

**Universidade de Brasília-UnB
Pós Graduação em Patologia Molecular
Faculdade de Medicina**

**Clonagem e caracterização do Fator Inibitório de Macrófago
do fungo *Paracoccidioides brasiliensis***

Gina Camilo de Oliveira

**Brasília-DF
2006**

**Universidade de Brasília-UnB
Pós Graduação em Patologia Molecular
Faculdade de Medicina**

**Clonagem e caracterização do Fator Inibitório de Macrófago
do fungo *Paracoccidioides brasiliensis***

Gina Camilo de Oliveira

Orientador: Marcelo de Macedo Brígido
Co-orientadora: Andréa Queiroz Maranhão

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular (Genética Molecular)

**Brasília-DF
2006**

Banca Examinadora:

Profa.Dra Maria Sueli Soares Felipe-UnB
Prof.Dr Marcos Antônio dos Santos Silva-UnB
Profa.Dra Ildinete Silva Pereira-UnB

Trabalho realizado no Laboratório
de Biologia Molecular (Instituto de
Biologia) da Universidade de
Brasília, com apoio financeiro da
CAPES-MCT-Cnpq

Este trabalho é dedicado
àqueles que incentivaram
e acompanharam as
minhas
oportunidades de aprendizado
e crescimento...

VALEU mesmo!!!!!!J

“Ao desconhecido, nosso estímulo”

Índice

| | |
|---|-----|
| Resumo | ix |
| Abstract | x |
| Lista de Siglas e abreviaturas | xi |
| Lista de Figuras | xiv |
| Lista de Tabelas | xv |
| Introdução | |
| 1. Interação parasito-hospedeiro | 2 |
| 2. Fator Inibitório de Macrófago | 8 |
| Objetivos e estratégia experimental | 11 |
| Justificativa | 12 |
| Material | 13 |
| 1. Meios de Cultura- <i>Escherichia coli</i> | 13 |
| 2. Antibióticos e soluções utilizadas para seleção de transformantes | 14 |
| 3. Linhagens bacterianas | 15 |
| 4. Plasmídeos utilizados | 15 |
| 5. Enzimas de restrição | 16 |
| 6. Outras enzimas | 16 |
| 7. Tampões de enzimas | 16 |
| 8. Soluções de uso geral | 17 |
| 9. Soluções utilizadas nos protocolos de transformação | 18 |
| 10. Soluções para preparação de DNA plasmidial | 19 |
| 11. Soluções para eletroforese em gel de agarose | 20 |
| 12. Soluções para eletroforese em gel de poliacrilamida | 20 |
| 13. Soluções para <i>Western Blot</i> | 22 |
| 14. Anticorpos e conjugados para <i>Western Blot</i> | 23 |
| 15. Soluções para <i>Northern-blot</i> | 23 |
| 16. Reagentes e Kits utilizados | 25 |
| 17. Oligonucleotídeos dos vetores | 26 |

| | |
|---|----|
| Metodologia | 27 |
| 1. Desenho dos oligonucleotídeos para amplificação e clonagem da ORF do PbMIF, a partir da seqüência de nucleotídeos do cDNA. | 27 |
| 2. Amplificação da ORF do PbMIF para clonagem no vetor de expressão | 27 |
| 3. Clonagem da ORF do PbMIF no vetor pGEMT | 28 |
| 4. Clonagem da ORF do PbMIF no vetor de expressão pET21a | 29 |
| 5. Preparação de Células Eletrocompetentes | 29 |
| 6. Transformação de células competentes (<i>E.coli</i>) – Eletroporação | 30 |
| 7. Preparo e transformação de células de <i>Escherichia coli</i> competentes congeladas pelo método de cloreto de cálcio | 31 |
| 8. Preparação de DNA plasmidial | 31 |
| 9. Digestão do DNA com enzimas de restrição | 32 |
| 10. Sequenciamento automático | 32 |
| 11. Análise da seqüência de nucleotídeos | 32 |
| 12. Análise da expressão diferencial pelo experimento de <i>Northern blot</i> | 33 |
| 13. Expressão heteróloga em <i>E.coli</i> | 34 |
| 14. Análise dos extratos protéicos de <i>E.coli</i> por SDS-PAGE | 35 |
| 15. Transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose e imunodeteção | 35 |
| 16. Análise da filogenia do MIF de <i>P. brasiliensis</i> | 36 |
| Resultados e Discussão | |
| 1. Obtenção do cDNA de MIF | 37 |
| 2. Análise da filogenia do MIF de <i>P. brasiliensis</i> | 41 |
| 3. Subclonagem do cDNA de MIF | 43 |

| | | |
|----|--|----|
| 4. | Confirmação do perfil de expressão diferencial do gene <i>pbmif</i> por <i>Northern blot</i> | 46 |
| 5. | Expressão heteróloga em <i>E.coli</i> | 47 |
| | Conclusão e Perspectivas | 51 |
| | Referências Bibliográficas | 52 |
| | Anexo | |

Resumo

O fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica e endêmica na América Latina. Estima-se que 10 milhões de indivíduos estejam infectados, mas apenas 2% desenvolvem a doença. A forma miceliana encontrada na natureza constitui a fase infectiva que diferencia para a forma de levedura no pulmão humano estabelecendo a infecção. O fungo promove uma resposta imunitária mediada por células e uma resposta inflamatória no pulmão. Os macrófagos são células efetoras do sistema imunitário que reconhecem e eliminam patógenos invasores. Inicialmente identificada como uma citocina de linfócitos T, o fator inibitório de macrófago (MIF) é também uma citocina do macrófago e atua como um importante mediador da inflamação, devido às suas características imunomodulatórias. MIF apresenta atividade enzimática de tautomerase, conferida pelo aminoácido Prolina conservado na posição 2 e também tem uma participação importante no ciclo celular por meio da inibição da apoptose ao inativar p53. O Projeto Genoma Funcional e Diferencial de *P. brasiliensis* realizado no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília junto à Rede Genoma Centro-Oeste permitiu a geração de ESTs (do inglês “Expressed Sequence Tags”) a partir de bibliotecas de cDNA das formas de micélio e levedura de *P. brasiliensis*. Não há relatos na literatura de homólogos de MIF em fungos, porém, no genoma do *P. brasiliensis* foi descrito uma seqüência que possui similaridade gênica significativa com o MIF de mamíferos, indicando um envolvimento potencial na patogênese do *P. brasiliensis*. O fragmento encontrado (contig 1528: *pbmif*) é de aproximadamente 400 pares de bases, diferencialmente expresso na fase de levedura de *P. brasiliensis*. MIF é uma proteína que possui homólogos em plantas, nematóides e vertebrados. O objetivo desse trabalho é identificar e caracterizar possíveis clones de cDNA (**PbMIF**) homólogos a MIF isolado da biblioteca de *P. brasiliensis*. Um clone de cDNA de MIF foi seqüenciado e identificado como similar a MIF humano. A expressão do mRNA é diferencial em levedura, como detectado por *Northern Blot*. A seqüência de aminoácidos de MIF do *P. brasiliensis* tem similaridade de 56% (32% de identidade) com o MIF de *Mus musculus*. Para a produção da proteína recombinante em *Escherichia coli*, o cDNA de MIF foi clonado no vetor de expressão (pET21).

A detecção e caracterização de um homólogo de fator inibitório de macrófago (MIF) no *P. brasiliensis* é um relato inédito descrito em fungos e o papel de MIF mimetizando uma citocina pode revelar novos fatores de virulência para a infecção pelo *P. brasiliensis*. Portanto, pela coevolução com o sistema imunitário, patógenos poderiam desenvolver relevantes estratégias para evasão das defesas do hospedeiro desenvolvendo moléculas homólogas a citocinas, como seria o caso do MIF de *P. brasiliensis*. O papel do MIF de *P. brasiliensis* é desconhecido, assim sua caracterização favorecerá o desenvolvimento de informações sobre o mecanismo de patogenicidade do fungo .

Abstract

The dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* is the etiological agent of paracoccidioidomycosis (PCM), a fungal disease that is endemic in Latin America. This infection affects 10 million individuals but only 2% develop the disease. The mycelia found in nature constitute the infective phase that differentiates to yeast form in the human lungs to establish the infection. The fungus promotes a cell mediated immune and inflammatory pulmonary response. Macrophages are pivotal effector cells of the innate immune system, recognizing and eliminating invasive microbial pathogens. Initially identified as a T-cell cytokine, the Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) is also a macrophage cytokine and an important mediator of inflammation, it has immunomodulatory characteristics. MIF has enzymatic activity related to the N-terminal proline residue in the position 2 and MIF can inhibit apoptosis through the inactivity of p53. From the project “Functional and Differential Genome of *P. brasiliensis*” ESTs (Expressed Sequence tags) database we discover a putative fungi homologue to the mammalian MIF. There are no previous reports in the literature of MIF homologues in fungi, however the sequence described in the genome of *P. brasiliensis* has sequence similarity to MIF genes found in animal, nematode and plant.

The aim of this work is to investigate the gene encoded by the **Pb MIF** homolog in order to characterize its coding sequence and predicted polypeptide and characterize the differential expression.

A MIF related cDNA clone was fully sequenced and the predicted MIF homolog was identified. The mRNA expression is restricted to the yeast form, as detected by *Northern Blot*. Sequence analysis indicated that the predicted amino acid sequence has a similarity of 56% (32% identical) with the MIF of *Mus musculus*. The Pb MIF CDS (coding sequence) was subcloned into bacterial expression vector (pET21) fused to a histidine tag. This CDS was expressed in *Escherichia coli* to produce recombinant protein.

We have detected and characterized a Pb MIF putative homolog. This is the first report of a MIF homolog among fungi and its role as a cytokine mimetic may reveal new virulent factors for *P. brasiliensis* infection. During the co-evolution with immune system, pathogens must had developed relevant strategies of evasion of host response. Though incorporating cytokines homologs may be a successful strategy for *P. brasiliensis* infection. The Pb MIF homolog may be part of an unknown strategy for *P. brasiliensis* survival inside the mammalian host.

Lista de Siglas e Abreviaturas

| | |
|------|---|
| Amp | Ampicilina |
| APS | Persulfato de amônio |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| BCIP | 5-bromo-4-cloro-indolil fosfato |
| BSA | Albumina bovina sérica |
| °C | Graus Celsius |
| cDNA | Ácido desoxirribonucléico complementar |
| cm | Centímetros |
| Da | Dalton |
| DATP | Desoxiadenosina 5' trifosfato |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| DNTP | Desoxinucleotídeo 5' trifosfato |
| DTH | Hipersensibilidade do tipo tardia (<i>Delayed Type Hypersensitivity</i>) |
| DTT | Ditiotreitol |
| EDTA | Ácido etilenodiaminotetracético |
| EST | (<i>Expressed Sequence Tag</i>) |
| Fc | Fragmento cristalizável de anticorpo (porção constante) |
| g | grama |
| g | Força gravitacional |
| IFN | Interferon |
| Ig | Imunoglobulina |
| IL | Interleucina |
| IPTG | Isopropil- β -D-Tiogalactosídeo |
| Kb | Quilobase |
| KDa | Quilodalton |
| Kv | Quilovolts |
| L | Litro |
| M | molar |

| | |
|-------------------|--|
| mA | miliampere |
| Mb | megabase |
| MDR | Multiresistência a drogas (<i>Multi-Drug-Resistance</i>) |
| MIF | Fator inibitório de macrófago (<i>Macrophage Inhibitory Factor</i>) |
| mg | miligrama |
| mL | mililitro |
| mM | milimolar |
| MM | massa molecular |
| mRNA | Ácido ribonucléico mensageiro |
| NBT | Azul de Nitrotetrazol (<i>Nitro Blue Tetrazole</i>) |
| OD ₆₀₀ | Densidade ótica a 600 nanômetros |
| ORF | Fase aberta de leitura (<i>Open Reading Frame</i>) |
| Ori | Origem de replicação |
| p/v | Peso/volume |
| pb | Pares de base |
| PBS | Tampão Fosfato-Salina (<i>Phosphate Buffered Saline</i>) |
| PCR | Reação em cadeia de polimerase |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| qsp | Quantidade suficiente para |
| RNA | Ácido ribonucléico |
| RNase | Ribonuclease |
| rpm | Rotações por minuto |
| SDS | Sódio Dodecil Sulfato |
| SDS-PAGE | Gel de poliacrilamida desnaturante (com SDS) |
| TEMED | N,N,N,N'-metil etilenodimetilamina |

| | |
|----------------|---|
| T _m | Temperatura de anelamento (<i>Temperature Melting</i>) |
| TNF | Fator de necrose tumoral |
| Tris | Tri(hidroximetil)aminometano |
| U | Unidade enzimática |
| UV | Ultravioleta |
| v | Volume |
| v/v | Volume/volume |
| X-Gal | 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo |
| μF | micro Faraday |
| μg | micrograma |
| μL | microlitro |
| μM | micromolar |
| μm | micrometro |
| ng | nanograma |

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1 Esquema indicando as duas ESTs isoladas da biblioteca de cDNA de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e a região consensual | 37 |
| Figura 2. Seqüência de nucleotídeos do clone C02.. | 38 |
| Figura 3. Alinhamento das seqüências de aminoácidos de MIF do <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> – PbMIF com outros organismos | 39 |
| Figura 4. Árvore filogenética do MIF de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> . | 43 |
| Figura 5. Estratégia para amplificação e clonagem do fragmento correspondente a ORF do <i>PbMIF</i> | 44 |
| Figura 6: Amplificação da ORF do <i>PbMIF</i> | 44 |
| Figura 7. Seqüência de nucleotídeos da ORF do <i>PbMIF</i> | 45 |
| Figura 8. Análise do perfil de expressão do gene <i>pbmif</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> nas formas de micélio(M) e levedura(L). | 47 |
| Figura 9. Análise de restrição do clone recombinante com as enzimas <i>Nde I</i> e <i>Xho I</i> . | 49 |
| Figura 10. Análise dos extratos protéicos de <i>Escherichia coli</i> por <i>western blot</i> . | 50 |

Lista de Tabelas

| | |
|--|-----------|
| Tabela 1. Linhagens de <i>Escherichia coli</i> utilizadas. | 15 |
| Tabela 2. Enzimas de restrição utilizadas. | 16 |
| Tabela 3. Características dos oligonucleotídeos utilizados. | 27 |

Introdução

O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), a mais prevalente micose sistêmica na América do Sul, destacando-se o Brasil como oitava causa de mortalidade entre as micoses sistêmicas. Estima-se que há 10 milhões de indivíduos infectados mas apenas 2 % desenvolvem a doença (Coutinho *et al.*, 2002). A PCM acomete especialmente populações de áreas rurais e tem uma importância em saúde coletiva associada aos custos sociais e econômicos. Ela ocorre principalmente em indivíduos em fase produtiva, com freqüentes seqüelas secundárias (fibrose pulmonar), motivo comum de incapacitação para o trabalho.

A classificação taxonômica e a nomenclatura dos fungos são baseadas na observação do fenótipo nos estágios de reprodução sexuada. Assim, fungos com reprodução sexual desconhecida, como o *P. brasiliensis*, têm sua classificação imprecisa e conflitante. Atualmente o *P. brasiliensis* é classificado como um ascomiceto, apesar de não ter ciclo sexual descrito, e por meio de comparações de seqüências de nucleotídeos do RNA ribossomal foi classificado como um provável membro da ordem Onygenales juntamente com os fungos *Histoplasma capsulatum* e *Blastomyces dermatitidis* (Guarro *et al.*, 1999).

P. brasiliensis é um fungo dimórfico. Lutz, em 1908, foi o primeiro a relatar a PCM e observar o dimorfismo (Lacaz, 1994), o qual é reprodutível *in vitro* por meio de variação de temperatura: 23-26° C micélio, 36-37° C levedura (San-Blas & Niño-Vega, G, 2001). Esse processo de transformação é reversível e depende de um conjunto de genes expressos de forma diferencial, em adição à regulação enzimática para a síntese de glucanas que alteram a composição da parede celular do fungo (Felipe *et al.*, 2005 a)

P. brasiliensis é multinucleado na sua forma patogênica de levedura, enquanto um único núcleo é presente na forma miceliana. Feitosa e colaboradores (2003) estimaram que o tamanho do genoma é de 30 Mb e estudos de microscopia confocal sugerem que *P. brasiliensis* pode ser haplóide/diplóide, ou eventualmente, aneuplóide. Além disso, quatro ou cinco cromossomos variando o tamanho entre 2 e 10 Mb foram identificados (Feitosa *et al.*, 2003; Montoya *et al.*, 1999; Cano *et al.*, 1998). Baseado no sequenciamento de ~ 50Kb de um fragmento genômico de *P. brasiliensis*, é possível estimar a presença de 7.500-9.000 genes. (Reinoso *et al.*, 2005)

O habitat natural de *P. brasiliensis* ainda não foi precisamente determinado, embora esse fungo tenha sido ocasionalmente isolado do solo (Silva-Vergara *et al.*,1998). Vários estudos têm sido feitos no intuito de determinar o micro-habitat de *P. brasiliensis*: condições favoráveis à existência do micro-habitat de *P. brasiliensis* foram presumidas à partir de características geoclimáticas das regiões onde houve isolamento do fungo e das áreas endêmicas. Theodoro e colaboradores (2005) utilizaram diferentes técnicas moleculares para a detecção do *P. brasiliensis* no solo. O *P. brasiliensis* parece utilizar a quitina como fonte de carbono, ensaios de atividade de glicosil hidrolase demonstraram que o *P. brasiliensis* produz e secreta quitinases durante a transição dimórfica (Bonfim *et al.*, 2006). Acredita-se que na sua fase miceliana esse fungo apresenta-se como saprófita em regiões com solos úmidos, ricos em matéria orgânica e com mínimas alterações de temperatura. Em condições adversas (falta de umidade e/ou nutrientes) o fungo produz propágulos da forma miceliana denominados conídios, os quais podem infectar o homem. Além do homem (*Homo sapiens*), um outro hospedeiro que apresenta relevância na elucidação da ecologia de *P. brasiliensis* é o tatu (*Dasypus novemcinctus*) (Bagagli *et al.*, 2005; Bagagli *et al.*,1998) Esse animal pode não ser apenas um simples carreador como também parece desenvolver a PCM, pois há formação de granuloma relacionado ao fungo que pode ser encontrado no pulmão, baço, fígado e linfonodos mesentéricos. O tatu pode ser o principal reservatório natural do fungo (Restrepo *et al.*, 2001).

Interação parasito-hospedeiro:

O complexo processo envolvendo a interação parasito-hospedeiro pode levar a diferentes resultados, tais como: infecção, comensalismo, colonização, resistência, doença ou erradicação do microorganismo (revisto por Casadevall & Pirofzki, 2000).

No progresso da infecção, os fungos dimórficos transitam para uma fase morfológica mais favorável à sua adaptação. A forma infectiva produz fatores de aderência e exoenzimas para a fixação inicial, crescimento e mobilidade do fungo no tecido do hospedeiro. Essa mudança morfológica do patógeno promove uma troca nas moléculas antigênicas de superfície, controla a expressão da cápsula de certos fungos que vão determinar a natureza comensal ou invasiva do micróbio, além de permitir mudanças no

hospedeiro essenciais para o seu ciclo de vida (Bonfim *et al.*, 2006; Tavares *et al.*, 2005; San-Blas *et al.*, 2000).

A parede celular de *P. brasiliensis* é constituída basicamente por proteínas, lipídeos, quitina e glucanas. A parede celular de levedura apresenta maior quantidade de quitina, sendo composta na sua grande maioria por α -1,3 glucana (95%), tendo apenas (5%) β -1,3 glucana. Já a forma miceliana possui em sua maioria β -1,3 glucana (San Blas & San Blas, 1994). San Blas, (1993) mostrou que a diferença no padrão de síntese de glucanas, entre as formas de micélio e levedura, deve estar envolvida no processo de diferenciação celular de *P. brasiliensis*, uma vez que durante a diferenciação da forma de levedura para a forma de micélio, a síntese de α -1,3 glucana é interrompida por um período de 8 horas, sem que haja indício de síntese de β -1,3 glucana. No processo inverso, ocorre redução da síntese de β -1,3 glucana. Essa síntese e degradação de glucanas durante o processo celular possivelmente permitem a adaptação do fungo às novas condições externas

A adesão às células do hospedeiro e superfícies mucosas é uma etapa crucial no estabelecimento da infecção por *P. brasiliensis*. Barbosa e colaboradores (2006) caracterizaram a gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH) do *P. brasiliensis* como uma adesina, que pode estar relacionada à adesão e invasão da matriz extracelular do hospedeiro pelo fungo. Essas observações indicam que a GAPDH de *P. brasiliensis*, associada à parede celular do fungo pode estar envolvida na aderência das células fúngicas à fibronectina, colágeno do tipo I e laminina presentes no tecido hospedeiro. Na fase crônica da PCM experimental, é possível detectar laminina e fibronectina na superfície de leveduras nas lesões granulomatosas (Gonzalez *et al.*, 2005).

Existe uma forte relação entre aderência e virulência, como sugerido por Hanna e colaboradores (2000) que observaram que linhagens mais virulentas apresentam maior capacidade de adesão. Essa abordagem é baseada no postulado de Falkow, originalmente descrito para identificação de genes de virulência em bactéria, requeridos especificamente para evadir da resposta imune específica do hospedeiro (Falkow *et al.*, 1988). Esse postulado preconiza que para um gene ser considerado de virulência deve haver atenuação ou perda da capacidade de isolados com um determinado gene nocauteado em sobreviver/crescer/promover doença em modelos animais bem estabelecidos, quando comparado a isolados do tipo-selvagem e reconstituídos. É importante ressaltar que um

mutante nulo para um determinado gene de virulência pode ser cultivado sob certas condições *in vitro*, porém tem sua capacidade de produzir doença atenuada ou completamente perdida quando introduzido no ambiente do hospedeiro *in vivo* (Perfect & Cox, 2000ab). Apesar do *P. brasiliensis* ser um patógeno que infecta o homem, pouco ainda é conhecido a respeito de seus genes de virulência. Tavares e colaboradores (2005) compararam prováveis genes de virulência obtidos no transcriptoma do *P. brasiliensis* (Felipe *et al*, 2005; Felipe *et al*, 2003); distribuiu-se as ESTs (do inglês *Expressed Sequence Tags*) em cinco classes metabolismo, parede celular, genes relacionados à detoxificação, fatores de secreção e outros. Esses resultados sugerem que esse organismo pode utilizar um arsenal vasto de possíveis fatores de virulência, que permitem a sua sobrevivência em diferentes ambientes.

Portanto, o desenvolvimento da PCM, bem como de diversas outras micoses, depende de interações entre o fungo e componentes do hospedeiro, características desenvolvidas para uma versatilidade fisiológica e nutricional que simplesmente permitem a sobrevivência do patógeno no ambiente do hospedeiro mamífero. Navarro-Garcia e colaboradores (2001) observaram que mudanças na parede celular podem modificar a adesão e reconhecimento do fungo *Candida albicans* pelo sistema imunitário do hospedeiro, ocasionando alterações na virulência.

A transição para a morfologia associada à doença pode auxiliar o patógeno no aumento da resistência às defesas do hospedeiro. No processo de transição, ocorre a indução de genes fase-específicos já descritos em *P. brasiliensis* cujos produtos podem contribuir para a sobrevivência do fungo no ambiente do hospedeiro (Felipe *et al.*, 2005 a,b).

A capacidade que os microorganismos possuem de sintetizar e secretar componentes tóxicos exerce um papel importante na sobrevivência das espécies. Há proteínas transmembrânicas (transportadores) envolvidas na captação de nutrientes e excreção celular. Em células cancerosas e em patógenos, particularmente em alguns fungos, algumas dessas proteínas são responsáveis por um importante fenômeno conhecido como “multi-resistência a drogas” (MDR do inglês: *Multi-Drug Resistance*). Foram identificados 22 ESTs em *P. brasiliensis* relacionados a transportadores ABC e que estão envolvidos na resistência a drogas, com similaridade em outros fungos (Costa *et al.*, 2005).

Estudos moleculares estabeleceram fatores gerais de virulência para diferentes fungos patogênicos: termotolerância, dimorfismo, componentes polissacarídeos da parede celular, moléculas de adesão, produção de enzimas (proteínases, fosfolipases, lipases) entre outros (Felipe *et al.*, 2005 a,b; van Burik *et al.*,2001; San-Blas *et al.*,2000). Esses dados mostram que a virulência fúngica é um evento altamente complexo e polivalente, resultante da expressão de múltiplos genes em diferentes estágios e em diferentes locais de infecção (Odds *et al.*, 2001).

Os fungos dimórficos são responsáveis pela maioria das infecções sistêmicas de humanos e outros mamíferos. O progresso da doença é marcado pela conversão da forma infecciosa, não patogênica, para uma morfologia distinta, patogênica (Rooney *et al.*, 2002). A patogenia parece estar intimamente ligada à morfogênese devido ao fato de que algumas linhagens de *P. brasiliensis*, e também de outros fungos patogênicos como *H. capsulatum* e *B dermatitidis*, são incapazes de fazer a transição dimórfica e não são virulentas. (Meddof *et al.*, 1986; Borges-Walmsley *et al.*, 2002)

Componentes do hospedeiro têm mostrado afetar a morfogênese dos fungos patogênicos. Devido a uma maior incidência da PCM em homens em relação às mulheres, apresentando uma proporção de 78:1, sugere-se um possível papel protetor do hormônio feminino β -estradiol (Restrepo *et al.*, 1997; revisto por Borges-Walmsley *et al.*, 2002). Estudos *in vitro* demonstraram que 17- β -estradiol inibe a transição de micélio para levedura. Os hormônios progesterona e estriol possuem menor efeito na inibição da transição enquanto que análogos como testosterona e 17- α -estradiol não possuem efeito (Salazar *et al.*, 1988; revisto por Rooney & Klein, 2002). Esses dados sugerem que provavelmente a infecção por *P. brasiliensis* é menos observada em mulheres porque os hormônios femininos suprimem a conversão de micélio para levedura, um evento precoce e pivô no processo infeccioso. Além disso, outras características do indivíduo, como idade, estado nutricional, patrimônio genético e integridade da resposta imunológica são importantes fatores para o estabelecimento do fungo, assim como a virulência e antigenicidade (Franco,1987). A PCM é na maioria dos casos assintomática, evoluindo em cerca de 2% de todos os indivíduos infectados (McEwen *et al.*,1995).

Acredita-se que o micélio e seus conídios constituam a forma infectiva que se transforma em levedura e estabelece a infecção nos pulmões, podendo também atingir

outros órgãos do hospedeiro. Assim, no ambiente natural, os conídios produzidos pela forma miceliana de *P. brasiliensis* atuam como propágulos infecciosos que ao serem inalados, chegam ao pulmão e transformam-se em levedura, estabelecendo a infecção. Posteriormente, dependendo da relação parasito-hospedeiro, a infecção poderia disseminar para os demais tecidos do hospedeiro, tornar-se latente ou ser erradicada (Franco, 1987; San-Blas *et al.*, 2002; revisado por Rooney & Klein, 2002 e Casadevall & Pirofski, 2000).

A infecção inicia-se principalmente nos pulmões e pode ser disseminada via corrente sanguínea ou pelos vasos linfáticos para vários tecidos do corpo. A maioria dos indivíduos infectados desenvolve apenas a infecção pulmonar assintomática; no entanto, alguns pacientes apresentando manifestações clínicas da doença dão origem à forma aguda, subaguda (tipo juvenil), e a forma crônica (tipo adulto). A progressão para a doença depende tanto das condições imunológicas do hospedeiro, como da virulência do fungo. A PCM afeta principalmente a faixa etária de 3-25 anos ocorrendo excepcionalmente em pacientes com idade mais avançada. As manifestações da doença refletem principalmente o grande comprometimento do sistema fagocitário mononuclear. Essa forma da doença progride rapidamente e dissemina pelo sistema linfático, com hipertrofia do linfonodo, hepatoesplenomegalia intensa e o envolvimento de outros órgãos. Nas formas crônicas, que são as mais comuns, a doença acomete indivíduos com mais de 25 anos de idade e tende a progredir mais lentamente. As lesões são restritas a determinados órgãos que podem surgir diretamente de um foco primário ou a partir de um foco quiescente após um determinado período de latência (Franco, 1987; Martinez, 2004).

A resposta imunitária celular efetiva mediada por linfócitos e a imunidade celular não específica mediada por macrófagos, neutrófilos e células citotóxicas naturais constituem a principal defesa contra infecções por fungos parasitas intracelulares como *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* e *Paracoccidioides brasiliensis* (Romani, 1997).

A resistência às infecções também tem sido associada ao papel protetor do interferon gama (IFN- γ) (Cano *et al.*, 1998), cuja depleção *in vivo* aumenta a severidade da doença desenvolvida tanto em camundongos resistentes (A/Sn) quanto em susceptíveis (B/10). A resistência está ligada principalmente à resposta imune do tipo Th 1 com elevada

secreção de IFN- γ e Interleucina 12 (IL-12) e a susceptibilidade está associada com baixos níveis destas citocinas (Kashino *et al* , 2000)

O IFN- γ age na ativação de macrófagos, na produção de óxido nítrico (NO), o maior agente microbicida dos macrófagos, que inibe a transformação de conídio para levedura. Entretanto, quando produzido exageradamente parece ter um papel na imunossupressão observada na paracoccidiodomicose experimental e humana (Bocca *et al* , 1998; Gonzalez *et al* 2000). IFN- γ também estimula macrófagos infectados por *P. brasiliensis* a secretar fator de necrose tumoral (TNF- α), que é requerido para a persistência dos granulomas (Souto *et al*, 2000). Assim, tanto IFN- γ quanto TNF- α conferem resistência a *P. brasiliensis* por estimular a formação do granuloma e produção de óxido nítrico, controlando a infecção.

Foi demonstrado recentemente que culturas *in vitro* de macrófagos de camundongos resistentes infectados com *P. brasiliensis* produzem muito TNF enquanto que macrófagos de camundongos sensíveis produzem somente NO. Na presença de um inibidor de NO ocorre a produção de TNF, o que sugere que o aumento de TNF ou a produção de NO estão associados, respectivamente, à resistência e à susceptibilidade na PCM (Nascimento *et al.*, 2002).

A falha na sinalização da ativação de fagócitos pode contribuir para a predisposição à infecção, limitar a eficácia terapêutica a antifúngicos e favorecer a persistência fúngica e/ou comensalismo (Calich *et al.*, 1998 revisto por Romani, 2004). O tratamento da doença é normalmente prolongado, podendo durar até cinco anos. Atualmente é feito à base de sulfas, drogas antifúngicas, além de acompanhamento pós-terapêutico. As drogas freqüentemente utilizadas são: Itraconazol, Sulfametoxazol, Trimetoprim e Anfotericina B.

O estabelecimento do fungo no tecido pulmonar induz uma resposta inflamatória que permite a formação de granuloma, o qual é definido como uma coleção compacta de células do sistema fagocitário mononuclear, podendo transformar em células epitelióides e gigantes. Linfócitos, plasmócitos, eosinófilos e fibroblastos também estão presentes (Williams *et al.*, 1983; De Brito *et al.*, 1994). A resposta inflamatória induzida pelos fungos auxilia no controle da infecção, entretanto, também contribui para a patogenicidade, como observado pela ocorrência de infecções severas em pacientes imunossuprimidos (Cheng *et al.*, 2000).

O granuloma é a lesão fundamental na PCM e como em outras doenças infecciosas (tuberculose, hanseníase, esquistossomose e histoplasmose) é resultado de uma reação de hipersensibilidade tardia (DTH do inglês *Delayed Type Hypersensitivity*) contra antígenos do agente infeccioso (Romani,1997). O macrófago é a principal célula componente do granuloma, e vários estudos clínicos e experimentais sugerem que macrófagos ativados por linfócitos T têm papel fundamental como a primeira barreira de resistência a *P. brasiliensis*. Dessa forma, o granuloma é um componente essencial na defesa contra o *P. brasiliensis*, pois é onde ocorre a cooperação linfócito T-macrófago, permitindo que o macrófago não só exerça as suas atividades microbicidas e de apresentador de antígenos, mas também, juntamente com o linfócito T, produza citocinas e outros fatores que proporcionem um granuloma competente e eficaz na contenção e eliminação do fungo, evitando assim a sua disseminação pelo organismo. Convém ressaltar que há uma plasticidade marcante do linfócito T em resposta às infecções fúngicas, como por exemplo, a ação antifúngica direta e lise dos fagócitos parasitados pelo fungo (Romani, 2004).

Fator Inibitório de Macrófago:

O fator inibitório de macrófago (MIF- do inglês: *Macrophage Migration Inhibitory Factor*), descrito primeiramente há 40 anos, era considerado um mediador linfocitário que inibia a migração randômica de macrófago (David *et al.* 1966). Posteriormente, MIF foi descrito novamente como um fator secretado pela hipófise e com propriedades neuro-endócrinas, caracterizadas principalmente por sua atividade pró-inflamatória (Bernhagen *et al.*, 1993; Calandra *et al.*, 1995).

Atualmente, MIF é considerado uma proteína pleiotrópica secretada principalmente por macrófagos, linfócitos e células endoteliais. Exerce atividades inflamatórias e imunitárias, induz a secreção de citocinas inflamatórias, a formação de óxido nítrico e ânions superóxidos e a proliferação linfocitária (Nguyen *et al.*, 2003). A atividade de MIF também é associada à regulação do macrófago e à DTH (Bernhagen *et al.*, 2002).

As atividades imunorregulatórias de MIF são baseadas na regulação transcricional de produtos gênicos inflamatórios, na modulação da proliferação celular e no controle do ciclo celular, na inibição da apoptose inativando P53 e em diversos efeitos metabólicos

(Bucala, 1996; Hudson *et al.*, 1999, Mitchell,2000; Lue *et al.*, 2002; Petrenko *et al.*, 2005). P53 é uma proteína supressora tumoral que atua como um fator de transcrição responsável por uma ativação direta de genes envolvidos em diversos eventos celulares, incluindo a apoptose (Vogelstein *et al.*,2000; Vousden *et al.*,2002).

MIF apresenta atividade enzimática além da característica de citocina e, de acordo com a literatura, um resíduo de prolina na posição 2 é o que determina a atividade de tautomerase (Swoope *et al.*, 1998; Subramanya *et al.*,1996). O MIF é uma citocina importante para ativar os linfócitos T e cataliza a conversão de D-dopacromo a 5,6-dihidroindol-2-ácido carboxílico. A seqüência de aminoácidos da enzima D-dopacromo tautomerase humana apresenta homologia com a seqüência do MIF humano. O mRNA de D-dopacromo tautomerase é expresso principalmente em fígado, mas também pode ser encontrado no coração, pulmão, e pâncreas. Apesar do mecanismo ser desconhecido, a enzima D-dopacromo tautomerase converte 2-carboxi-2,3-dihidroindol-5,6-quinona (D-dopacromo) em 5,6 dihidroxiindol. A atividade enzimática tanto de MIF quanto de D-dopacromo tautomerase é abolida com a mutação da prolina amino-terminal, assim é possível afirmar que a prolina é essencial para o mecanismo catalítico (Nishihira *et al.*, 1998).

MIF exerce um papel relevante na patogênese de uma variedade de condições inflamatórias e imunitárias, tais como choque séptico, artrite reumatóide, câncer e doenças pulmonares. Conseqüentemente, abordagens terapêuticas baseadas em MIF têm sido bastante sugeridas (Bozza *et al.*, 1999; Chesney *et al.*, 1999; Calandra *et al.*, 2000). Roger e colaboradores (2001) identificaram um papel crucial de MIF na resposta imunitária inata por meio da modulação dos receptores do tipo *TOLL-Like4*, indicando o tratamento anti-MIF como uma importante estratégia para a terapêutica de indivíduos com choque séptico induzido por bactérias GRAM negativas.

Apesar da estrutura gênica e molecular de MIF ser bem descrita (Bernhagen *et al.*,1998) os mecanismos moleculares da ação de MIF ainda não foram bem elucidados. Não há relatos de identificação de um receptor de membrana. MIF modula a fosforilação e a atividade de proteínas quinases (Mitchell *et al.*,1999) e interage e regula a atividade de coativador transcricional JAB 1/ CSN 5 atuantes no ciclo celular (Kleemann *et al.*, 2000; Burger-Kentischer *et al.*, 2002; Burger-Kentischer *et al.*, 2005). Porém, ainda não é claro o

que esses eventos moleculares regulatórios representam na interação do MIF com a célula alvo.

O Projeto Genoma Funcional e Diferencial de *P. brasiliensis* realizado no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília junto à Rede Genoma Centro-Oeste permitiu a geração de ESTs a partir de bibliotecas de cDNA das formas de micélio e levedura de *P. brasiliensis* (Felipe et al, 2005; Felipe *et al.*, 2003). Não há relatos na literatura de homólogos de MIF em fungos, porém, no genoma do *P. brasiliensis* foi descrito uma seqüência que possui similaridade gênica significativa com o MIF de mamíferos, indicando um envolvimento potencial na patogênese do *P. brasiliensis*.

Pela coevolução com o sistema imunitário, patógenos desenvolvem estratégias relevantes de evasão e adaptação às defesas do hospedeiro (Tosta, 2001) e podem assim desenvolver moléculas homólogas a citocinas, o que pode ser o caso do MIF de *P. brasiliensis*. Como o *P. brasiliensis* é um patógeno intracelular facultativo, conseqüentemente, uma interferência na sobrevivência do macrófago através de MIF, inativando P53 e interferindo no ciclo celular, pode permitir a sobrevivência do fungo ao microambiente do hospedeiro. O papel de MIF mimetizando uma citocina pode revelar novos fatores de virulência para a infecção pelo *P. brasiliensis*. Esse fenômeno sugere que caso seja confirmada a expressão de uma proteína homóloga a MIF em *P. brasiliensis*, o seu estudo favorecerá a elucidação de informações sobre o mecanismo de patogenicidade do fungo.

Objetivos

O objetivo geral desse trabalho é a clonagem, expressão heteróloga, análise da expressão diferencial e caracterização do cDNA completo do gene homólogo ao fator inibitório de macrófago (MIF) do fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*.

Estratégia experimental

1. Clonagem e sequenciamento do cDNA similar a MIF isolado de biblioteca de *P. brasiliensis*.
2. Confirmação do perfil de expressão diferencial do gene *mif* (*Northern blot*).
3. Clonagem do fragmento de cDNA correspondente ao MIF no vetor de expressão pET 21 a (Novagen) fusionado a uma cauda de histidina.
4. Expressão de MIF recombinante na linhagem BL21(DE3)-pLys S de *Escherichia coli*.
5. Confirmação da expressão heteróloga da proteína de fusão por SDS-PAGE e *Western blot*.

Justificativa:

A detecção e caracterização de um homólogo de fator inibitório de macrófago (MIF) no *Paracoccidioides brasiliensis* é um relato inédito para fungos; caso se confirme o papel de MIF mimetizando uma citocina podem ser identificados novos fatores de virulência para a infecção pelo *Paracoccidioides brasiliensis*. É importante ressaltar que foi demonstrado uma molécula homóloga a MIF em nematóides biologicamente ativa em macrófagos (Zang *et al.*, 2002). Portanto, pela coevolução dos patógenos com o sistema imunitário, estes poderiam empregar estratégias relevantes para a evasão das defesas do hospedeiro, desenvolvendo assim moléculas homólogas a citocinas. Este seria o caso do MIF de *P. brasiliensis*. Desta forma, uma nova faceta da relação patógeno-hospedeiro pode ser postulada. A compreensão desses mecanismos miméticos pode sugerir novas formas de intervenção no tratamento da paracoccidioidomicose (PCM).

MATERIAL

1. Meios de Cultura- *Escherichia coli*

Meio Luria-Bertani (LB)

| | |
|---------------------|------------|
| Peptona de caseína | 1,0% (p/v) |
| Extrato de Levedura | 0,5% (p/v) |
| NaCl | 1,0% (p/v) |
| pH = 7,2 | |

Meio LB ágar (LA)

Meio LB adicionado de ágar bacteriológico a 1,5% (p/v)

Meio 2XYT

| | |
|---------------------|------------|
| Peptona de caseína | 1,6% (p/v) |
| Extrato de levedura | 1,0% (p/v) |
| NaCl | 0,5% (p/v) |
| pH = 7,2 | |

Meio SB

| | |
|---------------------|------------|
| Triptona | 3,0% (p/v) |
| Extrato de levedura | 2,0% (p/v) |
| MOPS | 1,0% (p/v) |
| pH = 7,0 | |

Meio SOB

| | |
|---------------------|------------|
| Bacto-triptona | 2,0% (p/v) |
| Extrato de levedura | 0,5% (p/v) |
| NaCl | 10 mM |
| KCl | 2,5 mM |
| pH = 7,0 | |

Meio SOC

Ao meio SOB foram adicionadas as seguintes soluções estéreis, nas concentrações finais indicadas:

| | |
|-------------------|-------|
| Glicose | 20 mM |
| MgCl ₂ | 10 mM |
| MgSO ₄ | 10 mM |

Os meios foram autoclavados a 120° C por 20 minutos.

2. Antibióticos e soluções utilizadas para seleção de transformantes:

Ampicilina

Solução estoque: 50 mg/mL em água estéril.

Estocar protegida da luz, a -20° C.

Concentração final de uso: 100 µg/mL. No caso de células transformadas por eletroporação, a concentração final utilizada é de 200 µg/mL.

Tetraciclina

Solução estoque: 20mg/mL em etanol 70%

Concentração final de uso: 30µg/mL.

Cloranfenicol

Solução estoque: 20 mg/mL em etanol

Concentração final de uso: 20 µg/mL

IPTG (isopropil-β-D-tiogalactosídeo)

Solução estoque: 100 mM de IPTG em H₂O. Solução esterilizada por filtração em membrana Millipore® de 0,2 µm.

X-Gal (5-bromo-4-cloro-3indolil- β -Dgalactopiranosídeo)

Solução estoque: 2,5% de X-Gal dissolvida em N-N-dimetilformamida. A solução é estocada em vidro ou tubo de polipropileno a -20°C , protegido da luz.

3. Linhagens bacterianas :

Tabela 1. Linhagens de *Escherichia coli* utilizadas.

| Linhagem | Genótipo |
|--|--|
| XL 1-Blue (utilizada para amplificação de plasmídeos) | <i>rec A 1 endA1 gyr A 96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10(<i>tet</i>^r)]</i> |
| BL-21 (DE 3)pLysS (utilizada para produção de proteína recombinante) | <i>hsdSgal (λcIts857) ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1</i> |

4. Plasmídeos utilizados:

-pGEM-T Easy: 2.975 pb, ori fl, amp^r, promotores T 7 e SP6, lacZ, múltiplos sítios de clonagem (Promega[®], Madison, Wisconsin). O pGEM-T Easy é obtido à partir do corte do vetor pGEM[®],-5Zf(+) com *EcoRV*, e a adição de timidina às porções 3' das duas extremidades. Esta timidina que se sobressai na porção 3' aumenta a eficiência de ligação dos produtos de PCR, por prevenir a religação do vetor, e por fornecer extremidades compatíveis com produtos de PCR que tiveram adeninas acrescentadas às suas extremidades, o que pode ocorrer com o uso de determinadas *Taq* DNA Polimerases, que apresentam atividade de terminal deoxinucleotideo-transferase.

-pET 21a : vetor de fusão de 5.443 pb, oriPbr322, amp^r, promotor T7lac, lac I, múltiplos sítios de clonagem (Novagen). É utilizado para a expressão de proteínas fusionadas ao T7-tag na região amino-terminal e ao His-tag, que é muito útil como parceiro de fusão para purificação de proteínas, na região carboxi-terminal. O gene de interesse fica sob controle do promotor T7lac que necessita da RNA polimerase viral proveniente da célula hospedeira. O pET também carrega a seqüência natural promotora e codante do repressor lac (*lac I*) orientado de forma oposta ao promotor T7lac. Dessa forma, o

repressor age tanto no promotor *lacUV5* no cromossomo da célula hospedeira para reprimir a transcrição do gene T7 RNA polimerase pela polimerase da célula quanto no promotor *T7lac*, o vetor, para bloquear a transcrição do gene alvo pela T7 RNA polimerase que é produzida. Isso possibilita que a proteína de interesse somente seja expressa na presença do indutor IPTG, que se liga ao produto do gene *lac I*, levando à sua inativação

5. Enzimas de restrição:

Tabela 2. Enzimas de restrição utilizadas.

| Enzima | Sítio de clivagem | Tampão | Temperatura | Fornecedor |
|---------------|-----------------------|------------|-------------|------------|
| <i>EcoR</i> I | G [^] AATT_C | Tampão III | 37° C | Qbiogene |
| <i>Nde</i> I | CA [^] TA_TG | NEB II | 37° C | Biolabs |
| <i>Pvu</i> II | CAG [^] CTG | Tampão B | 37° C | Promega |
| <i>Xho</i> I | C [^] TCGA_G | NEB II | 37° C | Biolabs |

6. Outras enzimas:

T4 DNA ligase- 400 U/μL (New England Biolabs)

Fosfatase alcalina de camarão- SAP- 1000 U/μL (Boehringer Mannheim)

Taq DNA polimerase- 2 U/μL (Cenbiot-RS)

7. Tampões de enzimas:

Tampão de ligação 10 X (New England Biolabs®)

| | |
|-------------------|--------|
| Tris-HCl pH 7.4 | 0,50 M |
| MgCl ₂ | 0,10 M |
| DTT | 0,10 M |
| Espermidina | 0,01 M |
| ATP | 0,01 M |

Tampão da Taq DNA polimerase 10X

| | |
|-------------------|-------|
| Tris-HCl pH 8.3 | 0,1 M |
| KCl | 0,5 M |
| BSA | 0,1% |
| MgCl ₂ | 15 mM |

Tampão de reação para T4 DNA ligase (10X)

| | |
|-------------------|-----------|
| Tris-HCl pH 7.8 | 50 mM |
| MgCl ₂ | 10 mM |
| DTT | 10 mM |
| ATP | 1 mM |
| BSA | 25 (g/mL) |

Tampão da SAP (10X)

| | |
|--------------------|--------|
| Tris-HCl pH 8,5 | 500 mM |
| Mg Cl ₂ | 50 mM |

8. Soluções de uso geral:**Tampão TE**

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

Glicerol 70%

| | |
|----------|-----------|
| Glicerol | 70% (v/v) |
|----------|-----------|

Solução de equilíbrio

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

Fenol equilibrado

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

Homogeneizar repetidas vezes com solução de equilíbrio. Estocado protegido da luz e manipulado com luvas.

Clorofane

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

Equilibrado com Tris-HCl 100 mM pH 7,6. Estocado protegido da luz e manipulado com luvas.

Clorofil

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

Equilibrado com 0,25 v de tampão TE e estocado protegido da luz.

9. Soluções utilizadas nos protocolos de transformação:**Cloreto de cálcio**

| | |
|-------------------|--------|
| CaCl ₂ | 100 mM |
|-------------------|--------|

Esterilizar por filtração em membrana Millipore[®] de 0,2 μ m.

Estoque de Mg 2+ 2M

| | |
|--------------------------------------|----|
| MgCl ₂ .6H ₂ O | 1M |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 1M |

Estoque de glicose 2M

Solução de glicerol 10% (v/v)

Esterilizada por autoclavagem a 120°C por 30 minutos.

10. Soluções para preparação de DNA plasmidial**Solução I**

| | |
|----------------|-----------|
| Tris-HCl pH8,0 | 50 mM |
| EDTA pH8,0 | 10 mM |
| RNase A | 100 µg/mL |

Solução II

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

Preparada na hora do uso

Solução III

| | |
|------------------------|------------|
| Acetato de potássio 5M | 60 mL |
| Ácido acético | 11,5 mL |
| H ₂ O | qsp 100 mL |

Utiliza-se o acetato de potássio a uma concentração final de 3 M e o ácido acético a 2M. pH= 5,5.

RNase A

| | |
|---------|----------|
| RNase A | 10 mg/mL |
|---------|----------|

Dissolvida em tampão acetato de sódio 50Mm (pH 4,8) e fervida em banho-maria por 20 minutos. Estocada a -20°C.

11. Soluções para eletroforese em gel de agarose:

Tampão de Corrida Tris-Borato TEB (10X)

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

O pH é ajustado para 8,0 com ácido bórico.

Tampão de amostra para DNA/RNA (10X)

| | |
|---------------------------|------------|
| Glicerol | 50% (v/v) |
| Azul de bromofenol | 0,1% (p/v) |
| Xilenocianol | 0,1% (p/v) |
| Tampão de corrida TEB 10X | 50% (v/v) |

Solução de brometo de etídio

| | |
|-------------------|----------|
| Brometo de etídio | 10 mg/mL |
|-------------------|----------|

12. Soluções para eletroforese em gel de poliacrilamida:

Solução estoque acrilamida 30% (29:1)

| | |
|----------------|-----------|
| Acrilamida | 20% (p/v) |
| Bis-acrilamida | 1% (p/v) |

Filtrar e estocar na geladeira protegida da luz

Solução de Persulfato de Amônio (APS)

| | |
|----------------------|-----------|
| Persulfato de Amônio | 10% (p/v) |
|----------------------|-----------|

TEMED (N,N,N',N'-tetrametilenodiamina)

Foi utilizado o reagente TEMED da Companhia Organic Research.

Gel concentrador SDS-PAGE

Solução Acrilamida/Bis-acrilamida

| | |
|-----------------|-----------|
| 29:1 | 4%(p/v) |
| Tris-HCl pH 6,8 | 125mM |
| SDS | 0,1%(p/v) |

Gel separador SDS-PAGE**Solução Acrilamida/Bis-acrilamida**

| | |
|-----------------|-----------|
| 29:1 | 12%(p/v) |
| Tris-HCl pH 8,8 | 400mM |
| SDS | 0,1%(p/v) |

Tampão de Corrida para SDS-PAGE (Tris-Glicina)

| | |
|-------------|------------|
| Trizma base | 125 mM |
| Glicina | 960 mM |
| SDS | 0,5% (p/v) |
| PH= 8,3. | |

Tampão de amostra 2X para proteína

| | |
|-------------------------|-----------|
| Tris-HCl pH 6.8 | 200 mM |
| SDS | 4% (p/v) |
| Glicerol | 20% (v/v) |
| β -mercaptoetanol | 4% (v/v) |
| Azul de bromofenol | 0,1%(p/v) |

Solução Corante de Azul de Comassie para Gel SDS-PAGE

| | |
|-------------------------|----------|
| Metanol | 40%(v/v) |
| Ácido acético | 10%(v/v) |
| “Comassie Blue (R-250)” | 1% (p/v) |

Solução Descorante para Gel de SDS-PAGE

| | |
|---------------|-----------|
| Metanol | 40% (v/v) |
| Ácido acético | 10% (v/v) |

13. Soluções para *Western Blot*

Tampão PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) 10X pH7,4

| | |
|----------------------------------|-------------|
| NaCl | 1,37 M |
| KCl | 2,7 M |
| Na ₂ HPO ₄ | 1,2 M |
| KH ₂ PO ₄ | 1,2 M |
| NaN ₃ | 0,02% (p/v) |

Tampão PBST

PBS 1X adicionado de Tween 20 a 0,05% (v/v)

Tampão de Fosfatase Alcalina (*Alkaline Phosphatase Buffer-APB*)

| | |
|-------------------|--------|
| Tris-HCl pH 9,5 | 100 mM |
| NaCl | 100 mM |
| MgCl ₂ | 5 mM |

Tampão para Transferência Semi-Seca de Proteínas

| | |
|-------------|--------------|
| Trizma-base | 48 mM |
| Glicina | 39 mM |
| SDS | 0,037% (p/v) |
| Metanol | 20% (v/v) |

Solução de bloqueio

| | |
|----------------------|----------|
| BSA | 3% (p/v) |
| Dissolvido em PBS 1X | |

Solução reveladora para *Western Blot*

O NBT (Nitro Blue Tetrazole) e o BCIP (5-Bromo-4-Cloro-indolil fosfato) foram preparados em uma solução estoque de 50 mg/mL (Pierce), sendo o NBT dissolvido em N,N-dimetil formamida 70% enquanto o BCIP em água. Para preparar 10mL de solução reveladora adicionava-se 66µl do estoque de NBT e 33µl do estoque de BCIP em 10 mL de APB, nesta ordem para evitar a formação de precipitado.

Membrana de nitrocelulose

Hybond C+ (Amersham Biosciences)

14. Anticorpos e conjugados para *Western Blot*

Anti-HIS tag (Santa Cruz, SC 804)

Anticorpo IgG produzido em coelho, anti-HIS tag.

“Anti-Rabbit-IgG(Fc) Alkaline Phosphatase Conjugated”(PIERCE[®], n^o de catálogo: 31341)

Anticorpo IgG produzido em cabra, anti-IgG de coelho, conjugado a fosfatase alcalina.

15. Soluções para *Northern-blot*

MOPS/EDTA 10X

| | |
|------------------|-------|
| MOPS | 0,2 M |
| Acetato de sódio | 50 mM |
| EDTA pH 8,0 | 10 mM |

Ajustar o pH para 7,0 com NaOH 0,2M. A solução deve ser mantida em frasco escuro, a 4 °C.

Tampão de amostra para eletroforese desnaturante de RNA

| | |
|------------------------|---------|
| Formamida deionizada | 0,75 mL |
| MOPS/EDTA 10X | 0,15 mL |
| Formaldeído | 0,24 mL |
| H ₂ O | 0,10 mL |
| Glicerol 100% | 0,10 mL |
| Azul de bromofenol 10% | 0,08 mL |

SSC 20X

| | |
|--------------------|-------|
| NaCl | 3,0 M |
| Citrato Trissódico | 0,3 M |

Ajustar o pH para 7,0. Esta solução deve ser filtrada ou autoclavada após o preparo.

SSPE 20X

| | |
|----------------------------------|--------|
| NaCl | 3,6 M |
| NaH ₂ PO ₄ | 0,2 M |
| EDTA | 0,02 M |

Ajustar o pH para 7,4 com NaOH. Esta solução deve ser filtrada ou autoclavada após o preparo.

DEPC 0,1% (v/v)**Membrana de Nylon**

Hybond N+ (Amersham Biosciences)

16. Reagentes e Kits utilizados:

“BenchMark™ Pré-stained Protein Ladder” (Invitrogen Life Technologies) – Marcador de massa molecular pré-corado para eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE).

Cubetas de 0,2 cm – Utilizadas para eletroporação no equipamento Gene Pulser com Pulser Controller da Bio-Rad (Bio-Rad, número de catálogo 165-2086)

Glicogênio – 20 mg/mL (Invitrogen, número de catálogo: 10814-010)

High DNA Mass™ Ladder (Invitrogen, número de catálogo: 15618-010)

Marcador de Massa Molecular 1kb Ladder™ – (Invitrogen, número de catálogo: 15615-016)

Marcador de Massa Molecular 1kb Plus Ladder™ (Invitrogen, número de catálogo: 10787-026)

“pGEM-T& Easy Vector System I” (Promega, número de catálogo:A3600)

QIAprep Spin Miniprep kit- usado para preparação de plasmídios para o sequenciamento automático. (QIAGEN, número de catálogo: 27106)

QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN, número de catálogo: 28704)

Wizard&SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, número de catálogo: A9281)

Os Kits foram utilizados de acordo com a instrução dos fabricantes.

17. Oligonucleotídeos dos vetores**-Universal para M13**

5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3'-23mer

- Reverso para M13

5'-AGCGGATAACAATTCACACAGG-3'-23 mer

-T3

5' ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3'-20 mer

-T7 5'TAATACGACTCACTATAGGG-3'-20mer

METODOLOGIA

1. Desenho dos oligonucleotídeos para amplificação e clonagem da ORF do PbMIF, a partir da seqüência de nucleotídeos do cDNA.

A estratégia para expressão heteróloga da ORF do PbMIF (ORF do inglês: *Open Reading Frame* do MIF de *P.brasiliensis*) envolveu sua amplificação (a partir do respectivo cDNA), seguido por clonagem no vetor de expressão de *E. coli*, pET21a (Novagen). Os oligonucleotídeos utilizados nesses experimentos foram desenhados a partir da análise da seqüência nucleotídica do cDNA *pbmif*, flanqueando os prováveis códons de iniciação e terminação da tradução e adicionando-se à seqüência, sítios de enzimas de restrição visando a clonagem no vetor escolhido.

As características dos oligonucleotídeos desenhados durante esse trabalho, encontram-se esquematizadas na tabela 3.

Tabela 3. Características dos oligonucleotídeos utilizados.

| Nome | Seqüência ^a (5'®3') | Tamanho | GC (%) | Tm ^b (°C) | Sítios de restrição |
|-------|--------------------------------|---------|--------|----------------------|---------------------|
| MIF5' | CCACATATGCCTTTCATTGAGCT | 23 | 43,4 | 57 | <i>NdeI</i> |
| MIF3' | ACCCTCGAGTGCACCATAATTTAGCT | 26 | 46,1 | 60 | <i>XhoI</i> |

^a As posições dos sítios de restrição encontram-se sublinhadas nas seqüências dos oligonucleotídeos.

^b Método para cálculo da Tm: $Tm = [2(A+T) + 4(G+C)]$ (Silva-Pereira, 2003)

2. Amplificação da ORF do PbMIF para clonagem no vetor de expressão.

Foram utilizados 40 ng do plasmídeo contendo o cDNA *pbmif* em um sistema de amplificação de 50µL, contendo: tampão de reação 1X; 1,5mM de MgCl₂; 0,2mM de cada dNTP; 0,2 µM de cada oligonucleotídeo (MIF5' e MIF3') e 2U da enzima *Taq* DNA polimerase (Cenbiot/RS-Brasil).

A amplificação foi realizada de acordo com as seguintes etapas:

- a. Desnaturação: 94°C por 3 minutos.

- b. Anelamento: 42°C por 1 minuto.
- c. Extensão: 72°C por 2 minutos.
- d. Desnaturação: 94°C por 4 minutos.
- e. Repetição das etapas a-d por 4 vezes.
- f. Anelamento: 55°C por 1 minuto.
- g. Extensão: 72°C por 2 minutos.
- h. Desnaturação: 94°C por 1 minuto.
- i. Repetição das etapas a-i por 19 vezes.
- j. Anelamento: 55°C por 1 minuto.
- k. Extensão final: 72°C por 10 minutos.

O fragmento obtido na reação de PCR após ser analisado por meio de eletroforese em gel de agarose 1% foi purificado utilizando o kit “QIAquick Gel Extraction”(Qiagen) e utilizado para clonagem no vetor pGEMT (Promega). Posteriormente, foi digerido com as enzimas de restrição *XhoI* e *NdeI* e clonado no pET21a (Novagen). Esse fragmento de DNA, correspondendo à ORF do PbMIF, também foi usado como sonda em um experimento de *northern blot*, descrito a seguir.

3. Clonagem da ORF do PbMIF no vetor pGEMTe (Promega)

Os fragmentos obtidos por PCR, com os oligonucleotídeos MIF5' e MIF3', referentes à ORF do PbMIF após serem analisados por meio de eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), foram purificados e clonados no vetor pGEMT-Easy (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. A reação de ligação foi efetuada utilizando-se uma razão molar de 1:6 (vetor: inserto), de acordo com as instruções do fabricante. Após incubação a 4°C durante a noite, o sistema de ligação foi utilizado para transformar células eletrocompetentes da linhagem XL1-Blue. Após a obtenção de clones recombinantes, os plasmídeos preparados foram analisados por perfil de restrição e um clone positivo foi submetido ao sequenciamento automático visando confirmar a fase, se a sequência corresponde à inicial e se não ocorreu alguma alteração na realização da PCR.

4. Clonagem da ORF do PbMIF no vetor de expressão pET21a (Novagen)

O fragmento de cDNA correspondente à ORF do PbMIF, obtido conforme descrito anteriormente, foi clonado no vetor de expressão pET21a (Novagen) Inicialmente, este vetor foi usado para transformar células de *E.coli* da linhagem XL1-blue, por eletroporação, no intuito de manter o plasmídeo em uma linhagem de células mais estável . A reação de ligação constituiu em uma razão molar de 1:5 (vetor: inserto), de acordo com as instruções do fabricante. Após incubação a 16°C durante a noite, o sistema foi utilizado para transformar células eletrocompetentes da linhagem XL1-blue de *E .coli*. Após preparação do plasmídeo intacto, a partir de um clone recombinante confirmado por perfil de restrição, este foi quantificado para sequenciamento automático e usado para transformar a linhagem BL21(DE3)-pLysS de *E .coli* para expressão heteróloga da proteína recombinante de interesse.

5. Preparação de Células Eletrocompetentes (adaptado de Rader *et al.*, 2000)

Uma colônia isolada da linhagem XL1-blue de *E.coli* foi inoculada em 10 mL de meio SB, contendo tetraciclina a uma concentração final de 30µg/mL, e cultivada durante a noite a 37°C sob agitação a 250 rpm. Na manhã seguinte, 7,5 mL desse pré-inóculo foi inoculado em 250 mL de meio SB em um Erlenmeyer de 1L contendo 25 mL de glicose 20% (p/v) e 25 mL de MgCl₂ 1M, na ausência de antibiótico. Os frascos foram então incubados a 37 °C sob agitação a 250 rpm, até o inóculo atingir uma densidade de células medida como OD₆₀₀= 0,7. Após atingir essa taxa de crescimento, os frascos foram resfriados no gelo, assim como todo o material e soluções a serem usados posteriormente (frascos de centrifugação, pipetas, ponteiras, microtubos, etc.). A cultura foi centrifugada a 3.000xg por 20 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante descartado. O sedimento de células foi submetido a sucessivas lavagens em diferentes volumes de glicerol 10% gelado, seguido por centrifugação, como descritas a seguir: inicialmente, o sedimento foi ressuspenso em 25 mL de glicerol 10%(v/v) e o volume final completado com glicerol 10% para 100mL. As células foram novamente centrifugadas nas condições anteriores e o sedimento ressuspenso

em um volume final de 50 mL. Após nova centrifugação o sedimento foi ressuspenso em um volume final de 25 mL. Por fim, uma nova centrifugação foi realizada e o sedimento de células foi ressuspenso em um volume residual de glicerol (tipicamente 1 a 2 mL). Alíquotas de 100µl foram distribuídas em microtubos e em seguida congeladas em banho álcool/gelo seco ou N₂ líquido e estocadas a - 80°C.

6. Transformação de células competentes (*E.coli*) – Eletroporação - (adaptado de Maranhão,2000)

Uma alíquota de células eletrocompetentes foi descongelada em um banho gelo-água. A uma alíquota de 100µL dessas células, em um microtubo gelado, foi adicionado 20ng de DNA plasmidial ou até 5µL do sistema de ligação, e o tubo foi então incubado no gelo por cerca de 20 minutos. Com o auxílio de uma micropipeta a mistura células/ DNA foi colocada em uma cubeta de eletroporação pré-resfriada, com um espaço de 0,2 cm entre os eletrodos (BioRad). As eletroporações foram realizadas no aparelho “BioRad eletroporator” segundo os parâmetros: 2,5kV/200Ω/25 µF com uma duração de pulso de aproximadamente 5 milissegundos. Imediatamente após o pulso foi adicionado à cubeta 1 mL de meio SOC à temperatura ambiente e o conteúdo transferido para um tubo tipo Falcon de 50 mL, a cubeta foi lavada mais duas vezes com 1 mL de meio SOC totalizando 3 mL de meio de cultura. O tubo Falcon foi incubado a 37°C sob agitação (250 rpm) por 1 hora. Foram plaqueados 100 µL do sistema de transformação contendo o plasmídeo intacto fazendo diluições quando necessárias. Quando se tratava de um sistema de ligação, as células foram sedimentadas por centrifugação, ressuspenso em 300µL de meio SOC e plaqueados 100-200µL da suspensão de células em meio LB ágar contendo o antibiótico apropriado na concentração adequada. As placas foram incubadas a 37°C por aproximadamente 16 horas.

7. Preparo e transformação de células de *Escherichia coli* competentes congeladas pelo método de cloreto de cálcio (adaptado de Sambrook *et al.*, 2001)

Foram inoculados 50 mL de meio LB com 50µL de um pré-inóculo de *Escherichia coli* crescido durante a noite. Incubou-se a 37 °C sob agitação até a cultura atingir uma densidade óptica a 600 nm de 0,5. Em seguida, a cultura foi submetida à centrifugação a 5000 rpm a 4 °C por 5 minutos. O sedimento foi ressuscitado em 30 mL de solução de CaCl₂ 100mM estéril gelada com uma suave agitação. A seguir as células foram incubadas no gelo por 30 minutos. Após este período de incubação as células foram submetidas a uma nova centrifugação durante 7 minutos a 5.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuscitado em 5 mL de solução gelada de CaCl₂ 100mM/ glicerol 15% (v/v) estéril. Neste ponto, as células foram consideradas competentes e poderiam ser utilizadas imediatamente para transformação ou congeladas em alíquotas de 100µL em nitrogênio líquido e estocadas a -80 °C. Quando as células congeladas foram utilizadas para transformação, foram descongeladas em gelo por pelo menos 30 minutos antes de serem utilizadas. A transformação foi feita utilizando-se 100 a 500 ng de DNA e 50µL de células (em tubos *ependorf* estéreis). O tubo foi agitado suavemente e deixado em repouso no gelo por pelo menos 30 minutos. Em seguida, aplicou-se um choque térmico a 37°C por 3 minutos e os tubos recolocados no gelo imediatamente. Foram adicionados 200µL de meio LB aos tubos submetidos ao choque térmico e incubados por 1 hora a 37°C para crescimento das células. Um volume de 50- 100 µL de células transformadas foram semeadas em placas contendo meio LB ágar com 100 µg/mL do agente seletivo específico. As placas foram mantidas a 37°C durante a noite.

8. Preparação de DNA plasmidial

As extrações de DNA plasmidial em pequena e média escala foram feitas pelo método de lise alcalina de acordo com o protocolo padrão (Sambrook *et al.*, 2001). Alternativamente, foi empregado o kit QIAGEN (QIAprep Spin Miniprep kit) seguindo-se as instruções fornecidas pelo fabricante. O DNA plasmidial purificado foi ressuscitado em

água milliQ, analisado por meio de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, e quantificado por espectrofotometria.

9. Digestão do DNA com enzimas de restrição

As digestões dos plasmídeos com enzimas de restrição foram realizadas conforme instruções do fabricante.

10. Sequenciamento automático

O sequenciamento automático realizado nesse trabalho empregou cerca de 100ng de DNA plasmidial (purificado com o kit Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System), 5 picomoles do oligonucleotídeo adequado, o kit “DyEnamic ET DYE Terminator Cycle Sequencing” (Amersham Biosciences) e o seqüenciador MegaBACE 500 plus Molecular Dynamics, disponível no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília.

11. Análise da seqüência de nucleotídeos

As seqüências de nucleotídeos obtidas pelo seqüenciador automático são diretamente submetidas ao programa PhPh (<http://adenina.biomol.unb.br/phph>) para a leitura dos cromatogramas e filtragem para retirada de seqüência dos vetores. Os programas BLAST (NCBI) e Fasta 3.0 foram utilizados para análise da seqüência de interesse em banco de dados. As análises das seqüências também foram feitas utilizando-se o programa BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) (Hall,1999).

12. Análise da expressão diferencial pelo experimento de *northern blot*

As condições de eletroforese em gel de agarose desnaturante e transferência para a membrana de nylon (Hybond N⁺- Amersham), bem como as condições de preparo da sonda, hibridização e lavagem foram realizadas conforme rotina estabelecida no Laboratório de Biologia Molecular Universidade de Brasília em colaboração com Andrade, R V (Felipe *et al.*,2005 a) Nesse experimento foram utilizados cerca de 15µg de RNA total de células de levedura (L) e micélio (M).

Síntese da sonda

A sonda utilizada para experimentos de “northern blot” consistiu do produto de PCR purificado correspondente ao cDNA da ORF do PbMIF como descrito no item 2. Cerca de 25 ng desse fragmento de cDNA foram marcados pela técnica de “random priming” com (α -³² P) dATP utilizando-se o kit Megaprime (Amersham Bioscience) de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. A sonda foi purificada por meio de colunas MicroSpin S300 (Amersham Bioscience) seguindo instruções do fabricante, sendo a radioatividade incorporada quantificada pelo “Liquid Scintillator Analyzer” 1600 (Packard Canberra Company). Após desnaturação, a sonda foi utilizada na hibridização da membrana preparada anteriormente.

Hibridização e Lavagem

A membrana foi submetida a uma pré-hibridização por 2 horas a 42°C em solução de hibridização (50% formamida; SSPE 4X; Solução de Denhardt 5X; 0,5% SDS acrescido de 100µg/mL de DNA de esperma de arenque desnaturado). Após esta etapa, as membranas foram hibridadas durante a noite com a sonda nas mesmas condições descritas na pré-hibridização. Seguiram-se à hibridização sucessivas lavagens da membrana até uma estringência final de 0,1X SSPE, SDS 0,1% a 65°C por 20 minutos. A membrana foi exposta à tela sensível do aparelho Typhoon 9210-Variable Mode Imager (Molecular Dynamics, GE) para varredura e interpretação, por um período de tempo adequado.

13. Expressão heteróloga em *E.coli*

Preparo de células competentes para transformação por choque térmico (uso imediato)

As células foram preparadas pelo método de cloreto de cálcio, conforme descrito anteriormente no item 7.

Na manhã seguinte à transformação, para seleção do melhor clone recombinante, cerca de 50 clones foram repicados em duas placas de Petri, na ausência e na presença do indutor IPTG (1mM). Desta forma, os melhores clones foram selecionados, isto é, aquele que crescia mais na placa sem indutor do que na placa com IPTG, sugerindo provavelmente um maior nível de expressão da proteína de interesse.

Curva de indução

Com o intuito de estabelecer as melhores condições de expressão da proteína de fusão T7-tag/*PbMIFORF*/His-tag (*PbMIF* recombinante), foi feita uma curva de indução da expressão em pequena escala. Para tanto, uma colônia isolada de um clone recombinante contendo a construção de interesse (pET 21a-*PbMIFORF*) foi inoculada em 20 mL de meio 2XYT. Uma cultura bacteriana controle (contendo o vetor pET21a) foi utilizada em paralelo nesse experimento. Após crescimento a 37°C, sob agitação, até atingirem uma OD₆₀₀=0,8, uma alíquota de 1 mL de cada cultura foi coletada (controle negativo- sem indução 0h), sendo em seguida adicionado o indutor IPTG (1mM concentração final) às culturas. Seguindo a adição de IPTG, foram coletadas alíquotas de 1 mL de cada cultura, nos intervalos de tempo de 2 horas e 4 horas para análise da cinética de indução. Após a leitura da OD₆₀₀ de cada amostra, as células foram coletadas por centrifugação (10.000xg por 10 minutos a temperatura ambiente) e em seguida, ressuspensas em 100µL de tampão de amostra SDS-PAGE 2X. Cerca de 15 µL das amostras foram a seguir desnaturadas (100°C por 5 minutos) e analisadas por meio de eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE). Esse mesmo gel foi repetido e transferido para membrana de nitrocelulose, para experimento de *western blot* utilizando anticorpo anti-poli-histidina.

14. Análise dos extratos protéicos de *E. coli* por SDS-PAGE (Laemmli *et al*, 1970).

As proteínas foram analisadas em gel desnaturante de poliacrilamida a 12 %. Foram preparados dois géis de 1,0 mm de espessura, utilizados simultaneamente em um aparato de eletroforese submetido a uma corrente elétrica constante de 25mA. As amostras foram preparadas na presença de tampão de amostra contendo 5% de β -mercaptoetanol (v/v), fervidas por 10 minutos e aplicadas no gel de poliacrilamida logo em seguida. Após o término da eletroforese um dos géis foi corado com uma solução de azul de Comassie por aproximadamente seis horas sob leve agitação enquanto que o outro foi utilizado na transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose para o experimento de imuno-deteção (*western blot*).

15. Transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose e imunodeteção

Foram cortadas doze folhas de papel de filtro Whatmann e uma membrana de nitrocelulose (Hybond C+) do mesmo tamanho do gel a ser utilizado na transferência. Depois de terminada a corrida eletroforética, foi montado sobre a plataforma do pólo positivo do aparelho de transferência de proteínas semi-seco (Macrodrive 1 Power Supply-LKB Bromma 2301), um “sanduíche” da seguinte forma : 6 folhas de papel de filtro Whatmann (cerca de 3 mm) umedecidos em tampão de transferência, uma membrana de nitrocelulose umedecida em tampão de transferência, o gel, 6 folhas de papel de filtro Whatmann (cerca de 3 mm) também umedecidos no mesmo tampão de transferência. Após remoção das bolhas de ar o aparelho foi fechado e submetido a uma corrente elétrica constante igual a 0,8 vezes a área do gel, pelo período de 1 hora. Depois de terminada a transferência, a membrana foi corada com vermelho de Ponceau para verificar a eficácia da transferência. Após a remoção e lavagem em água destilada, foi adicionada a solução de bloqueio e a membrana foi então incubada durante a noite a 4 °C, sob leve agitação. A solução de bloqueio foi removida e a membrana lavada com PBST por três vezes. Uma solução de anticorpo primário (anticorpo IgG produzido em coelho, anti-HIS tag/titulação 1: 2500) foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente. A solução de anticorpo foi então

removida e a membrana lavada 3X com PBST. Uma solução do anticorpo secundário (anticorpo IgG produzido em cabra, anti-IgG de coelho, conjugado a fosfatase alcalina./ titulação 1:5000) foi adicionada à membrana que foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente. A solução de anticorpo secundário foi removida e a membrana lavada por três vezes com PBST. Adicionou-se a solução reveladora NBT/BCIP a qual foi incubada, sob leve agitação, até o aparecimento dos sinais correspondentes à interação antígeno-anticorpo (proteína imobilizada- anticorpo primário- anticorpo secundário). A reação de revelação foi interrompida por sucessivas lavagens com água destilada e as membranas foram secas sobre um papel de filtro, a temperatura ambiente.

16. Análise da filogenia do MIF de *P. brasiliensis*

Para a análise da filogenia do MIF de *P. brasiliensis* foi utilizado o alinhamento das seqüências de aminoácidos produzidos no programa Bioedit. Posteriormente, foi empregado o programa PHYLIP com o algoritmo “Máxima verossimilhança” (<http://www.hku.hk/bruhk/phylip.html>).

Resultados e Discussão

1. Obtenção do cDNA de MIF

A habilidade de *P.brasiliensis* iniciar a infecção, invadir o tecido do hospedeiro e sobreviver perante suas defesas está ligada a indução de genes específicos, que possibilitam a sobrevivência e eventual estabelecimento da infecção. A descoberta de fatores em *P. brasiliensis* que modulam a atividade de macrófagos pode contribuir com esse conhecimento.

A análise das ESTs geradas pelo Projeto Genoma de *P.brasiliensis* (Rede Centro- Oeste) mostra uma contig (1528), com um fragmento de aproximadamente 400pb e com uma sequência prevista de aminoácidos com similaridade gênica com o MIF de diversos organismos, indicando um envolvimento potencial na patogênese do *P.brasiliensis*. Consideramos essa ORF para a caracterização do MIF de *P.brasiliensis* (Pb). Esse contig era formado por duas ESTs (PBDMF-M1-008t_C10.esd e PBDEX-Y1-051t_C02.esd) isoladas da biblioteca de cDNA de *P. brasiliensis* (figura 1).



Figura 1. Esquema indicando as duas ESTs isoladas da biblioteca de cDNA de *P. brasiliensis* e a região consensual entre as duas (contig).

O clone C02 de cDNA foi escolhido para sequenciamento e identificação da sequência completa do PbMIF, devido à facilidade de excisão por ser um banco de plasmídeo e não de fago. Este foi preparado em larga escala e sequenciado com os oligonucleotídeos Universal, Reverso, T3 e T7. Na figura 2 é apresentada a sequência do cDNA completo além da ORF prevista.

MIF de todos os organismos não possui um peptídeo sinal amino-terminal clássico e o seu mecanismo de secreção é desconhecido. Flieger e colaboradores (2003) demonstraram que a regulação da secreção de MIF é mediada por uma via não clássica envolvendo um transportador ABC. A sequência similar a MIF presente no transcriptoma de *P.brasiliensis* também não possui peptídeo sinal clássico (figura 2), assim é possível propor a existência de uma via de secreção

envolvendo transportador ABC. Costa e colaboradores (2005) identificaram PbAESTs do *P.brasiliensis* relacionadas aos transportadores ABC.

| | |
|-----|---|
| 1 | <i>act agg tgg atc ccc cgg gcg tgc agg aaa ttg gaa gca tcg gag att tca cca tta atc</i> |
| 61 | <i>agc cac tgc tct tcg ccg cat tgt gct aaa ATG CCT TTC ATT GAG CTT CTC ACA AAT GTT</i> Met Pro Phe Ile Glu Leu Leu Thr Asn Val |
| 121 | <i>GCT CTC TCA CGC GAG CAG AGC AAA GAA CTC GCC CTT TCA CTC TCC AAG GTG TCA GCG AGG</i> Ala Leu Ser Arg Glu Gln Ser Lys Glu Leu Ala Leu Ser Leu Ser Lys Val Ser Ala Arg |
| 181 | <i>ATC CTT AAA AAG CCC GAG TCT TTC ATT TCA GTT CAA ATC CGC TCT GAT GAG GTC TTG ACG</i> Ile Leu Lys Lys Pro Glu Ser Phe Ile Ser Val Gln Ile Arg Ser Asp Glu Val Leu Thr |
| 241 | <i>TTT GCG GGC ACT CAT GAT CCA TGC TTT CAA ATG CGC GTA ACT TCT CTG GGC AAT CTA AAC</i> Phe Ala Gly Thr His Asp Pro Cys Phe Gln Met Arg Val Thr Ser Leu Gly Asn Leu Asn |
| 301 | <i>CCA GAC GAT AAT GTT AAT TTC TCC AAG GCC TTT GCT GAA TTC CTC AAG GAG GAG ATT GGT</i> Pro Asp Asp Asn Val Asn Phe Ser Lys Ala Phe Ala Glu Phe Leu Lys Glu Glu Ile Gly |
| 361 | <i>GTC ACG AAC GAT AGA GGA TAT GTT ATC TTT TAC GAT CCG GAC TAT GCA AAT CTA GGA TAT</i> Val Thr Asn Asp Arg Gly Tyr Val Ile Phe Tyr Asp Pro Asp Tyr Ala Asn Leu Gly Tyr |
| 421 | <i>AAA GGG ACA ACT GGA GCT AAA TTA TGG TGC TGA agg ggt aaa cgc tta cac gca gac at</i> Lys Gly Thr Thr Gly Ala Lys Leu Trp Cys End |
| 481 | <i>gta agg cat gaa act gtc gcc cac ctt gag gct tgg gat tcg cga gag gtt act tgc act</i> |
| 541 | <i>tgt cat gtt ggc atg gag tct ctt ctt ttt ttc ggc ctg gga ata aaa gaa acc ctt tgc</i> |
| 601 | <i>cat tta gcc tga taa cga gat ttt gca tcg ttt atc tat ttg aaa ttt tat ttt ttg cta</i> |
| 661 | <i>cng cta aca tgg tct ttt tca aaa aaa aaa gaa aaaa</i> |

Figura2. Sequência de nucleotídeos do clone C02. A sequência de nucleotídeos está apresentada em caracteres pretos, enquanto a sequência deduzida de aminoácidos (~13,5kDa) é apresentada abaixo da sequência nucleotídica. O aminoácido Prolina está destacado em azul, o “stop códon” está representado em verde.

Como já dito anteriormente, MIF é considerado uma proteína pleiotrófica e possui a estrutura gênica e molecular bem descrita, porém os mecanismos moleculares e a interação do MIF com a célula alvo ainda não são bem definidos. MIF é uma proteína que possui homólogos em plantas, nematóides e vertebrados (Bucala *et al.*, 2001). Comparamos a sequência prevista de aminoácidos do PbMIF com o MIF de diversas espécies a fim de analisarmos a similaridade e características destes em relação ao MIF de *P.brasiliensis* (figura 3).

| | | %Identidade/Similaridade ao Pb MIF |
|---|--|---------------------------------------|
| 1 | MPFTELLTNVALSREQSKEALSLSKVSARILKKPESFISVQIRSDVLTTFAGTHDPCFQ | PbMIF |
| 1 | MPTFVVIHTNV SADRV - SASVHDEV TALVAKALGKPVQYVAHVVPGLQMSFGGTKEPCAL | PmMIF 27%/58% |
| 1 | MPTLNLFTNIIPVDAVTCSDILKDATAVAKIIGKPESYVMILLNSGVPIAFAGTEEPAA Y | AtMIF 30%/51% |
| 1 | MPTLTINTNIPASKIPNDFLKTT- ANVVA DSLGKPLSYVVVHTINADQLLSFGGTD DPCA I | AaMIF 30%/57% |
| 1 | MPMFI VNTNVPHASVPEGFLS-ELTQQLAQATGKPAQYIAVHVVPDQLMTFSGTNDPCAL | MmMIF 29%/56% |
| 1 | MPMFI VNTNVPRASVPEGFLS-ELTQQLAQATGKPAQYIAVHVVPDQLMTFSGTSDPCAL | RnMIF 29%/55% |
| 1 | MPVFTIRITNV C--RDSVPDTLLSDLTQKAKATGKPAEYIAIHI VPDQIMSGDSTDP CA | XlMIF 25%/55% |
| 1 | MPCFITINTNVP-SDKVPQDFLKKTSALVAKSLSKPESYVAVRVNPQQMTFGGSADPCA V | AsMIF 28%/53% |
| 1 | MPIFTFSTNVP-SENISVDFLKSTSKLIIAGMLGKPESYVAVHITNGGQKIFTFGGT DAPAG F | TtMIF 33%/53% |
| 1 | MPMFV VNTNVPRASVPDGLLS-ELTQQLAQATGKPAQYIAVHVVPDQLMTFGGSSEPCAL | BtMIF 31%/54% |
| 1 | MPYFTIDINTNIPQNSISSAFILKKA- SNVVAKALGKPESYVSIHVNGGQAMVFGGSEDP CA V | BmMIF 25%/55% |
| 1 | MPVFSLVNIVSLSDEKKTSLKELSDVIGKLIKPEKYMCIHNTDQAI SFAGTTPQAG F | CbMIF 27%/49% |
| 1 | MPMFI VNTNVPRASVPDGFLS-ELTQQLAQATGKPAQYIAVHVVPDQLMAFGGSSEPCAL | HsMIF 28%/53% |
| 1 | MPIFTINTNIIKATDVP SDFLS-ST SALVGNLISKPGSYVAVHINTDQQLSFGGSTKPAAF | TsMIF 30%/53% |
| 1 | MPAFTINTNIPQNSVSDAFILKKA STV-AKALGKPESYVAIHVNGGQAMVFGGSDTPCA V | OvMIF 24%/53% |
| 1 | MPFIQINTSSKSVVEND-DLLQKDISKMIAVLTGKPENYVMTMIQRNAKMTFAGSDEPCC | PdMIF 30%/ -- |
| 1 | MPQLSLTINTNVPDAVVAADI IKDCSKALARLIGKPESYVMVSTSGSVPM SFAASEEPAA Y | OsmIF 29%/ -- |
| 1 | MPLIKLQTSIAALPSDQTTSLQSLSSTLAQQLGKPERYVMTLLETDPMTFAGTTAPAC | SlMIF 32%/ -- |
| 1 | MPSFVLKTNLARSALP-KDFLTETSKLVADILGKPEGCVCVCEADVLMTYGGS DAPCC L | BlMIF 29%/ -- |
| 1 | MPSFVVNTNVARADVP-AAI LSEAHRAGNRSCPKAQYIAVQINTDQMMMF GKGDP CA | TnMIF 28%/ -- |
| 1 | MPIFV VNTNVARADVP-VALLSEATNELAKAMGKPAQYIAVHINTDQMMMF GKGDP CA L | TrMIF 28%/ -- |
| 1 | MPLIKVQTSV SAPQAEIE SMLNLSAKLAKHLGKPESYVMTAFEPHPTMTFAGNTDPVC | NmMIF 30%/ -- |
| 1 | MPMFI VNTNVPRASVPEGLSEL TQQLAQATGKPAQYIAVHVVPDQLMTFSGS SDPCAL | MuMIF 28%/ -- |
| 1 | MPMFTIHTNVCKDAVP-DSL LGELTQQLAKATGKPAQYIAVHVVPDQMM SFGGSDTPCA L | GgMIF 25%/ -- |
| 1 | MPMFV VNTNVPRASVP-DGFLSEL TQQLVQAMGKPAQYIAVHVVPDQLMAFGGSSEPCAL | GkMIF 27%/ -- |
| 1 | MPMFV VNTNVPRASVP-DGFLSEL TQQLVQAMGKPAQYIAVHVVPDQLMAFGGSSEPCAL | SsMIF 25%/ -- |
| | | |
| | MRVTSLGNLNPDDNVNFSKAFAEFLKEEIGVINDRGYVIFYPDPYANLGYKGTGAKLWC | PbMIF |
| | AHLSSIGKISPAENKYSALLSEAMNTHLGIPKDRMYIAFHNQDPANVGVWNGSTFA 115 | PmMIF |
| | GELISIGGLPGVNGKLSSETISEI IQIKLSIDSSRFYIKFYD SPRPFFGYNGST 114 | AtMIF |
| | ANLYSIGCLSPKENKHSVLF EHI EKTLLIKENRMYINYFDMPASDVG YNGKTFFA 115 | AaMIF |
| | CSLHSIGKIGGAQNRNYSKLLCGLLSDRLHISPD RVYINYYDMNAANVGWNGSTFA 115 | MmMIF |
| | CSLHSIGKIGGAQNRNYSKLLCGLLSDRLHISPD RVYINYYDMNAANVGWNGSTFA 115 | RnMIF |
| | VCSLCSIGKIGGPQNKSYTKLLCDLITKQLNIPANRVYINYYDLNAA NVGWNGSTFA 115 | XlMIF |
| | CTLESIGAVGSSRNNAHA EKLYKHINETLGI PKNRMYISFVDIDPTTMA YNGSTFA 115 | AsMIF |
| | GQLLSIGGVGGEKNRSHSAKLFKHLTDGLGIPGNRMYIN FVDMRGSDVGYNGST 113 | TtMIF |
| | CSLHSIGKIGGAQNRNYSKLLCGLLTERLRISPDRYIN FCDMNAANVGWNGSTFA 115 | BtMIF |
| | CVLKSIGCVGPKVNSHAEKLYKLLADELKI PKNRMYIEFVDIEASSMAFNGST 113 | BmMIF |
| | AVLKSIGGVGTAKQNN AISDKVYPIITQHVGIPGDRLYIEFVSLGAADI AFEGHTFA 116 | CbMIF |
| | CSLHSIGKIGGAQNRNYSKLLCGLLAERLRISPDRYIN YDMNAANVGWNNSTFA 115 | HsMIF |
| | GTLM SIGGIEPSNRNDHSAKLFDLNKKLGI PKNRMYIH FVNINLGDDVGVWNGTT 113 | TsMIF |
| | CVLKSIGCVGPNVNSHSEKLFKLLADELKI PKNRMYIEFVNIDASTMAFNGST 113 | OvMIF |
| | IKVQSIGSLNP---SMSKALCELASKTNTNTNRIYIEFFDVKASNWGFNGSTFG--115 | PdMIF |
| | GELMSIGGIGPGVNGKLSAALAEI IETKLSVRSRFYVKFDDVKGFNLGFNGSTF---114 | OsmIF |
| | VEIKSVGQMKPTQTAQMSRLFCNQ IASELGIASDRYIEYFDMPASDVG YNGKTFAG-116 | SlMIF |
| | IDLMSIGKIGLEENKTHTAICDHVKKHLGIPGDRLYVNFDDMAANVGWDSNTFA--115 | BlMIF |
| | CSLHSIGKISRAQNKLYSNLLCGLLHKHLGISPNRIYIN FVDMDAANVGWSSDTFA--115 | TnMIF |
| | CSLHSIGKINGAQNQYSKLLCDQLSKHLGISPNRIYIN FVDMDAANVGWSSDTFA--115 | TrMIF |
| | EIKSIGTMKPDQTAAMSQ-EFCQQINQTLGVPKNR IYIEYDMNAANVGWNGSTFA--115 | NmMIF |
| | CSLHSIGKIGGAQNRNYSKLLCGLLAERLRISPDRYIN YDMNAANVGWNGSTFA--115 | MuMIF |
| | CSLYSIGKIGGQNKTYTKLLCDMIAKHLHVSADRVYIN YDMNAANVGWNGSTFA--115 | GgMIF |
| | CSLHSIGKIGGAQNRNYSKLLCGLLAERLRISPDRYIN FVDIEASSMAFNGSTFG--115 | GkMIF |
| | CSLHSIGKIGGAQNRNYSKLLCGLLAERLRISPDRYIN YDMNAANVGWNG-----111 | SsMIF |

Figura 3. Alinhamento das seqüências de aminoácidos de MIF do *Paracoccidioides brasiliensis*/ PbMIF com: *Petromyzon marinus* / PmMIF; *Arabidopsis thaliana* / AtMIF; *Amblyoma americanum* / AaMIF; *Mus musculus* / MmMIF; *Rattus norvegicus*/RnMIF; *Xenopus laevis* / XlMIF; *Ascaris suum* /AsMIF; *Trichuris trichiura* / TtMIF; *Bos taurus*/ BtMIF; *Brugia malayi*/ BmMIF; *Caenorhabditis briggsae*/ CbMIF; *Homo sapiens*/ HsMIF; *Trichinella spiralis* / TsMIF; *Onchocerca volvulus* / OvMIF; *Prochloron didemni*-PdMIF; *Oryza sativa* /OsMIF; *Synechococcus leopoliensis*/SIMIF; *Branchiostoma lanceolatum*/BIMIF; *Tetraodon nigrovividis* /TnMIF; *Takifugu rubripes*/TrMIF; *Nostoc microscopium* /NmMIF; *Meriones unguiculatus*/MuMIF; *Gallus gallus*/GgMIF; *Gekko gecko*/GkMIF; *Sus scrofa* /SsMIF As regiões destacadas em cinza são regiões de aminoácidos idênticas entre as espécies, além disso encontra-se em azul a Prolina na posição 2 , que confere atividade enzimática.

A análise e comparação da seqüências de aminoácidos foi obtida a partir da tradução da seqüência nucleotídica do MIF presente no banco do *P. brasiliensis* através do programa BLAST (do inglês: *Basic Local Alignment Search Tool*). O BLAST é o programa mais usado a fim de avaliar a similaridade de seqüências de proteínas e nucleotídeos (Altschul *et al.*,1997).

Considerando a similaridade gênica do MIF de *P. brasiliensis* com o MIF dos nematóides *Trichuris trichiura*, *Trichinella spiralis* e *Brugia malayi* é importante ressaltar a habilidade desses organismos de sobreviverem por longos períodos em uma constante interface com o sistema imunitário de seus hospedeiros, através da produção de fatores imunomodulatórios (Tan *et al.*, 2001), característica também da infecção pelo *P. brasiliensis*. As moléculas de MIF desses parasitos já foram isoladas e caracterizadas quanto à similaridade e atividade biológica em relação ao MIF de mamíferos (Zang *et al.*; 2002; Pennock *et al.*,1998). Esses estudos permitiram elucidar claramente a atividade enzimática e imunomodulatória dessa citocina. Com 55% de similaridade com o MIF de *P. brasiliensis*, o MIF de *Brugia malayi*, por exemplo, apresentou funções paralelas ao MIF de *Homo sapiens* : são quimiotáticos para monócitos humanos e os ativam para secretar IL-8, TNF α e MIF endógeno; possuem atividade enzimática que é abolida com uma mutação do resíduo amino-terminal de prolina. A atividade biológica e a estrutura cristalográfica é conservada entre o MIF humano e o MIF nematóide, apesar da distância filogenética entre estes organismos (Zang *et al.*; 2002). Essa similaridade permite uma proposição de que mecanismos envolvendo MIF exercem um papel importante nas estratégias de evasão do sistema imunitário pelo parasito.

MIF apresenta atividade enzimática além da característica de citocina e, de acordo com a literatura, um resíduo de prolina na posição 2 é o que determina a atividade de tautomerase (Swoope *et al.*, 1998; Subramanya *et al.*;1996). Porém, pouco se conhece a respeito das interações imunológicas dessa citocina que podem interferir na interação parasito-hospedeiro e que, conseqüentemente, seriam importantes na patogênese e adaptação ao microambiente. Talvez o mecanismo imunológico seja através da atividade enzimática. MIF apresenta características comuns às citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL1 (interleucina 1) mas difere de outras citocinas pró-inflamatórias devido a uma diversidade de propriedades bem características, dentre elas os aspectos funcionais e estruturais que envolvem a expressão de MIF, a sua localização, a secreção e interação com a célula alvo (Bernhagen *et al.* 1998). Convém ressaltar que o TNF é requerido para a

persistência do granuloma em *P. brasiliensis* (Souto *et al.*, 2000), permitindo assim uma sugestão de que o MIF também pode estimular a formação e proliferação do granuloma além de interferir no ciclo celular e apoptose do macrófago por meio da inativação de P53.

A presença de MIF em organismos que não apresentam características de patogenicidade, como por exemplo as plantas *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa*, evidencia o papel enzimático como uma característica marcante dessa molécula. Apesar do mecanismo ainda ser desconhecido, já é comprovado que MIF também atua no ciclo celular por meio de sua atividade enzimática conferida pela prolina na posição 2 (Burguer-Kentischer *et al.*, 2005).

2. Análise da filogenia do MIF de *P. brasiliensis*

A associação íntima e prolongada entre o hospedeiro e agentes infecciosos é capaz de gerar diversidade e mútua adaptação e, conseqüentemente coevolução. A similaridade do MIF de *P. brasiliensis* com outros organismos inclusive com o MIF de *Homo sapiens* (figura 3) permite a consideração de que esse mimetismo molecular é uma estratégia de sobrevivência do *P. brasiliensis*. Apesar do mecanismo molecular de atuação do MIF ainda permanecer obscuro, é importante ressaltar que a característica marcante dessa molécula manifesta-se principalmente pela preservação da atividade enzimática, determinada pela prolina conservada na posição 2. Como descrito anteriormente nesse trabalho, o MIF cataliza a conversão de D-dopacromo a 5,6-dihidroindol-2-ácido carboxílico e tanto o MIF humano quanto o MIF de outros organismos apresentam a atividade enzimática abolida com a mutação da prolina amino-terminal. A seqüência de aminoácidos da enzima D-dopacromo tautomerase humana apresenta homologia com a seqüência de aminoácidos de MIF humano (Nishihira *et al.*, 1998).

Atualmente, homólogos de MIF são encontrados nos mais diversos organismos como plantas, bactérias e animais. Entre estes há espécies parasíticas e não parasíticas, um fato que está em desacordo com o papel de MIF como imunomodulador. A busca de ancestrais comuns de MIF poderia sugerir a presença de duas linhagens distintas, postulando a existência de determinados tipos de MIF associados ao parasitismo.

Para entender a evolução da proteína MIF foi utilizado o alinhamento da figura 3 para gerar árvores filogenéticas empregando diferentes procedimentos (máxima verossimilhança,

máxima parcimônia e *neighbour joining*). Todas as árvores apresentaram aspectos muito semelhantes e uma distribuição clássica da filogenia, colocando o MIF de *P. brasiliensis* próximo de bactérias e distante dos mamíferos, descartando a hipótese de uma linhagem associada ao parasitismo. A seqüência de aminoácidos dos nematóides *Trichuris trichiura* e *Trichinella spiralis* não foi utilizada na construção da árvore filogenética da figura 4, mas considerando a mesma similaridade de ambos com o MIF de *P. brasiliensis* (53%) e o fato de serem nematóides como *Brugia malayi* é possível a consideração de que a sua distribuição na árvore ficaria no ramo dos nematóides.

Observa-se que o MIF é um peptídeo bem distribuído na natureza, porém é único no Reino Fungi (figura 4). Mesmo com a determinação do genoma de diferentes espécies de fungos descritos até o momento (Magee *et al*, 2003), a presença de possíveis homólogos ainda não foi detectada. É possível que os outros fungos tenham perdido esse peptídeo ao longo da evolução, enquanto o *P. brasiliensis* provavelmente manteve sua cópia através de pressão seletiva. Os fungos *Candida albicans*, *Neurospora crassa*, *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis*, *Blastomices dermatitidis* e *Histoplasma capsulatum* são exemplos de fungos cujo genoma foi analisado no banco de dados e não foi detectada a presença de um gene similar a MIF.

Uma alternativa à manutenção do gene *mif* em *P. brasiliensis* seria a captura de genes por transferência lateral. Essa possibilidade pode ser descartada diante da análise da filogenia do MIF de *P. brasiliensis*, que está relativamente distante do MIF de *H. sapiens* e outros mamíferos. A árvore apresentada mostra uma distribuição uniforme do MIF em diferentes organismos sugerindo que um ancestral comum a MIF já estava presente antes da separação das eubactérias e eucariotos.

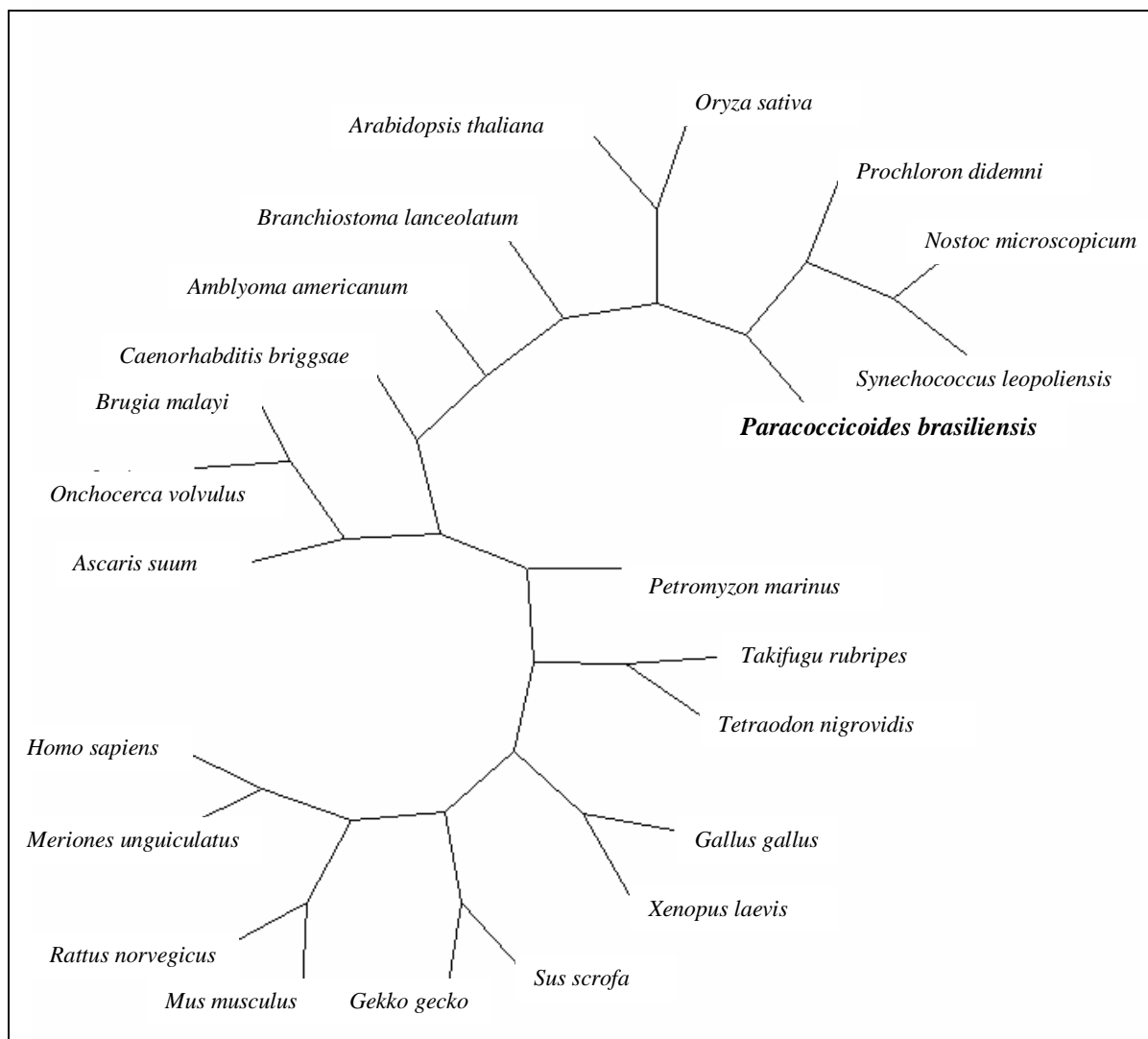


Figura 4 Árvore filogenética do MIF de *Paracoccidioides brasiliensis*. A árvore de máxima verossimilhança foi construída com o alinhamento da figura 3.

3. Subclonagem do cDNA de MIF

Com o objetivo de obter um fragmento de DNA contendo a ORF do PbMIF para análise da expressão diferencial por *Northern blot* e clonagem em vetor de expressão, procedemos a amplificação da ORF do PbMIF. Foram desenhados oligonucleotídeos flanqueando o sítio de iniciação (ATG) e terminação (TGA), utilizando o clone C02 de cDNA de MIF como molde para PCR (figura 5).

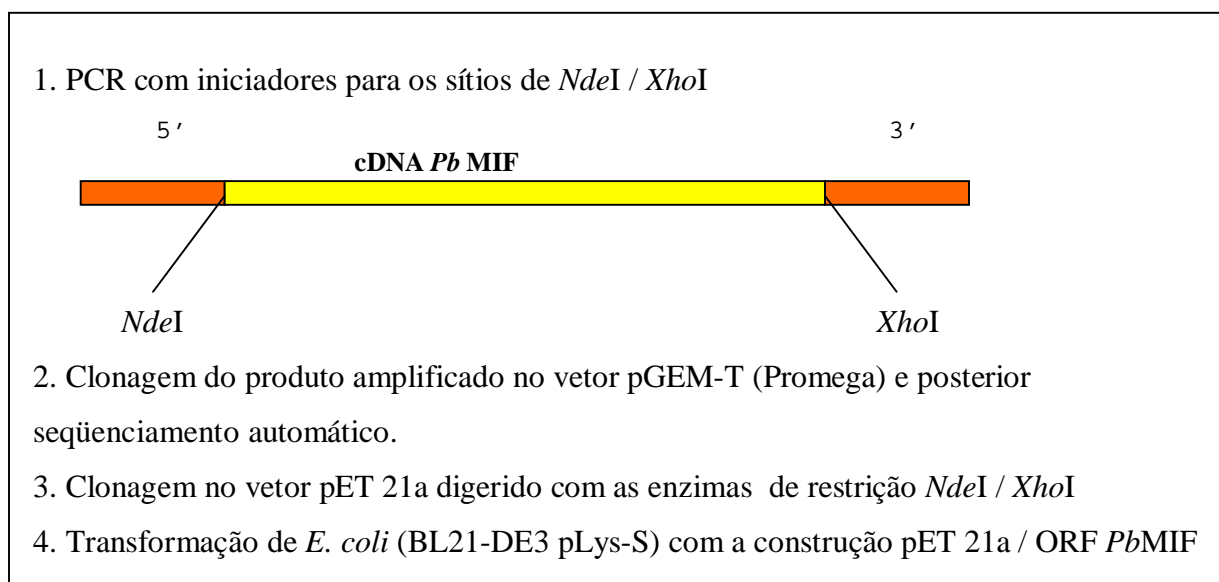


Figura 5. Estratégia para amplificação e clonagem do fragmento correspondente a ORF do *PbMIF* para expressão heteróloga.

O resultado da amplificação do fragmento de cDNA do MIF de *P. brasiliensis* apresentou o tamanho esperado, de aproximadamente 400 pares de bases (397pb) (figura 6)

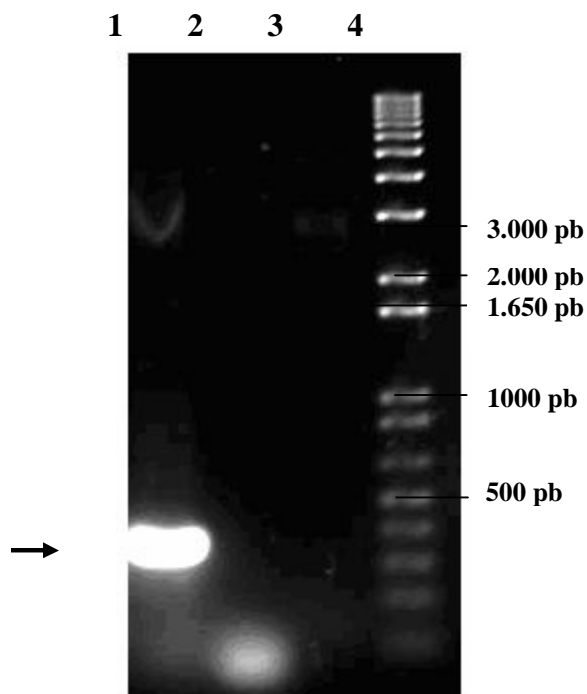


Figura 6. Amplificação da ORF do *PbMIF*. Cerca de 1/10 de cada reação de PCR foi analisada em gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídeo. Amostras: (1). PCR mostrando o fragmento de cDNA de aproximadamente 400pb (MIF com sítios para as enzimas de restrição *NdeI*/ *XhoI*). (2). Controle - (PCR com apenas um dos oligonucleotídeos *Xho I*). (3). Controle + (PCR sem o cDNA de MIF). (4). MM Marcador de Massa Molecular 1 kb plus (Invitrogen).

O fragmento de cDNA correspondendo à ORF do PbMIF foi clonado no plasmídeo pGEM-T (Promega)- seqüência mostrada na figura 7 ; foi utilizado ainda como sonda em um experimento de *northern blot* comprovando a expressão diferencial do MIF de *P. brasiliensis* (figura 8). Esse fragmento de cDNA foi também clonado no vetor pET21a (Novagen) e transformado em células de *E.coli* da linhagem XI-1blue para análise de restrição (figura 9). Posteriormente, esta ORF do PbMIF clonada no vetor de expressão foi utilizado nos experimentos de expressão heteróloga.

| | | |
|-----|---|-----|
| 2 | <i>cga atg ggc ccg acg tcg cat gct ccc ggc cgc cat ggc cgc ggg</i> | 46 |
| 47 | <i>att <u>CCA CAT ATG</u> CCT TTC ATT GAG CTT CTC ACA AAT GTT GCT CTC</i> | 91 |
| | Pro His Met Pro Phe Ile Glu Leu Leu Thr Asn Val Ala Leu | 30 |
| 92 | TCA CGC GAG CAG AGC AAA GAA CTC GCC CTT TCA CTC TCC AAG GTG | 136 |
| 31 | Ser Arg Glu Gln Ser Lys Glu Leu Ala Leu Ser Leu Ser Lys Val | 45 |
| 137 | TCA GCG AGG ATC CTT AAA AAG CCC GAG TCT TTC ATT TCA GTT CAA | 181 |
| 46 | Ser Ala Arg Ile Leu Lys Lys Pro Glu Ser Phe Ile Ser Val Gln | 60 |
| 182 | ATC CGC TCT GAT GAG GTC TTG ACG TTT GCG GGC ACT CAT GAT CCA | 226 |
| 61 | Ile Arg Ser Asp Glu Val Leu Thr Phe Ala Gly Thr His Asp Pro | 75 |
| 227 | TGC TTT CAA ATG CGC GTA ACT TCT CTG GGC AAT CTA AAC CCA GAC | 271 |
| 76 | Cys Phe Gln Met Arg Val Thr Ser Leu Gly Asn Leu Asn Pro Asp | 90 |
| 272 | GAT AAT GTT AAT TTC TCC AAG GCC TTT GCT GAA TTC CTC AAG GAG | 316 |
| 91 | Asp Asn Val Asn Phe Ser Lys Ala Phe Ala Glu Phe Leu Lys Glu | 105 |
| 317 | GAG ATT GGT GTC ACG AAC GAT AGA GGA TAT GTT ATC TTT TAC GAT | 361 |
| 106 | Glu Ile Gly Val Thr Asn Asp Arg Gly Tyr Val Ile Phe Tyr Asp | 120 |
| 362 | CCG GAC TAT GCA AAT CTA GGA TAT AAA GGG ACA ACT GGA <u>GCT AAA</u> | 406 |
| 121 | Pro Asp Tyr Ala Asn Leu Gly Tyr Lys Gly Thr Thr Gly Ala Lys | 135 |
| 407 | <u>TTA TGG TGC ACT CGA GGG TAA</u> <i>tca cta gtg cgg ccg cct gca ggt</i> | 451 |
| 136 | Leu Trp Cys Thr Arg Gly End | 150 |
| 452 | <i>cga cca tat ggg aga gct ccc aac gcg ttg gat gca tag ctt gag</i> | 496 |
| 497 | <i>tat tct ata gtg tca cct aaa tag ctt ggc gta atc atg gtc ata</i> | 541 |
| 542 | <i>gct gtt tcc tgt gtg aaa ttg tta</i> | 565 |

Figura 7: Seqüência de nucleotídeos da ORF do PbMIF. A seqüência de nucleotídeos está apresentada em caracteres pretos, enquanto a seqüência deduzida de aminoácidos é apresentada abaixo da seqüência nucleotídica. Os oligonucleotídeos amino-terminal e carboxi-terminal de MIF usados na PCR estão sublinhados, o oligo 3' foi utilizado para retirar o stop codon natural e inserção de um sitio de *Xho* I (em cinza) em fase com uma arginina (em verde). Esta fusão através de *Xho* I coloca o inserto em fase com o vetor pET21a; o aminoácido prolina, característico de atividade enzimática está em azul. O sitio de *Nde* I está em amarelo.

4. Confirmação do perfil de expressão diferencial do gene *pbmif* por *northern blot*..

Como já citado anteriormente, os mecanismos moleculares da ação de MIF ainda não foram bem elucidados, porém, devido ao fato de MIF exercer um papel relevante na patogênese de uma variedade de condições inflamatórias e imunitárias (Nguyen *et al.*, 2003), a presença de MIF na fase infectante de *P. brasiliensis* apóia a hipótese de uma participação no mecanismo de patogenicidade do fungo e permite sugerir abordagens terapêuticas baseadas em MIF.

A hibridização de membranas contendo RNA isolado de *P. brasiliensis* na forma leveduriforme e micelial resultou em um perfil típico de expressão diferencial. É possível verificar que a sonda hibridizou especificamente com a forma leveduriforme. A equivalência entre a quantidade de RNA nas duas amostras (micélio e levedura) pode ser observada pelo fragmento de RNA correspondente ao constitutivo L34, expresso em ambas as fases (figura 8).

O estudo da expressão diferencial de genes postula o envolvimento no processo de virulência de *P. brasiliensis* na interface hospedeiro-patógeno. Uma vez que a forma de levedura é a fase infectante de *P. brasiliensis*, a expressão de MIF nesta fase sugere seu papel como um possível fator de virulência. O desenvolvimento da PCM, bem como de diversas outras micoses, depende de interações entre o fungo e componentes do hospedeiro, características desenvolvidas para uma versatilidade fisiológica e nutricional que simplesmente permitem a sobrevivência do patógeno no ambiente do hospedeiro.



Figura 8. Análise do perfil de expressão do gene *pbmif* de *Paracoccidioides brasiliensis* nas formas de micélio(M) e levedura(L). *Northern blot* mostrando a expressão diferencial de MIF na fase de levedura(L) Controle: L34- gene que codifica para a proteína constitutiva da subunidade ribossomal 60S do *P.brasiliensis* .

5. Expressão heteróloga em *E.coli*

Embora a análise da sequência do cDNA *pbmif* indique uma ORF, e o caráter específico de expressão diferencial seja um indício da importância desse gene, não temos qualquer dado indicando que esse mRNA seja realmente traduzido e que seu produto protéico tenha atividade biológica, com papel enzimático. Nesse sentido, optamos por expressar a provável PbMIF em um sistema heterólogo visando a obtenção da proteína para testes de atividade biológica: atividade enzimática e ensaio de migração de macrófago.

O vetor de expressão utilizado foi o pET21a (Novagen) que produz a proteína de interesse na forma de proteína de fusão contendo um T7-tag na região amino-terminal e um His-tag na região carboxi-terminal. O gene de interesse clonado no vetor pET fica sob o controle do promotor *T7lac*,

dessa forma a expressão é induzida ao prover uma fonte de T7 RNA polimerase na célula hospedeira. A enzima T7 RNA polimerase é muito seletiva e eficiente, recrutando quase todos os recursos da célula para a expressão do gene alvo que pode compreender até mais de 50% das proteínas totais da célula. O vetor pET contém uma seqüência operadora *lac downstream* ao promotor T7. Ele também carrega a seqüência promotora natural e codante do repressor *lac (lacI)* orientado em direção oposta a *T7lac*. Quando esse tipo de vetor é utilizado, o repressor *lac* age tanto no promotor *lacUV5* no cromossomo da célula hospedeira para reprimir a transcrição do gene da T7 RNA polimerase pela RNA polimerase da célula bacteriana quanto no promotor *T7lac* do vetor bloqueando dessa forma a transcrição do gene alvo pela T7 RNA polimerase residual. Isso possibilita que a proteína de interesse somente seja expressa na presença do indutor IPTG, que se liga ao produto do gene *lacI* levando à sua inativação.

Outra forma de provermos estabilidade adicional aos genes alvos foi expressá-lo em linhagem hospedeira que contem o plasmídeo pLys S (resistente a cloranfenicol) que provê uma quantidade de lisozima do fago T7, um inibidor natural da T7 RNA polimerase. A lisozima viral é uma proteína bifuncional: cliva uma ligação específica na camada de peptidoglicana na parede celular de *E.coli* e se liga a T7 RNA polimerase inibindo a transcrição de genes sob controle do promotor T7. Dessa forma, pode ser usada para inibir os baixos níveis de atividade da RNA polimerase viral presente no estado não induzido e assim estabilizar plasmídeos que codificam proteínas estranhas que podem ser tóxicas à célula hospedeira. Como marca de seleção esse vetor apresenta um gene de resistência a ampicilina (β lactamase) na mesma orientação do gene alvo. A seqüência His-tag é muito útil como parceiro de fusão, favorecendo a posterior purificação de proteínas em geral. É particularmente usada para proteínas inicialmente expressas como corpos de inclusão, pois a purificação por cromatografia de afinidade pode ser feita em condições totalmente desnaturantes. Além disso, a fusão com His-tag apresenta a grande vantagem de permitir a detecção da proteína de fusão por *western blot*, utilizando anticorpo anti-His tag.

Após a construção do vetor contendo *T7-tag/ORF do PbmIF/His-tag* (figura 9), foi realizada indução utilizando-se células de *E.coli* da linhagem BL21-DE3 pLys S. Essa linhagem, além de produzir a T7 RNA polimerase necessária para a produção do gene de interesse dirigido pelo promotor T7 contém ainda o plasmídeo pLys S.

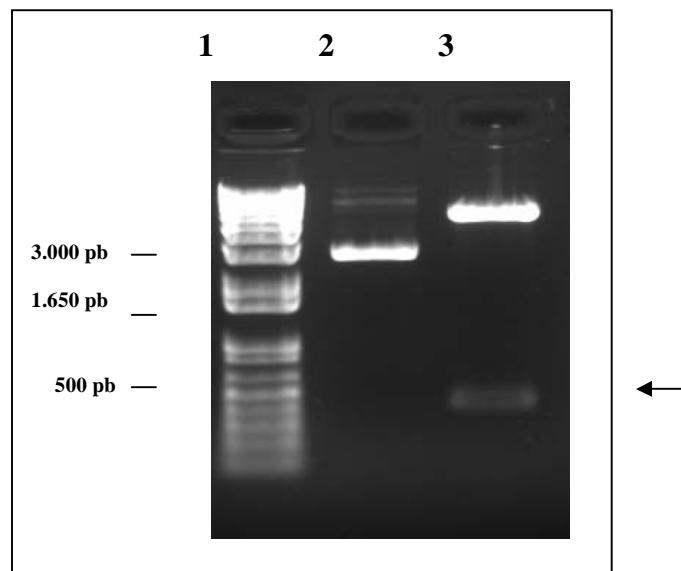


Figura 9. Análise de restrição do clone recombinante com as enzimas *Nde I* e *Xho I*. (em gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídeo.) Amostras: (1) MM Marcador de Massa Molecular 1 kb plus (Invitrogen). (2) T7-tag/*ORF do PbMIF/His-tag* intacto. (3) T7-tag/*ORF do PbMIF/His-tag* digerido com *Nde I* e *Xho I* mostrando um fragmento de aproximadamente 400 pares de bases.

A análise de restrição do clone recombinante (T7-tag/*ORF do PbMIF/His-tag*) foi satisfatória, porém não foi possível observar a clonagem por sequenciamento automático para confirmar se a seqüência corresponde à original, se não foram inseridos erros na PCR.

O experimento de *western blot*, empregando anticorpo anti-poli-histidina, mostra um fragmento peptídico com massa molecular de aproximadamente 15 kDa, correspondente ao tamanho esperado para a proteína de fusão. Comparando-se a presença do fragmento nas células induzidas com as amostras não induzidas é possível observá-lo apenas nas células induzidas. É possível visualizar a proteína PbMIF em extratos protéicos de *E. coli* mas não há um aumento de indução o que torna necessário ressaltar que é necessário realizar ajustes nesse experimento com a finalidade de otimizar o rendimento na obtenção das proteínas recombinantes (figura 10).

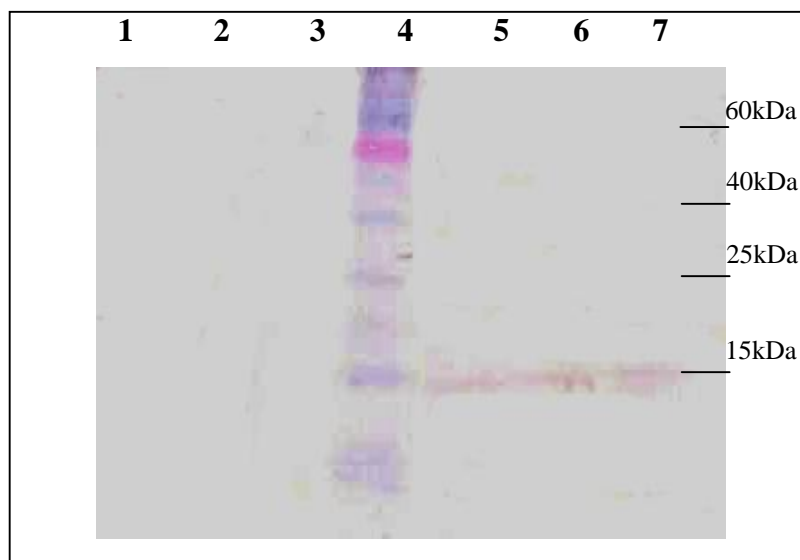


Figura 10. Análise dos extratos protéicos de *Escherichia coli* por *western blot*. Os extratos protéicos de *E.coli* transformadas com T7-tag/*ORF do PbMIF/His-tag* foram submetidos a eletroforese em gel de SDS-PAGE 12% e transferidas para membrana de nitrocelulose. Foi utilizado para a detecção da proteína recombinante, anticorpo anti-poli-histidina na diluição de 1 : 2.500. Após a reação de imunodeteção (anticorpo IgG produzido em cabra, anti-IgG de coelho, conjugado a fosfatase alcalina./ titulação 1:5000) a membrana foi revelada com solução NBT/BCIP, possibilitando a visualização de um fragmento peptídico com massa molecular de ~15 kDa, correspondente à proteína de fusão de tamanho esperado. Amostras: (1). Controle negativo: células transformadas com o plasmídeo pET21a e sem indução 0h. (2) e (3) células transformadas com o plasmídeo pET21a: 2h e 4h após a indução com IPTG. (4) Padrão de Massa Molecular pré-corado da Invitrogen (5) Controle negativo: células transformadas com o plasmídeo T7-tag/*ORF do PbMIF/His-tag* e sem indução 0h. (6) e (7) células transformadas com o plasmídeo pET21a-*ORF do PbMIF*: 2h e 4h após a indução.

Conclusão e Perspectivas

No presente trabalho foi possível a caracterização da seqüência deduzida de aminoácidos, da análise filogenética e análise da expressão diferencial de um provável gene de MIF de *P. brasiliensis* presente no banco de ESTs geradas pelo Projeto Genoma Funcional de *P. brasiliensis* (Felipe *et al.*, 2005; Felipe *et al.*, 2003). A observação da seqüência prevista de aminoácidos possui similaridade gênica com o MIF de diversos organismos, indicando um envolvimento potencial na patogênese do *P. brasiliensis*. A análise do cDNA de MIF por *northern blot* comprovou a expressão na fase de levedura e a busca no banco de dados mostra que a presença de MIF no *P. brasiliensis* é um fato inédito em fungo. A análise filogenética invalida a possibilidade de transferência lateral de genes entre o *P. brasiliensis* e *H. sapiens*, visto que o MIF de *P. brasiliensis* está localizado próximo de bactérias e distante dos mamíferos.

A clonagem do MIF no vetor de expressão foi realizada com sucesso, porém a ocorrência de baixos níveis da proteína recombinante obtida no ensaio de indução e a ausência de aumento de indução observadas no ensaio de *western blot* indicam que deverão ser realizados ajustes na metodologia empregada, com a finalidade de otimizar o rendimento na obtenção das proteínas recombinantes.

É necessário ainda um sequenciamento completo da ORF do PbMIF clonada no pET21a, visando confirmar se a seqüência corresponde à inicial.

Após a otimização dos experimentos de expressão heteróloga, SDS-PAGE e *western blot* há perspectivas de produção para purificação protéica e teste da atividade biológica por meio de teste de atividade enzimática e ensaio de migração de macrófagos. Estes ensaios deverão indicar se o PbMIF apresenta algum efeito sobre o sistema imunitário de mamíferos, permitindo uma extrapolação de seu papel na infecção do hospedeiro animal. Há ainda a possibilidade de mutação da prolina amino-terminal para uma glicina, para confirmação da atividade enzimática do MIF de *P. brasiliensis*.

Referências Bibliográficas

Altschul S.F, Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman D J (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs *Nucleic Acids Res* **21**: 3389-3402.

Bagagli E, Bosco S M, Theodoro RC, Franco M (2006). Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. *Infect Genet Evol.* [**Epub ahead of print Feb 9]**

Bagagli E, Sano A, Coelho KI, Alquati S, Miyaji M, de Camargo ZP, Gomes GM, Franco M, Montenegro MR (1998). Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus noveminctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg* **58(4)**:505-512.

Barbosa MS, Bao SN, Andreotti PF, de Faria FP, Felipe MS, dos Santos Feitosa L, Mendes-Giannini MJ, Soares CM. (2006). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. *Infect Immunity* 74(1):382-389.

Bernhagen J, Lue H, Kleemann R, Calandra T, Roger T (.2002) Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. *Microbes Infect* **4(4)**:449-60.

Bernhagen J, Calandra T, Bucala R (1998) Regulation of the immune response by macrophage migration inhibitory factor: biological and structural features. *J Mol Med.* **76**:151-161.

Bernhagen J, Calandra T, Mitchell RA, Martin SB, Tracey KJ, Voelter W, Manogue KR, Cerami A, Bucala R. (1993) MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature*. **365**:756-759.

Bocca AL, Hayashi EE, Pinheiro AG, Furlanetto AB, Campanelli AP, Cunha FQ, 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.

Bonfim SM, Cruz AH, Jesuino RS, Ulhoa CJ, Molinari-Madlum EE, Soares CM, Pereira M. (2006) Chitinase from *Paracoccidioides brasiliensis*: molecular cloning, structural, phylogenetic, expression and activity analysis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. **46(2)**:269-283.

Borges-Walmsley MI, Chen D, Shu X, Walmsley AR. (2002) The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends Microbiol*. **10**:80-7

Bozza M, Satoskar AR, Lin G, Lu B, Humbles AA, Gerard C, David JR. (1999) Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *J Exp Med*. **18**: 341-346.

Bucala R, Fingerle-Rowson GR, (2001) Neuroendocrine properties of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Immunol Cell Biol*. **79** :368-375.

Bucala R. (1996) MIF rediscovered: cytokine, pituitary hormone, and glucocorticoid-induced regulator of the immune response. *FASEB J*. **10**:1607-1613.

- Burger-Kentischer A, Goebel H, Seiler R, Fraedrich G, Schaefer HE, Dimmeler S, Kleemann R, Bernhagen J, Ihling C.(2002). Expression of macrophage migration inhibitory factor in different stages of human atherosclerosis.*Circulation*. **105**:1561-1566.
- Burger-Kentischerb, A. Finkelmeierb, D., Thielea, M., Schmuckerb, J., Geigerb, G., Tovarb, G.E.M., Bernhagena, J (2005) Binding of JAB1/CSN5 to MIF is mediated by the MPN domain but is independent of the JAMM motif. *FEBS Letters* **579**:1693–1701.
- Calandra T, Echtenacher B, Roy DL, Pugin J, Metz CN, Hultner L, Heumann D, Mannel D, Bucala R, Glauser MP.(2000) Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat Med* **6**:164-70.
- Calandra T, Bernhagen J, Metz CN, Spiegel LA, Bacher M, Donnelly T, Cerami A, Bucala R.(1995). MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature*. **377**:68-71.
- Calich VL, Vaz CA, Burger E (1998) Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Res Immuno* **149**:407-417
- Cano MI, Cisalpino PS, Galindo I, Ramirez JL, Mortara RA & da Silveira JF.(1998) Electrophoretic karyotypes and genome sizing of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *J.Clin.Microbiol.***36**: 742-747
- Casadevall A & Pirofski LA. (2000) Host-pathogen interactions: basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. *Infect Immun* .**68**:6511-6518
- Chesney J, Metz C, Bacher M, Peng T, Meinhardt A, Bucala R. (1999) An essential role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in angiogenesis and the growth of a murine lymphoma. *Mol Med*. **5**:181-91.

Cheng, V. C. Yuen KY, Chan WM, Wong SS, Ma ES, Chan RM.(2000).Immunorestitution disease involving the innate and adaptive response. *Clin. Infect. Dis.* **30**:882–892

Costa SC, Albuquerque FC, Andrade RV, Oliveira GC, Almeida MF, Brigido MM, Maranhão AQ (2005) Transporters in the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome:insights on drug resistance. *Genetics and Molecular Research* **4(2)**:390-408

Coutinho, Z. F., da Silva, D., Lazéra. M., Petri, v., de Oliveira, R. M., Saboza, P.C, Wanke, B. (2002). Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995), *Cad. Saúde Pública*, Rio de janeiro, **18**: 1441-1454.

David JR. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction (1966) *Proc Natl Acad Sci USA.***56**:72-77.

De Brito T, Franco MF. Granulomatous inflammation(1994). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* **36**:185-192

Falkow.S, (1988). Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity. *Rev Infect. Dis., Suppl2* : S274-276, *Nat.Rev. Microbiol.* **2**,67-72

Feitosa Ldos S, Cisalpino PS, dos Santos MR, Mortara RA, Barros TF, Moraes FV, Puccia R, da Silveira JF, de Camargo ZP (2003). Chromosomal polymorphism, syntenic relationships, and ploidy in the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol.* **39(1)**:60-69.

Felipe MS, Andrade RV, Arraes FB, Nicola AM, Maranhao AQ, Torres FA, Silva-Pereira I, Pocas-Fonseca MJ, Campos EG, Moraes LM, Andrade PA, Tavares AH, Silva SS, Kyaw CM, Souza DP, Network P, Pereira M, Jesuino RS, Andrade EV, Parente JA, Oliveira GS, Barbosa MS, Martins NF, Fachin AL, Cardoso RS, Passos GA, Almeida NF, Walter ME, Soares CM, Carvalho MJ, Brigido MM. (2005a) Transcriptional profiles

of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *J Biol Chem.* **280**: 24706-24714.

Felipe MS, Torres FA, Maranhao AQ, Silva-Pereira I, Pocas-Fonseca MJ, Campos EG, Moraes LM, Arraes FB, Carvalho MJ, Andrade RV, Nicola AM, Teixeira MM, Jesuino RS, Pereira M, Soares CM, Brigido MM (2005b) Functional genome of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **45(3)**:369-81.

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

Flieger O, Engling A, Bucala R, Lue H, Nickel W, Bernhagen J. (2003) Regulated secretion of macrophage migration inhibitory factor is mediated by a non-classical pathway involving an ABC transporter. *FEBS Lett.* **551**: 78-86.

Franco M. (1987) Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol.* **25** :5-18.

Gonzalez A, Gomez BL, Restrepo A, Hamilton AJ, Cano LE (2005).Recognition of extracellular matrix proteins by *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. *Med Mycol.* **43(7)**:637-45.

- Gonzalez A, de Gregori W, Velez D, Restrepo A, Cano LE. (2000) Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Infect Immun.* **68** :2546-2552.
- Guarro J, GeneJ, Stchigel AM. (1999) Developments in fungal taxonomy. *Clin Microbiol Rev.* **12**: 454-500.
- Hanna SA, Monteiro da Silva JL, Giannini MJ. (2000) Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. *Microbes Infect.* **2**: 877-884.
- Hall,T.A.(1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis. *Nucleic Acids Symp.* **41**:95-98
- Hudson, J.D., Shoaibi, M.A., Maestro, R., Carnero, A., Hannon, G.J., Beach, D.H. (1999). A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J. Exp. Med.* **190**, 1375–1382.
- Kashino SS, Fazioli RA, Cafalli-Favati C, Meloni-Bruneri LH, Vaz CA, Burger E, Singer LM, Calich VL. (2000) Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN-gamma production. *J Interferon Cytokine Res.* **20**:89-97
- Kleemann R, Rorsman H, Rosengren E, Mischke R, Mai NT, Bernhagen J. (2000) Dissection of the enzymatic and immunologic functions of macrophage migration inhibitory factor. Full immunologic activity of N-terminally truncated mutants. *Eur J Biochem.* **267**:7183-7193.

- Lacaz C.S. (1994). Historical evolution of the knowledge on paracoccidioidomycosis and its etiologic agent, *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Franco M, Lacaz C.S., Restrepo-Moreno A., Del Negro G. eds. Paracoccidioidomycosis. *Boca Raton: CRC Press*, 13-25.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**:680-685.
- Lue H, Kleemann R, Calandra T, Roger T, Bernhagen J. (2002) Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. *Microbes Infect*. **4**: 449-460.
- Magee, P. T., Gale, C., Berman, J. & Davis, D. (2003). Molecular genetic and genomic approaches to the study of medically important fungi. *Infect. Immun.* **71**, 2299–2309
- Maranhão AQ, Brigido MM.(2000) Expression of anti-Z-DNA single chain antibody variable fragment on the filamentous phage surface *Braz J Med Biol Res* **33(5)**:569-79.
- Martinez R. (2004). Paracoccidioidomicose. Em: Micologia médica à luz dos autores contemporâneos Eds., Sedim & Rocha. Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, RJ. pp. 204-221.
- McEwen JG, Garcia AM, Ortiz BL, Botero S & Restrepo A (1995) In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Arch Med Res* **26(3)**:305-6.
- Medoff G, Maresca B, Lambowitz AM, Kobayashi G, Painter A, Sacco M, Carratu L. (1986) Correlation between pathogenicity and temperature sensitivity in different strains of *Histoplasma capsulatum*. *J Clin Invest*. **78**:1638-1647.
- Mitchell RA, Bucala R. (2000) Tumor growth-promoting properties of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Semin Cancer Biol*. **10**:359-366.

- Mitchell RA, Metz CN, Peng T, Bucala R. (1999) Sustained mitogen activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action. *J Biol Chem.* **274**:18100-18106.
- Montoya AE, Alvarez AL, Moreno MN, Restrepo A, Mcewen JG (1999) Electrophoretic karyotype of environmental isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* **37**:219-222
- Nascimento FR, Calich VL, Rodriguez D, Russo M. (2002) Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. *J Immunol.* **168**: 4593-4600.
- Navarro-Garcia F, Eisman B, Roman E, Nombela C, Pla J. (2001) Signal transduction pathways and cell-wall construction in *Candida albicans*. *Med Mycol.* **39**:87-100.
- Nguyen MT, Beck J, Lue H, Funzig H, Kleemann R, Koolwijk P, Kapurniotu A, Bernhagen J. (2003) A 16-residue peptide fragment of macrophage migration inhibitory factor, MIF-(50-65), exhibits redox activity and has MIF-like biological functions. *J Biol Chem.* **278**: 33654-33671.
- Nishihira J., Fujinaga M, Kuriyama T, Suzuki M, Sugimoto H, Nakagawa A, Tanaka I, Sakai M (1998). Molecular cloning of human D-dopachrome tautomerase cDNA: N-terminal proline is essential for enzyme activation. *Biochem Biophys Res Commun.* **243(2)**:538-544.
- Odds FC, Gow NA & Brown AJ. (2001) Fungal virulence studies come of age. *Genome Biol.* **2(3)**:REVIEWS1009.

- Pennock JL, Behnke JM., Bickle QD, Devaney E, Grecis RK, Isaac RE, Joshua GWP, Selkirk ME, Zhang Y & Meyer DJ (1998) Rapid purification and characterization of L-dopachrome methyl éster tautomerase (macrophage-migration-inhibitory factor) from *Trichinella spiralis*, *Trichuris muris* and *Brugia pahangi*. *Biochem J* 495-498.
- Perfect J & Cox G (2000a) Virulence Mechanisms for Fungi, Part I. *Clin Microbiol Newsletter*. **22**:113-119
- Perfect J & Cox G (2000b) Virulence Mechanisms for Fungi, Part II. *Clin Microbiol Newsletter*. **22**:121-125
- Petrenko, O & Moll U. M. (2005) Macrophage Migration Inhibitory Factor MIF Interferes with the Rb-E2F Pathway *Molecular Cell* **17**, 225–236
- Rader C., Steiberg P. & Barbas C.F. (2000) Selection from antibody libraries. In: *Phage display- a laboratory manual*. 1a-Ediço. CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, pp 10.1-10.9
- Reinoso C, Nino-Vega G, San-Blast G, Dominguez A (2005). Random sequencing of *Paracoccidioides brasiliensis* genes. *Med Mycol*. 43(8):681-689.
- Restrepo A, McEwen JG, Castaneda E. (2001) The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med Mycol*. **39**:233-241.
- Restrepo, A. et al., (1997). Hormonal influences in the host-interplay with *Paracoccidioides brasiliensis*. Em: Fungal Interactions Eds Stevens, DA et al., National Foundation for Infectious Diseases. pp. 125-133.
- Roger T, David J, Glauser MP, Calandra T. (2001) MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature*. **414**:920-924.

- Romani L (2004) Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* **4**(1):1-23.
- Romani L. (1997) The T cell response against fungal infections. *Curr Opin Immunol.* **9**:484-490.
- Rooney PJ, Klein BS. (2002) Linking fungal morphogenesis with virulence. *Cell Microbiol.* **4**:127-137.
- Salazar ME, Restrepo A, Stevens DA. (1988) Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect Immun.* **56**:711-713.
- Sambrook J. & Russel D.V. (2001) *Molecular Cloning- A Laboratory Manual*. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- San-Blas G, Nino-Vega G, Iturriaga T. (2002) *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol.* **40**:225-42.
- San-Blas, G. & Niño-Vega, G (2001). *Paracoccidioides brasiliensis*: Virulence and Host Response. Em: Fungal Pathogenesis Principles and Clinical Applications. Eds. Cihlar R. L., Calderone R.A., Marcel Dekker. New York. pp. 205-226.
- San-Blas G, Travassos LR, Fries BC, Goldman DL, Casadevall A, Carmona AK, Barros TF, Puccia R, Hostetter MK, Shanks SG, Copping VM, Knox Y, Gow NA. (2000) Fungal morphogenesis and virulence. *Med Mycol.* **38**:79-86.
- San Blas, G. & San Blas, F. (1994). Biochemistry of *Paracoccidioides brasiliensis* dimorphism. In: Franco, M., Lacaz, C. S., Restrepo-Moreno, A. & Del Negro, G., (Eds). *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton: CRC Press: 49-63.

- San Blas, G. (1993). Paracoccidioomycosis and Etiologic Agent *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Med Vet. Mycology* 31:99-113.
- Silva-Vergara ML, Martinez R, Chadu A, Madeira M, Freitas-Silva G, Leite Maffei CM. (1998) Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibia, State of Minas Gerais, Brazil. *Med Mycol.* **36**:37-42.
- Silva-Pereira I(2003) Amplificação de DNA por PCR. In: Técnicas básicas em Biologia Molecular. Ed. Azevedo MO, Felipe-Soares MS, Brígido MM, Maranhão AQ e De-Souza MT. Editora UnB, Brasília- DF
- Souto JT, Figueiredo F, Furlanetto A, Pfeffer K, Rossi MA, Silva JS. (2000) Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. *Am J Pathol.* **156**:1811-1820.
- Subramanya HS, Roper DI, Dauter Z, Dodson EJ, Davies GJ, Wilson KS, Wigley DB. (1996) Enzymatic ketonization of 2-hydroxymuconate: specificity and mechanism investigated by the crystal structures of two isomerases. *Biochemistry.* **35**:792-802.
- Swope, M., Sun, Hong-Wei, Blak, P.R.& Lolis E. (1998) Direct link between cytokine activity and a catalytic site for macrophage migration inhibitory factor. *The EMBO Journal* **17 (13)**:3534–3541, 1998
- Tavares AH, Silva SS, Bernardes VV, Maranhao AQ, Kyaw CM, Pocas-Fonseca M, Silva-Pereira I.(2005) Virulence insights from the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome. *Genet Mol Res* **4(2)**:372-89.
- Theodoro RC, Candeias JM, Araujo JP Jr, Bosco Sde M, Macoris SA, Padula LO, Franco M, Bagagli E. (2005) Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. *Med Mycol.***43(8)**:725-729.
- Tosta CE (2001) Infectrons and coevolution. *Rev Soc Bras Med Trop.* **34(1)**:1-3

- van Burik, J. H and Magee, P. T. (2001) Aspects of fungal pathogenesis in humans. *Annual Review of Microbiology*, **55**: 743-772
- Williams GT, Williams WJ. (1983) Granulomatous inflammation--a review. *J Clin Pathol.* **36**:723-733.
- Tan TH, Edgerton SA, Kumari R, McAlister MS, Roe SM, Nagl S, Pearl LH, Selkirk ME, Bianco AE, Totty NF, Engwerda C, Gray CA, Meyer DJ. (2001). Macrophage migration inhibitory factor of the parasitic nematode *Trichinella spiralis* . *Biochem J* **357**,373-383
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. (2000) Surfing the p53 network. *Nature.* 408(6810):307-10
- Vousden KH & Lu X. (2002) Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer.***2(8)**:594-604.
- Zang X, Taylor P, Wang JM, Meyer DJ, Scott AL, Walkinshaw MD, Maizels RM (2002) Homologues of human macrophage migration inhibitory factor from a parasitic nematode. Gene cloning, protein activity, and crystal structure. *J Biol Chem.* **277(46)**:44261-7

Anexo

Transporters in the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome: insights on drug resistance

Christiane da Silva Costa, Flávia Caixeta Albuquerque,
Rosângela Vieira Andrade, Gina Camilo de Oliveira,
Mauro Fernandes de Almeida, Marcelo de Macedo Brigido and
Andrea Queiroz Maranhão

Laboratório de Biologia Molecular, CEL, IB, Universidade de Brasília,
70910-900 Brasília, DF, Brasil
Corresponding author: A.Q. Maranhão
E-mail: andreaqm@unb.br

Genet. Mol. Res. 4 (2): 390-408 (2005)
Received January 18, 2005
Accepted May 5, 2005
Published June 30, 2005

ABSTRACT. In the struggle for life, the capacity of microorganisms to synthesize and secrete toxic compounds (inhibiting competitors) plays an important role in successful survival of these species. This ability must come together with the capability of being unaffected by these same compounds. Several mechanisms are thought to avoid the toxic effects. One of them is toxin extrusion from the intracellular environment to the outside vicinity, using special transmembrane proteins, referred to as transporters. These proteins are also important for other reasons, since most of them are involved in nutrient uptake and cellular excretion. In cancer cells and in pathogens, and particularly in fungi, some of these proteins have been pointed out as responsible for an important phenotype known as multidrug resistance (MDR). In the present study, we tried to identify in the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome, transporter-ortholog genes from the two major classes: ATP binding cassette and major facilitator superfamily transporter. We found 22 groups with good similarity with other fungal ATP binding cassette

transporters, and four *Paracoccidioides brasiliensis* assembled expressed sequence tags that probably code for major facilitator superfamily proteins. We also focused on fungicide resistance orthologs already characterized in other pathogenic fungi. We were able to find homologs to *C. albicans* CDR1, CDR2, and MDR1, *Saccharomyces cerevisiae* PDR5 and *Aspergillus* AtrF genes, all of them related to azole resistance. As current treatment for paracoccidioidomycosis mainly uses azole derivatives, the presence of these genes can be postulated to play a similar role in *P. brasiliensis*, warning us for the possibility of resistant isolate emergence.

Key words: Drug resistance, *Paracoccidioides brasiliensis*, ATP binding cassette transporters, Major facilitator superfamily

INTRODUCTION

Paracoccidioides brasiliensis is a fungus which shows a natural dimorphism that can be induced *in vitro* by changing the growth temperature: at 26°C it is found as mycelium form, and at 36-37°C, it presents yeast cells (San Blas et al., 1982). This fungus is a human pathogen, being the etiologic agent of paracoccidioidomycosis (PCM), a serious systemic human disease. This is the most prevalent systemic mycosis in Latin America, where it mainly affects rural workers and immunocompromised patients (San Blas, 1993). This disease is acquired by spore (or conidia) or mycelium fragment inhalation; infection is facilitated by host epithelial lesions (Restrepo and Jimenez, 1988).

The pathogenesis degree varies according to host features and infecting lineage virulence. The immune response of the hosts against *P. brasiliensis* depends on factors such as sex, age, nutritional state, and genetic inheritance. PCM can be restricted to the respiratory tract or become disseminated throughout the organism, becoming lethal (Franco et al., 1987). Thus, the forms of PCM can be divided into two groups: PCM infection, which is generally self-limited and restricted to the site of contact with fungi fragments or to a single organ, affecting both sexes indistinctly, and PCM disease, which preferentially attacks males and can evolve benignly to a PCM infection or disseminate systemically, causing severe damage to the host.

PCM treatment lasts up to five years and basically uses sulfonamides, azoles and amphotericin B, with good cure rates (Hahn et al., 2002). Although not yet described for *P. brasiliensis*, the isolation of fungi resistant to these fungicides is becoming frequent (Del Sorbo et al., 2000). Especially against azoles, transmembrane proteins that can function as efflux pumps, avoiding intracellular drug concentration, give this resistant phenotype. As these are mainly microorganisms closely related to *P. brasiliensis*, in this study we searched the *P. brasiliensis* transcriptome for orthologs related to this function. The assigned PbAESTs, which are the *P. brasiliensis* assembled ESTs (expressed sequence tags), singlets and contigs are listed all over this study. The search was done focusing on gene orthologs to those already described as related to resistance, to look for targets for controlling fungus growth.

TRANSPORTERS

Transport is one of the most important and fascinating aspects of life and is an essential requirement for all organisms. Transport systems serve the cell in many ways, allowing the entry of all essential nutrients and ions, providing a means to regulate metabolic concentrations by catalyzing excretion products and deleterious substances of metabolic pathways, from organelles to cells. This permits the communication between cells, making it an important component of cell-environment relationships (Pao et al., 1998).

Biological membranes probably appeared very early during evolution, in order to isolate hydrophilic compounds from the surrounding medium, facilitating catalyzed reactions in an efficient manner. Biomembranes constitute efficient barriers against hydrophilic molecules, most of which can penetrate cells only by specific inward transport systems, or their entry is restricted to the endocytic pathway (Van Bambeke et al., 2000).

Transport by diffusion is possible only down a concentration gradient, and it is limited to solutes that are able to bypass hydrophobic membranes. Therefore, membrane-bound proteins with specialized transport functions mediate the transport of most compounds through the membrane. Ion channels are membrane complexes mediating the movement of ions across plasma membranes as well as membranes of cell organelles. These channels form a pore, allowing the passive flux of ions down an electrochemical gradient. Opening of these channels is generally gated. This means that the opening is regulated by changes in membrane potential or membrane stretching, or through the binding of a ligand. Ion channels play a role in diverse functions, such as osmoregulation, cell growth, development, and nutrient uptake (Andrade et al., 1999). In contrast to ion channels, facilitators or carriers bind molecules that are to be transported, and they undergo a reversible change in conformation during transport. The transporter must couple the carrier process to another energy-producing process. If energy expenditure is coupled to transmembrane solute translocation, this catalytic system can become an active transporter that facilitates the diffusion.

Active transporters (or porters) can function by uniport, symport, or antiport mechanisms (Figure 1). Uniporters, also called single-species transporters, or facilitated diffusion carriers, catalyze the transport of a single molecular species and transport therefore occurs independently of the movement of other molecular species (Figure 1C). Symporters, also classically called co-transporters, catalyze the transport of two or more molecular species in the same direction (Figure 1B). Antiporters, also called countertransporters, catalyze the exchange of one or more molecular species for another (Figure 1A). Antiport processes can be subdivided into two categories: antiport of solute-solute transport and antiport of solute-cation transport (Dahl et al., 2004).

These transport proteins play important physiological roles in different molecules, transporting such as amino acids, ions, sugars, lipids (pheromones, alarmones, hormones), co-factors, and other substrates that are essential for biological systems, across biological membrane structures.

On the basis of energy source and structural relationships, these all over spread active transport systems can be divided into two major classes: primary active transporters and electrochemical potential-driven transporters - secondary active transporters (Figure 2).

Transporters that use various forms of energy compose the primary active transport system. Transporters belonging to this system usually couple with ATP hydrolysis as they trans-

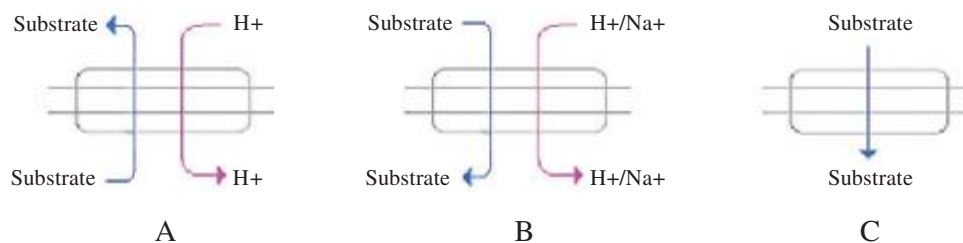


Figure 1. Mechanisms of translocation across the cytoplasmic membrane. **A**, Antiport; **B**, symport and **C**, uniport. The translocation systems are represented by squares.

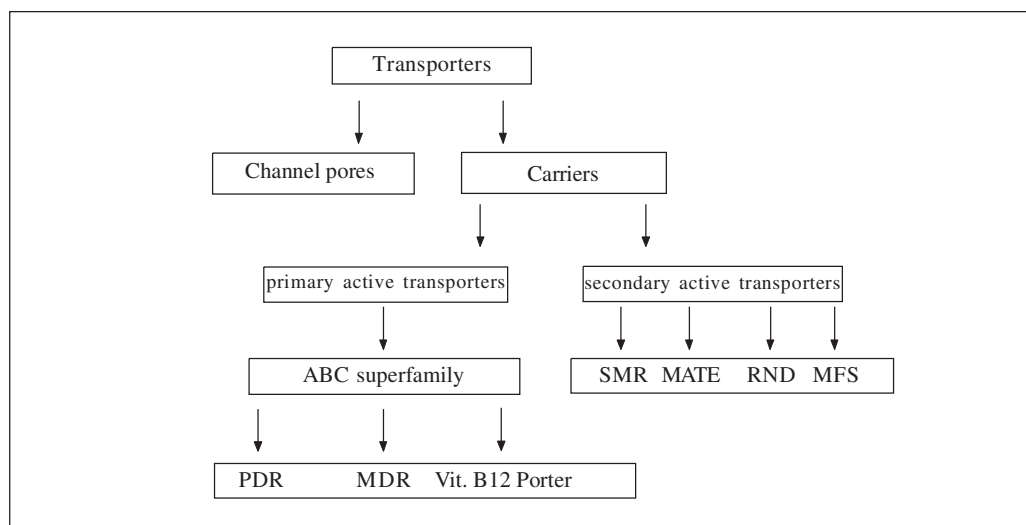


Figure 2. The scheme illustrates the currently classification of transporters, according to Saier Jr. (2000). The transporters are agruped in so-called superfamilies, families and subfamilies. ABC = ATP binding cassette; PDR = pleiotropic drug resistance; MDR = multidrug resistance; SMR = small multidrug resistance; MATE = multidrug and toxic compound extrusion; RND = resistance-nodulation-cell division; MFS = major facilitator superfamily.

locate metabolites across the membranes. The hydrolysis provides the energy to transport solutes against an electrochemical gradient. Two families of ATP-utilizing transporters have been described: the P-type ATPases, which make up a large superfamily of ATP-driven pumps involved in transmembrane transport of charged substrates, and the ATP binding cassette (ABC) transporters (Andre, 1995). We examined this latter group in detailed, since they usually play the most important role in drug efflux in eukaryotic cells (Lage, 2003).

ABC transporters

The diversity in substrate specificity is reflected in the diversity of physiological roles played by ABC transporters in the cell. ABC transporters are found in all taxa and form one of the largest transporter superfamilies, which contains both uptake and efflux transport systems (Saier Jr., 2000). The chemical nature of the substrates handled by ABC transporters is extremely diverse, ranging from inorganic ions to sugars and large polypeptides.

The best characterized *Saccharomyces cerevisiae* ABC transporters are those involved in multidrug (MDR) or pleiotropic drug resistance (PDR), which results in simultaneous resistance to a number of unrelated compounds. The overexpression of certain ABC transporters is the most frequent cause of resistance to cytotoxic agents, including antibiotics, antifungals, herbicides, and anticancer drugs (Higgins, 2001). Several ABC transporter genes have been detected and characterized in filamentous fungi, such as *Penicillium digitatum* (Nakaune et al., 1998), *Magnaporthe grisea* (Urban et al., 1999), *Mycosphaerella graminicola* (Zwiers and De Waard, 2000), *Botrytis cinerea* (Schoonbeek et al., 2001), other phytopathogenic fungi (Lee et al., 2001) and *Aspergillus* species (Del Sorbo et al., 1997; Tobin et al., 1997; Andrade et al., 2000a,b).

All ABC transporters have the same basic molecular architecture (Higgins, 1995). It is important to distinguish ABC transporter proteins from ABC proteins. Both types of proteins are defined by the presence of a highly conserved approximately 215-amino acid consensus sequence, designated as ABC, ABC domain, ABC-ATPase domain, or nucleotide binding domain (NBD). This domain contains two short peptide motifs, a glycine-rich (Walker A) and a hydrophobic motif (Walker B), both involved in ATP binding, and it is commonly present in all nucleotide-binding proteins (Walker et al., 1982). A third consensus sequence is named ABC signature and is unique in ABC domains, being found in transporters (Hyde et al., 1990; Croop, 1993).

ABC-containing proteins couple the phosphate bond energy of ATP hydrolysis to many cellular processes and are not necessarily restricted to transport functions. However, the proper meaning of the term ABC transporter protein is also designated as traffic ATPase or permease for import systems. This is satisfied when the ABC proteins are also associated with a hydrophobic, membrane-embedded transmembrane domain (TMD), usually composed of at least six transmembrane α -helices. TMDs are also designated as membrane-spanning domains that are believed to determine the ABC transporter protein substrate specificity. Some of the predicted membrane-spanning α -helices may not be crucial to transport, but rather can be engaged in auxiliary functions, such as membrane insertion or regulation (Higgins, 2001).

The minimal structural requirement for a biologically active ABC transporter seems to be two TMDs and two ABCs [TMD-NBD]₂ (Ambudkar et al., 1992). In mammals, the functionally active ABC proteins consist of at least four such domains, [TMD-NBD]₂. In some ABC transporter encoding genes, the different domains may be present within one polypeptide chain (full-transporters), or within two separate proteins (half-transporters) that are assembled in the membrane as structural subunits (Sarkadi et al., 2004). Some subfamilies of fungal ABC transporters are described as “half-sized” transporters; these are thought to be functional after assembly as homodimers or heterodimers (Del Sorbo et al., 2000).

We found 22 groups (including contigs and singlets) annotated as ABC transporters in the *P. brasiliensis* transcriptome. Their predicted proteins were also analyzed, by searching for INTERPRO ABC classical motifs (www.ebi.ac.uk/InterProScan). The results showed that 11 of the 22 ABC annotated *P. brasiliensis* groups have one of those motifs: ABC transporter domain (INTERPRO - IPR003439) or P-loop ATP/GTP-binding site motif A (INTERPRO - IPR001687) (Table 1).

We also used the *S. cerevisiae* MIPS database to search for any transporters related to fungal defense mechanisms (Table 2). This table includes major facilitator superfamily (MFS), PDR and other ABC transporters. Among these, we have highlighted multidrug phenotype ortholog genes, based on MIPS description. The listed PbAESTs represent paralogs of those

Table 1. ABC transporters found in the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome.

| PbAEST | Best hit organism | e-value | INTERPRO ABC transporter domain | INTERPRO P-loop ATP/GTP-binding site motif A | Other INTERPRO domains | Remarks |
|--------|----------------------|---------|---------------------------------|--|------------------------|--|
| 1454 | <i>L. tropica</i> | 1e-35 | IPR003439 | IPR001687 | | ABC-type MDR system, ATPase component |
| 255 | <i>S. cerevisiae</i> | e-164 | IPR003439 | IPR001687 | | Killer toxin resistant; Kre30p |
| 2585 | <i>A. fumigatus</i> | 0 | IPR003439 | IPR001687 | | MDR protein 1 |
| 393 | <i>A. fumigatus</i> | 2e-36 | | | | ABC transporter PDR12 |
| 687 | <i>S. pombe</i> | 2e-59 | | | | ABC transporter possibly mitochondrial ATM1 |
| 689 | <i>A. fumigatus</i> | 1e-80 | | | | ABC transporter Pdr5p |
| 841 | <i>S. pombe</i> | 1e-60 | | | | ATP-dependent transporter CAF16 |
| 2741 | <i>S. cerevisiae</i> | 4e-40 | | | | ATP-dependent permease ADPI |
| 2883 | <i>V. inaequalis</i> | 1e-73 | IPR003439 | | | ABC transporter (ABC1) PDR15 |
| 2906 | <i>S. pombe</i> | 3e-64 | IPR003439 | IPR001687 | | ATPase components of ABC transporters [Spo] |
| 3123 | <i>E. nidulans</i> | 1e-29 | | IPR001687 | | ABC multidrug transport protein ATRC, MDL2 |
| 3428 | <i>M. musculus</i> | 3e-14 | | | | ABC transporter MDL1 |
| 4517 | <i>A. thaliana</i> | 8e-31 | | | | ABC, subfamily G |
| 4798 | <i>S. pombe</i> | 6e-44 | IPR003439 | | | Heavy metal tolerance protein precursor |
| 4680 | <i>E. nidulans</i> | 1e-79 | IPR003439 | | | MDR protein |
| 4933 | <i>S. cerevisiae</i> | 1e-13 | | IPR001687 | IPR006209 | Homolog to ATP-dependent permeases; Adp1p, contains EGF-like domain |
| 4861 | <i>N. crassa</i> | 1e-77 | | IPR001687 | | ABC transporter, peroxisomal, long-chain fatty acid import |
| 5041 | <i>T. rubrum</i> | 4e-41 | | | | MDR protein STE6 |
| 5285 | <i>B. fuckeliana</i> | 3e-58 | | | | ABC transporter-like protein |
| 5352 | <i>A. fumigatus</i> | 7e-98 | IPR003439 | | | MDR protein 2 |
| 5902 | <i>E. coli</i> | 2e-86 | | | | ATP-binding transport protein homologous to <i>S. cerevisiae</i> MDL1p |

ABC = ATP binding site; PbAEST = *P. brasiliensis* assembled expressed sequence tag; MDR = multidrug resistance.

Table 2. MIPS transporter-related genes found in the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome.

| PbAEST | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | | <i>Candida albicans</i> | | <i>Neurospora crassa</i> | | <i>Homo sapiens</i> | | Remarks |
|-------------|---------------------------------|---------|-------------------------|---------|--------------------------|----------|---------------------|---------|---|
| | MIPS (gene name) ^φ | e-value | ORF code* | e-value | AC number | e-value | AC number | e-value | |
| PbAEST 2763 | YMR088c* | 2e-06 | CA1322 | 1e-06 | 1nc550_030 | 2.9e-09 | NP_004769.1 | 6e-04 | MDR similar ATPase, MFS (<i>S. cerevisiae</i>); related MDR protein fnx1 (<i>N. crassa</i>); related to putative multidrug transporter Mfs1.1 (<i>N. crassa</i>) |
| PbAEST 5813 | | 3e-18 | CA3253 | 6e-16 | b11e5_230 | 9.3e-18 | | | |
| PbAEST 3553 | YHR048w* | 4e-21 | CA4882 | 2e-27 | 6nc360_420 | 1.1e-32 | | | ABC transporter involved MDR, PDR (<i>S. cerevisiae</i>); <i>C. albicans</i> CDR1 homologue ABC protein (<i>S. cerevisiae</i>); <i>C. albicans</i> CaSNQ2 |
| PbAEST 393 | YDR011w (SNQ2) | 4e-21 | CA0608 | 2e-19 | 1nc100_090 | 1.9e-34 | AAG52982.1 | 2e-08 | |
| PbAEST 1454 | YOL075c* | 8e-09 | CA3828 | 9e-11 | CAD79694.1 | 1.2e-82 | AAC05632.1 | 2e-37 | ABC transporter involved in MDR, PDR (<i>S. cerevisiae</i>); <i>C. albicans</i> CDR4; <i>H. sapiens</i> breast cancer resistance protein |
| PbAEST 2883 | YOR153w (PDR5) | 1e-61 | CA3892 | 4e-66 | 6nc360_520 | 6.9e-60 | AAC97367.1 | 8e-16 | |
| PbAEST 689 | | 1e-53 | CA3892 | 3e-54 | 6nc360_520 | 5.0e-55 | AAL06598.1 | 6e-20 | Mitochondrial ABC transporter (<i>S. cerevisiae</i>); CaMDL1; MDR protein 1 (<i>Aspergillus fumigatus</i>); multidrug transport protein ATRC (<i>Emericella nidulans</i>); MDR protein 1 (<i>A. nidulans</i>) |
| PbAEST 3123 | YLR188w (MDL1) | 4e-20 | CA2382 | 9e-16 | xnc081_270 | 6.7e-25 | O95342IAB11 | 2e-21 | |
| PbAEST 2585 | | 2e-57 | CA2384 | 6e-58 | xnc081_270 | 4.0e-159 | NP_000918.1 | e-100 | Mitochondrial ABC transporter (<i>S. cerevisiae</i>) |
| PbAEST 687 | YMR301c (ATM1) | 8e-61 | CA0931 | 1e-52 | 2nc610_370 | 1e-69 | NP_004290.1 | 5e-51 | ABC transporter of long-chain fatty-acids import into peroxisomes |
| PbAEST 4798 | | 7e-30 | CA0931 | 1e-20 | 3nc400_080 | 4.0e-68 | AAG33617.1 | 1e-42 | |
| PbAEST 4680 | YPL270w (MDL2) | 9e-29 | CA2382 | 2e-26 | xnc081_270 | 7.2e-68 | BAA92038.1 | 7e-51 | ABC transporter MDR phenotype (nr); <i>H. sapiens</i> P-rubrum MDR protein |
| PbAEST 5352 | | 3e-59 | CA2384 | 2e-51 | 94c8_130 | 7.0e-82 | NP_036221.1 | 2e-54 | |
| PbAEST 4861 | YKL188w (PXA2) | 5e-30 | CA4990 | 2e-37 | b17c10_260 | 5.4e-75 | JC5712 | 6e-51 | ABC transporter that leads to neomycin-resistance (<i>S. cerevisiae</i> , <i>N. crassa</i>); CaDRS21 membrane-spanning Ca-ATPase (<i>C. albicans</i>) |
| PbAEST 5041 | YKL209c (STE6) | 0.016 | CA5727 | 0.54 | xnc081_270 | 1.5e-36 | AAA59575.1 | 1e-18 | |
| PbAEST 255 | YER036c (KRE30) | 1e-167 | CA3733 | 1e-171 | b24g20_030 | 1.5e-168 | AAH06323.1 | 5e-51 | ABC transporter - similarity to Pdr12p, Cdr1p, Pdr10p, Pdr15p, and Pdr5p (<i>S. cerevisiae</i>) |
| PbAEST 4517 | YCR011c (ADP1) | 6e-11 | CA4390 | 5e-86 | 3nc442_040 | 5.8e-87 | G02068 | 3e-14 | |
| PbAEST 4176 | YIL048w (NEO1) | 5e-56 | CA2277 | 1e-54 | NE7566 | 8e-67 | NM_198531 | 8e-61 | |

^φEntry and gene names based on MIPS nomenclature; *No gene names on MIPS site; MIPS [mips.gsf.de/genre/proj/yeast/index.jsp].

PbAEST = *P. brasiliensis* assembled expressed sequence tag; MDR = multidrug resistance; MFS = major facilitator superfamily; ABC = ATP binding cassette; PDR = pleiotropic drug resistance.

genes. We also assigned PbAEST orthologs for sequences found in *C. albicans*, *N. crassa* and *Homo sapiens*.

Multidrug resistance transporters

Microorganisms, as well as cancer cells, may also exhibit a cross-resistant phenotype against several unrelated drugs that differ widely in molecular structure and target specificity. This phenotype has been termed MDR. Different types of MDR phenotypes have been described, and most drug efflux pumps confer an MDR phenotype, corresponding to the large variety of substrates that they may recognize, including several classes of antibiotics, as well as non-antibiotic drugs.

The first described multidrug efflux pump was mammalian P-glycoprotein, an ATP-driven pump that provides resistance to a broad spectrum of compounds, including anticancer chemotherapeutic agents (Ling, 1997; Ambudkar et al., 1999). In many cancers, P-glycoprotein is overexpressed, contributing to resistance to clinically important chemotherapeutic drugs that are P-glycoprotein substrates.

Pleiotropic drug resistance transporters

The PDR transporters share several biochemical features with the human P-glycoprotein (Kolaczowski et al., 1996, 1998), and they constitute the main class of ABC-drug-efflux pumps in yeasts and fungi. The first and, until now, best-characterized yeast PDR transporter is the product of the PDR5 gene. Its promoter region presents a pleiotropic drug-responsive element, the binding site of the transcriptional activators Pdr1p and Pdr3p that control transcription of PDR5 and other drug-resistance-related genes (Balzi and Goffeau, 1995). We were able to identify two PbAESTs (a singlet and a contig) with a high degree of homology with the *S. cerevisiae* PDR5 gene (Table 2); however, no PDR1 or 3 was found. The protein Pdr5p has been shown to share nucleotide triphosphatase activities, as well as substrates and modulators, with the human MDR1-P-glycoprotein (Kolaczowski et al., 1998; Conseil et al., 2001; Rogers et al., 2001). The predicted topography of Pdr5p comprises two hydrophobic domains, each composed of six transmembrane segments (TMS₆), and two cytoplasmic NBD, showing the structure named (TMS₆-NBD)₂ “full-transporter” (Klein et al., 1999; Dassa and Bouige, 2001). Each half-Pdr5p starts with an NH₂-terminal NBD, followed by the first TMS₆ tract, whereas in P-glycoprotein the TMS₆ tracts precede the NBD. Thus, despite similar mechanisms of substrate recognition and transport, the significance of such domain inversion in yeast ABC transporters is unknown. This is mainly related to the lack of structural information on yeast ABC transporters, when compared with mammalian full-transporters (Ferreira-Pereira et al., 2003).

Non-ATP binding cassette transporters

The secondary-active transport systems mediate the drug efflux reaction in a coupled exchange with protons or sodium ions along a concentration gradient, as symport or antiport translocation systems. Members of the secondary transporters are the small multidrug resistance family (SMR), the multidrug and toxic compound extrusion family (MATE), the resistance-nodulation-cell division family (RND), and the MFS (Figure 2). Among these, SMR, MATE

and RND are widespread in bacteria and barely represented in the fungi. The opposite situation is observed to MFS, which is rarely found in bacteria and is often present among fungi (Murakami and Yamaguchi, 2003).

The SMR transporters are normally composed of around 100 amino acids that appear as four helices (Paulsen et al., 1996). Some SMR family members have not been found to exhibit an MDR phenotype, in spite of extensive studies (Mordoch et al., 1999). The MATE transporters are typically composed of approximately 450 amino acids, arranged into 12 helices. This novel family was identified only quite recently, with a characterization of NorM, a multi-drug Na⁺-antiporter from *Vibrio parahaemolyticus*, which confers resistance to dyes, fluoroquinolones and aminoglycosides (Borges-Walmsley et al., 2003). The RND family is composed of approximately 1000-amino acid residues (Tseng et al., 2003). They are predicted to adopt a 12-helical structure and possess large periplasmatic or extracytoplasmatic domains between helices 1 and 2 and between helices 7 and 8 (Murakami et al., 2002; Mao et al., 2002; Elkins and Nikaido, 2003).

Major facilitador superfamily transporters

MFS includes more than 1,000 evolutionarily related proteins, and it is implicated in the transport of a variety of solutes and metabolites across the membranes of organisms, ranging from bacteria to humans (Busch and Saier Jr., 2002). MFS-motivated transport across membranes is driven by the proton-motive force, which is composed of membrane potential and electrochemical proton gradients; consequently, MFS transporters (Figure 2) are termed as secondary active transport systems (Lewis, 1994). Unlike ABC transporters, MFS transporters have no characteristic signature. They are around 500-amino acid residues in length and show an RND-like 12-helix structure, although with smaller extra- or intra-cellular domains. More than 350 uniporters, symporters, and antiporters of sugars, peptides, drugs, organic, and inorganic ions fall within this superfamily (Pao et al., 1998). These authors have also identified a 13-residue consensus motif between the transmembrane spans 2 and 3. Meaningful sequence homology occurs among all members of this superfamily. Toxin export by MFS is also associated with virulence in plant pathogens (Del Sorbo et al., 2000). In our transcriptome study, we were able to annotate four PbAEST as MFS. They are homologs to two well-characterized MFS in fungi (Table 2). PbAESTs 2763 and 5813 correspond to the YMR088c MIPS gene, which is postulated to code an *S. cerevisiae* MFS, and are also homologous to a similar *N. crassa* protein. PbAESTs 3000 and 3553 seem to be homologous to YHR048w from *S. cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* MFS genes.

ANTIFUNGAL RESISTANCE

Systemic fungal infections are a big problem for clinicians; mucosal and invasive opportunistic fungal infections have increased during the past two decades. This is a consequence of the rising number of immunocompromised hosts, such as HIV-infected individuals, transplant recipients, and patients submitted to immunosuppressive therapies or broad-spectrum antibiotics. Another factor that contributes to the severity of opportunistic infections is the development of resistance to antifungal agents (Lupetti et al., 2002). Over the past decade, we have seen the emergence of resistant isolates from different pathogenic fungi, including *Candida* spp, *Cryp-*

tococcus neoformans, and from some invasive molds, like *Aspergillus* spp and *Histoplasma capsulatum* (Alexander and Perfect, 1997; Wheat et al., 1997; Kontoyiannis and Lewis, 2002).

Two major classes of xenobiotic transporters are involved in drug resistance in fungi: ABC transporters and MFS transporters. In contrast to prokaryotic microorganisms, in fungi the ABC transporters comprise the largest number of membrane-spanning efflux pumps (Higgins, 1992). Thus, it was not surprising that the first described ABC transporter homolog to human P-glycoprotein from a non-mammalian system was that from *S. cerevisiae*. This transporter, consisting of 1290-amino acid residues, is designated as Ste6p and is encoded by the STE6 gene (McGrath and Varshavsky, 1989). Ste6p, exhibiting a [TMD-NBD]₂ configuration, is physiologically involved in the transport of the mating α -factor pheromone, but it has no role in drug resistance. However, among at least 29 putative ABC transporter encoding genes in *S. cerevisiae*, five of them encode ABC transporters - Pdr5p, Pdr12p, Snq2p, Ycf1p, and Yor1p. They mediate MDR phenotype when present in multiple copies (Decottignies and Goffeau, 1997). In our transcriptome we found an *S. cerevisiae* STE6-related PbAEST (5041) and although this group exhibits low homology with its *S. cerevisiae* counterpart, it shows a high degree of similarity with other fungi, STE 6 homologs (Table 2).

The drug resistance phenomenon in fungi is characterized by a failure of antifungal therapy to control a fungal infection (Alexander and Perfect, 1997), which is measured as an increase in minimum inhibitory concentration, when compared to values obtained for susceptible reference organisms (Sanglard and Odds, 2002). In a clinical context, whenever antifungal agents are used to combat fungal infections, the exposure of fungal pathogens to these drugs is therefore expected to give rise to resistant isolates from an initially susceptible population (Sanglard, 2002). The increasing number of fungal infections documented in hospitals around the world could favor the occurrence of this phenomenon, as the number of antifungal treatments becomes higher. The increased use of antifungal agents in recent years has led to the development of resistance to these drugs (Beck-Sague and Jarwis, 1993). Resistance of microbes to antimicrobial agents has potentially serious implications for the management of infections (Sanglard and Odds, 2002). Antifungals are grouped mainly into five groups, on the basis of their site of action: polyenes, azoles, flucytosine, candins, and allylamines (Balkis et al., 2002; Sanglard, 2002), but current treatment of systemic mycoses, including PCM, is mainly based on the use of polyenes (e.g., amphotericin B) and azoles, such as triazoles - e.g., itraconazole and fluconazole (Lupetti et al., 2002).

Molecular basis of drug resistance in fungi

Resistance to chemotherapy is a common clinical problem in patients with infectious diseases as well as in patients with cancer, since it causes a decrease in the chance for successful treatment. From bacterial cells, fungi, and protozoa, to the complexity of human cancer cells, resistance has become a challenge (White et al., 1998). Furthermore, antifungal resistance can be classified as primary or intrinsic, when it is present before exposure to antifungal agents, and secondary or acquired, which develops after exposure to antifungals (Kontoyiannis and Lewis, 2002). However, it will be dependent on the type of fungal pathogen to be treated and the type of antifungal agents applied (Sanglard, 2002).

The emergence of an MDR phenotype is still more problematic, and it can occur during treatment of infections or malignant tumors. This happens when the prokaryotic or eukaryotic

microorganism and neoplastic cell drug targets are non-reactive to a variety of drugs that have different structures and functions (Lage, 2003). Although this phenotype has not been documented for PCM, we found at least five PbAESTs in the *P. brasiliensis* transcriptome that show similarity with other fungal orthologs and, one that is similar to a protozoan ortholog thought to code for MDR-related proteins. Table 1 shows these PbAESTs and another (16) identified in the *P. brasiliensis* Genome Project database as ABC transporters.

Several types of molecular mechanisms contribute to drug resistance phenotype in eukaryotic cells. In general, the most frequent mechanisms that originate resistance include the increase of cellular target levels, the decrease of these cellular targets affinity for the drug, enzymatic drug inactivation or degradation, and upregulation of drug efflux control genes. Therefore, more than one of these mechanisms can happen simultaneously, causing different cellular alterations (White et al., 1998). The main fungicide drugs used in fungal infection therapy are listed in Table 3.

Flucytosine

Flucytosine (5-fluorocytosine) is a pyrimidine analog working as an antifungal agent through conversion to 5-fluorouracil, which can be so on incorporated into RNA, causing premature chain termination in addition to an inhibition of DNA synthesis due to its effects on thymidilate synthase. Target cells must possess the machinery necessary to make this conversion; this includes a cytosine permease to permit internalization of the drug, cytosine deaminase to convert it to 5-fluorouracil, and uracil phosphoribosyl transferase to convert 5-fluorouracil into a substrate for nucleic acid synthesis. Because most filamentous fungi do not produce the enzymes needed to metabolize flucytosine and are consequently not responsive to drug (Odds et al., 2003), the spectrum is restricted to pathogenic yeasts. Primary mechanisms, such as poor uptake of the drug by cytosine permease alterations, or secondary mechanisms, such as a decrease in the metabolism of flucytosine to toxic metabolites, are commonly found in resistance to flucytosine in *Candida* spp and *C. neoformans* (Whelan, 1987). We have not found a cytosine permease-related group in the *P. brasiliensis* transcriptome, but we have annotated two groups, PbAEST 20 and 4726 that are similar to cytosine deaminase. Another two groups, PbAESTs 466 and 1502, were identified as being uracil phosphorybosil transferase similar sequences.

Polyenes

This class of drugs plays important role in PCM treatments. Amphotericin B targets ergosterol, the major component in fungal membranes, which is also very important for a variety of cellular functions, such as the fluidity and integrity of the membrane. Ergosterol is also the main component of secretory vesicles in *S. cerevisiae*, and it has an important role in mitochondrial respiration. Alterations in membrane ergosterol content due to alterations in the ergosterol biosynthetic pathway seem to be the main mechanism involved in amphotericin B-induced resistance in *C. albicans* (Dick et al., 1980), *C. neoformans* (Perfect and Cox, 1999), and other emerging filamentous fungi and yeasts (Kontoyiannis and Lewis, 2002). Such modifications in sterol content are also found in *P. brasiliensis* strains exposed to amphotericin B (Hahn and Hamdan, 2000). Since resistance is relatively rare, and diminished ergosterol content seems to

Table 3. Mechanisms and action spectrum of major antifungal agents.

| Antifungal | Mechanism of action | Spectrum/comments |
|--------------------------------------|---|---|
| Polyenes | Interaction with ergosterol and destabilization of cell membrane functions; cell death | Broad activity against <i>Candida</i> spp, <i>Cryptococcus neoformans</i> and filamentous fungi (except, of the <i>Aspergillus</i> spp, <i>A. terreus</i> and <i>A. flavus</i>). Used to control PCM |
| Amphotericin B | | |
| Nystatin | | |
| Pyrimidine analogue 5-fluorocytosine | Interferes with DNA/RNA synthesis | Activity against <i>Candida</i> spp, <i>Cryptococcus</i> spp. Rapid emergence of resistance when used as monotherapy |
| Azoles | Inhibition of cytochrome P450 14 α -lanosterol demethylase | Fluconazole is active against most <i>Candida</i> spp and <i>Cryptococcus</i> spp but has no activity against invasive molds. Other azoles such as itraconazole, voriconazole and posaconazole have improved activity against invasive molds. Itraconazole is frequently used in PCM patients |
| Ketoconazole | | |
| Fluconazole | | |
| Itraconazole | | |
| Voriconazole | | |
| Posaconazole | | |
| Echinocandins | Inhibition of cell-wall glucan synthesis, leading to susceptibility of fungal cell to osmotic lysis | Rapidly fungicidal against <i>Candida</i> spp and moderate against <i>Aspergillus</i> spp, including azole-resistant species. Poor activity against <i>C. neoformans</i> |
| Allylamines | Inhibition of squalene epoxidase | Activity against most dermatophytes, poor activity against <i>Candida</i> spp |

PCM = paracoccidioidomycosis.

be evolutionary disfavored (Lupetti et al., 2002), problems arise mainly because of toxicity to mammalian cells more than because of drug resistance phenomena. Hence it is a fungicidal agent that is preferentially used in short-term treatments (Odds et al., 2003).

Azoles

Within different categories of antifungal drugs, the development of azole resistance is the most relevant medical problem. Treatment failures have been observed following the extensive use of fluconazole for *Candida* infection, frequently associated with relapses of oropharyngeal candidiasis in AIDS patients (Kelly et al., 1997). The major cellular target of azoles in yeasts and fungi is a cytochrome P450 (Erg11p), C14 α -demethylase, involved in the ergosterol pathway. The resulting ergosterol depletion and accumulation of C14 α -demethyl-sterols, such as lanosterol, interfere with ergosterol functions (Lupetti et al., 2002). Both effects result in growth arrest in most species, although, in some other species (*C. neoformans* and *A. fumigatus*), specific azoles, such as itraconazole, have a fungicidal effect (Klepser et al., 1998; Manavathu et al., 1999; Lass-Flörl et al., 2001). In the *P. brasiliensis* transcriptome, we were able to find PbAEST 1797, whose predicted product shares 80% similar amino acids with *Aspergillus fumigatus* Erg11p.

Three major mechanisms are associated with secondary resistance in *C. albicans* by reducing azole accumulation: 1) over expressing the target Erg11p or altering the C14 α -demethylase binding site, 2) mutations downstream of the ergosterol pathway (Erg5p and Erg3p) leading to the accumulation of less toxic sterols, and 3) increased drug efflux (Sanglard and Odds, 2002; Odds et al., 2003). Genes involved with efflux have been identified in *C. albicans*: *CDR1* (Prasad et al., 1995) and *CDR2* (Sanglard et al., 1997), which code for ABC transporters. A third gene is *MDR1* (Ben-Yaacov et al., 1994), which codes for a protein belonging to the MFS of transporters. This gene has also been assigned as a virulence gene fitting Falkow's postulate, which means that its disruption generates an attenuation phenotype that is reversed by its complementation. All of these gene orthologs could be assigned in the *P. brasiliensis* genome (Table 4).

Do Nascimento et al. (2002) have identified genes encoding ABC transporters that confer pleiotropic drug resistance, designated *abcA-D*, in *Aspergillus* isolates. One of these genes, *abcD*, was cloned and characterized. In our transcriptome analysis, we found an *abcA* homolog (Table 4). Besides the detection of upregulated ABC expression, other features contribute to the fungicide resistant phenotype in *C. albicans*, like the ability to form biofilms, which is associated with high fluconazole resistance (Mukherjee et al., 2003). These authors used a set of isogenic *Candida* strains lacking one or more of the drug efflux pumps, Cdr1p, Cdr2p, and Mdr1p, to determine their role in fluconazole resistance within the biofilm context. Additionally, variation in sterol profile as a possible mechanism of drug resistance was investigated. They concluded that parental and MDR mutant strains formed similar biofilms, indicating a lack of involvement of efflux pumps in resistance at late stages of biofilm formation. Indeed, biofilms formed by double and triple mutants were more susceptible to fluconazole than was the wild-type strain. Sterol analysis showed that ergosterol levels were significantly decreased at biofilm intermediate and mature phases, compared to those in early-phase. These studies suggest that other features, such as sterol content and phase-specific mechanisms, control fungal azole resistance. Other mechanisms that do not include transporter usage are described for various

Table 4. PbAEST-related transporter genes found in fungi other than *Saccharomyces cerevisiae* associated with drug resistance.

| Gene | GenBank (accession number) | PbAEST | e-value | % Similarity | Remarks | References |
|--------------------------------------|----------------------------|-------------|---------|---------------|---|----------------------------|
| <i>Candida albicans</i> | | | | | | |
| CDR1 | X77589 | PbAEST 2883 | 5e-62 | 146/197 (74%) | ABC transporter; strongly involved in azole resistance | Prasad et al., 1995 |
| CDR2 | U63812 | PbAEST 2883 | 3e-62 | 146/197 (74%) | ABC transporter; strongly involved in azole resistance | Sanglard et al., 1997 |
| MDR1 | CAA76194 | PbAEST 3000 | 4e-24 | 111/195 (56%) | MFS multidrug efflux; related to cycloheximide resistance protein | Ben-Yaacov et al., 1994 |
| | | PbAEST 3553 | 2e-11 | 62/125 (49%) | | |
| FLU1 | AF188621 | PbAEST 3553 | 4e-19 | 70/126 (55%) | MFS multidrug efflux transporter. Other names: CaMDR1 and Ben' | Calabrese et al., 2000 |
| <i>Aspergillus nidulans</i> | | | | | | |
| AbcD | AF173826 | PbAEST 2883 | 1e-59 | 102/142 (71%) | ABC transporters; pleiotropic drug resistance | Do Nascimento et al., 2002 |
| AtrA | Z68904 | PbAEST 2883 | 2e-76 | 102/127 (80%) | ABC transporters; pleiotropic drug resistance | Del Sorbo et al., 1997 |
| AtrB | Z68905 | PbAEST 689 | 6e-57 | 85/123 (69%) | ABC transporters; pleiotropic drug resistance | Del Sorbo et al., 1997 |
| AtrC | AF082072 | PbAEST 2585 | 1e-80 | 103/132 (78%) | ABC transporter protein; multidrug resistance protein | Angermayr et al., 1999 |
| AtrD | AF071411 | PbAEST 4680 | 4e-96 | 164/180 (91%) | ABC transporter protein; multidrug resistance protein | Andrade et al., 2000 |
| AtrF | AJ309281 | PbAEST 2883 | 1e-59 | 102/142 (71%) | ABC-type multidrug transport system | |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | | | | | | |
| MDR1 | U62934 | PbAEST 4680 | 2e-92 | 158/177 (89%) | ABC-type multidrug transport system; multiple drug resistance | Tobin et al., 1997 |
| MDR2 | U62936 | PbAEST 5352 | e-110 | 108/114 (94%) | ABC-type multidrug transport system; multiple drug resistance | Tobin et al., 1997 |
| MDR3 | AF503774 | PbAEST 5232 | 0.020 | 36/78 (46%) | Multiple resistance to itraconazole | Do Nascimento et al., 2003 |
| MDR4 | AF503773 | PbAEST 2585 | 1e-82 | 249/441 (56%) | Multiple resistance to itraconazole | Do Nascimento et al., 2003 |
| | | PbAEST 5352 | 1e-39 | 242/467 (51%) | | |
| AbcA | AJ417501 | PbAEST 2883 | 2e-62 | 153/219 (69%) | ABC-type multidrug transport system, ATPase | Do Nascimento et al., 1999 |
| | | PbAEST 689 | 3e-44 | 86/176 (48%) | | |
| AtrF | AJ311940 | PbAEST 2883 | 4e-67 | 86/185 (46%) | ABC-type multidrug transport system, ATPase | Slaven et al., 2002 |
| | | PbAEST 689 | 7e-53 | 175/302 (57%) | | |
| <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> | | | | | | |
| Pfr1 | AJ558104 | PbAEST 5352 | 0.0 | 607/608 (99%) | ABC-type multidrug protein lipid transport system, induction up regulated as response to azoles in <i>P. brasiliensis</i> | Gray et al., 2003 |

PbAEST = *Paracoccidioides brasiliensis* assembled expressed sequence tag; ABC = ATP binding cassette; MFS = major facilitator superfamily.

organisms and fungi, such as *C. neoformans* and *A. fumigatus* azole-resistant isolates, which overexpress P450 C14 α -demethylase (Tobin et al., 1997; Perfect and Cox, 1999), and *H. capsulatum* isolates that show a decrease of ergosterol biosynthesis after exposure to fluconazole, which probably reduces the accumulation of toxic sterols (Wheat et al., 1997). Increasing content of Erg11p by gene amplification or upregulation of the corresponding gene was best investigated in *C. glabrata* (Marichal et al., 1997), and reduced affinity for azole is also described in *C. kruzei* (Sanglard, 2002). Because sequence alterations may be simply due to allelic variations, the involvement of mutations in azole resistance is difficult to be evaluated, although some reported mutations influencing bond interference with fluconazole have been investigated since Podust et al. (2001) obtained a C14 α -demethylase crystal. Other mechanisms that not include transporter participation, such as overexpression of P450 C14 α -demethylase (Tobin et al., 1997; Perfect and Cox, 1999) are described for *C. neoformans* and *A. fumigatus* azole-resistant isolates and for some *H. capsulatum* isolates that show a decrease in ergosterol biosynthesis after exposure to fluconazole, which probably reduces the accumulation of toxic sterols (Wheat et al., 1997).

Gray et al. (2003) described a gene in *P. brasiliensis* that encodes a half-ABC transporter, designated PFR1, an ABC-superfamily member, involved in multidrug resistance. The PFR1 gene is predicted to encode an 827-amino acid protein that, in common with mammalian MDR1, has a transmembrane-NBD topology and seems to be a mitochondrial protein. The transcription of the PFR1 gene is induced by the triazole drug fluconazole, but not by amphotericin B, suggesting a role in transport-mediating azole resistance, and an ABC transporter is induced as part of the cellular response to drug treatment. We found a PFR1 singlet in our transcriptome (PbAEST 5352). This singlet is 616 nucleotides long, and it is identical to the yet described gene (Table 4). The promoter region of PFR1 contains a pleiotropic drug-responsive element-like consensus sequence, which could be the element responsible for up-regulation of PFR1 transcripts in response to fluconazole. The NBD of PFR1 was expressed and purified from *Escherichia coli*, and was shown to retain ATPase activity, consistent with PFR1 functioning as a homodimeric transport ATPase.

Paracoccidioidomycosis treatment

Paracoccidioides brasiliensis is a very sensitive organism when exposed to antifungal drugs, in contrast with other pathogenic fungi. Based on the *P. brasiliensis* sensibility profile, different therapeutic schedules are available for PCM treatment. Several classes of antifungal drugs have been widely employed for this disease, including the sulfonamides (sulfadiazine, sulfadoxine, sulfamethoxypyridazine, cotrimazine, and cotrimoxazole) as a maintenance treatment, amphotericin B, azole compounds (ketoconazole, fluconazole and itraconazole) and terbinafine. The cure rates achieved with these various drugs have ranged between 69 and 100%. Although comparative clinical trials in PCM are missing, it is believed nowadays that itraconazole is the drug of choice for treatment of most clinical forms of the disease (Telles, 2002).

Hahn and colleagues (2002) reported terbinafine activity against *P. brasiliensis* *in vitro*, thus suggesting that this allylamine can be considered a new option for PCM therapy. Currently, there are six new antifungal drugs in advanced stages of clinical investigation, including three new triazoles and three compounds belonging to a new class of antifungal drugs, the echinocandins that act by inhibiting cell wall synthesis. The second-generation triazoles include

ravuconazole, posaconazole and voriconazole. These compounds are very active *in vitro* and in animal models against *Cryptococcus* spp, *Aspergillus* spp, *Trichosporon* spp, and other endemic mycosis agents, including *P. brasiliensis*. Among the echinocandins, caspofungin and micafungin do not show *in vitro* activity against *P. brasiliensis*; therefore, they are not useful for treating PCM (Telles, 2002).

CONCLUDING REMARKS

In this study we were able to identify 22 PbAESTs related to ABC transporters and three other groups that code for two MFS. Although rarely reported for *P. brasiliensis*, emergence of resistant isolates to the usual antifungals is becoming frequent. Especially for azoles, efflux pumps play a major role in resistant phenotypes. A recent study showed that ketoconazole-resistant isolates could be found in PCM patients (Hanh et al., 2003). This result, taken together with the finding of drug resistance in closely related microorganisms and our findings concerning the *P. brasiliensis* transcriptome, lead us to suggest that there is a need to make efforts towards the control of potential drug resistance *P. brasiliensis*. This can be assumed based on the same principles for other pathogenic fungi, since similar resistance genes can be involved.

ACKNOWLEDGMENTS

Research supported by MCT/CNPq, CNPq, CAPES, FUB, and UFG.

REFERENCES

- Alexander, B.D. and Perfect, J.R. (1997). Antifungal resistance trends towards the year 2000. Implications for therapy and new approaches. *Drugs* 54: 657-678.
- Ambudkar, S.V., Lelong, I.H., Zhang, J., Cardarelli, C.O., Gottesman, M.M. and Pastan, I. (1992). Partial purification and reconstitution of the human multidrug-resistance pump: characterization of the drug-stimulatable ATP hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 8472-8476.
- Ambudkar, S.V., Dey, S., Hrycyna, C.A., Ramachandra, M., Pastan, I. and Gottesman, M.M. (1999). Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39: 361-398.
- Andrade, A.C., Zwiers, L.H. and Waard, M.A. (1999). ABC transporters and their impact on pathogenesis and drug sensitivity. In: *Pesticide Chemistry and Bioscience - The Food Environment Challenge* (Brooks, G.T. and Roberts, T.R., eds.). Royal Society of Chemistry, Cambridge, England, pp. 221-235.
- Andrade, A.C., Del Sorbo, G., Van Nistelrooy, J.G.M. and De Waard, M.A. (2000a). The ABC transporter AtrB from *Aspergillus nidulans* mediates resistance to all major classes of fungicides and some natural toxic compounds. *Microbiology* 146: 1987-1997.
- Andrade, A.C., Van Nistelrooy, J.G.M., Peery, R.B., Skatrud, P.L. and De Waard, M.A. (2000b). The role of ABC transporters from *Aspergillus nidulans* in protection against cytotoxic agents and in antibiotic production. *Mol. Gen. Genet.* 263: 966-977.
- Andre, B. (1995). An overview of membrane transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 11: 1575-1611.
- Angermayr, K., Parson, W., Stoffer, G. and Haas, H. (1999). Expression of atrC - encoding a novel member of the ATP binding cassette transporter family in *Aspergillus nidulans* - is sensitive to cycloheximide. *Biochim. Biophys. Acta* 1453: 304-310.
- Balkis, M.M., Leidich, S.D., Mukherjee, P.K. and Ghannoum, M.A. (2002). Mechanisms of fungal resistance: an overview. *Drugs* 62: 1025-1040.
- Balzi, E. and Goffeau, A. (1995). Yeast multidrug resistance: The PDR network. *J. Bioenerg. Biomembr.* 27: 71-76.
- Beck-Sague, C.M. and Jarwis, W.R. (1993). Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. *J. Infect. Dis.*

- 167: 1247-1251.
- Ben-Yaacov, R., Knoller, S., Caldwell, G.A., Becker, J.M. and Koltin, Y.** (1994). *Candida albicans* gene encoding resistance to benomyl and methotrexate is a multidrug resistance gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 648-652.
- Borges-Walmsley, M.I., McKeegan, K.S. and Walmsley, A.R.** (2003). Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs. *Biochem. J.* 376: 313-338.
- Busch, W. and Saier Jr., M.H.** (2002). The transporter classification (TC) system. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 37: 287-337.
- Calabrese, D., Bille, J. and Sanglard, D.** (2000). A novel multidrug efflux transporter gene of the major facilitator superfamily from *Candida albicans* (FLU1) conferring resistance to fluconazole. *Microbiology* 146: 2743-2754.
- Conseil, G., Perez-Victoria, J.M., Jault, J.M., Gamarro, F., Goffeau, A., Hofmann, J. and Di Pietro, A.** (2001). Protein kinase C effectors bind to multidrug ABC transporters and inhibit their activity. *Biochemistry* 40: 2564-2571.
- Croop, J.M.** (1993). P-glycoprotein structure and evolutionary homologies. *Cytotechnology* 12: 1-32.
- Dahl, S.G., Sylte, I. and Westrheim-Ravna, A.** (2004). Structures and models of transporter proteins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 309: 853-860.
- Dassa, E. and Bouige, P.** (2001). The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Res. Microbiol.* 152: 211-229.
- Decottignies, A. and Goffeau, A.** (1997). Complete inventory of the yeast ABC proteins. *Nat. Genet.* 15: 137-145.
- Del Sorbo, G., Andrade, A.C., Van Nilstelrooy, J.G., Van Kan, J.A., Balzi, E. and De Waard, M.A.** (1997). Multidrug resistance in *Aspergillus nidulans* involves novel ATP-binding cassette transporters. *Mol. Gen. Genet.* 254: 417-426.
- Del Sorbo, G., Schoonbeek, H. and De Waard, M.A.** (2000). Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides. *Fungal Genet. Biol.* 30: 1-15.
- Dick, J.D., Mers, W.J. and Saral, R.** (1980). Incidence of polyene-resistant yeasts recovered from clinical specimens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 18: 158-163.
- Do Nascimento, A.M., Goldman, M.H. and Goldman, G.H.** (2002). Molecular characterization of ABC transporter-encoding genes in *Aspergillus nidulans*. *Genet. Mol. Res.* 1: 337-349.
- Do Nascimento, A.M., Goldman, G.H., Park, S., Marras, S.A., Delmas, G., Oza, U., Lolans, K., Dudley, M.N., Mann, P.A. and Perlin, D.S.** (2003). Multiple resistance mechanisms among *Aspergillus fumigatus* mutants with high-level resistance to itraconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 1719-1726.
- Elkins, C.A. and Nikaïdo, H.** (2003). 3D structure of AcrB: the archetypal multidrug efflux transporter of *Escherichia coli* likely capture substrates from periplasm. *Drug Resist. Update* 6: 9-13.
- Ferreira-Pereira, A., Marco, S., Decottignies, A., Nader, J., Goffeau, A. and Rigaud, J.L.** (2003). Three-dimensional reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* multidrug resistance protein Pdr5p. *J. Biol. Chem.* 278: 11995-11999.
- Franco, M., Montenegro, M.R., Mendes, R.P., Marques, S.A., Dillon, N.L. and Mota, G.S.** (1987). Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J. Med. Vet. Mycol.* 25: 5-15.
- Gray, C.H., Ines Borges-Walmsley, M., Evans, G.J. and Walmsley, A.R.** (2003). The *pfr1* gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* encodes a half-ABC transporter that is transcribed in response to treatment with fluconazole. *Yeast* 20: 865-880.
- Hahn, R.C. and Hamdan, J.S.** (2000). Effects of amphoterecin b and three azole derivatives on the lipids of yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 1997-2000.
- Hahn, R.C., Font's, C.J., Batista, R.D. and Hamdan, J.S.** (2002). *In vitro* comparison of activities of terbinafine and itraconazole against *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Clin. Microbiol.* 40: 2828-2831.
- Hahn, R.C., Morato Conceição, Y.T., Santos, N.L., Ferreira, J.F. and Hamdan, J.S.** (2003). Disseminated paracoccidioidomycosis: correlation between clinical and *in vitro* resistance to ketoconazole and trimethoprim sulphamethoxazole. *Mycoses* 46: 342-347.
- Higgins, C.F.** (1992). ABC transporters: From microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8: 67-113.
- Higgins, C.F.** (1995). The ABC of channel regulation. *Cell* 82: 693-696.
- Higgins, C.F.** (2001). ABC transporters: physiology, structure and mechanism - an overview. *Res. Microbiol.* 152: 205-210.
- Hyde, S.C., Emsley, P., Hartshorn, M.J., Mimmack, M.M., Gileadi, U., Pearce, S.R., Gallagher, M.P., Gill, D.R., Hubbard, R.E. and Higgins, C.F.** (1990). Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* 346: 362-365.

- Kelly, S.L., Lamb, D.C., Kelly, D.E., Manning, N.J., Loeffler, J., Herbart, H., Schumacher, U. and Einsele, H. (1997). Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol $\Delta^{5,6}$ -desaturation. *FEBS Lett.* 400: 80-82.
- Klein, I., Sarkadi, B. and Varadi, A. (1999). An inventory of the human ABC proteins. *Biochem. Biophys. Acta* 1461: 237-262.
- Klepser, M.E., Wolfe, E.J. and Pfaller, M.A. (1998). Antifungal pharmacodynamic characteristics of fluconazole and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. *J. Antimicrob. Chemother.* 41: 397-401.
- Kolaczowski, M., van der Rest, M., Cybularz-Kolaczowska, A., Soumillon, J.P., Konings, W.M. and Goffeau, A. (1996). Drugs, ionophoric peptides, and steroids as substrates of the yeast multidrug transporter Pdr5p. *J. Biol. Chem.* 271: 31543-31548.
- Kolaczowski, M., Kolaczowska, A., Luczynski, J., Witek, S. and Goffeau, A. (1998). *In vivo* characterization of the drug resistance profile of the major ABC transporters and other components of the yeast pleiotropic drug resistance network. *Microb. Drug Resist.* 4: 143-158.
- Kontoyiannis, D.P. and Lewis, R.E. (2002). Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet* 359: 1135-1144.
- Lage, H. (2003). ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. *Int. J. Antimicrob. Agents* 22: 188-199.
- Lass-Florl, C., Nagl, M., Speth, C., Ulmer, H., Dierich, M.P. and Wurzner, R. (2001). Studies of *in vitro* activities of voriconazole against *Aspergillus* hyphae using viability staining. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 124-128.
- Lee, Y.J., Hamamoto, H., Nakaune, R., Nawata, O., Makizumi, Y., Akutsu, K. and Hibi, T. (2001). Distribution of the consensus sequences of ABC transporter gene among several taxonomically distinct phytopathogenic fungi. *J. Gen. Plant Pathol.* 67: 106-110.
- Lewis, K. (1994). Multidrug resistance pumps in bacteria: Variations on a theme. *Trends Biochem. Sci.* 19: 119-123.
- Ling, V. (1997). Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 40 (Suppl.): 3-8.
- Lupetti, A., Danesi, R., Campa, M., Del Tacca, M. and Kelly, S. (2002). Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends Mol. Med.* 8: 76-81.
- Manavathu, E.K., Cutright, J. and Chandrasekar, P.H. (1999). Comparative study of susceptibilities of germinated conidia of *Aspergillus fumigatus* to various antifungal agents. *J. Clin. Microbiol.* 37: 858-861.
- Mao, W., Warren, M.S., Black, D.S., Satou, T., Murata, T., Nishino, T., Gotoh, N. and Lomovska, O. (2002). On the mechanism of substrate specificity by resistance nodulation division (RND)-type multidrug resistance pumps: the large periplasmic loops of MexD from *Pseudomonas aeruginosa* are involved in substrate recognition. *Mol. Microbiol.* 46: 889-901.
- Marichal, P., Vanden Bossche, H., Odds, F.C., Nobels, G., Warnock, D.W., Timmerman, V., Van Broeckhoven, C., Fay, S. and Pose-Larsen, P. (1997). Molecular biological characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 2229-2237.
- McGrath, J.P. and Varshavsky, A. (1989). The yeast STE6 gene encodes a homologue of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein. *Nature* 340: 400-404.
- Mordoch, S.S., Granot, D., Lebendiker, M. and Schuldiner, S. (1999). Scanning cysteine accessibility of EmrE, an H⁺-coupled multidrug transport from *E. coli*, reveals a hydrophobic pathway for solutes. *J. Biol. Chem.* 274: 19480-19486.
- Mukherjee, P.K., Chandra, J., Kuhn, D.M. and Ghannoum, M.A. (2003). Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. *Infect. Immun.* 71: 4333-4340.
- Murakami, S. and Yamaguchi, A. (2003). Multidrug-exporting secondary transporters. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13: 443-452.
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E. and Yamaguchi, A. (2002). Crystal structure of the bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* 419: 587-593.
- Nakaune, R., Adachi, K., Nawata, O., Tomiyama, M., Akutsu, K. and Hibi, T. (1998). A novel ATP-binding cassette transporter involved in multidrug resistance in the phytopathogenic fungus *Penicillium digitatum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3983-3988.
- Odds, F.C., Brown, A.J.P. and Gow, N.A.R. (2003). Antifungal agents mechanisms of action. *Trends Microbiol.* 11: 272-279.
- Pao, S.S., Paulsen, I.T. and Saier, M.H. (1998). Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 1-34.

- Paulsen, I.T., Brown, M.H. and Skurray, R.A.** (1996). Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol Rev.* 60: 575-608.
- Perfect, J.R. and Cox, G.M.** (1999). Drug resistance in *Cryptococcus neoformans*. *Drug Resist. Update* 2: 259-269.
- Podust, L.M., Poulos, T.L. and Waterman, M.R.** (2001). Crystal structure of cytochrome P450 14 α -sterol demethylase (CYP51A1) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with azole inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 3068-3073.
- Prasad, R., De Wergifosse, P., Goffeau, A. and Balzi, E.** (1995). Molecular cloning and characterization of a novel gene of *Candida albicans*, *CDR1*, conferring multiple resistance to drugs and antifungals. *Curr. Genet.* 27: 320-329.
- Restrepo, A. and Jimenez, B.E.** (1988). Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium. *J. Clin. Microbiol.* 12: 279-281.
- Rogers, B., Decottignies, A., Kolaczowski, M., Carvajal, E., Balzi, E. and Goffeau, A.** (2001). The pleiotropic drug ABC transporters from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2: 207-214.
- Saier Jr., M.H.** (2000). A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 354-411.
- San Blas, F., San Blas, G., Del Negro, G., Lacaz, C.S. and Fiorilo, A.M.** (1982). *Paracoccidioidomycosis*. Sarvier, EDUSP, São Paulo, SP, Brazil, pp. 35-38.
- San Blas, G.** (1993). Paracoccidioidomycosis and etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Med. Vet. Mycol.* 31: 99-113.
- Sanglard, D.** (2002). Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. *Curr. Opin. Microbiol.* 5: 379-385.
- Sanglard, D. and Odds, F.C.** (2002). Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect. Dis.* 2: 73-85.
- Sanglard, D., Ischer, F., Monod, M. and Bille, J.** (1997). Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of *CDR2*, a new multidrug ABC transporter gene. *Microbiology* 143: 405-416.
- Sarkadi, B., Özvegy-Laczka, C., Némethy, K. and Váradi, A.** (2004). ABCG2 - a transporter for all seasons. *FEBS Lett.* 567: 116-120.
- Schoonbeek, H.J., Del Sorbo, G. and De Waard, M.A.** (2001). The ABC transporter BcatrB affects the sensitivity of *Botrytis cinerea* to the phytoalexin resveratrol and the fungicide fenpiclonil. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14: 562-571.
- Slaven, J.W., Anderson, M.J., Sanglard, D., Dixon, G.K., Bille, J., Roberts, I.S. and Denning, D.W.** (2002). Increased expression of a novel *Aspergillus fumigatus* ABC transporter gene, *atrF*, in the presence of itraconazole in an itraconazole resistant clinical isolate. *Fungal Genet. Biol.* 36: 199-206.
- Telles, F.Q.** (2002). Treatment of patients with paracoccidioidomycosis: new insights and approaches. Presented at the VIII International Meeting on Paracoccidioidomycosis "Carlos Silva Lacaz", June 25-28, 2002, Pirenópolis, GO, Brazil. *Ann. Rev. Biomed. Sci.* (Especial issue): pp. 26-27.
- Tobin, M.B., Peery, R.B. and Skatrud, P.L.** (1997). Genes encoding multiple drug resistance-like proteins in *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*. *Gene* 200: 11-23.
- Tseng, T.T., Gratwick, K.S., Kollman, J., Park, D., Nies, D.H., Goffeau, A. and Saier, M.H.** (2003). The RND permease family: An ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1: 107-125.
- Urban, M., Bhargava, T. and Hamer, J.E.** (1999). An ATP-driven efflux pump is a novel pathogenicity factor in rice blast disease. *EMBO J.* 18: 512-521.
- Van Bambeke, F., Balzi, E. and Tulkens, P.M.** (2000). Antibiotic efflux pumps. *Biochem. Pharmacol.* 60: 457-470.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J. and Gay, N.J.** (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1: 945-951.
- Wheat, J., Marichal, P., Vanden Bossche, H., Le Monte, A. and Connolly, P.** (1997). Hypothesis on the mechanism of resistance to fluconazole in *Histoplasma capsulatum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 410-414.
- Whelan, W.T.** (1987). The genetic basis of resistance to 5-fluorocytosine in *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. *Crit. Rev. Microb.* 15: 45-56.
- White, T.C., Marr, K.A. and Bowden, R.A.** (1998). Clinical, cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 382-402.
- Zwiwers, L.H. and De Waard, M.A.** (2000). Characterization of the ABC transporter genes *MgAtr1* and *MgAtr2* from the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Fungal Genet. Biol.* 30: 115-125.