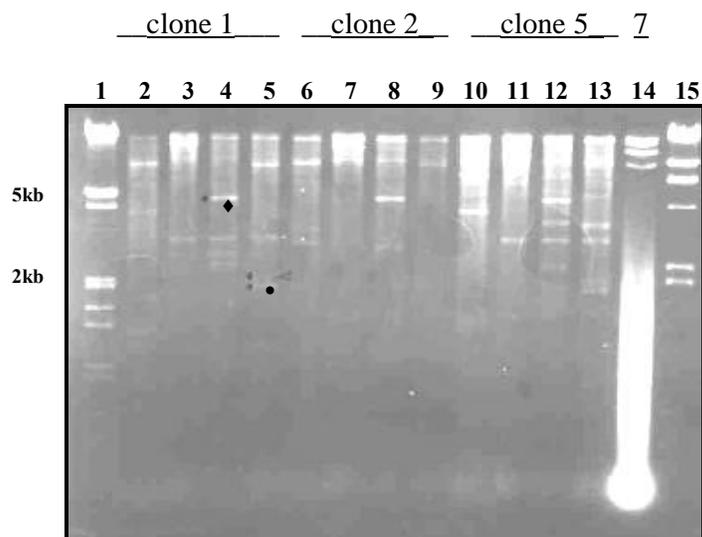


Figura 9: Análise eletroforética em gel de agarose 0,8 %, corado com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL, de produtos de digestão com endonucleases de restrição, do DNA de fagos recombinantes. Poços 1 e 15, marcadores λ / *Eco* RI / *Hind* III e λ / *Hind* III, respectivamente. Poços 2 a 5, DNA do clone 1 digerido com *Eco* RI / *Bam* HI, *Eco* RI, *Eco* RI / *Hind* III e *Eco* RI / *Sal* I, respectivamente. Poços 6 a 9, DNA do clone 2 digerido com *Eco* RI / *Bam* HI, *Eco* RI, *Eco* RI / *Hind* III e *Eco* RI / *Sal* I, respectivamente. Poços 10 a 13, DNA do clone 5 digerido com *Eco* RI / *Bam* HI, *Eco* RI, *Eco* RI / *Hind* III e *Eco* RI / *Sal* I, respectivamente. Poço 14, DNA do clone 7 digerido com *Not* I. ◆, • - Fragmentos de hibridação positiva. ◆-Fragmento posteriormente selecionado, eluído e sub-clonado.

De modo a investigar em que fragmentos estava contida a seqüência homóloga ao gene *pacC*, o DNA digerido foi utilizado em experimento típico de *Southern blot*, empregando-se como sonda o mesmo fragmento usado no *screening* do banco genômico

(Figura 10). Essa figura demonstra que o DNA dos fagos recombinantes 1, 2 e 5 apresentam o mesmo perfil de hibridação com a sonda. Em experimentos não apresentados foi demonstrado que o DNA dos fago recombinante 7 também apresenta o mesmo perfil de hibridação.

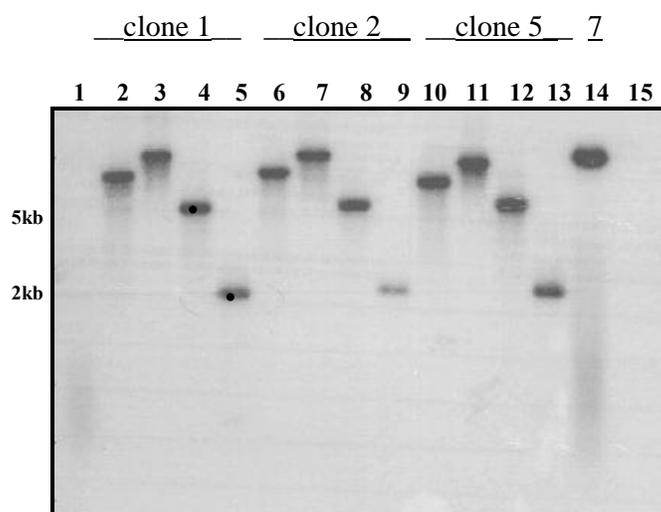


Figura 10: Análise radiográfica correspondente ao padrão de hibridação do DNA dos fagos recombinantes da Figura 9 com a sonda semelhante a usada nos experimentos de *screening* do banco genômico. • -Fragmentos correspondentes aos indicados na figura anterior

A figura 11 apresenta o perfil eletroforético do clone 7 após digestões duplas com diferentes endonucleases de restrição, uma vez que inicialmente esse clone havia sido digerido unicamente com *Not* I (Figuras 9 e 10). A figura 12 representa o experimento de *Southern blot* correspondente ao clone 7.

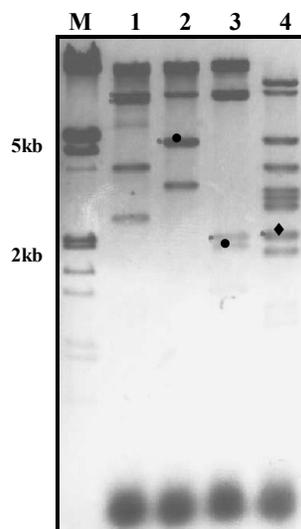


Figura 11: Análise eletroforética em gel de agarose 0,8 %, corado com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL, de produtos de digestão com endonucleases de restrição, do DNA do clone recombinante 7. Poço 1 a 4: digestões do DNA do clone com *Not I / Bam HI*, *Not I / Hind III*, *Not I / Sal I* e *Not I / Pst I*, respectivamente. M- marcador λ / *Eco RI / Hind III*. •, ♦ - Fragmentos de hibridação positiva. ♦ - Fragmento de DNA eluído e sub-clonado.

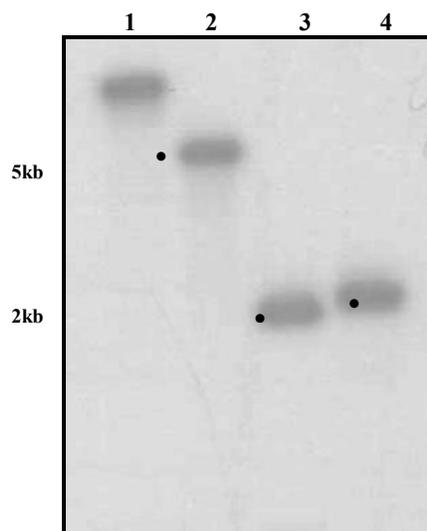


Figura 12: Análise radiográfica correspondente ao padrão de hibridação do DNA do fago recombinante da Figura 11 com a sonda semelhante a usada nos experimentos de *screening* do banco genômico.. •-Fragmentos correspondentes aos indicados na figura anterior.

Para o prosseguimento da caracterização molecular dos fagos recombinantes escolhemos, em razão do tamanho, os fragmentos de aproximadamente 4,5 kb provenientes da digestão *Eco* RI / *Hind* III (Figuras 9 e 10) e de cerca de 2,0 kb da digestão *Not* I / *Pst* I (Figuras 11 e 12) para subclonagem e seqüenciamento.

Como as digestões para os experimentos de *Southern blot* foram duplas, exceto *Eco*R I e *Not* I, foi efetivada nova digestão analítica visando a confirmação das extremidades dos fragmentos selecionados. Conforme pode ser observado na figura 13, o fragmento de 4,5 kb possui extremidades geradas apenas por *Hind* III (poço 3). Já o fragmento de 2,0 kb, apenas por *Pst* I (poço5). Assim, os fragmentos isolados foram subclonados em vetor pTZ19U (Pharmacia) linearizado com as enzimas apropriadas, após defosforilação das extremidades.

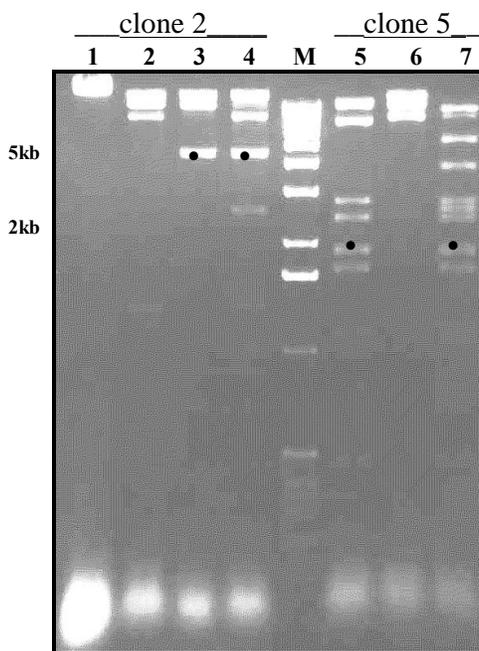


Figura 13: Identificação dos sítios de clivagem para endonucleases de restrição presentes na extremidade dos fragmentos selecionados para subclonagem. Análise eletroforética em gel de agarose 0,8 %, corado com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL, de produtos de digestão com endonucleases de restrição do DNA dos clones 2 e 5. Poço 1: DNA intacto do clone 2. Poços 2 a 4: digestões do DNA do clone 2 com as endonucleases *Eco* RI, *Hind* III e *Eco* RI / *Hind* III, respectivamente. Poços 5 a 7: digestões do DNA do clone 5 com as endonucleases *Pst* I, *Not* I e *Pst* I / *Not* I, respectivamente. M- marcador 1kb DNA Ladder.

O fragmento de 4,5 kb – *Hind* III foi eficientemente clonado no vetor pTZ19U (poço 3), como pode ser verificado na figura 14. A essa construção deu-se o nome de **pac1Pb**. O fragmento de 2 kb – *Pst* I, conforme pode ser observado na digestão do DNA com a respectiva enzima (poços 7 e 9), também foi eficientemente sub-clonado no pTZ19U e nomeado **pac8Pb**.

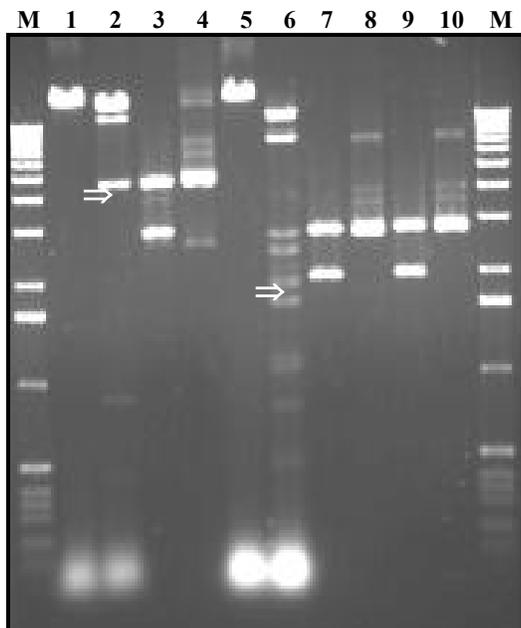


Figura 14: Análise Eletroforética em gel de agarose 0,8 %, corado com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL, de plasmídeos recombinantes contendo fragmentos do gene *pacC* putativo de *P. brasiliensis*. Poço 1, DNA intacto do clone 1 de fago; Poço 2, DNA do clone 1 de fago digerido com *Hind* III, liberando fragmento de 4,5 kb; Poço 3, plasmídeo digerido com *Hind* III, liberando o fragmento sub-clonado de 4,5 kb. Poço 4 plasmídeo intacto contendo o fragmento gênico anterior. Poço 5, DNA intacto do clone 5. Poço 6, DNA do clone 5 digerido com *Pst* I. Poços 7 e 9 plasmídeos digeridos com *Pst* I liberando fragmento de aproximadamente 2kb. Poços 8 e 10, plasmídeo intactos contendo fragmento gênico de 2kb. M- marcador 1kb DNA Ladder.

2. Seqüenciamento das Extremidades dos Fragmentos de DNA Isolados da Biblioteca Genômica de *P. brasiliensis*

As construções *pac1Pb* e *pac8Pb* foram submetidas à seqüenciamento automático das extremidades de seus insertos, provindos da biblioteca genômica, e posteriormente alinhados, com o uso dos programas BLASTn e BLASTx, com seqüências depositadas nos bancos de dados internacionais GenBank, EMBL, DDBJ e PDB.

As duas extremidades da construção pac8Pb, denominadas pac8Pb-U (seqüenciada com o oligonucleotídeo de iniciação universal) e pac8Pb-R (com o oligonucleotídeo de iniciação reverso), alinharam com seqüências de *pacC* depositadas nos bancos de dados, tendo maior similaridade com o gene e com a proteína de *T. rubrum* (*Accession Numbers*: gi|67974642|gb|AF363788.2| para o gene e gi|73921568|sp|Q9C1A4| para a proteína) (Figura 15).

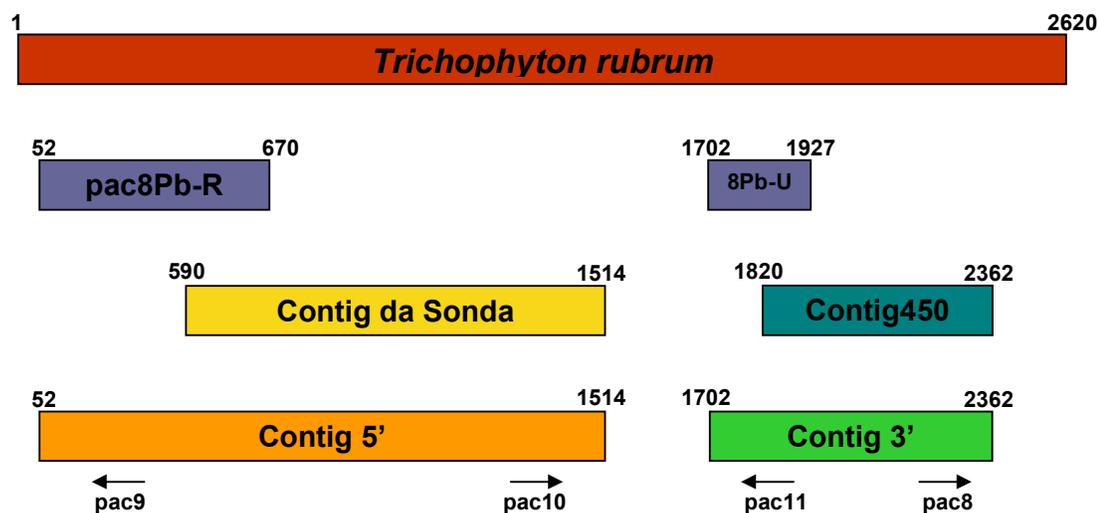


Figura 15: Esquema demonstrativo da região de alinhamento das seqüências parciais de *pacC* de *P. brasiliensis* com a seqüência do gene de *pacC* de *T. rubrum*. Os números representam a ordem dos nucleotídeos, tendo como referencia o gene de *T. rubrum*, sendo o nucleotídeo “1” a adenina de seu códon de iniciação. As setas indicam a região aproximada de anelamento dos oligonucleotídeos de iniciação pac8, pac9, pac10 e pac11, sendo representados pelas pontas das setas os sentidos de amplificação em reações de PCR.

A seqüência de pac8Pb-U alinhou apenas com o uso do BLASTx (*e-value* de $8e^{-4}$, identidade de 50 % e similaridade de 64 %), o que é esperado uma vez que esse alinhamento se deu em região mais C-terminal da proteína PacC de *T. rubrum*, a qual é pouco conservada entre as espécies. Já pac8Pb-R alinhou com o uso de ambos os programas. Por estar próximo a região de dedo-de-zinco do gene, a qual é altamente conservada, uma vez mais a maior similaridade foi verificada com o gene *pacC* de *T. rubrum* (*e-value* de $4e^{-17}$, identidade de 86 % no BLASTn e *e-value* de $9e^{-14}$, identidade de 97 % e similaridade de 100 % no BLASTx).

Nenhuma das extremidades de pac1Pb apresentou similaridade significativa nos alinhamentos. Entretanto, como o fragmento de DNA clonado apresentou hibridação positiva no experimento de *Southern blot* (Figura 10) e tem um tamanho superior à média dos genes *pacC* de diferentes fungos (aproximadamente 3,5 kb), acreditamos que o gene de *P. brasiliensis* completo esteja interno a esse clone.

3. Obtenção da Seqüência Completa do Gene *pacC* de *P. brasiliensis*

3.1 Estratégia de *Shot-Gun*

O aparelho de seqüenciamento automático disponível para nossos experimentos (MegaBace 1000) é capaz de determinar, com acurácia, seqüências de até aproximadamente 500 pb. Como os fragmentos de *pacC* clonados em pTZ19U possuem 2,0 kb, e 4,5 kb, eles não poderiam ser seqüenciados por completo em uma única reação. Assim, optamos por gerar fragmentos menores, por meio da digestão do DNA das construções pac1Pb e pac8Pb com diferentes enzimas de restrição. A seleção das enzimas de restrição seguiu os seguintes critérios: i) enzima que não digere o vetor pTZ19U; ii) sítio de restrição com alta probabilidade de ocorrência.

Após análise do perfil de restrição do clone *pac1Pb* (Figura 16) foram selecionados nove fragmentos: três resultantes da digestão com *Sal* I (~500 pb, ~1,8 kb e ~2,0 kb), um de digestão com *Xba* I (~2,0 kb), um da digestão com *Xba* I / *Hind* III (~2,0 kb, ligeiramente menor que o fragmento digerido apenas com *Xba* I), um derivado da digestão com *Pst* I / *Hind* III (~1,8 kb) e três derivados da digestão com *Pst* I (~450 pb, ~500 pb e ~1,9 kb). Para o clone *pac8Pb* (Figura 17) foram selecionados apenas dois fragmentos, ambos digeridos com *Sal* I (~550 pb e ~1,4 kb).

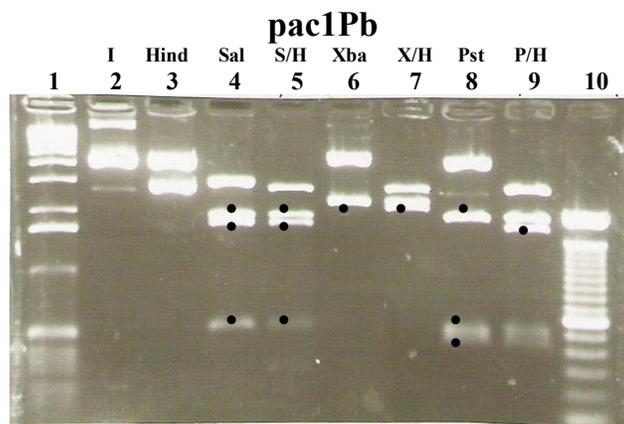


Figura 16: Análise eletroforética em gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL do perfil de restrição do clone *pac1Pb*. Marcador 1 kb ladder (poço 1) e 100pb (poço 10) ambos da Invitrogen. DNA não digerido (poço 2) e digerido com *Hind* III, liberando o inserto de 4,5 kb (poço 3). DNA digerido com *Sal* I (poço 4) e *Sal* I / *Hind* III (poço 5). DNA digerido com *Xba* I (poço 6) e *Xba* I / *Hind* III (poço 7). Clone digerido com *Pst* I (poço 8) e *Pst* I / *Hind* III (poço 9). • - Fragmentos selecionados.

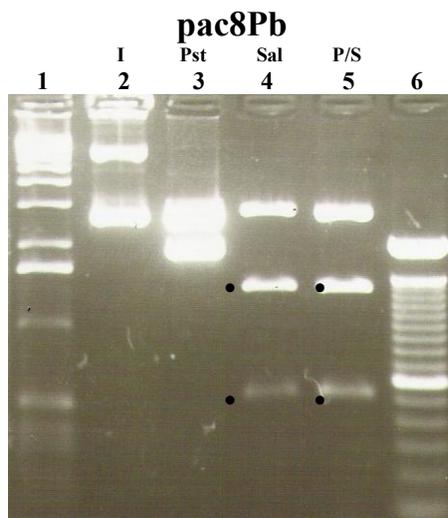


Figura 17: Análise eletroforética em gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL do perfil de restrição do clone pac8Pb. Marcador 1 kb ladder (poço 1) e 100 pb (poço 6) ambos da Invitrogen. DNA não digerido (poço 2) e digerido com *Pst* I liberando o inserto (poço 3). DNA digerido com *Sal* I (poço 4) e *Sal* I / *Pst* I (poço 5). • - Fragmentos selecionados.

Os fragmentos selecionados foram isolados por eluição de DNA de gel de agarose e ligados ao vetor pTZ19U. Os sistemas de ligação foram utilizados em transformações por eletroporação de células de *E. coli* XL1Blue. Os clones de interesse foram selecionados por perfil de digestão com endonucleases apropriadas e analisados por eletroforese em gel de agarose (Figuras 18, 19 e 20). Não foram eficientemente clonados os fragmentos da digestão de pac8Pb, assim como o fragmento da digestão simples de *Xba* I de pac1Pb.

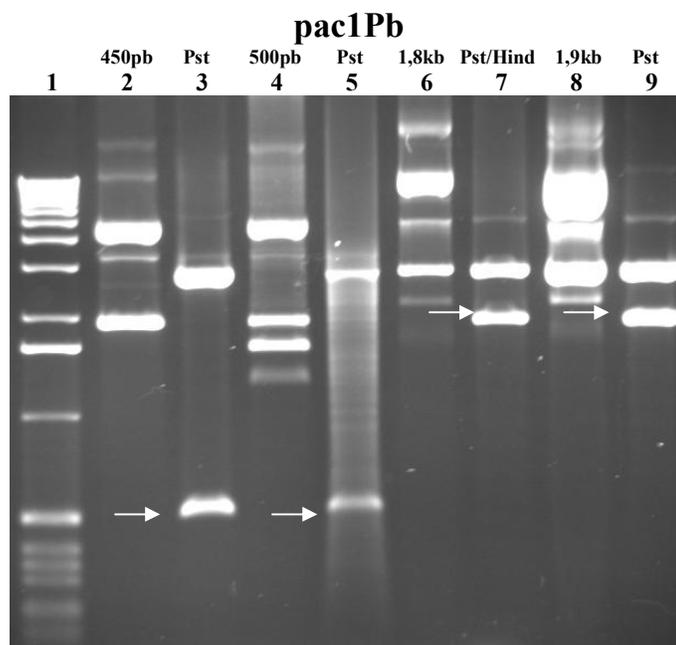


Figura 18: Análise eletroforética em gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL confirmando a clonagem dos fragmentos de *pac1Pb* digerido com *Pst* I. Marcador 1 kb DNA Ladder Invitrogen (poço 1). Plasmídeo intacto contendo o fragmento de aproximadamente 450 pb (poço 2) e digerido com *Pst* I (poço 3). Plasmídeo intacto contendo o fragmento de aproximadamente 500 pb (poço 4) e digerido com *Pst* I (poço 5). Plasmídeo intacto contendo o fragmento de aproximadamente 1,8 kb (poço 6) e digerido com *Pst* I / *Hind* III (poço 7). Plasmídeo intacto contendo o fragmento de aproximadamente 1,9 kb (poço 8) e digerido com *Pst* I (poço 9). As setas indicam os fragmentos liberados após a digestão.

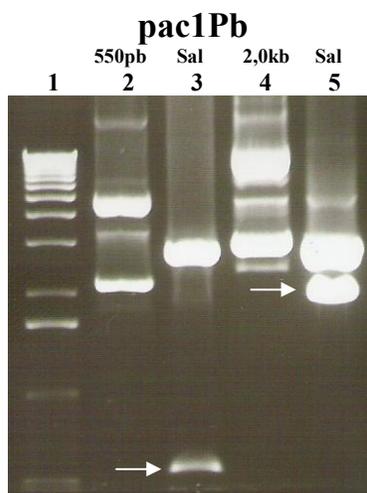


Figura 19: Análise eletroforética em gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL confirmando a clonagem dos fragmentos de *pac1Pb* digeridos com *Sal* I. Marcador 1kb DNA Ladder Invitrogen (poço 1). Plasmídeo intacto contendo o fragmento de aproximadamente 550 pb (poço 2) e digerido com *Sal* I (poço 3). Plasmídeo intacto contendo o fragmento de aproximadamente 2,0 kb (poço 4) e digerido com *Sal* I (poço 5). As setas indicam os fragmentos liberados após a digestão.

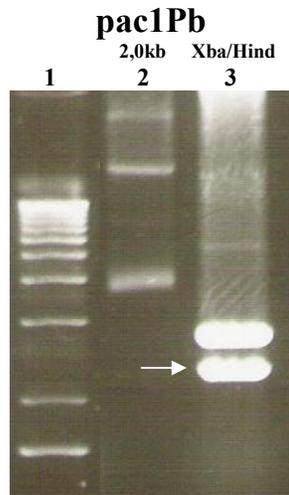


Figura 20: Análise eletroforética em gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL confirmando a clonagem dos fragmentos de *pac1Pb* digerido com *Xba* I / *Hind* III. Marcador 1 kb DNA Ladder Invitrogen (poço 1). Plasmídeo intacto contendo o fragmento de aproximadamente 2,0kb (poço 2) e digerido com *Xba* I / *Hind* III (poço 3). As setas indicam os fragmentos liberados após a digestão.

Confirmada a obtenção, os novos clones foram submetidos a seqüenciamento automático das extremidades dos insertos, com o uso dos oligonucleotídeos de iniciação Universal e Reverso. As seqüências obtidas foram alinhadas, com o uso dos programas BLASTn e BLASTx, com seqüências depositadas nos bancos de dados internacionais GenBank, EMBL, DDBJ e PDB.

Apenas as seqüências das extremidades do fragmento de 450 pb (obtido pela sua digestão do DNA do clone pac1Pb com *Pst* I) e a extremidades seqüenciada com o oligonucleotídeo de iniciação Universal do fragmento de 2,0kb (obtido pela digestão do clone pac1Pb com *Sal* I) alinharam com seqüências de *pacC* depositadas nos bancos de dados. Esse alinhamento só ocorreu com o uso do programa BLASTx, o qual resultou em uma maior similaridade com a proteína PacC de *T. rubrum*.

Análises com o programa CAP3 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>) evidenciaram que as seqüências das extremidades desses subclones alinhavam entre si, formando um contig denominado **Contig 450**. O contig foi submetido a alinhamento por BLASTx, apresentando similaridade a proteína PacC de *T. rubrum* (Figura 15). O Contig 450 codifica um peptídeo que alinhou a uma região mais C-terminal da proteína PacC (*e-value* de $7e^{-04}$, identidade de 52 % e similaridade de 72 %), a qual é pouco conservada. Sendo assim, justifica-se o não alinhamento dessa seqüência ao gene *pacC* de *T. rubrum* com o uso do BLASTn.

3.2 Seqüenciamento da Sonda

Com a finalidade de fechar a seqüência completa do gene *pacC* de *P. brasiliensis* (vide figura 15), o fragmento de aproximadamente 900 pb, correspondente à sonda utilizada nos experimentos de *Southern blot*, foi obtido por amplificação em reação de

PCR, na qual foi usado pac1Pb como molde e pacF e pacR como oligonucleotídeos de iniciação.

O fragmento relativo à amplificação foi isolado por eluição de DNA em gel de agarose e ligado ao vetor pGEM-T Easy (Promega). O sistema de ligação foi utilizado em transformações por eletroporação de células de *E. coli* XL1Blue. O clone de interesse foi selecionado por perfil de digestão com a endonuclease *Eco* RI (Promega) e analisado por eletroforese em gel de agarose.

O fragmento clonado foi então submetido à seqüenciamento automático de suas extremidades, com o uso dos oligonucleotídeos de iniciação Universal e Reverso. As seqüências obtidas foram alinhadas com o programa CAP3 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>), formando um contig denominado **Contig da Sonda**.

A seqüência do Contig da Sonda foi alinhada a seqüências depositadas nos bancos de dados internacionais GenBank, EMBL, DDBJ e PDB com o uso dos programas BLASTn e BLASTx, apresentando alta identidade e similaridade ao gene *pacC* de *T. rubrum* (*e-value* de $6e^{-42}$, identidade de 85 % no BLASTn e *e-value* de $2e^{-107}$, identidade de 73 % e similaridade de 77 % no BLASTx) (Figura 15).

3.3 Seqüenciamento dos Gaps da Seqüência de *pacC* de *P. brasiliensis*

Ainda com o uso do programa CAP3 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>), foram obtidos dois *contigs*: o **Contig 5'**, formado pelo alinhamento das seqüências do Contig da Sonda e do pac8Pb-R, e o **Contig 3'**, formado pelo alinhamento das seqüências de pac8Pb-U e do Contig 450 (Figura 15).

Para se obter as seqüências dos “gaps” do gene *pacC* de *P. brasiliensis*, foram desenhados oligonucleotídeos de iniciação que alinhariam nas extremidades das seqüências já conhecidas, representadas pelos Contig 5’ e Contig 3’ (Figura 15).

Os oligonucleotídeos de iniciação *pac8*, *pac9*, *pac10* e *pac11* foram utilizados em reações de seqüenciamento automático do plasmídio *pac1Pb*. As seqüências obtidas foram submetidas a análises de alinhamento no programa CAP3 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>) nas quais, juntamente com os Contig 5’ e Contig 3’, foi obtida uma seqüência única de 2837pb denominada *pacCPb* (Figura 21).

TTGGCGTTTTGTCGTTTTCCCTTTTTTCCGCTCCCAAGACTTTTGCTTTTGGCGACAAGAAAAAATTTCTTGGCAGACCA
TGTCTTCCCGCGAAAACCCAGACACTTCCGCCCTATGGCCAACAACAACCCGAGCAACAGCAACAGCAACAACAACCAC
 AACCACAGCAGCAGCAGCAGCAGCAACAGCAACAACAACAGGCTCAGCAGACGACGCAACAGCAACAATCCCTCAACAGC
 CATCCCAACAATCACCCTGGTCAGCAACAGCACCAGCCACAGCCTCAGCAGTCCAGCAGGGCCCGAACGGTCTCCAT
 CTCTACGCACCAATCTCAGCGCATGTCCAGCATTCCCCGTCAGCCCTCCATCCACCGCTGAGCTCCTCCCGCAGCCGT
 CCAGCAGGCTGCAGCTGCAGCTGTCTGCTGCCGCGCAGCGGCATCTGTCTCGCTCCAGTGCCTCTGCCACAGAATGGGAGCAA
 TGGCGCAGCCCTAGGTGTCCAGGAACTTGGTGTGTCTAGTGGCAGGGTTGCCAAGAAAGGTTGCCCACTGCTGAAGCTCT
 ATATGTGAGTTGACTCTTTCTTGTCTCTTGAGGGCTTGTCTTATCTGTCTTGTCCATCTCTTGGCTGCCAGCCCAACCGG
 GGATTTTGTATGCACGTGATACACACAAGCTCTGTGCAAATCTATTCAGCGGTTTTTATTTTTATTTTTTACCATTATTTTGG
 TTTTCATATGAATGCTACATCCGCTGTGTGACGTTGAGTTGCCTGGGTTTTTCAATTGTTTACATTCAATCTGCCAGGT
 GACGTTGTGCGTTTTATGAGAAATTTCAATAATGTGCCTGATGCTCGCTCATTTTCTCGTCATATCCATACCTTATAACTA
 ACCAAAGAACAAATAGGAAATGTCTGCGAACGCCACGTAGGGCGCAAGAGCACCAATAACCTAAATCTGACTGTGGAT
 GGGCAAATGGCGGACAACCACCGTCAAACGTGACCACATTACATCGCATATCCGCGTCCATGTGCCCTCAAGCCTCACA
 AGTGTGACTTCTCGGGGAAGGCTTTCAAACGCCCGCAGGACTTGAAGAAGCATGTCAAGACTCATGCAGATGACTCGGTCC
 TCGTGAGGTCTCCGGAGCCTGGACCTGGAACCGGCCACCAATGGAATGTTTGGGGTTGGTGTGGTGTGGTGGGAAAT
GTAAGTCTAGCATTTTCTAAAGCTGTAGCCTATCCCATTTATATGTGTTTTACCCGTACTAATCTAAGTTCCCAATGGCAG
 CCCACTATTTCGAAGGCTCCCTAGGACACGTTACCGGCCAAGGTTACCCGCACGGAGCACCAATACTATCAAACCCCC
 ACCAACACACCCCTCCAACCCCTCATACGGGAATGTCTACTACGCCATAGGCAGCGACTCTCACCAGCCCTCTACGAGT
 CCAAAAAGCGCGGTACGATGCCCTGAATGAGTTTTTCGGAGACTTGAACGCCGTCAGTTCGACCCACCTCTACGGGG
 TTGTTGGACAGCGTCTCTTAAACCTGCACGGTCTGCCACTACCCCTGTCAACGGCGCTGCTGTCCCGTCCCTGAGTACC
 AGACACAACCCATGCCGGCTATGGTCTCCGTCCGCCACGGTGGCGGCCATAGCGGGGGTGGTGGCTACCAACCCGCCAGCC
 CCATGCAGTCCACCTGCCACCGATGGGCAACCTGCGCACCAAGGCTGACTTGATGAACATTGACCAGTTCCCTGGAGC
 AGATGCAGTGCACCGTCTACGAGAGTGTGACCAGTGTGCTGCGGCCGGTGTGCGCAACCGGGCGCTCACTACGTCCAGC
 ATGGCGGGATGAGTTATCGTACCTCCCACAGCAGCAATAACGCAACGCCAATGCCAATGCCAGTCATACCCGCCACCGTT
 CCCCAGCATCAGCAGCCACAAACATCCCATCCACCCACGCAACAGCCACGACACAACAACGACATCAGCACCCATGATCCCA
 CCTCCAGCGCCGCCGCTGCTCCCCACACATGCACCACGCCATGCCCTGACCCTCCCTCCAGCGCTCAGTCATATACTT
 CCGGCCGTCTCCCGTCTCCGTCTCCTCAACCCACCACCATCCCGCCCTCCACCATTACACCACACCCATAAACCATA
 ACCATAACCACCCCTAACTCCAGCGCGGGCATGTACCCACCCCTCCCGCCACGAGCGCGCAGGACGGAAGCTCGACAAACA
 CATACCAGCGCTCTCGGGCGTGCAGCACCCTGCACACTTAGCAGTGTCTTCGATAGCGAGGGCGGGAGGATGCGG
 GCGGATGCTCAGAGGCTTAGACCGGGGATTGTGGCGTCTCACCACCGCCGTCGACAGGGCTCACCGTCTATGTCAATTTG
 CGGAGGTTGGTGGGAATGACACTAAGACGGCGTCCCGTCCATGTCAATTTCCGGCTAGTGTATTGATCCAGCGTTGCAGG
 CGGGGTCTGAGAAGCAGAGTGGTAGCAGTGGCAGTGGTGTGAGGCTGGTGCCTGGTGCCTGGTGCCTGGTGCCTGGTGC
 AGGAGCGCAATGGTTCGTCAFCGTCCCTACTGCTGATGTGGAGGAAGTTTTCCCGTGCCCTCTCCTCTGCCAACGCAACCA
 CTACCATGGCAACTAAAACAGCACCACCAGAAGTCCCAAGTCATACGGTCGAGCAATGGGTCGCCAACGTCGCTCTGCTGG
 AGAAATTCGGCGCTGTATATCTATGAGAGGTTGAGTCCGTGAGACTACGAGGAGGATACCAACAACAGTGGTAGCGATGTCC
 AG

Figura 21: Sequência do gene *pacC* de *P. brasiliensis* (*pacPb*). As seqüências inicial e final em verde claro representam as prováveis regiões 5'-UTR e 3'-UTR. Em azul e sublinhado destaca-se provável sítio de iniciação da tradução. Em laranja são destacados os íntrons sugeridos, nos quais estão presentes as seqüências flanqueadoras 5'-GT...AG-3'. Em vermelho estão destacados possíveis sítios de terminação da tradução, os quais, com exceção do último, são encontrados no interior dos íntrons. Sublinhados no interior dos mesmos se encontram os motivos necessários à formação da alça de *lariat* (Turner, 1993). Nesses motivos estão presentes, nos três primeiros íntrons, possíveis sítios de terminação.

4. Análise *in silico* da Sequência Completa de *pacC* de *P. brasiliensis*

A sequência *pacCPb* foi submetida a alinhamentos com sequências depositadas nos bancos de dados internacionais GenBank, EMBL, DDBJ e PDB com o uso dos programas BLASTn e BLASTx, apresentando regiões com maior similaridade ao gene/proteína *pacC/PacC* de *T. rubrum* (*e-value* de $1e^{-79}$, identidade de 97 % para o BLASTn e *e-value* de $9e^{-109}$, identidade de 73 % e similaridade de 76 % para o BLASTx). Aferiu-se a identidade de *pacCPb* em alinhamentos a sequências de *pacC* de diversos organismos, encontradas nos bancos de dados internacionais, com o uso do programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) (Tabela 2).

Tabela 2: Identidade da sequência *pacCPb* com sequências de genes *pacC* de outros fungos. A identidade foi aferida após alinhamento com o programa ClustalW.

| Fungo | Identidade com <i>pacCPb</i> |
|------------------------|-------------------------------------|
| <i>T. rubrum</i> | 46,9 % |
| <i>A. oryzae</i> | 44,5 % |
| <i>A. parasiticus</i> | 42,6 % |
| <i>A. fumigatus</i> | 40,3 % |
| <i>A. giganteus</i> | 31,4 % |
| <i>A. nidulans</i> | 40,0 % |
| <i>P. chrysogenum</i> | 47,1 % |
| <i>B. fuckeliana</i> | 31,0 % |
| <i>S. sclerotiorum</i> | 36,3 % |

A sequência *pacCPb* foi analisada quanto a possível presença de íntrons pelo uso do programa Wise 2 (<http://www.ebi.ac.uk/Wise2/index.html>) que compara uma sequência protéica a uma sequência de DNA genômico. Para tanto, a sequência de *pacCPb* foi comparada à sequência da proteína PacC de *T. rubrum* (*Accession Number*:

gi|73921568|sp|Q9C1A4) depositada em bancos de dados internacionais (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Foram sugeridos quatro íntrons na seqüência *pacCPb* (Figura 21).

Os possíveis íntrons foram analisados quanto a presença de códons de terminação em fase em sua seqüência, a presença de seqüências flanqueadoras **5'-GT...AG-3'** e a presença de motivo interno **CTPuAPy** (Figura 21), necessário à formação da alça de *lariat*, conforme descrito por Turner (1993), onde Pu é uma purina e Py uma pirimidina, sendo **CTGA** uma seqüência particularmente conservada nesse consenso.

Todos os íntrons apresentaram-se flanqueados pelas seqüências **5'-GT...AG-3'**, além de possuírem motivos **CTPuAPy**. Esses motivos se apresentaram em sua forma mais conservada (CTGA) em todos os íntrons com exceção do terceiro (Figura 21). Apenas o quarto íntron não apresentou códon de parada de tradução em seu interior. Esse também foi o único que, quando presente, não mudou a fase de leitura da tradução de *pacCPb*.

O primeiro íntron apresentou extensão de 161 nucleotídeos, além de um códon de parada sobreposto ao motivo CTGA. O Segundo íntron, de 337 nucleotídeos, apresentou cinco códons de terminação, sendo um sobreposto ao motivo CTGAT. O terceiro íntron possui 96 nucleotídeos de extensão, além de dois códons de parada, sendo um sobreposto ao motivo CTAAT. O quarto íntron apresenta 90 nucleotídeos de extensão (Figura 21).

Até o momento, o gene *pacC* de *P. brasiliensis* é o que apresenta o maior número de íntrons dentre os genes homólogos descritos na literatura científica. A maioria dos genes *pacC* publicados em artigos científicos ou depositados em bancos de dados internacionais possui entre dois e três íntrons, com exceção apenas do *P. chrysogenum* que possui apenas um íntron (Suarez & Peñalva, 1996). As publicações de todas as seqüências de *pacC* do gênero *Aspergillus* disponíveis evidenciam a presença de apenas dois íntrons (Tilburn *et*

al., 1995; MacCabe *et al.*, 1996; Pinero & Keller, 2001; Sano & Machida, 2001; Meyer *et al.*, 2005), assim como em *T. rubrum* (Ferreira-Nozawa, 2001).

Já em representantes do gênero *Fusarium*, assim como nas espécies *B. fuckeliana*, *S. sclerotiorum* e *Acremonium chrysogenum*, observa-se a presença de três íntrons (Rollins & Dickman, 2001; Schmitt *et al.*, 2001; Tudzynski & Selle, 2002; Caracuel *et al.*, 2003; Flaherty *et al.*, 2003; Poussereau & Rasclé, 2004).

A conservação do número e da posição de íntrons em genes de fungos filamentosos é bastante controversa, dependendo do modelo de estudo. Entre genes que codificam enzimas hidrolíticas, por exemplo, não se verifica geralmente tal conservação.

Para a análise dos íntrons da seqüência *pacCPb*, foram feitas análises de tradução *in silico*, excluindo-se dessa seqüência os íntrons sugeridos. Também foram feitas traduções com a presença de apenas um íntron por vez, além de traduções com a retirada de apenas um íntron por vez (Figura 22).

```

> pacCPb sem nenhum dos íntrons propostos
MSSRENPDTSAPMAQQQPQQQQQQQQPQPQQQQQQQQQQQAQQTQQQQSPQQPSQQSPLPAAAAAASVIAPVPLPQNGS
NGAALGVTENLVCWQGCQERLPTAEALYEHVCERHVGRKSTNNLNLTCGWANCRTTTVKRDHITSHIRVHVPLKPHKCDF
CGKAFKRPQDLKKHVKTHADDSVLVRSPEPGPGTRPPNGMFGVGVGADGKCSLGHVHGQGYPHGAPQYYQTPHQHPSNPS
YGNVYYAIGSDSHQASYESKKRGYDALNEFFGDLKRRQFDPTSYAVVGQRLLNLHGLPLPLVNGAAVAVPEYQTPMPAMV
SVGHGGGHSGGGGYQPASPMQSYHLPPMGNLRTKADLMNIDQFLEQMOSTVYESDDHVAAGVAQPGAHYVQHGGMSYRTS
HSSNNANANANASHTATSSPPSAATNIPSTHATATTTTTSAPMIPTSSAARLLPTHAPRHALTPSSAQSYTSGRSPVSVS
STHHHIPPSSHHTHNNHNNHNPSSAGMYPTLPATSAQDGSSTNTYHGVSGAAAPSTLSSVFDSEGGRRYAGGCCRGLDR
GLWRRHRRRRQGSPPSMSFAEVGGNDTKTASPPSMSFSASVIDPALQAGSEKQSGSSGSGVSRALSSANATTTMATKTAPPEV
PSHTVEQWVANVRLLEKLRLYIYERLSR*

> pacCPb retendo apenas o 4° íntron
MSSRENPDTSAPMAQQQPQQQQQQQQPQPQQQQQQQQQQQAQQTQQQQSPQQPSQQSPLPAAAAAASVIAPVPLPQNGS
NGAALGVTENLVCWQGCQERLPTAEALYEHVCERHVGRKSTNNLNLTCGWANCRTTTVKRDHITSHIRVHVPLKPHKCDF
CGKAFKRPQDLKKHVKTHADDSVLVRSPEPGPGTRPPNGMFGVGVGADGKCSLGHVHGQGYPHGAPQYYQTPHQHPSNPS
YGNVYYAIGSDSHQASYESKKRGYDALNEFFGDLKRRQFDPTSYAVVGQRLLNLHGLPLPLVNGAAVAVPEYQTPMPAMV
SVGHGGGHSGGGGYQPASPMQSYHLPPMGNLRTKADLMNIDQFLEQMOSTVYESDDHVAAGVAQPGAHYVQHGGMSYRTS
HSSNNANANANASHTATSSPPSAATNIPSTHATATTTTTSAPMIPTSSAARLLPTHAPRHALTPSSAQSYTSGRSPVSVS
STHHHIPPSSHHTHNNHNNHNPSSAGMYPTLPATSAQDGSSTNTYHGVSGAAAPSTLSSVFDSEGGRRYAGGCCRGLDR
GLWRRHRRRRQGSPPSMSFAEVGGNDTKTASPPSMSFSASVIDPALQAGSEKQSGSSGSGGEAGAGAGAGAGAGEERNSSSS
PTADVEEVSRALSSANATTTMATKTAPPEVPSHTVEQWVANVRLLEKLRLYIYERLSR*

> pacCPb retendo apenas o 1° íntron
MSSRENPDTSAPMAQQQPQQQQQQQQPQPQQQQQQQQQQQAQQTQQQQSPQQPSQQSPLRQQQHQPQPQQSQGQPQSP
SLRTNLQRMSSIPSSPSIHR*ALPQPSSRLQLQLLPPQRHLSSQLCLCHRMGAMAQP*VSRRTWCVSGRVAKKGCPLLKL
YMNMSANAT*GARAPIT*I*PVDGQIAGQPPSNVTTLHRISASMCPSLTSVTSAGRLSNARR*RSMSRLMQMTRSS*GL
RSLDLEPGHPMECLGLVLVLMGNAP*DFTAKVTRTEHHNTIKPPTNNTPTPHTGMSTP*AATLTKPPTS PKSAATMP*
MSFSET*NAVSTPPPTRLLDVSV*CTVCHYPLSTALLSPLSTRHNPCRLWSPSATVAAIAGVVATNPPAPCSPTTCHR
WATCAPRLT**TLTSSWSRCSRSTRVMTLLRPVLRNRALTTSSMAG*VIVPPTAAITQTPMPMPVIPPVPRHQQPQTS
HPPTQQPQRHQHP*SPPPAPPACSPHMHAMP*PLPPALSHILPAALPSPSPQPTTTSRPPTITPTPITITITTLTPAR
ACTPPSPRRARTEARQHTHTASRALPHRRHLAVSSIARAGGMRADAAEV*TGDCGVVTTAVVTGLTVYVICGGWWE*H*
DGVPVHVIFG*CY*SSVAGGV*EAEW*QWQCFPCPLLCQRNHYHGN*NSTTRSPKSYGRAMGRQRASAGEIAAVYL*EVE
SGRLRGYQQQW*RCP

```

Figura 22: Sequências protéicas de traduções *in silico* de *pacCPb*. São apresentadas as sequências deduzidas a partir de *pacC/Pb* sem íntrons, apenas com o 4° íntron e apenas com o 1° íntron, respectivamente. As duas primeiras sequências são idênticas, excetuando-se a destacada em azul que se refere à tradução do quarto íntron. A primeira sequência, sem íntrons, possui 676 resíduos de aminoácidos e a segunda, apenas com o quarto íntron, 706 resíduos. A última sequência apresenta múltiplos códons de parada, além de mudança na fase de leitura, representada pela sequência em verde. As demais sequências apresentaram-se semelhantes à *pacC/Pb* com apenas o 1° íntron, por a mudarem a fase de leitura da tradução e por apresentarem múltiplos códons de parada. Os códons de parada são representados por “*”, sendo os presentes nas duas primeiras sequências equivalentes ao último códon de parada apresentado na figura 21.

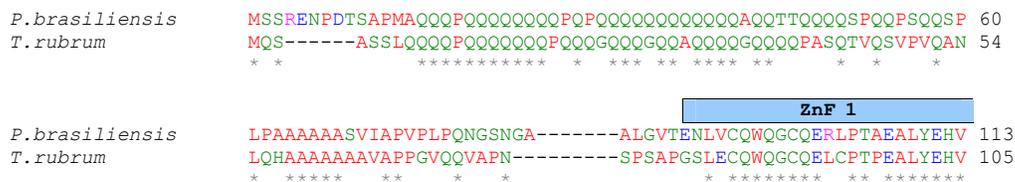


Figura 23: Alinhamento parcial da porção n-terminal de seqüências de PacC predito de *P. brasiliensis* com PacC de *T. rubrum*. O resíduo de metionina (M) inicial da seqüência de *P. brasiliensis* se refere ao códon de iniciação predito (Figura 21). Os “*” mostram identidade entre os resíduos alinhados. A caixa azul indica início da seqüência referente ao primeiro dedo de zinco (ZnF 1) de PacC e será discutida posteriormente. Os números aqui apresentados não levam em consideração a seqüência referente ao ZnF 1.

Comparações feitas a partir de alinhamentos com genes/proteínas *pacC*/PacC de outros organismos, além de análises de fase de leitura, sugeriram a localização do provável códon de iniciação da tradução da seqüência *pacCPb*. Essas análises mostram identidade entre a parte inicial da proteína predita da seqüência de *pacCPb* e a proteína PacC de *T. rubrum* (Figura 23), que apresentam abundância de resíduos de glutamina (aproximadamente 42 % em *P. brasiliensis* e 44 % em *T. rubrum*) e alanina (aproximadamente 13 % em *P. brasiliensis* e 17 % em *T. rubrum*). A referida identidade ocorre apenas a partir do resíduo equivalente ao códon de iniciação proposto em destaque na figura 21. Assim sendo, a provável região 5'-UTR (Figura 21) não foi utilizada nas análises de tradução.

A presença de qualquer dos três primeiros íntrons, isolados ou em conjunto, resultaram em seqüências de *pacCPb* traduzidas *in silico* contendo múltiplos códons de terminação que abortariam a tradução de forma precoce (Figura 21 e 22). Tais seqüências também possuíam fase de leitura que gerava proteínas menos similares às seqüências

protéicas de PacC de outros fungos. Tal observação sugere que os três primeiros íntrons devem ser reais. O quarto íntron não apresentou códon de terminação, não abortando a tradução, e nem mudou a fase de leitura, acrescentando apenas alguns aminoácidos à seqüência total (Figura 22).

A presença de qualquer dos três primeiros íntrons, isolados ou em conjunto, prejudicaram a tradução *in silico* da seqüência *pacCPb*, seja pela presença de múltiplos códons de terminação que abortariam a tradução de forma precoce (Figura 21 e 22), seja pela mudança da fase de leitura que geria proteínas menos similares às seqüências protéicas de PacC de outros fungos. Tal observação sugere que os três primeiros íntrons devam de fato existir (Figura 22). Entretanto, a confirmação desses íntrons depende da obtenção e seqüenciamento da molécula de cDNA completa correspondente a *pacCPb*. Além disso, como o 4º e último íntron não apresenta códon de parada, é possível que ele não seja processado em todas as condições fisiológicas, podendo levar a considerável diversidade na região cabóxi-terminal da proteína.

Ainda é importante se observar o tamanho dos íntrons sugeridos. Em média os íntrons de genes *pacC* encontrados na literatura e em bancos de dados variam de 50-90 pb. O terceiro e quarto íntrons possuem tamanho próximo ao limite esperado, 96 pb e 90 pb respectivamente, os quais são próximos ao tamanho de um dos íntrons de *T. rubrum* que possui 91 pb (Ferreira-Nozawa *et al.*, 2001). O primeiro íntron possui tamanho maior que o esperado, 161 pb. No entanto seu tamanho não é tão maior a exceções como no caso do *A. niger*, *A. oryzae*, *A. parasiticus* e *A. giganteus* que possuem íntrons variando de 138-149 pb (MacCabe *et al.*, 1996; Pinero & Keller, 2001; Sano & Machida, 2001; Meyer *et al.*, 2005).

O segundo íntron possui tamanho de 337 pb, apresentando tamanho duas vezes superior ao maior íntron de gene *pacC* já descrito (Meyer *et al.*, 2005). A presença de um

íntron com tal tamanho é incomum em fungos filamentosos, que geralmente possuem poucos íntrons por gene com tamanhos de aproximadamente 60 pb. Ademais, esse possível íntron se encontra truncando a seqüência protéica predita na posição do resíduo de aminoácido 110, o qual se encontra no meio da estrutura do primeiro dedo-de-zinco (Figura 24), sendo pouco provável que uma estrutura tão conservada e importante como essa seja diferenciada em *P. brasiliensis* (Tilburn *et al.*, 1995; Espeso *et al.*, 1997; Fernández-Martínez *et al.*, 2003).

Com a finalidade de se avaliar a similaridade das duas possíveis seqüências de *pacCPb* traduzidas (retirando-se todos os íntrons ou mantendo-se apenas o quarto íntron), foram feitos alinhamentos com bancos de dados internacionais com o uso do programa BLASTp. Ambas as seqüências apresentaram alinhamentos com maior identidade à seqüência protéica de *T. rubrum*. Em alinhamentos posteriores com o uso do programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>), a primeira seqüência de *pacCPb*, sem íntrons, apresentou identidade de 50,2 %. Já a segunda, que possui apenas a última seqüência interveniente, apresentou identidade de 51,1 %.

Foram feitos alinhamentos, utilizando-se o programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>), dessas seqüências protéicas de *pacCPb*, sem íntrons e apenas com o quarto íntron, com seqüências de PacC de vários organismos, retiradas de bancos de dados internacionais. Alto grau de identidade/similaridade foi verificado principalmente na região N-terminal (Figura 24 e Tabela 3). No entanto, a região onde se encontra o quarto íntron é pouco conservada, não sendo possível avaliar se sua seqüência seria parte codante de *pacC*.

| | ZnF 1 | |
|------------------------|---|---------------|
| <i>P. brasiliensis</i> | LPAAAAASVIAPVPLPQNGSNGA-----ALGVTENLVCQWQGCQERLPTAEALYEHV | 113 |
| <i>T. rubrum</i> | LQHAAAAAAVAPPVGVQVAPN-----SPSAPGSLCQWQGCQELCPTPEALYEHV | 105 |
| <i>A. oryzae</i> | VTATAAAATAAVA-SPPVNG-----AARPTTEELSCLWQGCSEKCPTEPESLYEHV | 89 |
| <i>A. parasiticus</i> | VTATAAAATAAVA-SPPVNG-----AARPTTEELSCLWQGCSEKCPTEPESLYEHV | 89 |
| <i>A. fumigatus</i> | VTATAAAATAAVS-APQANG-----TPPSDEQLSCLWQGCSEKCPSEALYDHI | 101 |
| <i>A. giganteus</i> | VTATAAAATAAVA-SPPMNG-----SPRPEELSCLWQGCSEKCSSAEALYEHV | 104 |
| <i>A. nidulans</i> | VTATAAAATAAVA-SPQANGNAASPVAPASSTSRPAEELTGMWQGCSEKLPTEPESLYEHV | 97 |
| <i>P. chrysogenum</i> | VTATAAAATAAVNAPSMMNG-----AGEQLPCQWVGCCEKSPTEPESLYEHV | 79 |
| <i>B. fuckeliana</i> | STVTPSIQQNVVS-----DDSLLCQWKEKCSERCPTPEALFDHI | 66 |
| <i>S. sclerotiorum</i> | TTATSSIQQNVVA-----DDSLLCQWKEKCSERCPTPEALFDHI | 66 |
| <i>M. grisea</i> | APSTSTTATSQSS-----DDSLICRWQGCSERFPSAEALYDHI | 73 |
| | ::: * * * * * | ::: * * * * * |

| | ZnF 1 | ZnF 2 | ZnF 3 | | |
|------------------------|-----------------|------------------|------------|--------------------------------|-----|
| <i>P. brasiliensis</i> | CERHVG | RKSTNNLNLTCGWANC | RRTTVVKRD | HITSHIRVHVPLKPKHCDFCGKAFKRPQDL | 173 |
| <i>T. rubrum</i> | CERHVG | RKSTNNLNLTCGWNSC | RRTTVVKRD | HITSHIRVHVPLKPKHCDFCGKAFKRPQDL | 165 |
| <i>A. oryzae</i> | CERHVG | RKSTNNLNLTCQWGC | RRTTVVKRD | HITSHIRVHVPLKPKHCDFCGKAFKRPQDL | 149 |
| <i>A. parasiticus</i> | CERHVG | RKSTNNLNLTCQWGC | RRTTVVKRD | HITSHIRVHVPLKPKHCDFCGKAFKRPQDL | 149 |
| <i>A. fumigatus</i> | CERHVG | RKSTNNLNLTCQWGC | RRTTVVKRD | HITSHIRVHVPLKPKHCDFCGKAFKRPQDL | 161 |
| <i>A. giganteus</i> | CERHVG | RKSTNNLNLTCQWGC | RRTTVVKRD | HITSHIRVHVPLKPKHCDFCGKAFKRPQDL | 164 |
| <i>A. nidulans</i> | CERHVG | RKSTNNLNLTCQWGC | RRTTVVKRD | HITSHIRVHVPLKPKHCDFCGKAFKRPQDL | 157 |
| <i>P. chrysogenum</i> | CERHVG | RKSTNNLNLTCQWGT | CNRTTVVKRD | HITSHIRVHVPLKPKHCDFCGKAFKRPQDL | 139 |
| <i>B. fuckeliana</i> | CEKHVG | RKSTNNLNLTCGWNSC | RRTTVVKRD | HITSHIRVHVPLKPKHCDFCGKAFKRPQDL | 126 |
| <i>S. sclerotiorum</i> | CEKHVG | RKSTNNLNLTCGWNSC | RRTTVVKRD | HITSHIRVHVPLKPKHCDFCGKAFKRPQDL | 126 |
| <i>M. grisea</i> | CERHVG | RKSTNNLNLTCHWNSC | RRTTVVKRD | HITSHIRVHVPLKPKHCDFCGKSFKRPQDL | 133 |
| | ** :***** * * * | * * ***** | ** :***** | ** :***** | |

| | ZnF 3 | |
|------------------------|---|-----|
| <i>P. brasiliensis</i> | KKHVKTTHADDSVLVRSPE-PGPGTR--PPNGMGVGVGADGKC---SLGHVHGQGYPHGA | 227 |
| <i>T. rubrum</i> | KKHVKTTHADDSVLMRSPE-PGAGQRQPPAGMFGVGLPDKR---SLGPVP-QAYGHP | 220 |
| <i>A. oryzae</i> | KKHVKTTHADDSVLVRSPE-PGSRNPDIIMFGGNPAKGYATATHYFEPALNVPVPSQGYAHGA | 208 |
| <i>A. parasiticus</i> | KKHVKTTHADDSVLVRSPE-PGSRNPDIIMFGGNPAKGYATATHYFEPALNVPVPSQGYAHGA | 208 |
| <i>A. fumigatus</i> | KKHVKTTHADDSVLVRSPE-PGARNPDMMFHGA-GKGYAAAAHYFEPALNVPVPSQGYAHGA | 219 |
| <i>A. giganteus</i> | KKHVKTTHADDSVLVRSPE-PGSRNPDMMPFPGG-GKGYAAAAHYFEPALNVPVPSQGYAHGA | 222 |
| <i>A. nidulans</i> | KKHVKTTHADDSVLVRSPE-PGSRNPDMMPFPGG-FKGYA-AAHYFEPALNVPVPSQGYAHGP | 214 |
| <i>P. chrysogenum</i> | KKHVKTTHADDSE-IRSPE-PGMKHDMMPFQN-PRGSPAATHYFESPINGINGQYSHAPP | 196 |
| <i>B. fuckeliana</i> | KKHVKTTHADDSVLLRSPEQPQQPGNGGYRQPGGKVIANLQHLAANPMGYDHNASMHGSA | 186 |
| <i>S. sclerotiorum</i> | KKHVKTTHADDSVLLRTPEQSGSNGGYRQPGGKVIANLQHLAANPMGYDHNASMHGSA | 186 |
| <i>M. grisea</i> | KKHVKTTHADDSVLARSQPDPNANLG---PG---AYRGHASKAPSSYYDHNGHVRTNS | 185 |
| | ** :***** : * * * : .. | |

| | I | II | |
|------------------------|---|------------------------------|------|
| <i>P. brasiliensis</i> | PQYYQTPHQ-----QHPSNP-SYGNVYYAIG-SDS-H-----QASYE | SKKR GY | 267 |
| <i>T. rubrum</i> | PQYYQPQHP-----QQPNP-SYGNVYYAVG-HDAH-----QASYE | SKKR GY | 261 |
| <i>A. oryzae</i> | PQYYQSHHP-----QPANP-SYGNVYYALNHGHEAG-----HASYE | SKKR GY | 250 |
| <i>A. parasiticus</i> | PQYYQAHHP-----QPANP-SYGNVYYALNHGHEAG-----HASYE | SKKR GY | 250 |
| <i>A. fumigatus</i> | PQYYSSHPP-----HGPSNP-SYGNVYYALNHGHGDG-----HASYE | SKKR GY | 260 |
| <i>A. giganteus</i> | PQYYQAHPP-----QPANP-SYGNVYYALNHGHGDG-----HASYE | SKKR GY | 263 |
| <i>A. nidulans</i> | PQYYQAHHA-----QPPSNP-SYGNVYYALNTGPEPH-----QASYE | SKKR GY | 256 |
| <i>P. chrysogenum</i> | PQYYQPHPP-----QAPNPHSYGNLYYALSQGEQG-----HPYD-- | RKR GY | 237 |
| <i>B. fuckeliana</i> | GLYGNSSHG-GHSGYYAPAHPPPSSYGGPGYYQMSHNPDLG-----QHA | AWDEKKN RY | 239 |
| <i>S. sclerotiorum</i> | GVYGNSSHG-GHSGYYAPAHQSQSSYGGPGYYQMSHNPDLG-----QHA | AWDEKKN RF | 239 |
| <i>M. grisea</i> | AFQPPHHQNGHASYYS---HPPAPYGGG-MYYQP PPHMGP | RDRIFGHPGAGAYDSRKR GY | 241 |
| | . * * * | : | ** : |

| | II | |
|------------------------|---|-----|
| <i>P. brasiliensis</i> | DALNEFFGDLKRRQFDPTS YAVVGQRLNLLHGLPLPLVNGAAVAVEPYQTQMPAMVSVG | 327 |
| <i>T. rubrum</i> | DALNEFFGDLKRRQFDPTS YAAVGQRLNLLHGLPLPLTH--AGAVPEYQ--PMPAMVGVG | 317 |
| <i>A. oryzae</i> | DALNEFFGDLKRRQFDPSNS YAVGQRLGLQSLSPILS--GGPLEYQ--PMPAPVAVG | 306 |
| <i>A. parasiticus</i> | DALNEFFGDLKRRQFDPSNS YAVGQRLGLQSLSPILS--GGPLEYQ--PMPAPVAVG | 306 |
| <i>A. fumigatus</i> | DALNEFFGDLKRRQFDLSH YAVGQRLGLQNLSPILT--GGPLEYQ--PMPAPVAVG | 316 |
| <i>A. giganteus</i> | DALNEFFGDLKRRQFDLSH YAVGQRLGLQNLSPILA--GGPLEYQ--PMPAPVAVG | 319 |
| <i>A. nidulans</i> | DALNEFFGDLKRRQFDPSNS YAVGQRLLSLQNLSPVLT--AAPLE YQ--AMPAPVAVA | 312 |
| <i>P. chrysogenum</i> | DALNEFFGDLKRRQFDPSNS YAVGQRLGLQALQLPFLS--G-PAPEYQ--QMPAPVAVG | 292 |
| <i>B. fuckeliana</i> | ENLNDFFGAAKRRQIDANS YQVNRMLALQIGIPISGGGAIHDYIHSAP--QLVPIDGHG | 297 |
| <i>S. sclerotiorum</i> | DNLNDFFGAAKRRQIDANS YQVNRMLQIQIGIPITGGGISDYIHSAP--QLVPIDGHG | 297 |
| <i>M. grisea</i> | DDLNDFFGNLKRRQFDASSY AHVGRSLVPLHGALSVHTGGVGGMAEYM--AAPPPSSSV | 299 |
| | : ** :*** :**** : * * * * * : | |

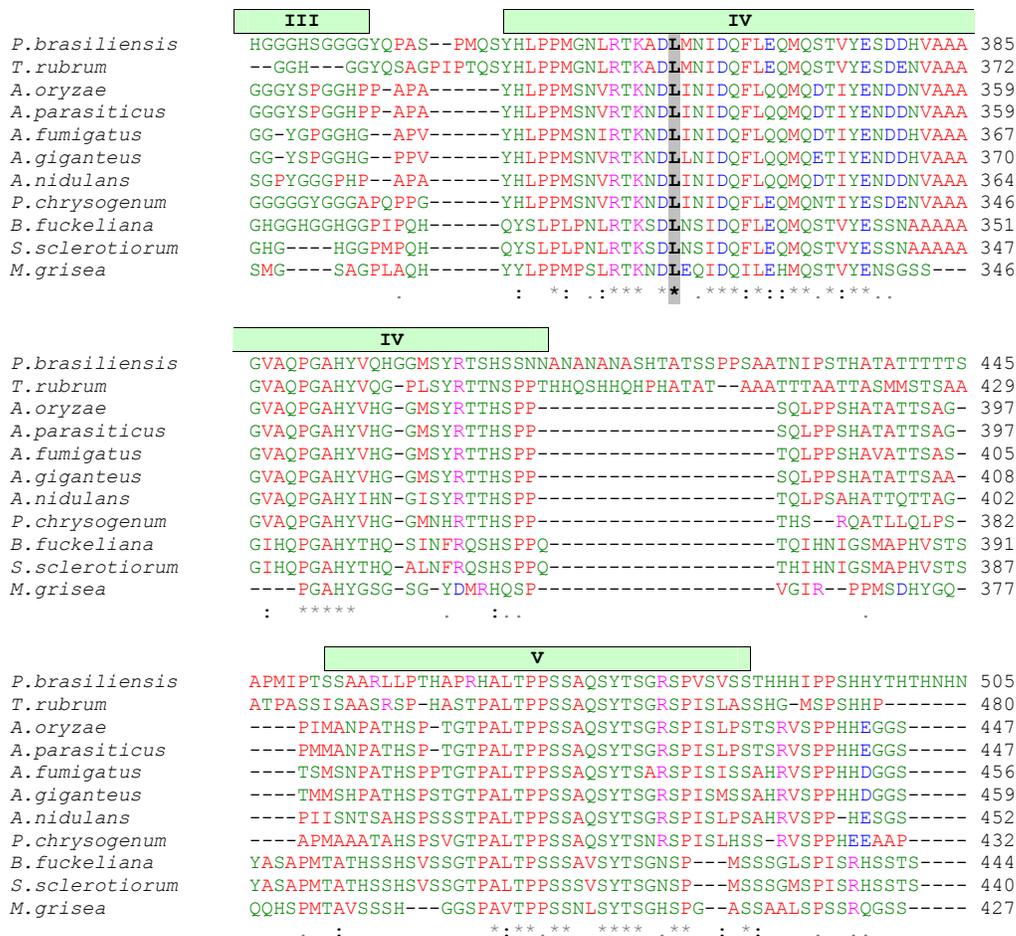


Figura 24: Alinhamento parcial entre as de seqüências PacC preditas de *P. brasiliensis* e proteínas

PacC de outros organismos. Os três dedos-de-zinco (ZnF) estão indicados pelas caixas azuis. Os resíduos de Cisteína e Histidina conservados (Cis₂His₂) estão hachurados em amarelo. As regiões de I-V estão indicadas pelas caixas verdes. Na região II estão em destaque os motivos de sinalização para localização nuclear (SKKR...KRRQ), hachurados em azul. Ainda nessa região destacam-se, hachurados em cinza, os resíduos Leu259 e Leu266 (em *A. nidulans*), os quais devem interagir com a região C-terminal da proteína. Na região IV destaca-se, hachurado em cinza, o resíduo Leu340 (em *A. nidulans*), que interage com a porção C-terminal da proteína. O símbolo “*” abaixo das seqüências indica que o resíduo de aminoácido é idêntico em todas as seqüências. “:” e “.” indicam conservação de resíduo na maioria das seqüências, ou presença de resíduos com funções semelhantes, em maior e menor grau, respectivamente. Os números à esquerda da figura indicam a posição do último resíduo apresentado na linha em relação à seqüência completa de cada proteína.

Tabela 3: Identidade da seqüência protéicas preditas de *pacCPb* com seqüências de proteínas PacC de outros fungos. A identidade foi aferida após alinhamento com o programa ClustalW.

| | <i>pacCPb</i> retendo apenas o 4° íntron | <i>pacCPb</i> sem nenhum dos íntrons propostos |
|------------------------|--|--|
| <i>T. rubrum</i> | 51,1 % | 50,2 % |
| <i>A. oryzae</i> | 45,9 % | 46,7 % |
| <i>A. parasiticus</i> | 46,2 % | 47,0 % |
| <i>A. fumigatus</i> | 45,0 % | 45,9 % |
| <i>A. giganteus</i> | 45,2 % | 45,5 % |
| <i>A. nidulans</i> | 44,8 % | 42,1 % |
| <i>P. chrysogenum</i> | 42,0 % | 41,4 % |
| <i>B. fuckeliana</i> | 36,7 % | 36,9 % |
| <i>S. sclerotiorum</i> | 36,1 % | 35,4 % |
| <i>M. grisea</i> | 34,9 % | 35,4 % |

As duas seqüências protéicas preditas evidenciaram em seus alinhamentos motivos semelhantes a dedos-de-zinco (*zinc finger*) C_2H_2 . Esses motivos apresentam seqüência de resíduos semelhante ao padrão proposto por Klug & Schwabe (1995), podendo ainda ser classificados como do tipo A1 segundo Bohm e colaboradores (1997). Pode-se verificar que os prováveis motivos de dedo-de-zinco apresentados pela proteína predita de *P. brasiliensis* são extremamente conservados quando comparado às demais proteínas PacC de outros fungos, estando evidentes vários resíduos de aminoácidos idênticos, além dos resíduos de cisteínas e histidina essenciais à composição do motivo (Figura 24). Observa-se que o dedo-de-zinco 1 é menos conservado que os dedos-de-zinco 2 e 3, os quais são os responsáveis pela ligação ao DNA. Estão presentes nos dois últimos motivos todos os resíduos de aminoácidos essenciais para o reconhecimento e ligação ao DNA (Figura 5), estando esses conservados em todas as proteínas analisadas (Figura 25) (Espeso *et al.*, 1997).

A região I de PacC (Suárez & Peñalva, 1996), cuja seqüência em *A. nidulans* é N-P-S-Y-G-N-V/L-Y-Y-A-L, mostra-se bastante conservada entre as seqüências protéicas

preditas de *pacCPb*, *P. chrysogenum*, *T. rubrum* e dos fungos do gênero *Aspergillus*. Apenas nas seqüências de *B. fuckeliana*, *S. sclerotiorum* e *M. grisea* não se observa consenso para essa região. A real necessidade dessa região para o correto funcionamento de PacC é questionável, uma vez que ela não é conservada em algumas espécies como as acima citadas, além da *A. chrysogenum* (Schmitt *et al.*, 2001).

Também são observados motivos relacionados ao sinal de localização nuclear (SKKR...KRRQ) nas duas seqüências das proteínas preditas de *P. brasiliensis*, próximo a sua parte central, na região II (Fernández-Martínez *et al.*, 2003). A segunda parte do motivo (KRRQ) é conservada em todas as proteínas utilizadas no alinhamento, enquanto a primeira parte (SKKR) em seis das 10 proteínas utilizadas na comparação. A região II, de forma geral, se apresentou conservada, com pequenas exceções de resíduos isolados, principalmente nas proteínas de *B. fuckeliana*, *S. sclerotiorum* e *M. grisea*. O resíduo Leu259 (*A. nidulans*) é conservado nas 10 espécies e o Leu266 (*A. nidulans*) só não está presente em *B. fuckeliana*, *S. sclerotiorum*, sugerindo que os mesmos devam ter papel importante na função de PacC (Figura 24).

As seqüências protéicas preditas de *pacC/Pb* apresentaram região conservada rica em glicina, a região III. Segundo Suárez & Peñalva (1996) essa região deve funcionar como uma dobradiça flexível. Não se pode afirmar, no entanto, que essa região desempenhe papel crucial na atividade de PacC, uma vez que existem algumas espécies cujos fatores transcricionais PacC não possuem a citada região conservada, como *S. sclerotiorum*, *M. grisea* (Figura 23) e *A. chrysogenum* (Schmitt *et al.*, 2001). A região IV de todas as proteínas alinhadas contém o resíduo Leu340 (*A. nidulans*) conservado (Figura 24). Sabe-se que esse resíduo interage com porções carbóxi-terminais da proteína (Schmitt *et al.*, 2001), devendo essas ser de extrema importância na função de PacC de forma a estabilizar a conformação fechada. Ainda pode ser observado no alinhamento da figura 24

que a região V, na porção C-terminal de PacC, é pouco conservada entre o gênero *Aspergillus* e os demais apresentados. Contudo, a região se mostra rica em resíduos de prolina em todos os fatores transcricionais apresentados, devendo assumir papel estrutural importante.

5. Análise de Expressão de *pacC* em *P. brasiliensis*

Apesar de evidências apontando uma auto-regulação (Tilburn *et al.* 1995; Mingot *et al.* 1999; Peñalva & Arst 2002; Fernández-Martínez *et al.* 2003), persiste na literatura científica a dúvida se a transcrição de *pacC* é regulada pelo pH alcalino, ou se esse sinal apenas ativa o processamento do polipeptídeo que seria produzido constitutivamente. Nesse sentido análises de expressão em diferentes condições de crescimento do fungo *P. brasiliensis* podem aportar informações relevantes. Para verificar se o gene *pacC* de *P. brasiliensis* é de fato expresso e para o estudo das condições dessa expressão, optamos pela técnica de RT-PCR, tendo em vista que essa se encontra bem padronizada em nosso grupo de pesquisa.

Para tanto, foi extraído o RNA total de culturas de *P. brasiliensis* (isolado Pb01) crescido por 5 e 18 h em meios com valores de pH de 5, 7 e 9, de forma que se pudesse verificar o perfil de expressão de *pacC* em ambiente ácido, neutro e alcalino. O meio utilizado para tais culturas foi tamponado com ácido cítrico de forma a evitar que o metabolismo do fungo mudasse drasticamente seu pH. Medidas feitas no momento da coleta para a extração de RNA mostraram que as culturas de pH ácido e neutro tiveram seu pH praticamente inalterado, enquanto as culturas com pH alcalino apresentaram queda de pH para ~7,9 após as 5h e para ~7,6 após as 18h (Figura 25). Contudo, mesmo com as

mudanças de pH, as culturas alcalinas ainda se mantiveram em pH levemente básico, condição na qual o fator transcricional PacC ,é ativado (revisto por Arst & Peñalva 2003).

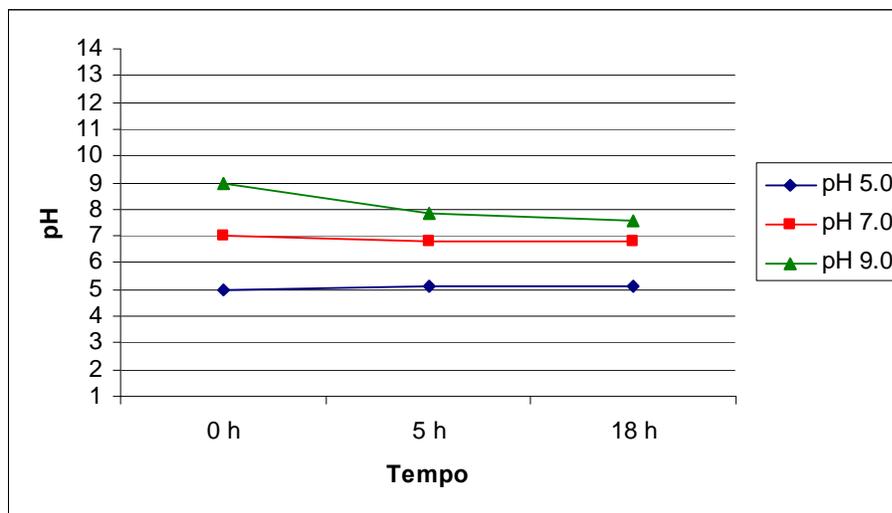


Figura 25: Gráfico de valores de pH da cultura por tempo de crescimento de *P. brasiliensis*. Foram feitas medidas em culturas com valores de pH de 5, 7 e 9. As medidas foram feitas a partir dos sobrenadantes das culturas, no momento da coleta do fungo para extração de RNA total. Todas as culturas foram feitas em duplicata, sendo a média dos dados obtidos apresentada no gráfico.

As diferentes amostras de RNA total foram tratadas com DNase I para se retirar qualquer contaminação com DNA genômico. Após análise eletroforética, as amostras de RNA foram submetidos a RT-PCR para detecção do transcrito de *pacC*. Foram utilizados os oligonucleotídeos sintéticos iniciadores *pacPbEXF* e o *pacPbEXR*. Esses oligonucleotídeos foram desenhados em uma região da sequência *pacCPb* que correspondente à região flanqueadora de um íntron do gene *pacC* de *A. nidulans*, de modo a verificar se esse íntron também estava no gene de *P. brasiliensis* (dados não

apresentados). As reações de PCR foram submetidas à análise por eletroforese em gel de agarose (Figura 26).

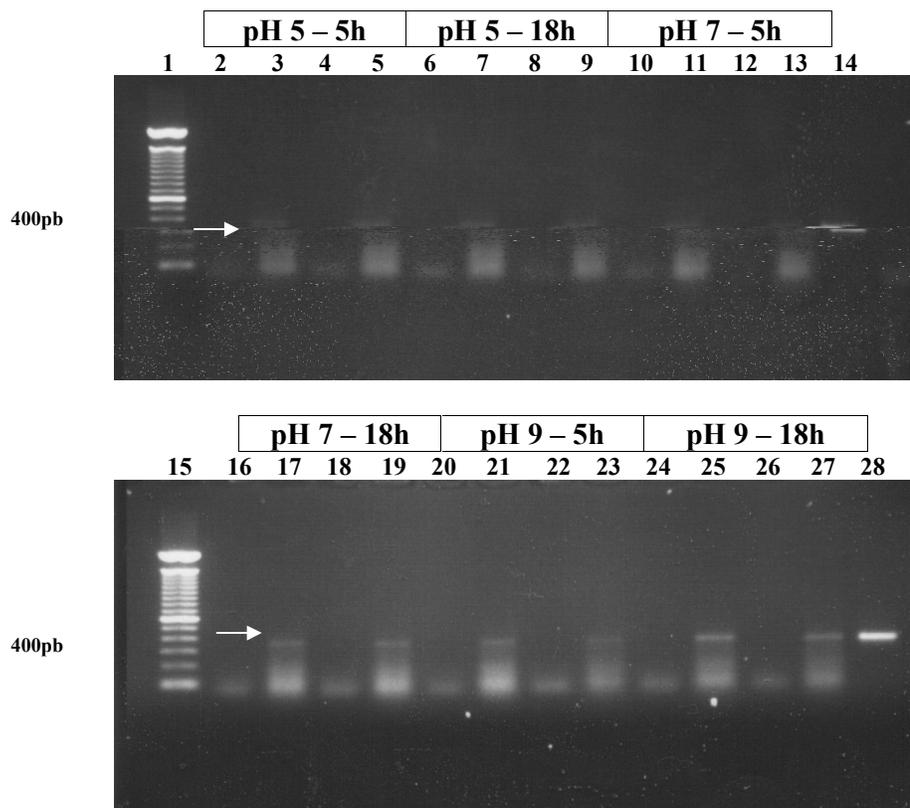


Figura 26: Análise eletroforética em gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL dos produtos de RT-PCR de amostras de RNA total de *P. brasiliensis* crescido em diferentes valores de pH e tempos. Observam-se fragmentos amplificados de aproximadamente 400pb em todas as reações (tamanho indicado pelas setas brancas). Marcador 100bp DNA Ladder Invitrogen (poços 1 e 15). Reações referentes às culturas crescidas em pH 5 por 5h (poços 3 e 5) e 18h (poços 7 e 9). Reações referentes às culturas crescidas em pH 7 por 5h (poços 11 e 13) e 18h (poços 17 e 19). Reações referentes às culturas crescidas em pH 9 por 5h (poços 21 e 23) e 18h (poços 25 e 27). Controles negativos sem transcriptase reversa (poços 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 18, 20, 22, 24 e 26). Controles positivos: amplificação a partir de DNA genômico (poços 14 e 28).

Foi observada amplificação de tamanho compatível ao esperado para as reações de RT-PCR referentes a todas as condições de cultivo analisadas, assim como no controle positivo com DNA genômico. Uma possível contaminação com DNA nas amostras de RNA foi descartada, pois nenhum dos controles sem transcriptase reversa apresentou amplificação (Figura 26). Com base nesses dados pode-se concluir que o gene homólogo a *pacC* em *P. brasiliensis* é expresso tanto em pH ácido quanto em neutro e alcalino. Assim, é possível que o controle de ativação desse fator transcricional ocorra em nível pós-traducional: PacC possivelmente ficaria em uma conformação inativa em pH ácido mudando para uma ativa em pH de neutro a alcalino, como descrito para *A. nidulans* por Espeso e colaboradores (2000).

Na análise eletroforética apresentada na figura 26, não foi possível se observar diferença relativa à presença de íntron entre os cDNA e o controle genômico. Não poderíamos afirmar com certeza a ausência deste íntron em *P. brasiliensis*, pois os oligonucleotídeos iniciadores utilizados flanqueavam um íntron da seqüência de *A. nidulans* de apenas 54 pb, sendo o método de análise utilizado pouco sensível para demonstrar essa pequena diferença. Desta forma foi feita nova análise eletroforética, desta vez em gel de poliacrilamida 10 %, o qual teria resolução suficiente para diferenciar os fragmentos questionados (Figura 27).

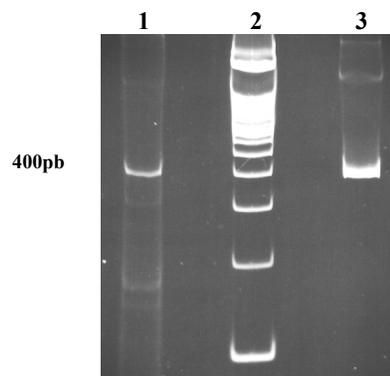


Figura 27: Análise eletroforética em gel de poliacrilamida 10 % corado com brometo de etídeo a 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dos produtos de RT-PCR a partir de RNA total de *P. brasiliensis* crescido em pH 7 por 5h. Tanto o produto da RT-PCR (poço 1) quanto o controle genômico (poço 3) apresentam tamanhos aproximados a 400pb. Marcador 100bp DNA Ladder Invitrogen (poço 2).

A análise eletroforética em gel de poliacrilamida não evidenciou diferença entre os tamanhos do produto da RT-PCR e do controle genômico, tendo ambos tamanhos aproximado a 400 pb. Conclui-se então que *P. brasiliensis* não compartilha com *A. nidulans* a posição desse íntron de aproximadamente 54 pb.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Foi obtida com sucesso a seqüência de nucleotídeos de clones isolados de bibliotecas genômicas de *P. brasiliensis*, com o uso de sonda homóloga ao gene *pacC* de *A. nidulans*. A determinação da seqüência de DNA de um desses clones permitiu a identificação de um gene completo, homólogo a genes *pacC* de diferentes fungos.

Análises *in silico*, por meio de diferentes programas de bioinformática, permitiram a comparação do gene e da proteína predita com homólogos disponíveis em bancos de dados.

A seqüência *pacCPb* apresenta 2837 nucleotídeos, tendo a maior identidade sido descrita para o gene *pacC* de *T. rubrum* (46,9 %).

A região codante é interrompida por 4 íntrons e corresponde a uma proteína predita de 676 aminoácidos e 72,4 kDa.

O transcrito relativo ao gene *pacC* de *P. brasiliensis* foi detectado por RT-PCR tanto em pH ácido, como em neutro e básico.

Os dados obtidos iniciam os estudos acerca da influência do pH ambiental sobre o ciclo de vida do *P. brasiliensis*. Associado a futuros estudos, o presente trabalho poderá determinar de que forma o pH ambiental, por um mecanismo de regulação da expressão gênica homólogo ao sistema *pacC*, exerce tal influência nesse patógeno.

PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

- Obtenção e seqüenciamento da molécula de cDNA completa correspondente ao gene *pacC* de *P. brasiliensis*, visando à confirmação do papel funcional da seqüência em experimentos de complementação fenotípica em mutantes de *A. nidulans* e/ou *S. cerevisiae* deficientes para *pacC*.
- Confirmar a presença dos íntrons por comparações de PCR genômica com RT-PCR de RNA obtidos de fungos crescidos em diferentes condições, utilizando-se para tanto oligonucleotídeos iniciadores que flanqueam as regiões desses íntrons.
- Verificar a ocorrência de diversidade na região carbóxi-terminal da proteína PacC de *P. brasiliensis*, ocasionada por possível *splicing* alternativo do quarto íntron.
- Avaliar o papel de *pacC* no ciclo de vida de *P. brasiliensis*, utilizando-se de técnicas de *knock-out* gênico sítio dirigidas.
- Investigar a possibilidade de correlação entre a regulação da transcrição gênica pelo pH externo e a expressão de fatores de virulência em *P. brasiliensis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARST, H. N. Jr; TOLLERVEY, D.; DOWZER, C. E. A.; KELLY, J. M. (1990). An inversion truncating the *creA* gene of *Aspergillus nidulans* results in carbon catabolite repression. *Mol. Microbiol.* 4:851–54
- ARST, H. N. Jr.; BIGNELL, E.; TILBURN, J. (1994). Two new genes involved in signalling ambient pH in *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet.* Dec 15;245(6):787-90
- ARST, H. N. Jr; PEÑALVA, M. A. (2003). pH regulation in *Aspergillus* and parallels with higher eukaryotic regulatory systems. *TRENDS in Genetics* 19: 224-231 n°4.
- ARST, H. N. Jr; PEÑALVA, M. A. (2003). Recognizing gene regulation by ambient pH. *Fungal Genet. Biol.* 40:1–3
- BAGAGLI, E.; SANO, A.; COELHO, K. I.; ALQUATI, S.; MIYAJI, M.; DE CAMARGO, Z. P.; GOMES, G. M.; FRANCO, M.; MONTENEGRO, M. R. (1998). Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus noveminctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg.* 58(4):505-12.
- BIGNELL, E.; NEGRETE-URTASUN, S.; CALCAGNO, A. M.; HAYNES, K.; ARST, H. N. Jr.; ROGERS, T. (2005). The *Aspergillus* pH-responsive transcription factor PacC regulates virulence. *Molecular Microbiology* 55(4), 1072–1084
- BOCCA, A. L.; HAYASHI, E. E.; PINHEIRO, A. G.; FURLANETTO, A. B.; CAMPANELLI, A. P.; CUNHA, F. Q.; FIGUEIREDO, F. (1998). Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. *J. Immunol.* 161: 3056-3063.

- BÖHM, S.; FRISHMAN, D.; MEWES, H. W. (1997). Variations of the C2H2 zinc finger motif in the yeastgenome and classification of yeast zinc finger proteins *Nucleic Acids Research*, Vol. 25, No. 12 - p.2464–2469
- BRUMMER, E.; HANSON, L. H.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A. (1989). Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: Killing and restriction of multiplication by activated macrophages. *Infection and Immunity*, 57: 2289-2294.
- CADDICK, M. X.; BROWNLEE, A. G.; ARST, H. N. Jr. (1986). Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet*. May; 203(2):346-53.
- CAMARGO, Z. P.; FRANCO, M. F. (2000). Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev Iberoam Micol*. 17(2):41-8.
- CANO, M. I. N.; CISALPINO, P. S.; GALINDO, I.; RAMIREZ, J. L.; MORTARA, R. A.; DA SILVEIRA, J. F. (1998). Eletrophoretic Karyotypes and Genome Sizing of the Pathogenic Fungus *Paracoccidioides brasiliensis* . *J. Clin. Microbiol.*, 36(3): 742-747.
- CARACUEL, Z.; RONCERO, M.I.; ESPESO, E. A.; GONZÁLEZ-VERDEJO, C. I.; GARCÍA-MACEIRA, F. I.; DI PIETRO, A. (2003). The pH signalling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Mol. Microbiol*. 48:765–79
- COHEN, S. N.; CHANG, A. C. Y.; HSU, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 69: 2110-2114.
- COUTINHO, Z. F.; DA SILVA, D.; LAZÉRA, M.; PETRI, V.; DE OLIVEIRA, R.M.; SABROZA, P.C.; WANKE, B. (2002). Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad. Saúde Pública*. 18:1441-1454.

- DAVIS, D.; WILSON, R. B.; MITCHELL, A. P. (2000a). *RIM101*-dependent and-independent pathways govern pH responses in *Candida albicans*. *Mol. Cell Biol.* 20:971-978.
- DAVIS, D.; EDWARDS, J. E. Jr.; MITCHELL, A. P.; IBRAHIM, A. S. (2000b). *Candida albicans RIM101* pH response pathway is required for host-pathogen interactions. *Infect. Immun.* 68: 5053-5959.
- DAVIS, D. (2003). Adaptation to environmental pH in *Candida albicans* and its relation to pathogenesis. *Curr. Genet.* 44:1-7.
- DE BERNARDIS, F.; MUHLSCHEGEL, F. A.; CASSONE, A.; FONZI, W. A. (1998). The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 66: 3317-3325.
- DE BRITO, T. & FRANCO, M. F. (1994). Granulomatous inflammation. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 36(2): 185-92.
- DENISON, S. H.; OREJAS, M.; ARST, H. N. Jr. (1995). Signaling of ambient pH in *Aspergillus* involves a cysteine protease. *J. Biol. Chem.* 270:28519-22
- DENISON, S. H.; NEGRETE-URTASUN, S.; MINGOT, J. M.; TILBURN, J.; MAYER, W. A. (1998). Putative membrane components of signal transduction pathways for ambient pH regulation in *Aspergillus* and meiosis in *Saccharomyces* are homologous. *Mol. Microbiol.* 30:259-64
- DÍEZ, E.; ÁLVARO, J.; ESPESO, E. A.; RAINBOW, L.; SUÁREZ, T. (2002). Activation of the *Aspergillus* PacC zinc-finger transcription factor requires two proteolytic steps. *EMBO J.* 21:1350-59
- ESPESO, E. A.; TILBURN, J.; ARST, H. N. Jr; PEÑALVA, M. A. (1993). pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene. *EMBO J.* Oct;12(10):3947-56.

- ESPESO, E. A.; TILBURN, J.; SÁNCHEZ-PULIDO, L.; BROWN, C. V.; VALENCIA, A. (1997). Specific DNA recognition by the *Aspergillus nidulans* three zinc finger transcription factor PacC. *J. Mol. Biol.* 274:466–80
- ESPESO, E. A.; RONCAL, T.; DÍEZ, E.; RAINBOW, L.; BIGNELL, E. (2000). On how a transcription factor can avoid its proteolytic activation in the absence of signal transduction. *EMBO J.* 19:719–28
- FELIPE, M. S.; ANDRADE, R. V.; PETROFEZA, S. S.; MARANHÃO, A. Q.; TORRES, F. A.; ALBUQUERQUE, P.; ARRAES, F. B.; ARRUDA, M.; AZEVEDO, M. O.; BAPTISTA, A. J.; BATAUS, L. A.; BORGES, C. L.; CAMPOS, E. G.; CRUZ, M. R.; DAHER, B. S.; DANTAS, A.; FERREIRA, M. A.; GHIL, G. V.; JESUINO, R. S.; KYAW, C. M.; LEITAO, L.; MARTINS, C. R.; MORAES, L. M.; NEVES, E. O.; NICOLA, A. M.; ALVES, E. S.; PARENTE, J. A.; PEREIRA, M.; POCAS-FONSECA, M. J.; RESENDE, R.; RIBEIRO, B. M.; SALDANHA, R. R.; SANTOS, S. C.; SILVA-PEREIRA, I.; SILVA, M. A.; SILVEIRA, E.; SIMOES, I. C.; SOARES, R. B.; SOUZA, D. P.; DE-SOUZA, M. T.; ANDRADE, E. V.; XAVIER, M. A.; VEIGA, H. P.; VENANCIO, E. J.; CARVALHO, M. J.; OLIVEIRA, A. G.; INOUE, M. K.; ALMEIDA, N. F.; WALTER, M. E.; SOARES, C. M.; BRIGIDO, M. M. (2003). Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. *Yeast.* 20(3):263-71.
- FELIPE, M. S.; ANDRADE, R. V.; ARRAES, F. B.; NICOLA, A. M.; MARANHÃO, A. Q.; TORRES, F. A.; SILVA-PEREIRA, I.; POCAS-FONSECA, M. J.; CAMPOS, E. G.; MORAES, L. M.; ANDRADE, P. A.; TAVARES, A. H.; SILVA, S. S.; KYAW, C. M.; SOUZA, D. P.; NETWORK, P.; PEREIRA, M.; JESUINO, R. S.; ANDRADE, E. V.; PARENTE, J. A.; OLIVEIRA, G. S.; BARBOSA, M. S.; MARTINS, N. F.; FACHIN, A. L.; CARDOSO, R. S.; PASSOS, G. A.; ALMEIDA, N. F.; WALTER, M.

- E.; SOARES, C. M.; CARVALHO, M. J.; BRIGIDO, M. M. (2005). Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *J Biol Chem.* 2005; 280(26):24706-14. Epub Apr 22.
- FERREIRA-NOZAWA, M. S.; NOZAWA, S. R.; ROSSI, A.; FACHIN, A. L.; MACCHERONI, W. Jr.; MARTINEZ-ROSSI, N. M. (2001). Cloning of a zinc (Zn)-finger transcription factor pacC gene from the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *Genetica, Universidade de Sao Paulo. Mar-23. USP, Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirao Preto, SP 14049-900, Brazil*
- FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, J.; BROWN, C. V.; DÍEZ, E.; TILBURN, J.; ARST, H. N. Jr. (2003). Overlap of nuclear localisation signal and specific DNA binding residues within the zinc finger domain of PacC. *J. Mol. Biol.* 334:667–84
- FLAHERTY, J. E.; PIRTTILA, A. M.; BLUHM, B. H.; WOLOSHUK, C. P. (2003). PAC1, a pH-Regulatory Gene from *Fusarium verticillioides*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (9), 5222-5227
- FRANCO, M. (1987). Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol.* 25(1):5-18.
- FRANCO, M. D.; NUNES, J.; LIPCEY, C.; LOPEZ, M.; MAWAS, C.; OLIVE, D. (1993). Regulation of CD2-mediated human T cell activation: anti-CD8 monoclonal antibodies inhibit CD2-mediated rise in intracellular calcium. *Cell Immunol.* 152(1):162-75.
- FUTAI, E.; MAEDA, T.; SORIMACHI, H.; KITAMOTO, K.; ISHIURA, S.; SUZUKI, K. (1999). The protease activity of a calpain-like cysteine protease in *Saccharomyces cerevisiae* is required for alkaline adaptation and sporulation. *Mol. Gen. Genet.* 260:559–68

- GHANNOUM, M. A.; SPELLBERG, B.; SAPORITO-IRWIN, S. M., FONZI, W. A. (1995). Reduced virulence of *Cândida albicans* *PHR1* mutants. *Infect. Immun.* 63: 4528-4530.
- HEINZ, W. J.; KURZAI, O.; BRAKHAGE, A. A.; FONZI, W. A.; KORTING, H. C.; FROSCH, M.; MÜSHLSCHLEGEL. (2000). Molecular responses to changes in the environmental pH are conserved between the fungal pathogens *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *Int. J. Med. Microbiol.* 290: 231-238.
- KANETSUNA, F.; CARBONELL, L. M.; MORENO, R. E.; RODRIGUEZ, J. (1969). Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* 97 (3): 1036-41.
- KANETSUNA, F. & CARBONELL, L. M. (1970). Cell wall glucans of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* 101 (3): 675-80.
- KLUG, A.; SCHWABE, J. W. (1995). Protein motifs 5. Zinc fingers. *FASEB J.* May; 9(8):597-604.
- LOOSE, D. S.; STOVER, E. P.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A.; FELDMAN, D. (1983). Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80(24):7659-63.
- LUTZ, A. (1908). Uma micose pseudococcídica localizada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das hifoblastomicoses americanas. *O Brazil-Medico* 22 (13,15): 121-124, 141-144.
- MACCABE, A. P.; VAN DEN HOMBERGH, J. P. T. W.; TILBURN, J.; ARST, H. N. Jr.; VISSER, J. (1996). Identification, cloning and analysis of the *Aspergillus niger* gene *pacC*, a wide domain regulatory gene responsive to ambient pH. *Mol. Gen. Genet.* 250:367-374.

- MATUTE, D. R.; MCEWEN, J. G.; PUCCIA, R.; MONTES, B. A.; SAN-BLAS, G.; BAGAGLI, E.; RAUSCHER, J. T.; RESTREPO, A.; MORAIS, F.; NINO-VEJA, G.; TAYLOR, J. W. (2006). Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol.* 23(1):65-73.
- MEYER, V.; SPIELVOGEL, A.; FUNK, L.; TILBURN, J.; ARST, H. N. Jr.; STAHL, U. (2005). Alkaline pH-induced up-regulation of the *afp* gene encoding the antifungal protein (AFP) of *Aspergillus giganteus* is not mediated by the transcription factor PacC: possible involvement of calcineurin. *Mol Genet Genomics.* Oct; 274(3):295-306. Epub 2005 Oct 20.
- MINGOT, J. M.; TILBURN, J.; DÍEZ, E.; BIGNELL, E.; OREJAS, M. (1999). Specificity determinants of proteolytic processing of *Aspergillus* PacC transcription factor are remote from the processing site, and processing occurs in yeast if pH signalling is bypassed. *Mol. Cell. Biol.* 19:1390–400
- MINGOT, J. M.; ESPESO, E. A.; DÍEZ, E.; PEÑALVA, M. A. (2001). Ambient pH signaling regulates nuclear localization of the *Aspergillus nidulans* PacC transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* 21:1688–99
- MOLINARI-MADLUM, E. E.; FELIPE, M. S.; SOARES, C. M. (1999). Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates can be correlated to groups defined by random amplified polymorphic DNA analysis. *Med. Mycol.* 37: 269-276.
- MOYE-ROWLEY, W. S. (2002). Transcription factors regulating the response to oxidative stress in yeast. *Antioxid. Redox Signal* 4: 123-140.
- MUHLSHLEGEL, F. A. & FONZI, W. A. (1997). *PHR2* of *Candida albicans* encodes a functional homolog of the pH-regulated gene *PHR1* with an inverted pattern of pH-dependent expression. *Mol. Cell Biol.* 17: 5960-5067.

- NEGRETE-URTASUN, S.; DENISON, S. H.; ARST, H. N. Jr. (1997). Characterization of the pH signal transduction pathway gene *pala* of *Aspergillus nidulans* and identification of possible homologs. *J. Bacteriol.* 179:1832–35
- ODDS, F. C.; GOW, N. A. R.; BROWN, A. J. P. (2001). Fungal virulence studies come of age. *Genome Biol.*, 2(3):1009.1-1009.4.
- OREJAS, M.; ESPESO, E. A.; TILBURN, J.; SARKAR, S.; ARST, H. N. Jr.; PEÑALVA, M. A. (1995). Activation of the *Aspergillus* PacC transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxyterminal moiety. *Genes Dev.* 9:1622– 32
- PEÑALVA, M. A.; ARST, H. N. Jr. (2002). Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. *Microbiol.Mol. Biol. Rev.* 66:426–46
- PEÑALVA, M. A.; ARST, H. N. Jr. (2004). Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* 2004. 58:425–51.
- PETERSON, S. W.; SIGLER, L. (1998). Molecular genetic variation in *Emmonsia crescens* and *Emmonsia parva*, etiologic agents of adiaspiromycosis, and their phylogenetic relationship to *Blastomyces dermatitidis* (*Ajellomyces dermatitidis*) and other systemic fungal pathogens. *J Clin Microbiol.* Oct, 36(10):2918-25.
- PINERO, D. & KELLER, N. P. (2001). Isolation and Characterization of the *Aspergillus parasiticus* *pacC* Gene. *Plant Pathology and Microbiology*, Aug-13, Texas A&M University, 2132 TAMU, College Station, TX 77843-2132, USA
- PORTILLO, F. (2000). Regulation of plasma membrane H(+)-ATPase in fungi and plants. *Biochim Biophys Acta.* Mar 10;1469(1):31-42.
- POUSSEREAU, N. & RASCLE, C. (2004). Isolation of a *pacC* homolog in the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. *Unite de Microbiologie et Genetique* Jun-07.

- RAMON, A. M.; PORTA, A.; FONZI, W. A. (1999). Effect of environmental pH on morphological development of *Candida albicans* is mediated via the *pacC* - Related transcription factor encoded by PRR2. *J. Bacteriol.* 181:7524-7530.
- REINOSO, C.; NINO-VEGA, G.; SAN-BLAST, G.; DOMINGUEZ, A. (2005). Random sequencing of *Paracoccidioides brasiliensis* genes. *Med Mycol* 43 (8): 681-9.
- RESTREPO, A. (1978). Paracoccidioidomycosis. *Acta Med. Colomb.* 3: 33-66.
- RESTREPO, A.; SALAZAR, M. E.; CANO, L. E.; STOVER, E. P.; FELDMAN, D.; 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.
- RESTREPO, A. (1985). The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Sabouraudia.* 23(5):323-34.
- RESTREPO, A.; MCEWEN, J. G.; CASTANEDA, E. (2001). The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med Mycol.* 39(3):233-41.
- RICCI, G.; MOTA, F. T.; WAKAMATSU, A.; SERAFIM, R. C.; BORRA, R. C.; FRANCO, M. (2004). Canine paracoccidioidomycosis. *Med Mycol* 42(4): 379-83.
- ROLLINS, J. A.; DICKMAN, M. B. (2001). pH signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: Identification of *pacC/RIM1* homolog. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:75-81.
- ROLLINS, J. A. (2003). The *Sclerotinia sclerotiorum pac1* gene is required for sclerotial development and virulence. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16:785-95
- ROMANI, L. (1997). The T cell response against fungal infections. *Curr. Opin. Immunol.* 9: 484-490.
- ROONEY, P. J. & KLEIN, B. S. (2002). Linking fungal morphogenesis with virulence. *Cell. Microbiol.*, 4:127-137.

- ROSSI, A. & ARST, H. N. Jr. (1990). Mutants of *Aspergillus nidulans* able to grow at extremely acidic pH acidify the medium less than wild type when grown at more moderate pH. *FEMS Microbiol Lett.* Jan 1;54(1-3):51-3.
- SALAZAR, M. E.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A. (1988). Inhibition by oestrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect. Immun.*, 56:711-713.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. (2001). Molecular Cloning – A Laboratory Manual, 3rd Edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.*
- SAN-BLAS, F. & SAN-BLAS, G. (1985). *Paracoccidioides brasiliensis*. Em: SZANISZLO, P. (ed.). Fungal Dimorphism. P.93. *Plenum Press, New York.*
- SAN-BLAS, G. & 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.; NINO-VEJA, G.; ITURRIAGA, T. (2002). *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol.* 40(3):225-42.
- SANO, M. & MACHIDA, M. (2001). Cloning of a genomic DNA for *pacC* from *Aspergillus oryzae*. *Published Only in DataBase.*
- SAPORITO-IRWIN, S. M.; BIRSE, C. E.; SYPHERD, P. S., FONZI, W. A. (1995). *PHR1*, a pH-regulated gene of *Candida albicans*, is required for morphogenesis. *Mol. Cell Biol.* 15:601-613.
- SCHMITT, E. K.; KEMPEN, R.; KUCK, U. (2001). Functional analysis of promoter sequences of cephalosporin C biosynthesis genes from *Acremonium chrysogenum*: specific DNA-protein interactions and characterization of the transcription factor PACC. *Mol. Genet. Genomics* 265 (3), 508-518.

- SINGER-VERMES, L. M.; BURGER, E.; FRANCO, M. F.; DI-BACCHI, M. M. (1989). Evaluation of the pathogenicity and immunogenicity of seven *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible inbred mice. *J Med Vet Mycol.* 27(2):71-82.
- SOARES, C. M.; MADLUN, E. E.; DA SILVA, S. P.; PEREIRA, M.; FELIPE, M. S. (1995). Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates by random amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol.* 33(2):505-7.
- SORIMACHI, H.; SUZUKI, K. (2001). The structure of calpain. *J. Biochem.* 129:653–64
- SOUTO, J. T.; FIGUEIREDO, F.; FURLANETTO, A.; PFEFFER, L.; ROSSI, M. A.; SILVA, J. S. (2000). Interferon- γ and tumor necrosis factor- α determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. *Am. J. Pathol.*, 156(5): 1811-1820.
- STOVER, E. P.; SCHAR, G.; CLEMONS, K. V.; STEVENS, D. A.; FELDMAN, D. (1986). Estradiol-Binding Proteins from Mycelial and Yeast-Form Cultures of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect. Immun.* 51: 199-203.
- SUAREZ, T.; PEÑALVA, M. A. (1996). Characterization of a *Penicillium chrysogenum* gene encoding a PacC transcription factor and its binding sites in the divergent *pcbAB-pcbC* promoter of the penicillin biosynthetic cluster. *Mol. Microbiol.* 20:529-540.
- TILBURN, J.; SARKAR, S.; WIDDICK, D. A.; ESPESO, E. A.; OREJAS, M.; MUNGROO, J.; PENALVA, M. A.; ARST, H. N. Jr. (1995). The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J.* 14:779–90
- TUDZYNSKI, B. & SELLE, A. (2002). Cloning and functional analysis of the *Gibberella fujikuroi* PACC-encoding gene. *Institut fuer Botanik*, 25-OCT. University Muenster, Schlossgarten 3, D-48149 Muenster

- TURNER, G. (1993). Gene organization in filamentous fungi. In: The Eukaryotic Genome Organization and Regulation. BRODA, P. M. A.; OLIVER, S. G.; SIMS, P. F. G. (eds). *Society for General Microbiology Symposium 50. Cambridge University Press*. Pp. 107-125.
- VAN DEN HOMBERGH, J. P. T. W.; MACCABE, A. P.; VAN DEN VONDERVOORT, P. J. I.; VISSER, J. (1996). Regulation of acid phosphatases in an *Aspergillus niger* *pacC* disruption strain. *Mol. Gen. Genet.* 251: 542-550.
- VINCENT, O.; RAINBOW, L.; TILBURN, J.; ARST, H. N. Jr.; PEÑALVA, M. A. (2002). YPXL/I is a protein interaction motif recognised by *Aspergillus* PalA and its human homologue AIP1/Alix. *Mol. Cell. Biol.* 23:1647-55