

Hugo Costa Paes

Isolamento e caracterização funcional
do fator de choque térmico (Hsf) do patógeno
termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*

Dissertação apresentada ao
Departamento de Biologia Celular da
Universidade de Brasília como
requisito parcial para a obtenção do
grau de Mestre em Biologia Molecular.

Brasília, 20 de fevereiro de 2009.

Quatro citações:

C. F. Gauss:

Nichts ist getan, wenn etwas noch zu tun bleibt.

Pauca sed matura.

W. Shakespeare:

“There is thy gold; worse poison to men’s souls, / doing more murder in this loathsome world, / than these poor compounds that thou mayst not sell: / I sell thee poison: thou hast sold me none.”

When I have seen by Time's fell hand defaced

The rich proud cost of outworn buried age;

When sometime lofty towers I see down-razed

And brass eternal slave to mortal rage;

When I have seen the hungry ocean gain

Advantage on the kingdom of the shore,

And the firm soil win of the watery main,

Increasing store with loss and loss with store;

When I have seen such interchange of state,

Or state itself confounded to decay;

Ruin hath taught me thus to ruminare,

That Time will come and take my love away.

This thought is as a death, which cannot choose

But weep to have that which it fears to lose.

Trabalhos acadêmicos são freqüentemente precedidos de citações, como acima, e de agradecimentos. Os autores dedicam particular atenção a esses dois trechos, porque é a única oportunidade que têm de escrever livremente, sem os grilhões da convenção científica.

Agradecimentos sempre me pareceram como antigos álbuns de casamento ou formatura: livros freqüentemente esquecidos a que quase nunca se retorna. O melhor registro, com todas as suas falhas, é a memória: poucos, creio eu, são capazes de reviver sentimentos ao ver uma foto antiga, ou reler uma lista de agradecimentos, a não ser em casos em que o sentimento real foi preservado na memória. Nesses casos, para que o registro pictórico ou escrito?

Minha impressão é de que, se eu fosse escrever uma lista de agradecimentos individuais, iria acabar produzindo uma peça constrangedora em que uma sucessão de nomes seria incapaz de esgotar o verdadeiro material humano sem o qual esta dissertação seria impossível. Provavelmente, eu jamais quereria ler esse trecho de novo.

E, no fundo, o esforço é inútil, pois, ao cabo de uma longa convivência em que relações de estima e afeto se desenvolvem, nenhum agradecimento é necessário. Sendo assim, ousou afirmar que

os que merecem agradecimentos, sabem disso e já o receberam na forma de meu apreço;

e os que porventura não souberem, é porque são tão abnegados com a dádiva do seu intelecto, que seria indelicado mencioná-los que tiveram muito a ver com meu êxito.

Aos desconhecidos, desejo felicidade. Aos indiferentes e maliciosos – e os há –, reservo o silêncio.

Orientadora: Professora Doutora Maria Sueli Soares Felipe

Banca Examinadora:

Professora Doutora Maria Sueli Soares Felipe (presidente)

Professor Doutor Cezar Martins de Sá

Professor Doutor Túlio César Ferreira

Professora Doutora Andréa Barretto Motoyama (suplente)

Lista de figuras.....	6
Resumo	6
Abstract.....	6
1. Introdução	7
1.1. O fator de choque térmico em fungos.....	7
1.1.1. O elemento de choque térmico e as bases moleculares da regulação pelo Hsf ..	8
1.1.2. Hsf: correlação entre estrutura molecular e função	9
1.1.3. Genes-alvos do Hsf e arquitetura refinada dos HSEs	10
1.1.4. Características estruturais exclusivas do Hsf de <i>S. cerevisiae</i>	12
1.1.5. Regulação do Hsf e considerações sobre o Hsf em fungos filamentosos	13
1.2. O fungo <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	16
1.2.1. Considerações gerais sobre fungos patogênicos.....	16
1.2.2. <i>P. brasiliensis</i> , patógeno regional.....	17
1.2.3. O Hsf em fungos termodimórficos: possibilidades.....	22
2. Objetivo geral	24
3. Objetivos específicos	24
4. Materiais e métodos	24
4.1. Considerações gerais.....	24
4.2. Extração de RNA total.....	25
4.3. Amplificação rápida de extremidades de DNA complementar (RACE).....	27
4.4. Purificação de bandas, seqüenciamento, PCR e clonagem molecular.....	27
4.4.1. Fragmentos de RACE	27
4.4.2. Seqüência codante do Hsf.....	29
4.4.3. Geração do amplicon codante do Hsf.....	30
4.4.4. Clonagem no vetor de levedura e expressão em <i>S. cerevisiae</i>	30
4.5. Contra-seleção com 5-FOA	34
4.6. Bioinformática	35
4.6.1. Análise das seqüências brutas e alinhamentos.....	35
4.6.2. Filogenia de Hsfs fúngicos	36
4.6.3. Varredura de promotores do fungo em busca de HSEs	36
5. Resultados e Discussão	37
5.1. Extração do RNA total e RACE	37
5.2. Seqüência e estrutura do Hsf	38
5.3. Filogenia do Hsf em Eurotiomycetidae	50
5.4. Clonagem do PbHsf em <i>S. cerevisiae</i>	51
5.5. Contra-seleção com 5-FOA e <i>trans</i> -complementação de <i>S. cerevisiae</i>	53
5.6. Varredura de promotores à procura de HSEs	55
6. Conclusões e perspectivas.....	59
7. Referências.....	60
8. Apêndice	69
8.1. Abreviaturas, siglas, unidades, conversões para o Sistema Internacional (SI).....	69
8.2. Soluções complexas (unidades SI, notação científica)	69
8.3. Tabela 1: oligonucleotídios.....	72
8.4. Tabela 2: genótipos das cepas de microrganismos usadas.....	73
8.5. Tabela 3: Possibilidades combinatórias de HSEs	74
8.6. ORFs categorizadas de Pb01 cujos promotores contêm HSEs.....	74

Lista de figuras

- Figura 1 – página 37
- Figura 2 – página 38
- Figura 3 – página 39
- Figura 4 – páginas de 41 a 44
- Figura 5 – páginas de 46 a 48
- Figura 6 – página 49
- Figura 7 – página 50
- Figura 8 – página 51
- Figura 9 – página 53
- Figura 10 – página 54
- Figura 11 – página 57

Resumo

O presente trabalho foi o primeiro a caracterizar o fator de choque térmico (Hsf) em um fungo patogênico para humanos. O gene de *Paracoccidioides brasiliensis* isolado 01 (Pb01) teve sua seqüência determinada e analisada por ferramentas de bioinformática. Constatou-se que os domínios regulatórios da proteína são divergentes dos de *Saccharomyces cerevisiae* e similares aos de outros membros da superclasse Eurotiomycetidae, sugerindo especialização evolutiva. O cistron do Hsf de Pb01 foi clonado num vetor episomal de expressão em *S. cerevisiae*, e a clonagem do plasmídio resultante na levedura foi capaz de resgatar a perda do gene nativo, que normalmente seria letal. Isso comprova que a proteína de *P. brasiliensis* reteve seu papel funcional. Uma varredura computacional de promotores de Pb01, em busca de elementos de resposta ao choque térmico (HSE), resultou na constatação de que uma diversidade de genes maior que a vista em levedura contém HSEs em suas regiões regulatórias, embora sejam necessários estudos funcionais para confirmar esse achado.

Abstract

This work is the first to characterise the heat shock factor (Hsf) in a fungal pathogen of humans. The gene of *Paracoccidioides brasiliensis* isolate 01 (Pb01) had its sequence determined and analysed by bioinformatics tools. Its regulatory domains are distinct from those of the Hsf from *Saccharomyces cerevisiae* and similar to those of other Eurotiomycetidae, suggesting evolutionary specialisation. The cistron of the Pb01 Hsf was cloned into an episomal expression vector for *S. cerevisiae*, and the final construct was able to rescue the otherwise lethal loss of the native gene in yeast, thus proving that the Pb01 protein retained its function. A computational screening of Pb01 promoters for heat shock

elements (HSE) showed that a greater proportion of genes contains these regulatory regions than in budding yeast. However, functional studies will be necessary to confirm this finding.

1. Introdução

1.1. O fator de choque térmico em fungos

Um dos elementos essenciais para o funcionamento dos sistemas vivos é a capacidade de resistir aos estresses ambientais. Embora isso seja mais evidente no caso de organismos unicelulares, que estão sujeitos, no seu nicho ecológico, às mínimas variações de temperatura, osmolaridade, pH e concentração de espécies reativas, as células constituintes de organismos multicelulares também se deparam individualmente com situações semelhantes que ameaçam sua homeostase metabólica.

A elevação da temperatura para além da faixa ideal é uma circunstância a que todo organismo está sujeito, principalmente os unicelulares. Os efeitos agudos incluem a perda de atividade catalítica de enzimas e danos à estrutura terciária de várias proteínas. Em casos mais extremos, a desnaturação irreversível de diversos peptídios pode comprometer o funcionamento da célula e provocar a sua morte. Além disso, períodos mais prolongados de choque térmico também provocam toxicidade oxidativa, pois é sabido que a concentração de espécies reativas também aumenta com a temperatura (Davidson *et al.*, 1996).

É natural, portanto, que mecanismos tenham sido selecionados evolutivamente para se contrapor aos efeitos deletérios do estresse térmico. Em todos os organismos, uma classe funcional de proteínas foi identificada como protagonista da recuperação pós-termoestresse agudo: as chamadas proteínas de choque térmico (Hsps; salvo menção em contrário, todos os acrônimos neste texto são ingleses). Essas proteínas, muito conservadas filogeneticamente, são normalmente expressas em níveis basais nas células, e mais intensamente quando estas são confrontadas com elevações de temperatura. Suas principais funções são proteger as células de agentes estressantes – com destaque para o choque térmico, que deu nome a essa classe de proteínas – e guiar o dobramento de peptídios (Alberts *et al.*, 2002). As Hsps desempenham suas funções de diversas maneiras: i) associando-se a proteínas de maneira a impedir a sua desnaturação; ii) impedindo que proteínas desnaturadas formem agregados citoplasmáticos que ponham em risco a integridade estrutural da célula; iii) guiando a renaturação de proteínas; e iv) quando a

renaturação for impossível, conduzindo as proteínas desnaturadas à degradação pelos proteassomas. A expressão coordenada de Hsps assegura às células a capacidade de se recuperar dos efeitos de choques térmicos moderados e transientes. Aliás, experimentos sugerem de que a hiperexpressão de Hsps pode ser deletéria (Halladay *et al.*, 1995), o que evidencia a importância de uma regulação refinada da síntese dessas proteínas.

Em eucariotos, a expressão de Hsps é coordenada eminentemente em nível transcricional. Em todos os eucariotos em que a regulação do termoestresse foi estudada, um fator de transcrição em particular foi identificado como responsável pelo aumento da expressão de Hsps em resposta ao estresse térmico (Voellmy, 2004). Trata-se do fator de choque térmico (Hsf), uma proteína cujo tamanho varia de 520 a 840 resíduos de aminoácidos, em metazoários e leveduras, respectivamente. Sua atividade foi identificada em meados dos anos oitenta (Parker & Topol, 1984), e o gene correspondente em *Saccharomyces cerevisiae* foi isolado e seqüenciado no fim daquela década (Wiederrecht *et al.*, 1988).

O Hsf foi estudado em fungos, plantas e animais. Em fungos, é encontrado em cópia única nos genomas (Sorger & Pelham, 1988), enquanto metazoários podem possuir até três cópias que codificam proteínas com funções especializadas (Voellmy, 2004). Já o vegetal *Arabidopsis* possui 21 Hsfs (Nover *et al.*, 2001). No presente trabalho, será dado ênfase ao funcionamento dos fatores de choque térmico fúngicos, tendo como protótipo as leveduras de brotamento *S. cerevisiae* e *Kluyveromyces lactis* e a levedura de fissão *Schizosaccharomyces pombe*.

1.1.1. O elemento de choque térmico e as bases moleculares da regulação pelo Hsf

A caracterização do Hsf foi acompanhada por um estudo aprofundado dos promotores que respondem a ele. Estudos de proteção contra DNase desses promotores permitiram identificar um elemento consensual comum que é reconhecido pelo fator. Essa seqüência, denominada elemento de choque térmico (HSE), consiste no pentanucleotídeo 5' nGAAn 3', tendo como ponto de referência a fita codante (Perisic *et al.*, 1989). Contudo, a presença de apenas dois HSE num determinado promotor, embora seja passível de ligar o Hsf *in vitro*, não é suficiente para colocar o respectivo gene sob o seu controle (Flick *et al.*, 1994). Estudos de adaptação de seqüências sintéticas a promotores de genes repórteres indicaram que a presença de três HSEs consecutivos, alternados entre as duas fitas (por exemplo, 5' nGAAnnTTCnnGAAn 3'), é o mínimo necessário para garantir a intensificação transcricional mediada por Hsf (revisto em Bulman *et al.*, 2001). Isso levou

à conclusão de que a proteína age na forma de homotrímero, o que foi confirmado experimentalmente (Sorger *et al.*, 1989). Esse motivo de três HSEs foi denominado HSE canônico (cHSE; revisto em Hashikawa *et al.*, 2007).

Funcionalmente, o Hsf apresenta dois tipos de cinética, de acordo com a espécie. Em *S. cerevisiae* e *K. lactis*, o fator pode ser encontrado em associação com o DNA cromossomal em todos os momentos, e sua atividade regulatória é potencializada pela presença de agentes estressantes (Jakobsen *et al.*, 1988); enquanto que, em metazoários e *S. pombe*, a proteína se encontra normalmente no citoplasma em forma monomérica e a trimerização e associação aos promotores só ocorre mediante estresse (Gallo *et al.*, 1991). No entanto, a deleção do gene é letal também em *S. pombe*, mesmo em condições de cultivo na ausência de estresse térmico, o que pode indicar que haja circunstâncias no ciclo de vida natural da levedura em que o Hsf seja necessário para desempenhar funções essenciais à célula (Gallo *et al.*, 1993)

1.1.2. Hsf: correlação entre estrutura molecular e função

Como mencionado, o Hsf é muito conservado filogeneticamente. Sua estrutura foi elucidada por cristalografia, primeiramente em *K. lactis* (Damberger *et al.*, 1995). Dados adicionais foram obtidos a partir de estudos de sua ligação a elementos promotores e a partir da análise de alinhamento computacional de seqüências de Hsfs de vários organismos, conforme se discutirá a seguir. O consenso funcional aponta para alguns elementos conservados na seqüência da proteína. O mais conhecido deles é um domínio de ligação ao DNA (DBD) (Nieto-Sotelo *et al.*, 1990) do tipo hélice-volta-hélice, com cerca de noventa resíduos de extensão e responsável pelo reconhecimento do HSE nas regiões promotoras dos genes regulados por Hsf. Em *S. cerevisiae*, a partir de estudos de mutagênese, detalhou-se o papel de resíduos individuais nas interações com os nucleotídeos do sítio de reconhecimento, revelando-se a importância, por exemplo, dos resíduos serina-225 e glutamina-228 na terceira hélice do DBD (Hubl *et al.*, 1994; Torres *et al.*, 1995). Outros estudos apontaram para a necessidade de o HSE se localizar na fenda larga da dupla hélice para que o Hsf possa reconhecê-lo (Flick *et al.*, 1994). Destaca-se ainda, no DBD, a presença de uma hélice alar, configurando um motivo comum a vários fatores de transcrição (Gajiwala, 2000; Cicero *et al.*, 2001).

Além do DBD, são conservados em todos os eucariotos dois outros domínios: uma região regulatória (RR) de noventa resíduos com estrutura de zíper de leucina logo a jusante do DBD, e que é responsável pela trimerização do Hsf mediante ativação (Bonner

et al., 1992); e uma região de setenta resíduos amino-terminais (AR1), que é responsável pela ativação transcricional de genes que possuam cHSE em seus promotores (Bulman *et al.*, 2001). Essa ativação, cujo protótipo é o gene da Hsp70 SSA2 de *S. cerevisiae* (Hjorth-Sørensen *et al.*, 2001), se dá de modo transitente: mediante choque térmico, ocorre um aumento rápido dos níveis de Hsps durante um período de cerca de meia hora, após o que ocorre uma atenuação de resposta mesmo na vigência continuada do termoestresse. Os níveis de Hsps caem para um platô intermediário entre os valores basais e o pico de expressão e permanecem nesse patamar até que o estímulo cesse (Bulman *et al.*, 2001).

Leveduras, por só possuírem um Hsf, contrastam com os demais organismos. Enquanto em metazoários, a presença de vários Hsfs garantiu a especialização de cada um deles (Voellmy *et al.*, 2004), em leveduras uma proteína evoluiu para compreender toda a diversidade de resposta aos diferentes tipos de estresse. Isso se reflete na presença, nos Hsfs de leveduras, de domínios estruturais adicionais que, como se verá a seguir, conferem-lhes propriedades singulares.

O mais bem estudado desses domínios funcionais extras é o domínio de ativação carbóxi-terminal (AR2). Contendo cerca de duzentos resíduos, essa região é responsável pela chamada resposta sustentada ao estresse (Nieto-Sotelo *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1993). Para que se compreenda esta modalidade regulatória do Hsf de leveduras, será necessário discutir os seus genes-alvos.

1.1.3. Genes-alvos do Hsf e arquitetura refinada dos HSEs

A investigação de proteínas que respondem à ativação do Hsf apontou desde o início para a existência de outros genes-alvos que não as Hsps. Observações que sustentavam essa hipótese incluíam a letalidade do genótipo *hsf1* em *S. cerevisiae*, mesmo que as tentativas experimentais de ruptura gênica se dessem em temperaturas nas quais não havia indução significativa de Hsps (Sorger & Pelham, 1988). Experimentos de eletroforese bidimensional de proteínas indicaram a presença de dezenas de genes regulados por Hsf em *S. cerevisiae* (Boy-Marcotte *et al.*, 1999). Posteriormente, estudos de imunoprecipitação de cromatina estimaram que até três por cento do genoma codante de *S. cerevisiae* estão parcial ou integralmente sob o controle de Hsf (Hahn *et al.*, 2004). Ao mesmo tempo, descobriu-se que alguns genes eram ativados pelo Hsf mediante outras formas de estresse que não o térmico. Essas compreendiam a privação de glicose (Tamai *et al.*, 1994), a exposição a metais pesados como cobre e cádmio (Sewell *et al.*, 1995) e a indução de estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio (Liu e Thiele, 1996). Uma

observação importante foi de que o Hsf não percebe a temperatura absoluta, e sim a variação súbita entre dois patamares de incubação (Hjorth-Sørensen *et al.*, 2001).

Curiosamente, apesar de o gene ser essencial em *S. cerevisiae* (e, presumivelmente, em outros eucariotos unicelulares), é controverso o quanto ele é necessário para a termotolerância. Alguns estudos iniciais mostraram que mutações termossensíveis não resultaram em perda da resistência ao choque térmico agudo (Smith e Yaffe, 1991), enquanto publicações posteriores mostram o contrário (Nwaka *et al.*, 1996). Essas últimas, associada aos estudos que sugerem que as Hsps são muito mais importantes para o choque térmico abrupto do que para o estresse sustentado (Davidson *et al.*, 1996), estão de acordo com a constatação de que a hiper-expressão de Hsps apresenta um pico transiente de resposta, e que outros fatores seriam responsáveis pela termotolerância prolongada (Davidson *et al.*, 1996).

O estudo de promotores ainda revelou que muitos dos genes responsivos ao Hsf possuem elementos de resposta a outros fatores em suas regiões regulatórias; dentre esses se destacam os elementos de resposta padrão ao estresse (STREs), que, em leveduras, são controlados na vigência de estresse oxidativo pelas proteínas Msn2 e Msn4. De fato, há cooperatividade entre esses dois fatores e o Hsf na regulação da resposta ao estresse oxidativo e, em menor escala, ao térmico (Amorós & Estruch, 2001). Do mesmo modo, descobriu-se que as Hsps possuem níveis de expressão basal determinada pela associação constitutiva do Hsf, em níveis baixos, aos seus elementos promotores e que a associação constitutiva de Hsf aos promotores é complementada pela associação deste mesmo fator em condição de estresse (Hahn *et al.*, 2004).

Um maior refinamento das investigações permitiu a divisão inicial de genes responsivos ao Hsf em dois grandes grupos. Os de resposta ao termoestresse agudo, transitória, que compreendiam principalmente as chaperonas clássicas (famílias Hsp70, Hsp104 e pequenas chaperonas, como Hsp12 e Hsp26), dependem essencialmente da ação do domínio N-terminal do Hsf (Sorger *et al.*, 1990). Outro grupo, que compreende as proteínas da família Hsp90 (genes *HSP82* e *HSC82* em *S. cerevisiae*) e o gene da metalotioneína de *S. cerevisiae* (*CUP1*), que é induzido tanto de forma transitória quanto sustentada (Tamai *et al.*, 1994) e depende da presença de uma AR2 funcional (Santoro *et al.*, 1998). Na verdade, a região carbóxi-terminal do Hsf de *S. cerevisiae* possui atividade regulatória independente do restante da proteína, o que foi demonstrado pela construção de quimeras usando DBDs de outros fatores de transcrição fusionados a AR2; essas quimeras

eram capazes de comandar a expressão em altos níveis de genes-alvos naturais dos fatores de transcrição doadores dos DBDs (Nieto-Sotelo *et al.*, 1990).

Os promotores do segundo grupo foram estudados em comparação com os do primeiro. Um estudo (Santoro *et al.*, 1998) mostrou, no caso do promotor de *CUP1*, alterações do espaçamento entre dois HSEs canônicos e um HSE não-canônico e atribuiu a essa arquitetura peculiar a resposta diferenciada do gene da metalotioneína ao estresse oxidativo, mediada por Hsf. Ao mesmo tempo, descobriram-se, no promotor de *HSP82*, grupos de HSEs não-canônicos (ncHSEs) que parecem atuar de maneira sinérgica com o grupo principal, o que explicaria a resposta diferenciada (Erkine *et al.*, 1999). Ao se estenderem os estudos para outros promotores, compreendeu-se que, em muitos casos, um cHSE bastaria para garantir a associação constitutiva do Hsf e níveis basais de expressão. Já os ncHSEs seriam responsáveis pelo componente induzível da regulação, ao recrutarem trímeros extras mediante estímulo (revisado em Hashikawa *et al.*, 2007).

Mesmo a identificação dos ncHSEs de Hsp90 e de *CUP1* não bastou para esclarecer a resposta dos genes-alvos ao Hsf em leveduras. O estudo de chaperonas mitocondriais levou à identificação de um novo ncHSE ligado à Hsp do gene *MDJ1* (Tachibana *et al.*, 2002). Este também depende de AR2 para disparar a transcrição dos genes-alvos mediante indução, mas possui uma arquitetura completamente diferente, com espaçamentos entre os HSEs individuais de até quinze nucleotídeos. Finalmente, os estudos de imunoprecipitação identificaram, de maneira fidedigna e reprodutível, promotores a que o Hsf se liga mediante termoestresse, sem que se tenham identificado HSEs de qualquer espécie (Hahn *et al.*, 2004). Outra evidência para papéis mais amplos do Hsf e de seus genes-alvos foi a constatação de que a deleção do domínio AR2 em *S. cerevisiae* resultava em parada da progressão do ciclo celular, tanto em G₁ como em G₂, num processo marcado pelo surgimento de formas de brotamento anômalas e distúrbios citoesqueléticos bem documentados (Zarzov *et al.*, 1997). Claramente, o mecanismo de associação do Hsf aos promotores das diferentes classes de genes regulados ainda não se encontra completamente elucidado.

1.1.4. Características estruturais exclusivas do Hsf de *S. cerevisiae*

O estudo da regulação de genes com ncHSEs permitiu a identificação de outros domínios funcionais no Hsf de *S. cerevisiae* que haviam escapado aos estudos iniciais (compilado em Sakurai *et al.*, 2001). Hoje se sabe que a regulação de AR1 e AR2 depende de um heptapeptídeo hidrofóbico e rico em leucinas, chamado CE2. Este se encontra entre

RR e AR2, e modula o estado de fosforilação de uma seqüência de serinas adjacente a ele (Høj & Jakobsen, 1994). Constatou-se que mutações em CE2 ou na cadeia de serinas provocam hiperativação transcricional nos genes-alvos, não apenas mediante estresse térmico, mas com relação aos níveis basais na incubação sob temperaturas permissivas. A mutação dupla L_{452/4}→A gera um dos mutantes de Hsf com maior atividade intrínseca (Høj & Jakobsen, 1994).

Finalmente, a região carbóxi-terminal extrema (CTM) (Sakurai *et al.*, 2001) do Hsf de *S. cerevisiae* foi identificada como um novo domínio regulatório do Hsf, responsável essencialmente pela regulação de genes possuidores de ncHSEs nas regiões promotoras. Surpreendentemente, nessa classe de genes-alvos, a eliminação da CTM provoca reduções mais dramáticas na expressão induzida por termoestresse do que a deleção de AR2.

Assim, o estudo das relações estruturais dos domínios conservados do Hsf culminou num modelo modular de regulação, em que as regiões funcionalmente discretas mantêm ao mesmo tempo independência funcional – controlando conjuntos de genes diferentes de acordo com a arquitetura dos seus promotores – e regulação mútua do seu estado de ativação (Bonner *et al.*, 2000a). Conjetura-se que as regiões não conservadas dos Hsfs sejam conectores flexíveis entre os domínios estruturalmente organizados, o que é sustentado por estudos de dicroísmo circular (Flick *et al.*, 1994). No entanto, estudos de mutagênese do Hsf de *S. cerevisiae* sugerem uma grande diversidade de associações estruturais na proteína nativa, que variam de acordo com os estímulos fornecidos (Bulman *et al.*, 2001).

1.1.5. Regulação do Hsf e considerações sobre o Hsf em fungos filamentosos

Se Hsf regula a resposta a vários tipos de estresse, quem modula a atividade da proteína Hsf? Não é uma pergunta simples. Estudos de co-eluição, associados à identificação de regiões consensuais para outros fatores de transcrição nos promotores de genes alvos (Amorós & Estruch, 2001), sugerem que Hsf pode se associar a uma diversidade de proteínas. Os primeiros logo identificaram uma possível associação *in vitro* entre Hsf e Hsp70 de *S. cerevisiae* (Bonner *et al.*, 2000b). Durante alguns anos, isso serviu de base para um modelo de regulação segundo o qual Hsps se manteriam associadas ao Hsf na ausência de estímulo (Hjorth-Sørensen, 2001). Uma vez presente um agente estressante, mudanças conformacionais mobilizariam as Hsps, desfazendo o complexo e permitindo que o Hsf se associasse aos promotores-alvos, ativando a transcrição de genes de resposta ao estresse, incluindo as próprias Hsps. O aumento da concentração dessas

últimas constituiria um arco de retroalimentação, uma vez que elas se reassociariam ao Hsf e responderiam pela atenuação da resposta que é observada em um estresse prolongado.

No entanto, esse modelo inicial se revelou insatisfatório por diversos motivos: i) ele não incorpora a regulação mais refinada dada pelos ncHSEs; ii) observações cuidadosas provaram que alguns genes têm pico de ativação em temperaturas diferentes [por exemplo, em *S. cerevisiae*, *CUPI* tem ativação máxima a 39 °C, enquanto que, para as Hsps, ela ocorre a 37 °C (Tamai *et al.*, 1994)]; iii) a hiperexpressão constitutiva de Hsp70 ou Hsp90 não eleva a temperatura de evocação de choque térmico, como seria de se esperar se esse modelo fosse correto (Hjorth-Sørensen, 2001); iv) a mesma hiperexpressão não diminuiu a afinidade do Hsf pelos HSEs em experimentos de retardo de mobilidade eletroforética (EMSA; Hjorth-Sørensen, 2001).

Apesar de descartado para leveduras, o modelo de retroalimentação é válido para os Hsfs de metazoários. Avanços significativos nos últimos anos permitiram identificar um complexo multiprotéico formado por Hsf, Hsp90 e p23 em células de mamíferos, que seria responsável por manter o Hsf seqüestrado no citoplasma enquanto não houvesse estímulo à dissociação, na forma de um agente estressante (Voellmy, 2004).

Em linhas de investigação alternativas, obtiveram-se alguns resultados com respeito à modificação covalente do Hsf – no caso, a fosforilação. Além da observação de que a fosforilação das serinas associadas ao CE2 é necessária para retornar o Hsf a um estado inativo após o estímulo inicial (Høj & Jakobsen, 1994), outros estudos mostraram que a proteína é fosforilada também durante a ativação (Liu & Thiele, 1996), e que as diferentes formas de estresse a que o Hsf responde se manifestam em padrões diferenciais de fosforilação. Em *S. cerevisiae*, constatou-se que a ativação do Hsf mediada por privação de glicose carecia da ação da cinase Snf1 e de seu cofator Snf4 para regular a expressão de *CUPI* (Tamai *et al.*, 1994). Curiosamente, um estudo do mesmo promotor revelou que a sua ativação por Hsf dependia da ação do complexo formado pela glicogênio sintase fosfatase Glc7 e seu cofator Gac1 (Lin & Lis, 1999). Os resíduos exatos que são modificados por esses complexos não foram identificados, mas, no caso da fosfatase, sabe-se que eles se encontram na região que vai da segunda metade do DBD à primeira da RR, e que possuem funções repressoras (Lin & Lis, 1999).

Nenhuma via de transdução de sinal foi até agora identificada como responsável pela modulação de Hsf em fungos. No entanto, uma das proteínas ativadas por ele, a Hsp90, é notória moduladora de vias de transdução de sinal em eucariotos, e já se sabe que

muitos genes hiperexpressos como resposta ao choque térmico, mas a cujos promotores o Hsf aparentemente não se liga, são na verdade clientes de vias de transdução de sinal modulada por Hsp90, como a via de integridade de parede celular mediada por cinases ativadas por mitógenos (MAP cinases; Truman *et al.*, 2007). Ou seja, combinando estudos de expressão gênica com imunoprecipitação, evidencia-se que uma fração ainda maior de genes pode responder à ativação do Hsf. É digno de nota que, em *S. cerevisiae*, alguns poucos genes parecem ter sua expressão reduzida em resposta ao estresse térmico mediada pelo Hsf (Hahn *et al.*, 2004).

Como o Hsf percebe a presença de agentes estressantes é, portanto, uma questão em aberto no caso de leveduras e fungos. Embora não se possa descartar por completo a ação de Hsps como sinalizadoras (Duina *et al.*, 1998), a discussão acima indica que tal modo de regulação é improvável. Hipóteses variam desde a percepção direta de alterações na fluidez das membranas celulares até a participação de alguma das vias de transdução de sinal descritas nesses organismos. Naturalmente, é provável que se trate de uma resposta multifatorial. Vale lembrar que os HSEs não são os únicos elementos regulatórios presentes nos genes-alvos, e que Hsf pode ser modulado por outros fatores de transcrição. Pelo menos um relato sugere que HSEs podem ser reconhecidos por outra proteína, chamada Skn7 (Raitt *et al.*, 2000), que guarda semelhanças estruturais marcantes com Hsf, principalmente no DBD. De fato, na vigência de estresse oxidativo, a expressão de Hsps depende de uma Skn7 funcional, que nesse caso é quantitativamente mais importante do que do Hsf. Tanto o Hsf quanto a Skn7 são capazes de se oligomerizar, e é concebível que tanto hetero- quanto homo-oligômeros ocorram *in vivo* (Raitt *et al.*, 2000).

Em fungos filamentosos, há apenas dois estudos envolvendo o Hsf, ambos em *Neurospora crassa*. Uma análise computacional identificou possíveis HSEs no promotor da glicogênio sintase, e se verificou por EMSA que proteínas nucleares se ligam ao citado promotor mediante choque térmico (Freitas & Bertolini, 2004), embora, é claro, não se possa afirmar categoricamente que o Hsf – que está presente no genoma desse fungo – seja uma dessas proteínas. Um estudo mais amplo (Meyer *et al.*, 2000) procurou observar a atividade de ligação de extratos protéicos de *N. crassa* a um cHSE sintético, o que é indicativo de atividade do Hsf. Várias condições foram induzidas para a obtenção de extratos protéicos para EMSA: crescimento vegetativo em temperatura permissiva, choque térmico breve ou prolongado, germinação de conídios e forma de hifa aérea. Somente na última não se observou retardo eletroforético apreciável. Em algumas condições, observaram-se duas bandas de retardo, o que os autores interpretaram como sinal de

modificação covalente – provavelmente fosforilação – sobre uma fração das proteínas. Concluiu-se que, em *N. crassa*, a atividade do Hsf lembra mais a de *S. cerevisiae* do que a de *S. pombe* ou metazoários. Nada se sabe sobre a arquitetura de HSEs, o número de genes-alvos, o papel de cofatores ou a responsividade a outras formas de estresse em *N. crassa* ou em qualquer outro fungo filamentosos. Nada se sabe sobre Hsfs em fungos dimórficos.

1.2. O fungo *Paracoccidioides brasiliensis*

1.2.1. Considerações gerais sobre fungos patogênicos

Fungos são agentes infecciosos bem conhecidos, que vitimam milhares de pessoas anualmente. As micoses podem ser divididas em sistêmicas ou superficiais (como, respectivamente, a histoplasmose e as dermatofitoses), primárias ou oportunistas (blastomicose e criptococose), cosmopolitas ou endêmicas (candidíase e coccidioidomicose). Previsivelmente, as apresentações clínicas podem variar desde infecções benignas como as dermatofitoses até graves quadros disseminados com altos índices de morbimortalidade, como a meningoencefalite criptocócica em aids. Os agentes causadores de micoses em humanos se distribuem por vários filos, mas a maioria dos agentes sistêmicos, causadores dos quadros clínicos mais graves e de maior interesse para este trabalho, encontra-se entre os ascomicetos (*Cryptococcus neoformans*, um basidiomiceto, é uma exceção).

No estudo das micoses humanas, são de particular interesse os fungos dimórficos. Estes se distinguem por apresentarem duas fases morfológicas bem distintas: micélio e levedura, somente uma das quais é patogênica (Rappleye & Goldman, 2006). Grande parte dos ascomicetos causadores de micoses sistêmicas é dimórfica (uma exceção é *Aspergillus fumigatus*, que só ocorre como micélio). O mais importante clinicamente é *Candida albicans*, o comensal oportunista e cosmopolita cujo biofilme miceliano é responsável pela maioria dos casos de candidíase grave. No entanto, a maioria dos ascomicetos dimórficos e patogênicos, que se discutirá em maior detalhe a seguir, não é comensal, e sim de vida livre, e ocorre à temperatura ambiente (de 22 a 25 °C) na forma de micélio (Rappleye & Goldman, 2006). Essas formas, tidas normalmente como saprofitas, são, porém, capazes de liberar propágulos na forma de fragmentos de hifa ou esporos, que podem ser inalados por humanos, ou neles inoculados através de soluções de continuidade na pele ou em mucosas. Uma vez em contato com o corpo humano, a nova temperatura de 36 a 37 °C

induz uma reprogramação morfogenética que resulta no desenvolvimento da forma patogênica, neste caso leveduriforme (Rappleye & Goldman, 2006); a transição dimórfica é reversível (pela incubação da levedura à temperatura ambiente) e pode ser induzida *in vitro*. Os fungos que apresentam esse comportamento constituem o grupo dos ascomicetos termodimórficos, cujos principais membros são: *Blastomyces dermatitidis*, os gêneros *Coccidioides* e *Paracoccidioides*, *Histoplasma capsulatum*, *Penicillium marneffei* e *Sporothrix schenckii* (Rappleye & Goldman, 2006). Todos pertencem ao subfilo Pezizomycotina, embora diverjam quanto à classe (Fitzpatrick *et al.*, 2006; Bagagli *et al.*, 2006; Yuen *et al.*, 2003; Guarro *et al.*, 1999).

Os ascomicetos termodimórficos têm muito em comum quanto aos quadros clínicos que evocam (Rappleye & Goldman, 2006). Invariavelmente, trata-se de doenças granulomatosas de evolução crônica, com tendência a deixar seqüelas incapacitantes. Em função da via de entrada predominantemente inalatória, o principal órgão afetado é o pulmão, mas pode ocorrer disseminação sistêmica por via hemolinfática, com acometimento visceral e de linfonodos (Rappleye & Goldman, 2006). Fenômenos inflamatórios podem potencializar o quadro. O tratamento é com antifúngicos sistêmicos, prolongado, sujeito a problemas de toxicidade medicamentosa e, no caso de alguns patógenos, recidivas tardias são freqüentes. Embora muitos deles sejam patógenos primários, outros são oportunistas e mais agressivos em pacientes cronicamente imunocomprometidos. A associação entre *H. capsulatum* e a síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS) é bem conhecida (Rappleye & Goldman, 2006).

1.2.2. *P. brasiliensis*, patógeno regional

O ascomiceto termodimórfico *P. brasiliensis* pertence à classe Eurotiomycetes, subclasse Eurotiomycetidae, ordem Onygenales (Bagagli *et al.* 2006). A posição dele dentro dos Onygenales é algo controversa, não menos pelo fato de se tratar de um fungo mitospórico sem fase sexuada identificada até o momento. Embora originalmente classificado na família Onygenaceae, há um consenso filogenético emergente em posicioná-lo junto com *B. dermatitidis* e *H. capsulatum* na família Ajellomycetaceae, que incluiria a espécie-irmã *Lacazia loboi* (M. Teixeira, *Mol. Phyl. Evol.*, artigo em fase de revisão).

P. brasiliensis é responsável pela paracoccidioidomicose (PCM) (Brummer *et al.*, 1993). Antigamente chamada de blastomicose sul-americana, trata-se de uma micose sistêmica primária endêmica na região que se estende do México à Argentina, com maior

incidência no Brasil (80% dos casos) e na região andina (Brummer *et al.*, 1993). O fungo foi primeiro isolado por Adolfo Lutz em 1908. Estima-se que dez milhões de pessoas estejam infectadas, das quais cerca de duzentas mil desenvolverão a doença em algum momento de suas vidas (Felipe *et al.*, 2005b).

A PCM não foge ao protótipo de micose causada por ascomicetos termodimórficos descrito acima (Brummer *et al.*, 1993). O espectro clínico pode variar de formas benignas, em que o fungo é contido num granuloma primário pelo hospedeiro através de uma resposta imune celular do tipo Th1 e o paciente evolui para a cura espontânea; e formas progressivas de doença, acompanhadas por evocação de resposta Th2 ineficiente e marcadas pela disseminação do fungo no parênquima pulmonar e para outros sítios de infecção no organismo. O desfecho clínico nesses casos, na ausência de tratamento, é fatal.

Apesar do quadro clínico semelhante, há distinções marcantes entre *P. brasiliensis* e os outros ascomicetos termodimórficos (Brummer *et al.*, 1993). A principal diz respeito ao fato de que *P. brasiliensis* é o único fungo a apresentar tropismo sexual, na medida em que causa doença preferencialmente em homens. A proporção de pacientes infectados masculinos e femininos chega a 150:1 segundo algumas estimativas (Brummer *et al.*, 1993). Descontadas as mulheres infectadas fora da idade fértil, a taxa pode ser ainda maior, o que levou desde cedo os investigadores a supor que algum dos hormônios sexuais exerceria ação negativa sobre o fungo. De fato, os estrógenos são capazes de inibir a transição dimórfica para a fase de levedura *in vitro*, sendo que a ação mais forte é a do 17 β -estradiol (Aristizábal *et al.*, 2002). Supõe-se que a resistência de mulheres férteis decorreria do fato de que, sendo incapaz de se transformar em levedura no organismo feminino, o fungo não poderia colonizá-las (Aristizábal *et al.*, 2002). Entretanto, dados experimentais recentes lançam dúvidas sobre essa hipótese (L. F. Matos, comunicação pessoal).

Como enunciado acima, a PCM, ao contrário da histoplasmose e da penicilose, mas de modo semelhante à blastomicose, não é oportunista e, embora casos em aidéticos tenham sido notificados, a doença não figura entre as grandes causas de mortalidade nesses pacientes (Brummer *et al.*, 1993). Porém, preocupa o fato de que a ocorrência seja grande em homens jovens da zona rural, em razão da incapacitação provocada pelas seqüelas, tais como fibrose pulmonar restritiva.

A prevalência rural provavelmente se explica pelo nicho ecológico do fungo (Brummer *et al.*, 1993). Embora este não tenha sido elucidado de maneira inequívoca, são fortes as evidências de que *P. brasiliensis* seja um habitante do solo, e que a infecção se dê

pela inalação casual de propágulos. O fungo também já foi recuperado de tatu (*Dasypus novemcinctus*; Bagagli *et al.*, 1998), um animal que também desenvolve PCM. Não há registro de transmissão inter-individual (Brummer *et al.*, 1993).

Ainda não há consenso sobre qual propágulo, fragmento de hifa ou esporo, seja o principal responsável pela endemia. Vários isolados de *P. brasiliensis* foram obtidos a partir de pacientes, tatus ou amostras de solo, e alguns deles se mostram totalmente refratários a experimentos de indução de conidiação *in vitro* (Terçarioli *et al.*, 2007), o que sugere que alguns isolados possuam peculiaridades morfológicas distintas.

A biologia molecular de *P. brasiliensis* tem sido objeto de investigação, não apenas por sua importância clínica como mais importante micose sistêmica da América Latina, mas também como forma de compreender as micoses profundas como um todo e como modelo de infecções granulomatosas. Avanços recentes incluem a decodificação do transcriptoma diferencial das fases de levedura e micélio e (Felipe *et al.*, 2003, 2005a; Nunes *et al.*, 2005), mais recentemente, a elucidação do genoma cromossomal de um dos isolados do fungo (ainda não publicado; porém, disponível para consulta no endereço virtual

http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html).

Discutir-se-ão a seguir essas conquistas em detalhe.

Três são os isolados geneticamente mais bem estudados de *P. brasiliensis*: Pb01, Pb18 e Pb03. Os dois primeiros foram alvos de estudos de expressão diferencial (Felipe *et al.*, 2003, 2005a; Nunes *et al.*, 2005), e, no caso de Pb01, atingiu-se uma cobertura de mais de 80% dos mRNAs produzidos pelo fungo nas fases de micélio e levedura (Felipe *et al.*, 2005a); Pb18, por sua vez, é padrão para estudos de virulência e imunidade (Nunes *et al.*, 2005). Pb03, apesar de menos proeminente nos estudos de transcriptômica e microarranjo, foi incluído no projeto de seqüenciamento do genoma cromossomal e mitocondrial de *P. brasiliensis*, por representar um terceiro grupo de espécie filogenética (Matute *et al.*, 2006). Esse projeto, atualmente em curso no Instituto Broad nos EUA, em colaboração com universidades brasileiras, seqüenciou os três isolados e liberou os primeiros relatórios de montagem e anotação (vide endereço eletrônico acima).

Os estudos de transcriptômica em Pb01 e Pb18 revelaram, como esperado, o grande grau de reprogramação metabólica que o fungo sofre em resposta à mudança de temperatura que deflagra a transição dimórfica (Felipe *et al.*, 2005a; Nunes *et al.*, 2005). Ao se compararem as fases estanques de levedura e micélio cultivadas *in vitro*, identificaram-se não apenas genes diferencialmente expressos responsáveis pelos

processos morfogenéticos que têm lugar em outros ascomicetos termodimórficos, como também genes únicos de *P. brasiliensis*, cuja função ainda está por ser elucidada. Surpreendentemente, o transcrito mais expresso de *P. brasiliensis* é um RNA longo não codificador, um achado sem precedentes (Felipe *et al.*, 2005a). Outros genes regulados são notórios fatores de virulência, como o gene da alfa-glucana sintase, cujo papel na evasão de fungos ao sistema imunitário do hospedeiro humano já é bem conhecido (Rappleye *et al.*, 2007). A identificação de transcritos diferenciais da fase patogênica de levedura, tais como enzimas exclusivas do ciclo do glioxilato (Felipe *et al.*, 2005a; Arraes *et al.*, 2005) e enzimas de combate ao estresse oxidativo (Campos *et al.*, 2005), dá uma idéia do grau de reprogramação sofrido pelo transcriptoma do fungo.

A partir dos dados compilados dos estudos de transcriptoma, análises de expressão diferencial baseada em microarranjo e PCR quantitativo foram levadas a cabo com o intuito de identificar genes regulados mediante situações que simulassem melhor o processo de infecção do que a incubação *in vitro*. Experimentos de expressão *ex vivo* mediante co-incubação com macrófagos murinos ou com plasma humano identificaram muitos genes que se presume serem diretamente envolvidos com a virulência do fungo e a evasão à resposta imune do hospedeiro (Tavares *et al.*, 2007; Bailão *et al.*, 2007).

Além dos estudos amplos de genômica funcional, já está em curso a dissecação de vias de sinalização individuais, ainda que em estádios iniciais. O exemplo mais marcante dessa linha de análise é a avaliação recente do papel das proteínas Ras no ciclo de vida de *P. brasiliensis* (Fernandes *et al.*, 2008). No entanto, algumas dificuldades experimentais começam a impor um pesado fardo a avanços no sentido de compreender melhor a biologia do fungo, dificuldades que podem perdurar mesmo após a elucidação dos genomas cromossomais dos isolados citados acima.

Em primeiro lugar, informações elementares para o estabelecimento de protocolos clássicos de ruptura gênica ainda são desconhecidos em *P. brasiliensis*. A ploidia do fungo, cujo conhecimento é essencial para experimentos de ruptura por recombinação, ainda enseja controvérsia entre micologistas, embora evidências contundentes existam de que a maior parte das células de vários isolados seja haplóide na maior parte do tempo (Almeida *et al.*, 2007a). Na verdade, ainda não se identificou uma forma diplóide de *P. brasiliensis* de maneira inequívoca. No entanto, há evidências de que o fungo possua um ciclo sexual, dadas pela identificação de homólogos de genes envolvidos com cruzamento nos estudos de genômica e pela evidência utilizando bioinformática de eventos de recombinação durante o processo de especiação do fungo (Matute *et al.*, 2006; Teixeira *et*

al., manuscrito em fase de revisão). É claro, a própria existência de um assexualismo perfeito em seres vivos ainda é controversa, em razão dos obstáculos apresentados pela língua Mulleriana (Butcher, 1995). Este é um termo que sintetiza um modelo de evolução molecular que postula a obrigatoriedade da ocorrência de eventos recombinacionais dentro de uma mesma espécie, mesmo que infreqüentes, como salvaguarda contra o acúmulo irreversível de mutações deletérias nas progênes. O corolário desse modelo é a obrigatoriedade do sexo em organismos celulares. Fungos que se pensava serem estritamente assexuais tiveram ciclos meióticos descritos recentemente, como o patógeno humano *Aspergillus fumigatus* (O’Gorman *et al.*, 2009).

A propósito de especiação, outro problema que se avizinha é a iminente reclassificação de *P. brasiliensis* como um conjunto de espécies aparentadas e pouco distinguíveis morfológicamente ou quanto à doença que causam de maneira semelhante à separação de *C. posadasii* de *C. immitis*, mas possivelmente de maneira ainda mais drástica, visto que *P. brasiliensis* pode corresponder a um conjunto de mais de três espécies crípticas (Matute *et al.*, 2006; M. Teixeira, manuscrito em fase de revisão). Isso significa que muito do que se sabe sobre o fungo poderá ter que ser reavaliado para cada uma das novas espécies. Algumas observações experimentais já sugeriam essa possibilidade, como a aparente ausência de esporulação em alguns isolados (vide acima), graus de virulência distintos e constatado isolamento geográfico de alguns grupos de isolados (Matute *et al.*, 2006).

Finalmente, o maior problema a ser confrontado no que se refere a *P. brasiliensis* é a dificuldade de se manipular o seu genoma. O fungo foi, durante muitos anos, refratário a estratégias de transformação, e mesmo o protocolo mais eficaz em fungos filamentosos, pelo uso da bactéria *Agrobacterium tumefaciens*, é de implementação laboriosa, reprodutibilidade variável e resultados insatisfatórios para estudos de mutagênese insercional (discutido em Almeida *et al.*, 2007b), além de não poder ser acoplado, neste fungo, a um estudo de ligação gênica por cruzamentos para exclusão de mutantes pleiotrópicos e não ter sido ainda usado com sucesso para inserção homóloga.

Em suma, *P. brasiliensis* tem se revelado tão renitente às tentativas de manipulação por engenharia genética que, com poucas exceções, todas as evidências funcionais de que se dispõe sobre genes desse fungo são indiretas, seja por analogia com outros ascomicetos dimórficos mais maleáveis, seja por estudos de taxa de expressão. É razoável supor que, para reverter esse quadro, os seguintes obstáculos tenham que ser vencidos: o desenvolvimento de mecanismos de deleção ou silenciamento gênicos reproduzíveis,

padronizados, eficientes e confiáveis, tanto para análises por inserção em massa, quanto para estudo de genes individuais pré-selecionados; a determinação inequívoca da ploidia dos isolados (ou espécies) mais importantes e a padronização de mecanismos para obter e purificar – se possível – conídios (úteis por serem haplóides e uninucleados) para eles; e o desenvolvimento de sistemas de expressão para o fungo.

Este último item, não discutido acima, revolve em torno do parco conhecimento disponível sobre promotores e fatores de transcrição em *P. brasiliensis*. Os poucos trabalhos publicados sobre transformação de *P. brasiliensis* para expressão de genes heterólogos usaram promotores de outros fungos selecionados por seu uso prévio, e que fortuitamente se revelaram funcionais neste. Na verdade, os promotores *cpc* de *Neurospora crassa* e *gpd* de *Aspergillus nidulans* são os únicos a terem sido validados como funcionais para *P. brasiliensis* (Soares *et al.*, 2005; Leal *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2007b). Em breve, a partir do conhecimento do genoma cromossomal, promotores do próprio fungo poderão ser usados para esses estudos, com a possibilidade de se escolher a intensidade de produção do transcrito desejado. No entanto, ainda resta estudar melhor os fatores de transcrição de *P. brasiliensis*, sobre os quais nada é sabido, no que o fungo não difere muito dos outros ascomicetos termodimórficos. Dessa necessidade surgiu a motivação para o presente projeto.

1.2.3. O Hsf em fungos termodimórficos: possibilidades

Conforme descrito na introdução, o Hsf é um regulador transcricional com efeitos amplos e variáveis de acordo com o organismo que se estuda. Embora suas funções já tenham sido parcialmente elucidadas em *S. cerevisiae*, não há motivos para se postular que tudo o que é verdadeiro para este organismo valha para outro. A evolução garante que fatores de transcrição sejam recrutados para o controle de novos genes-alvos que melhor reflitam a interação do organismo com seu nicho ecológico.

É claro, é de se esperar que as Hsps de *P. brasiliensis* sejam controladas por Hsf, pois se trata de uma resposta praticamente universal ao termoestresse. A inspeção superficial *in silico* de um promotor de Hsp70 de Pb03 sugere que isso seja verdade. Porém, enquanto *S. cerevisiae* sofre a 37°C, *P. brasiliensis* não só sobrevive a essa temperatura como passa por uma intensa reprogramação morfogênica. Não seria concebível pensar que alguns dos genes responsivos ao Hsf em *P. brasiliensis* fossem os protagonistas da transição dimórfica? Vale lembrar que a transição dimórfica é um determinante de patogenicidade *per se*, o que nos levaria a crer que alguns genes de

virulência talvez pudessem ser regulados do mesmo modo que os genes propriamente morfogenéticos.

Um trabalho pioneiro em *B. dermatitidis* e *H. capsulatum* já identificou o transdutor de sinal do dimorfismo. Bruce Klein e colaboradores (Nemecek *et al.*, 2006) conseguiram, analisando um mutante insercional de *B. dermatitidis*, identificar a primeira proteína inequivocamente implicada na transição termodimórfica: a histidina cinase de membrana relacionada ao dimorfismo (nomeada Drk1), uma proteína com ortólogos bem conservados identificados em vários genomas de patógenos termodimórficos, inclusive *P. brasiliensis*, e cujo fenótipo de nocaute já foi reproduzido em *H. capsulatum*.

Presumiu-se então que Drk1 seria o receptor do sinal térmico que deflagra o dimorfismo. Passou-se então a procurar, pela análise de outros mutantes insercionais, proteínas que atuassem, na mesma via de sinalização, a jusante da histidina cinase. Anita Sil e colegas (Nguyen & Sil, 2008; Webster & Sil, 2008) descobriram três fatores de transcrição, Ryp1, Ryp2 e Ryp3 (acrônimos ingleses parciais para “proteína requerida para crescimento como levedura à temperatura ambiente”) em *H. capsulatum*, cuja ruptura insercional ou silenciamento por interferência de RNA gera fenótipos similares ao da perda de Drk1 quanto ao dimorfismo, além de defeitos na produção de esporos pela hifa (alterações similares haviam sido relatadas, porém não investigadas mais a fundo, por Klein e colaboradores no artigo supracitado).

Os pesquisadores puderam elaborar um modelo em que as proteínas Ryp atuariam em conjunto e de maneira interdependente para comandar a reprogramação morfogenética dos fungos estudados (Webster & Sil, 2008), o que foi possível pela constatação de que a maioria dos genes diferencialmente expressos na fase de levedura é regulada por Ryp1 (Nguyen & Sil, 2008) e de que Ryp2 e Ryp3 são estruturalmente similares às proteínas Velvet de *Aspergillus nidulans* (Webster & Sil, 2008), que governam a resposta desse organismo à luz e que executam suas funções na forma de complexos heteroméricos, conforme constatado por Gerhard Braus e colegas (Bayram *et al.*, 2008).

Depreende-se, portanto, que é concebível levantar a hipótese de que o Hsf seja um dos executores, ou mesmo o principal deles, da transição dimórfica deflagrada pela Drk1. Além de fazer sentido dentro da lógica darwiniana de que estruturas pré-existentes são recrutadas para novas funções, é compatível com o tipo de sinal que o Hsf detecta (calor). Embora não se almejasse, neste trabalho, investigar essa correlação, pretendeu-se lançar as bases para que tais estudos possam ser levados a cabo no futuro. Antes de mais nada, há que se compreender o funcionamento do Hsf de *P. brasiliensis* no nível mais elementar.

Há outro motivo para se estudar o Hsf em ascomicetos termodimórficos. Em *S. cerevisiae*, trata-se de um fator de transcrição muito flexível, cujo módulo ativador carbóxi-terminal pode ser expresso em fusão com DBDs de outros fatores para estudos de controle da expressão gênica (Nieto-Sotelo *et al.*, 1990), quiçá mesmo para ensaios de duplo híbrido. Caso o mesmo valha para *P. brasiliensis*, um bom entendimento desse fator nesse fungo certamente será útil para a compreensão da sua biologia e será um acréscimo ao conjunto de ferramentas para o estudo de fungos patogênicos em geral.

Finalmente, há que se ter em mente o fato de que, dadas as semelhanças entre os ascomicetos termodimórficos, o estudo de *P. brasiliensis* pode significar informações úteis para todos os outros patógenos desse grupo, ainda mais no caso de um fator de transcrição sabidamente conservado. É importante ressaltar que, na fase inicial deste trabalho, o genoma estrutural dos três isolados de *P. brasiliensis* (Pb01, Pb3 e Pb18) ainda não tinha sido iniciado pelo Broad Institute – USA.

2. Objetivo geral

Pelo presente projeto pretendeu-se isolar e caracterizar o homólogo do fator de choque térmico de *P. brasiliensis*, isolado 01.

3. Objetivos específicos

1. Identificação e isolamento do gene *hsf* de *P. brasiliensis*;
2. Isolamento dos amplicons cistrônico e genômico;
3. Clonagem do amplicon cistrônico em vetor de expressão de *S. cerevisiae*;
4. Análise funcional do gene *hsf* de *P. brasiliensis* em *S. cerevisiae* por *trans*-complementação;
5. Análise de bioinformática da seqüência da proteína Hsf de *P. brasiliensis*;
6. Identificar cHSEs potenciais em promotores no genoma de Pb01;

4. Materiais e métodos

4.1. Considerações gerais

Todos os oligonucleotídios, devidamente identificados quanto à função, têm suas seqüências mostradas na **tabela 1** do apêndice. No mesmo apêndice, se encontram as receitas dos meios e soluções complexas usados, à exceção daqueles adquiridos prontos dos fabricantes de sistemas de biologia molecular, para os quais se refere o leitor aos respectivos manuais. Genótipos de linhagens dos microrganismos usados também se

encontram ali (**tabela 2**). As soluções simples (um soluto apenas) são aquosas exceto menção em contrário e não estão descritas no apêndice e sim no texto. As centrifugações são à temperatura ambiente salvo menção em contrário e tanto elas como as ressuspensões são sempre em tubos de polipropileno adequados ao tamanho da amostra. A água sempre é deionizada em grau analítico. Ressuspensões são sempre por repipetagem. Todas as eletroforeses de DNA, salvo menção em contrário, são em gel de agarose a 1% (m/v), tampão TBE 0,5X, corado com brometo de etídio a 0,5 µg/ml; o campo elétrico aplicado é de cinco volts por centímetro. Nos experimentos com RNA, materiais cerâmicos e vítreos foram tornados livres de ribonuclease (RNase) por incubação a 200 °C por uma noite; tubos e reagentes líquidos já foram fornecidos pelo fabricante livres de RNase; soluções aquosas e material de eletroforese, pela incubação prévia na presença de dietil-pirocarbonato (DEPC) à concentração de 0,1 % (v/v) por uma hora; a água foi produzida pela unidade de filtração deionizante (Human Power I⁺ Water Purification System, Barnstead Corporation) já livre de RNase, e foi coletada em tubo igualmente livre. Endonucleases de restrição, seus respectivos tampões de reação em soluções estoques concentradas dez vezes (NEBn 10X) e a albumina sérica bovina concentrada cem vezes (BSA 100X) usada com algumas delas são sempre fornecidos pela empresa New England Biolabs. Excetuando menção em contrário, soluções estocadas ou adquiridas em forma concentrada (*n*X) têm sempre concentração de uso 1X.

4.2. Extração de RNA total

A solução de RNA total de *P. brasiliensis* isolado 01 foi obtida a partir de uma cultura *in vitro* de levedura pelo protocolo de extração com TRIzol[®] (Invitrogen), com todos os recipientes e soluções aquosas e alcoólicas livres de RNase. Brevemente, 500 ml de levedura cultivada por uma semana sob agitação em meio BHI foram precipitados por cinco minutos de centrifugação a 2.000 g, após o que se removeu o meio de cultura; o precipitado foi pesado (três gramas) e então congelado imediatamente em nitrogênio líquido e transferido para uma almofariz previamente resfriada da mesma forma. Procedeu-se então à trituração do precipitado com pistilo livre de RNase, intercalando-se reaplicações de nitrogênio líquido para impedir o derretimento da massa leveduriforme. Quando o precipitado foi reduzido a um pó bem fino, ele foi ressuspense em TRIzol[®] à proporção aproximada de um mililitro para cada cinco milhões de células. Após cinco minutos de agitação vigorosa por vórtice mecânico para garantir a dissociação dos complexos nucleoprotéicos, a suspensão foi centrifugada a 12.000 g por dez minutos.

Decantou-se o sobrenadante num novo tubo e se descartou o precipitado. Procedeu-se à separação das fases orgânica e aquosa pela adição de 0,2 ml de clorofórmio por mililitro de solução de TRIzol[®]. Após agitação manual vigorosa e incubação à temperatura ambiente por três minutos, centrifugou-se a suspensão a 12.000 g por quinze minutos para separar as fases. A fase aquosa foi então transferida cuidadosamente para um novo tubo e o RNA foi precipitado com a adição de 2-propanol à proporção de meio mililitro por mililitro de solução de RNA; incubação à temperatura ambiente por dez minutos; e centrifugação a 12.000 g por dez minutos a quatro graus. O precipitado foi então enxaguado com etanol a 75% (v/v em água), à proporção de um mililitro de etanol por mililitro de TRIzol[®] usado inicialmente. Após breve agitação vigorosa em vórtice mecânico, centrifugou-se a amostra a 7.500 g por cinco minutos a quatro graus. A solução de etanol foi então removida e o precipitado, secado brevemente ao ar livre antes de ser ressuspenso em três mililitros de água e incubado a 60 °C por dez minutos. A solução teve sua concentração estimada por espectrofotometria (quatro microgramas por microlitro) e foi estocada a -70 °C. Procedeu-se então ao tratamento da solução com deoxi-ribonuclease (DNase) I: a dez microgramas de RNA (2,5 µl de solução) foram adicionadas dez unidades de enzima (dez microlitros; Promega Corporation), tampão de reação 10X (fornecido pelo fabricante) e água para um volume final de 25 µl. A solução foi incubada por uma hora e meia a 37 °C e a reação foi interrompida pela adição de 2,5 µl de uma solução de EDTA 20 mM, pH 8, seguida de incubação a 65 °C por dez minutos. Para remoção da enzima e de monômeros de nucleotídeos gerados pela DNase I, adicionaram-se, nesta ordem, 2,5 µl de solução de glicogênio a 0,2 % (m/v); 60 µl de água; dez microlitros de solução 3 M de acetato de sódio, pH 5,2; e 300 µl de etanol absoluto. Após breve agitação, a solução foi incubada por três horas a -20 °C e então centrifugada a 13.200 g por 40 minutos a zero grau. O sobrenadante foi removido e o precipitado, enxaguado com um mililitro de solução de etanol a 75% (v/v). Seguiu-se nova centrifugação a 13.200 g por cinco minutos a quatro graus, após o que se removeu o sobrenadante e se secou o precipitado por exposição do tubo aberto ao ar por cinco minutos em posição invertida. O precipitado foi então ressuspenso em oito microlitros de água. Uma alíquota de um microlitro foi submetida à eletroforese livre de RNase para confirmar a integridade do RNA antes de ser usado. Outro microlitro foi quantificado espectrofotometricamente (982 ng/µl; $A_{260/280}=1,963$; $A_{320}=0,03$).

4.3. Amplificação rápida de extremidades de DNA complementar (RACE)

Quando o autor deu início ao mestrado, ele já conseguira, com o uso de iniciadores degenerados, isolar e seqüenciar um amplicon de 361 pares de bases com alta similaridade com Hsfs fúngicos presumidos, e correspondendo à região central do gene, cerca de setecentos nucleotídios a jusante do códon de iniciação e mil e quinhentos a montante do de terminação, a julgar pela comparação com homólogos de outros fungos filamentosos. Vale ressaltar que o gene não fora identificado pelos projetos de transcriptoma do fungo (Felipe *et al.*, 2005a; Nunes *et al.*, 2005), provavelmente por apresentar níveis baixos de expressão, dificultando a clonagem em bibliotecas de cDNA. Essa seqüência foi usada para desenhar novos iniciadores, dessa vez sem degenerações, com o objetivo de obter amplicons que contivessem as regiões 5' e 3' do gene pelo método de amplificação rápida de extremidades de cDNA (RACE). Usou-se para isso um sistema integrado de 5' e 3' RACE, o S.M.A.R.T.[®] RACE cDNA Amplification System (TaKaRa Clontech).

O protocolo de RACE seguiu à risca as instruções do fabricante, com as seguintes ressalvas: i) o programa de PCR usado foi o de ciclo bifásico para iniciadores com temperatura de dissociação superior a 70 °C (vide manual do produto) e o tempo de extensão foi de três minutos; e ii) as quantidades de cDNA usadas foram as prescritas para bibliotecas feitas a partir de extração de RNA total, e não de RNA poli-A(+).

4.4. Purificação de bandas, seqüenciamento, PCR e clonagem molecular

4.4.1. Fragmentos de RACE

As bandas de RACE foram purificadas a partir de gel de agarose pelo sistema ilustra GFX[®] PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante. As soluções de bandas isoladas foram usadas para cloná-las no vetor pGEM[®] T Easy (Promega) seguindo as instruções do fornecedor para o protocolo de ligação ao DNA, com as seguintes ressalvas: i) a proporção molar entre banda a ser clonada e vetor foi 3:1; ii) a concentração final de DNA foi de 10 ng/μl; e iii) a incubação foi de, no mínimo, doze horas a 12 °C.

Para transformação dos sistemas de ligação, alíquotas eletrocompetentes da linhagem de *Escherichia coli* comercial XL1-Blue[®] (Stratagene) foram preparadas pelo protocolo 1.26 de Sambrook & Russel (2000), sem modificações. Para a transformação, duas alíquotas de 40 μl foram rapidamente descongeladas em gelo, a cada uma se adicionou um microlitro de cada sistema de ligação e as suspensões foram transferidas

para cuvetas de eletroporação com fenda de um milímetro. Estas foram transferidas para um eletroporador ajustado para 1,7 kV, 200 mΩ e 25 μF. Aplicou-se o choque e se reanimaram as células pela adição imediata de três mililitros de meio SOC. As suspensões foram então transferidas para tubos de 50 ml e incubadas por 45 minutos sob agitação vigorosa a 37 °C. Alíquotas de 200 μl foram semeadas em placas de 60 mm de diâmetro com meio SOB-ágar contendo ampicilina a 100 μg/ml (os antibióticos permitem, em clonagem, a seleção de colônias recombinantes pelo fato de os plasmídios transformados possuírem genes de resistência contra eles) e pré-submetidas à aplicação superficial de 40 μl de solução de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-galactosídeo (X-Gal; dois por cento massa/volume em dimetilformamida) e sete microlitros de solução a 0,8 M de isopropil-tio-β-D-galactosídeo (IPTG). Esses dois últimos reagentes permitem a seleção de colônias contendo o inserto pelo rompimento do gene da beta-galactosidase (*lacZ*) no vetor, uma vez que esse gene dá origem a uma enzima que degrada o X-Gal a um produto que tinga a célula de azul; o IPTG é necessário para desreprimir o operon *lac* em células contendo o alelo *LacI^q*, como é o caso da XL-1 Blue[®]. As placas foram incubadas por uma noite a 37 °C e, no dia seguinte, dez colônias brancas de cada foram selecionadas para processamento conforme descrito a seguir.

Uma fração de cada colônia candidata foi semeada em cinco mililitros de meio LB contendo ampicilina a 100 μg/ml, num tubo de vidro com tampa de rosca. Os tubos, devidamente rotulados, foram incubados sob agitação a 250 rpm por uma noite. Após atingirem uma densidade óptica aceitável, alíquotas de três mililitros submetidas à centrifugação a 16.000 g por trinta segundos para dar início à minipreparação plasmidial por lise alcalina. Após remoção do sobrenadante, os precipitados bacterianos foram ressuspensos em 750 μl de STE para remoção de restos de meio de cultura. Após uma nova centrifugação como a anterior e remoção do sobrenadante, o precipitado foi ressuspenso em 200 μl de solução I. A essa suspensão se adicionaram 360 μl de solução II fresca, e as amostras foram homogeneizadas por inversão suave e incubadas à temperatura ambiente por cinco minutos. Em seguida, a cada uma se adicionaram 300 μl de solução III, seguida de nova homogeneização e incubação como as anteriores. Prosseguiu-se então à precipitação dos resíduos celulares por centrifugação a 16.000 g por cinco minutos. Os sobrenadantes foram decantados em novos tubos e a cada um se adicionaram 750 μl de 2-propanol. Após homogeneização vigorosa em vórtice mecânico, procedeu-se à precipitação dos ácidos nucléicos pequenos por centrifugação a 16.000 g por cinco minutos. Após remoção do sobrenadante, redissolveu-se o precipitado em 200 μl de uma

solução de TE/RNase. As soluções foram incubadas a 37 °C por meia hora, após o que se adicionaram a cada uma 80 µl de solução de acetato de amônio a 10 M. Os resquícios protéicos foram então precipitados por centrifugação a 16.000 g por dez minutos. Os sobrenadantes foram decantados em novos tubos, e a cada um se adicionaram 750 µl de etanol absoluto. Após homogeneização vigorosa em vórtice mecânico, precipitaram-se os plasmídios por centrifugação a 16.000 g por dez minutos. Depois de removidos os últimos traços de etanol por secagem breve, os precipitados foram ressuspensos em 30 µl de água. Alíquotas de um microlitro foram submetidas à eletroforese para seleção de candidatos que pudessem conter insertos, e para quantificar aproximadamente a concentração de cada um.

As amostras promissoras foram submetidas à digestão com endonuclease de restrição para confirmar a presença de inserto. Como a seqüência dos amplicons de RACE não é conhecida (conhecê-la é o propósito da clonagem), selecionou-se uma enzima cujo sítio tem baixa freqüência de ocorrência, NotI, que tem dois sítios externos ao ponto de clonagem do vetor pGEM[®] T Easy. A intenção era minimizar a possibilidade de haver sítios nos amplicons, o que poderia confundir a interpretação dos resultados. Desse modo, esperava-se obter bandas cujo tamanho correspondesse aos amplicons originais, e mais a banda correspondente ao vetor. As digestões foram feitas sobre amostras de pelo menos um micrograma de DNA, a que se adicionaram dez unidades de enzima, BSA, tampão NEB3 e água para um volume final tão pequeno quanto possível para cada amostra. Os sistemas de digestão foram incubados por uma noite a 37°C e, em seguida, metade de cada um foi submetida à eletroforese na presença do vetor linearizado e de um marcador de peso molecular.

4.4.2. Seqüência codante do Hsf

Várias minipreparações continham o plasmídio recombinante com os insertos de 5' e 3' RACE. Alíquotas de um mililitro das respectivas culturas bacterianas foram estocadas à temperatura de -70 °C pela adição de glicerol estéril para uma concentração final de 20% (v/v) e imersão em nitrogênio líquido antes da transferência para o congelador. O restante das minipreparações foi usado para seqüenciamento do gene num seqüenciador capilar MegaBACE[®] 1000 (GE Healthcare).

Para o seqüenciamento, usou-se o amplicon de 361 pb novamente para desenhar iniciadores que apontassem para as regiões desconhecidas dos amplicons de RACE. Obtiveram-se assim seqüências inéditas, que por sua vez foram usadas para desenhar

novos iniciadores que pudessem ser usados para fazer avançar o seqüenciamento sobre o restante das regiões desconhecidas. Assim, com avanços de cerca de quatrocentos pares de base por seqüenciamento por amplicon, seqüenciaram-se ambos em cerca de três gerações de iniciadores.

4.4.3. Geração do amplicon codante do Hsf

Usaram-se as seqüências das UTRs para desenhar iniciadores que permitissem a amplificação do gene inteiro num fragmento só. Esses iniciadores foram usados para PCR tendo como molde tanto o DNA genômico de Pb01, quanto a biblioteca de cDNA produzida pelo sistema S.M.A.R.T.[®]; a primeira reação geraria um amplicon contendo quaisquer íntrons que porventura tivesse o gene, enquanto a segunda geraria um amplicon completo da região codante, ou cistron, que permitiria a clonagem dela num vetor de expressão. Para gerar os amplicons genômico e cistrônico, usou-se o sistema Fidelity[®] PCR Master Mix (USB Corporation) segundo as instruções do fornecedor (volume de reação de 50 µl). O programa de amplificação consistiu de pré-desnaturação de dois minutos a 95 °C; amplificação em 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 50 °C por 30 segundos, extensão a 68 °C por 3,5 minutos; e extensão complementar a 68 °C por sete minutos. Os iniciadores possuem, além das regiões de anelamento, caudas 5' contendo sítios para a enzima BglII (para a qual já se sabia, pelo seqüenciamento dos fragmentos de RACE, não haver sítio algum na região codante do gene, doravante chamado *PbHsf*) e, no caso do iniciador 5', duas degenerações que convertiam a seqüência ao redor do códon de iniciação num consenso de Kozak mais facilmente reconhecível pelo maquinário transcricional de *S. cerevisiae*. O objetivo era obter um amplicon que pudesse ser usado para expressão heteróloga do gene nesta levedura.

4.4.4. Clonagem no vetor de levedura e expressão em *S. cerevisiae*

Uma vez de posse de um amplicon contendo o cistron completo de *Pbhsf*, este foi purificado diretamente a partir do sistema de PCR com o uso do sistema GFX[®]. Ele foi ressuspenso em tampão TE, pH 8, e, uma vez confirmada por eletroforese a recuperação do fragmento, este foi clonado num vetor apropriado. Desta vez, usou-se o método de ligação mediada por topoisomerase do sistema pCR-XL TOPO[®] (Invitrogen), segundo as instruções do fornecedor. Brevemente, montou-se um sistema de ligação com quatro microlitros da solução de amplicon e um da solução de vetor fornecida com o sistema.

Misturaram-se as duas brevemente e incubou-se o sistema a 25 °C por cinco minutos antes de se interromper a reação pela adição de um microlitro da solução de parada de reação fornecida (6X TOPO[®] Cloning Stop Solution) seguida de suave mistura por alguns segundos à temperatura ambiente.

Dois microlitros desse sistema de ligação foram usados para transformar células de *E. coli* da linhagem EPI300[®] (Epicentre Biotechnologies), tornadas eletrocompetentes da mesma maneira que a linhagem XL1-Blue[®] acima. A transformação foi igual à descrita acima, mas, ao invés de se semear apenas 200 µl, semeou-se toda a suspensão de três mililitros de meio SOC usada para reanimar as células transformadas. Para isso, usou-se uma placa de 529 cm², tradicionalmente empregada para experimentos com bibliotecas gênicas e fagos, contendo 100 ml de meio LB-ágar e canamicina à concentração de 50 µg/ml, e pré-tratada com aplicação superficial de 100 µl de solução estoque de X-Gal (o vetor contém *lacZ* e a linhagem não possui LacI^q). Após uma noite de incubação a 37 °C, dez colônias brancas foram selecionadas para minipreparação de DNA plasmidial. Cada uma delas foi semeada em cinco mililitros de meio LB com canamicina à mesma concentração, e incubada a 37 °C mediante agitação de quatro hertz por uma noite. Porém, a purificação do DNA não foi desta vez por método caseiro, e sim pelo sistema comercial illustra[®] PlasmidPrep Mini Spin (GE Healthcare), seguindo o protocolo para três mililitros de cultura bacteriana fornecido pelo fabricante. O DNA plasmidial foi ressuspense num volume final de 100 µl de água.

Após uma breve seleção de candidatos pelo padrão de deslocamento à eletroforese, cinco foram selecionados para verificação da presença do inserto. Esta foi feita valendo-se dos sítios de BglII presentes nos iniciadores: três microlitros de cada amostra foram digeridos por uma noite a 37 °C com cinco unidades da enzima na presença do tampão NEB3, num volume final de cinco microlitros.

Um dos clones (número cinco) foi selecionado arbitrariamente para dar seguimento à clonagem. Doze microlitros dele (aproximadamente 2,5 µg de plasmídio) foram digeridos por uma noite a 37 °C por 15 unidades de BglII na presença do NEB3 num volume de 15 µl. O volume total de amostra foi submetido à eletroforese para separar do remanescente do vetor de clonagem a banda de aproximadamente 2,5 kpb correspondente ao cistron *Pbhsf*. Isso foi feito pela excisão da região do gel contendo a banda do fragmento, que foi processada pelo sistema GFX[®].

Após se confirmar a recuperação do fragmento, ressuspense em 50 µl de água, por nova eletroforese, procedeu-se à sua clonagem no plasmídio de destino, o vetor de

clonagem YEppgk351 para *S. cerevisiae* (construído por L. M. P. Moraes). Este vetor binário episomal de levedura tem como características de interesse a presença do promotor do gene que codifica para a enzima 3-fosfoglicerato cinase de *S. cerevisiae*, conferindo aos genes sob seu comando expressão constitutiva em altos níveis. O vetor foi fornecido gentilmente por A. S. Galdino já pré-processado para clonagem, linearizado com a enzima BglIII, com extremidades livres defosforiladas para minimizar a recircularização sem inserto, purificado e ressuspenso em água à concentração de 20 ng/μl. Bastou, para a clonagem, montar o sistema de ligação, contendo 40 ng do vetor, 120 ng do cistron, 1,5 μl de solução 10 mM de ATP, seis unidades Weiss da enzima T4 DNA Ligase (New England Biolabs), 1,5 μl de tampão 10X da enzima fornecido pelo fabricante e água para um volume final de 15 μl. O sistema foi incubado a 15 °C por uma noite. Em seguida, procedeu-se à remoção da enzima e dos sais do tampão em preparação para transformar o sistema por eletroporação. Isso foi feito por meio de dois ciclos de: diluição do sistema com água para 500 μl; aplicação da solução numa unidade de filtração Microcon[®] YM-100 (Millipore) num tubo de polipropileno; e centrifugação a 500 g por 15 minutos; após o que o DNA retido na membrana da unidade estava virtualmente livre de enzima e resíduos iônicos e pôde ser recuperado aplicando-se a unidade em posição invertida num novo tubo e centrifugando o conjunto a 1.000 g por três minutos. O volume recuperado foi secado por centrifugação a vácuo (sistema SpeedVac[®] SC-100, Savant Corporation) para um volume inferior a quatro microlitros e essa amostra foi inteiramente usada para transformar uma alíquota de células eletrocompetentes EPI300[®] exatamente como na transformação anterior. A semeadura também foi como na etapa anterior, com a diferença de que não havia X-Gal na placa (vetor sem *lacZ*) e o antibiótico usado para selecionar recombinantes foi a ampicilina a uma concentração de 100 μg/ml. Após uma noite de incubação, vinte e quatro colônias foram arbitrariamente selecionadas para obtenção do DNA plasmidial pelo método caseiro delineado acima.

Após pré-seleção de potenciais recombinantes e aferição aproximada da sua concentração pela eletroforese dos plasmídios intactos, dezessete candidatos com maior retardo de migração no gel foram submetidos à verificação de presença de inserto. Esta se deu em duas etapas: na primeira, o inserto foi liberado por meio da digestão, a 37 °C e por uma noite, de cinco microlitros de cada amostra com cinco unidades de BglIII num volume final de sete microlitros na presença do tampão NEB3. Doze candidatos liberaram a banda de cerca de 2,5 kpb contendo o cistron. No entanto, como a clonagem não foi direcional – no sentido de que o sítio único de clonagem permite que o inserto entre em duas

orientações possíveis com relação ao promotor –, e o objetivo é expressar o gene em *S. cerevisiae*, foi necessário descobrir quais desses doze candidatos possuíam o cistron clonado na orientação correta em relação ao promotor *pgk*. A análise da seqüência dos plasmídios recombinantes nas duas orientações de inserção possíveis revelou que a digestão com a enzima EcoRV resultaria em duas bandas, de tamanhos aproximados de 8,2 kpb e 1,7 kpb, no caso de inserção correta; e em duas bandas de cerca de 6,5 kpb e 3,5 kpb no caso de inserção invertida. Assim, cada uma das doze amostras foi submetida à digestão a 37 °C e por três horas, de 200-500 ng de plasmídio com dez unidades de EcoRV na presença de BSA e do tampão NEB3. O volume final dependeu da amostra e ficou entre cinco e sete microlitros.

Para o experimento de *trans*-complementação, foi escolhida a cepa HS126 de *S. cerevisiae*, gentilmente cedida pelo Dr. Hiroshi Sakurai da Escola de Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade de Kanazawa, Japão. Seu genótipo se encontra no apêndice. Brevemente, ela teve o gene do Hsf rompido no cromossomo e repostado por um plasmídio centromérico contendo a marca auxotrófica *URA3* (orotidina 5-fosfato descarboxilase, necessária para a síntese *de novo* de uracila). A própria levedura não possui os genes *ADE2* (fosfo-ribosil-amino-imidazol carboxilase, enzima que catalisa o sexto passo da síntese *de novo* de purinas), *TRP1* (fosfo-ribosil-antranilato isomerase, primeira enzima da via de síntese de triptofano) e *LEU2* (beta-isopropilamato desidrogenase, terceira da via de síntese de leucina), de modo que pode ser transformada por plasmídios contendo qualquer dessas três marcas auxotróficas e os recombinantes podem ser selecionados em meio mínimo carente de leucina, triptofano ou adenina.

O vetor YEPcHSF possui a marca *LEU2*. Após confirmada a clonagem em orientação correta, transformou-se a cepa HS126. Isso foi feito pelo método de transformação não-integrativa por choque térmico. Brevemente, semeou-se a cepa HS126, a partir de um estoque na presença de glicerol a -70 °C, numa placa de meio YPD, que foi incubada por dois dias a 30°C de modo a reanimar as células e gerar colônias isoladas. Semeou-se uma delas por espalhamento numa placa de meio SD suplementado com adenina 148 µM, leucina 265 µM e triptofano 108 µM (SD-TLA) para comprovar o genótipo pelo crescimento nessas condições mínimas. Uma colônia isolada foi transferida para um tubo contendo cinco mililitros de YPD. O sistema foi incubado a 30°C sob agitação vigorosa até que o crescimento da levedura atingisse a fase estacionária, o que se monitorou pela opacidade da cultura à inspeção visual. Quando o ponto de saturação foi atingido, centrifugaram-se 200 µl da cultura a 2000 g por um minuto. Descartou-se o

sobrenadante e se ressuspendeu o precipitado de leveduras na solução de transformação em passo único contendo um micrograma do YEPcHSF. A suspensão foi incubada a 45°C por uma hora e então semeada em meio sólido SD-TA, de maneira a selecionar os recombinantes pela ausência de leucina. Somente células portadoras tanto do plasmídio original da cepa contendo o *hsf* nativo e o novo plasmídio contendo o *Pbhsf* sobreviveriam.

Para confirmação da presença do plasmídio nas linhagens de HS126 transformadas, recorreu-se a um protocolo de PCR de colônia, em que se usaram iniciadores que se anelassem ou no gene de *P. brasiliensis* (par Pb5HSF-F/PbTF2; amplicon de 400 pb) ou no nativo da levedura (ScHSFF/ScHSFR; amplicon de 500 pb). Usou-se o sistema Fidelity PCR Master Mix (USB), segundo as orientações do fabricante para uma reação de 50 µl, com iniciadores a 200 nM e um fragmento microscópico de colônia para lise numa pré-incubação a 95 °C por 5 minutos antes do ciclo de amplificação (95 °C por um minuto, 60 °C por um minuto, 72 °C por 40 segundos, 35 vezes, seguidas de uma extensão complementar a 72 °C por cinco minutos). Como controle usou-se uma cepa que não contivesse o plasmídio, e o próprio plasmídio purificado (1,5 ng por reação).

4.5. Contra-seleção com 5-FOA

A expulsão do plasmídio nativo foi feita por meio de contra-seleção com ácido 5-fluoro-orótico (5-FOA), uma substância que, ao ser processada pelo produto do gene *URA3* (presente no plasmídio da cepa HS126), é convertida em 5-fluorouracil, um produto letal à levedura. Como eventos de não-disjunção mitótica ocorrem com baixa frequência em todos os eucariotos, espera-se que alguns descendentes percam o plasmídio centromérico a cada ciclo de divisão celular. Desse modo, um meio SD-Ura-Trp-5-FOA-Ade (SD-TAU5) oferece a contra-seleção desejada: a ausência de leucina exerce pressão seletiva para que somente leveduras recombinantes contendo o vetor YEPcHsf possam crescer; a presença de uracila (na concentração de 179 µM) desobriga a cepa de sintetizar a própria, eliminando a necessidade da levedura possuir o gene *URA3*; e a presença do 5-FOA exerce pressão seletiva para que só leveduras que perderam o gene *URA3* (e, conseqüentemente, o plasmídio contendo o *hsf* nativo) sobrevivam. Como a presença de um Hsf funcional é imprescindível para a levedura, quaisquer colônias que crescerem significarão leveduras cuja sobrevivência foi assegurada pelo resgate da perda da proteína nativa pelo PbHsf. Como a solução estoque de 5-FOA (570 mM) tem como solvente o dimetil-sulfóxido (DMSO), confirmou-se que este não apresentaria toxicidade às

leveduras pela sua semeadura numa placa SD-Trp-Ade-Ura-DMSO (este último a um por cento volume/volume; SD-TAUD).

4.6. Bioinformática

4.6.1. Análise das seqüências brutas e alinhamentos

Ao término de cada geração de seqüenciamento, selecionaram-se, a partir dos arquivos de seqüência crua as regiões com boa qualidade e, conforme uma rodada se seguia à anterior, usava-se o programa CAP3 de montagem de seqüências (Huang & Madan, 1999) para reuni-las pelas regiões de sobreposição. Os assim chamados contigs, ou arquivos de seqüência contínua montada, foram gerados para cada um dos amplicons. Finalmente, usou-se o mesmo programa para reunir os dois contigs dos amplicons 5' e 3' através do amplicon central de 361 pb, e assim se obteve um contig único que correspondia à região codante do gene, mais uma parte de cada UTR.

Alinhamentos de seqüências múltiplas foram, neste projeto, feitas pelo programa CLUSTALW2 do Instituto de Bioinformática do Laboratório Europeu de Biologia Molecular (EBI/EMBL; <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>; Larkin *et al.*, 2007). O depósito da seqüência do Hsf foi feito no banco de dados do Centro Nacional de Informação em Biotecnologia dos Estados Unidos da América (Genbank/NCBI; dentre várias referências, a que cobre os aperfeiçoamentos mais recentes é a de Benson *et al.*, 2007; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) sob o identificador alfanumérico específico EF599107.

A análise bioinformática preliminar foi feita por meio da ferramenta de alinhamento múltiplo do NCBI; selecionou-se o algoritmo BlastP para orientar a busca de homologias significativas que pudessem orientar as análises estruturais posteriormente conduzidas

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?PAGE=Proteins&PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on;

descrito por Altschul *et al.*, 1990), tendo o banco de dados de seqüências não redundantes (nr) como referência e usando-se o comando FUNGI[ORGN] para dirigir a busca apenas para seqüências fúngicas.

Estimativas de peso molecular e ponto isoeletrico da proteína foram obtidas com o uso da ferramenta pI/MW do servidor de proteômica ExpASY do Instituto Suíço de Bioinformática (http://ca.expasy.org/tools/pi_tool.html; Bjellqvist *et al.*, 1994). A presença

de pontes dissulfeto (para posterior definição do protocolo de extração de proteína total) foi estimada pela ferramenta de rede neural DCON da Universidade de Bolonha, Itália (http://gpcr.biocomp.unibo.it/cgi/predictors/cys-cys/pred_dconcgi.cgi; Fariselli & Casadio, 2001).

4.6.2. Filogenia de Hsfs fúngicos (por M. M. Teixeira, a partir de seqüências do autor)

Uma vez de posse de homólogos prováveis de Hsfs de Eurotiomycetidae, obtidos a partir da ferramenta BlastP, estas seqüências protéicas foram usadas para construir um filograma por meio dos métodos de máxima parcimônia e inferência Bayesiana. Usou-se um modelo evolutivo que atribui frequências e escores iguais a todos os resíduos polimórficos. Não se estimou o tempo de divergência entre os ramos. A árvore foi gerada após um milhão de gerações pelo programa MrBayes (Huelsenbeck & Ronquist, 2001), com mil Bootstraps por ramo.

4.6.3. Varredura de promotores do fungo em busca de HSEs (em colaboração com R. O. Mello)

A partir dos dados da literatura, conforme descritos à introdução, classificamos os HSEs em canônicos e não-canônicos, e estes últimos, de acordo com Hashikawa *et al.* (2007), em ncHSE compassado e descompassado. As possibilidades combinatórias se encontram à **Tabela 3** do apêndice.

O núcleo de bioinformática do Laboratório de Biologia Molecular da UnB usou esses parâmetros para programar um miniaplicativo para varrer seqüências gênicas em busca desses padrões e, ao identificá-las, gerar um arquivo de saída contendo as suas posições e classificações. O arquivo de entrada usado foi um documento no formato FASTA, oriundo da página do genoma de Pb01 no Broad Institute, e que contém os fragmentos de seqüência correspondentes às 1000 bases a montante da região codificadora de cada fase de leitura aberta anotada eletronicamente (o arquivo está disponível publicamente em http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiDownloads.html). Essas regiões de comprimento arbitrário, presume-se, contêm a totalidade dos promotores dos genes do fungo, e quaisquer HSEs funcionais devem se encontrar no seu interior.

O arquivo de saída foi filtrado manualmente. Excluíram-se todos os promotores cujas fases de leitura aberta (ORFs) fossem classificadas como proteína desconhecida ou hipotética. Excluíram-se ainda aquelas cuja classificação fosse baseada não em critérios funcionais, mas na presença de domínios estruturais conservados. As proteínas restantes foram distribuídas nas classes funcionais do sistema de aglomerados de grupos ortológicos (COG; Tatusov *et al.*, 2003).

5. Resultados e Discussão

5.1. Extração do RNA total e RACE

A **figura 1** mostra a foto do gel de eletroforese, confirmando a qualidade do RNA.

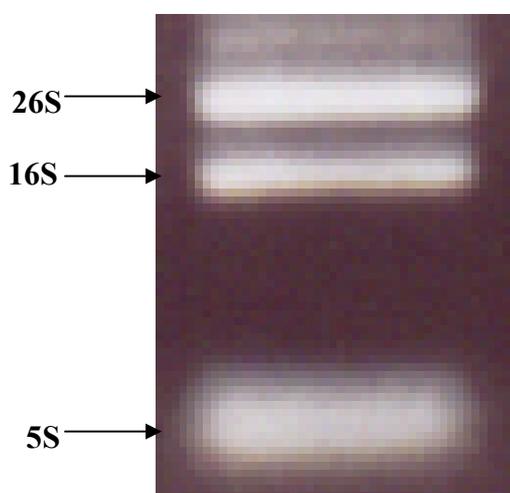


Figura 1. Eletroforese do produto de extração de RNA de Pb01. Observa-se o padrão de bandas nítidas correspondentes ao RNA ribossomal contido em um microlitro de solução de RNA total de Pb01. A ausência de um rastro de degradação confirma a qualidade do material. As setas apontam as bandas dos RNAs principais, com o tamanho indicado em svedbergs.

A 5' RACE gerou uma banda única de cerca de 1,5 kpb e a 3' RACE, uma banda de cerca de 2,5 kpb [(ressalvando que, além das regiões codantes, amplicons de RACE incluem regiões terminais não traduzidas (UTRs)]. A **figura 2** mostra a foto do gel de eletroforese contendo esses amplicons.

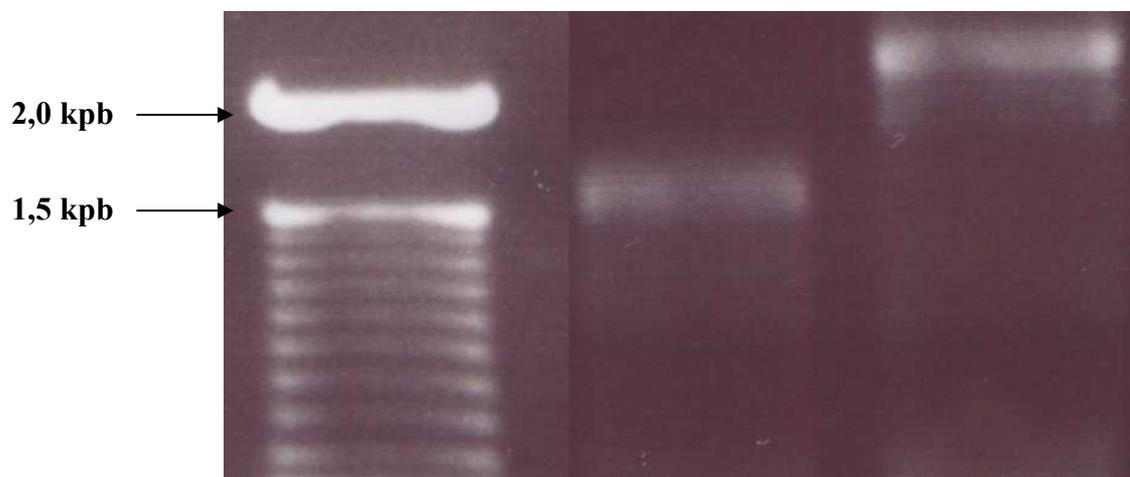


Figura 2. Eletroforese dos amplicons de RACE. O primeiro poço contém 300 ng do marcador de massa molecular 100 bp DNA Ladder (Invitrogen). O segundo contém cinco microlitros do sistema de 5' RACE e o terceiro, a mesma quantidade do sistema de 3' RACE. Observam-se as bandas de cerca de 1,5 e dois kpb, respectivamente, dos amplicons. A foto foi editada digitalmente para remover faixas do gel original que não continham amostras relevantes para este projeto. A banda de 3' RACE teve seu tamanho, posteriormente à clonagem, estimado em 2,5 kpb.

5.2. Seqüência e estrutura do Hsf

A comparação entre os amplicons genômico e cistrônico revelou uma pequena diferença entre eles por análise eletroforética, sugestiva de presença de um ou mais íntrons pequenos, o que é visível à foto de gel de eletroforese da **figura 3**. Procedeu-se então ao seqüenciamento do amplicon genômico com os iniciadores que já haviam sido empregados com os amplicons de RACE, e usando o programa CAP3 para montagem das seqüências parciais. É importante ressaltar que, nesta fase do trabalho, o genoma estrutural dos três isolados de *P. brasiliensis* (Pb01, Pb3 e Pb18) ainda não tinha sido iniciado pelo Broad Institute – USA. O contig genômico foi então alinhado ao cistrônico pelo programa CLUSTALW2, e se identificou, de fato, a presença de uma inserção única de 136 pb na região codante, correspondente a um íntron.

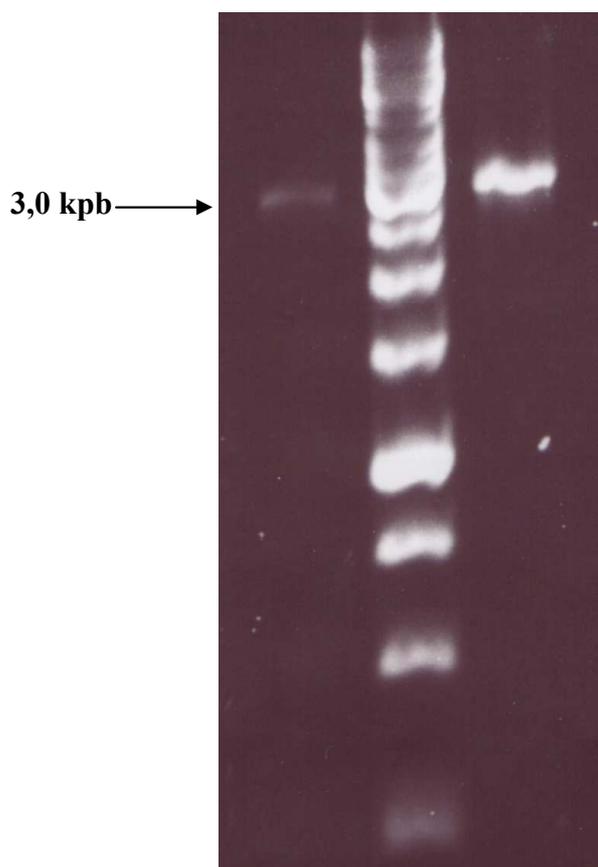


Figura 3. Eletroforese dos amplicons genômico e cistrônico. O poço do meio contém 500 ng do marcador de massa molecular GeneRuler[®] 1 kb DNA Ladder (Fermentas), sendo que a banda mais intensa junto aos amplicons tem três quilobases. O poço da esquerda contém dois microlitros da solução purificada do amplicon cistrônico. O da direita, a mesma quantidade da solução de amplicon genômico. Observe a pequena diferença de mobilidade dos dois amplicons, indicativa da presença de um ou mais íntrons pequenos no genômico.

Como resultado da busca pela ferramenta BlastP, todas as vinte seqüências melhor alinhadas – e, portanto, com maior grau de similaridade – correspondiam a homólogos do fator de choque térmico em fungos filamentosos, cuja identidade fora inferida pela similaridade com a seqüência de *S. cerevisiae* (doravante chamada ScHsf). O próprio ScHsf foi apontado pelo programa como detentor de um alto grau de similaridade (correspondente a um valor de E de e^{-24} para os parâmetros de alinhamento usados) com a seqüência de *P. brasiliensis*, doravante denominada PbHsf. O valor de E para o alinhamento com o único Hsf de fungo filamentoso para o qual há estudos funcionais, o de

N. crassa (NcHsf), é de $2e^{-101}$. O homólogo mais próximo, com *E* desprezível, é a sequência de anotação eletrônica de *H. capsulatum* de código no Genbank EDN08408, e que será chamada HcHsf. Isso está de acordo com inferências recentes que sugerem que *P. brasiliensis* é filogeneticamente mais próximo de *H. capsulatum*.

Alguns meses após a obtenção do PbHsf de Pb01, foi divulgada a primeira montagem do genoma cromossomal de Pb03. A varredura do banco de dados de Pb03 à procura do gene PbHsf, usando o gene do isolado 01 como sequência-guia, resultou, como se esperava, na identificação de uma sequência apenas, localizada no supercontig 1 e previamente anotada eletronicamente como homóloga do fator de choque térmico. O alinhamento das duas sequências de DNA revelou que ambas tinham alto grau de correspondência, inclusive quanto à sequência do íntron único. A comparação das proteínas revelou uma semelhança ainda maior (naturalmente, dada a degeneração do código genético), em que os isolados diferiam apenas pela aparente inserção de um resíduo de serina na proteína de Pb01 e por algumas diferenças entre outros resíduos. Essas diferenças desapareceram quando foi liberado o genoma de Pb01.

O *PbHsf* corresponde a um gene de 2.659 pb, com dois éxons e um íntron. O éxon 1 tem 458 pb, o éxon 2, 2065 pb e o íntron, 136 pb. Descontado o códon de terminação, a sequência de 2.520 pb codifica uma proteína de 840 resíduos de aminoácidos e cerca de 92 quilodaltons (kDa), estimados pela ferramenta pI/MW. Usou-se a sequência da proteína ScHsf, extremamente bem estudada, para guiar a procura de domínios conservados no PbHsf com o uso do CLUSTALW2. Começou-se pelo DBD (em ScHsf, resíduos 171-259), cuja estrutura é essencial para o reconhecimento do HSE, com especial importância para a alfa-hélice 3 (resíduos 224-232). Constatou-se que o DBD está presente no PbHsf, entre os resíduos 142 e 221. A alfa-hélice três se encontra inteiramente conservada, entre os resíduos 196 e 204, assim como a fita-beta três, que contém o resíduo de lisina cuja substituição por alanina resulta em atividade constitutiva: no PbHsf, trata-se do resíduo 209. Pouco a montante da alfa-hélice três, se encontra conservado, na posição 194, um resíduo de asparagina com propriedades semelhantes. A torção do motivo hélice-volta-hélice, característica dos Hsfs, está presente no resíduo de prolina na posição 187. No restante do DBD do PbHsf, resíduos individuais conservados em todos os outros Hsfs estudados também o são, com poucas exceções. O restante do DBD, no entanto, é relativamente variável de acordo com a espécie. No entanto, uma varredura com o programa InterProScan do EBI (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>; Quevillon *et al.*, 2005) permitiu identificar a hélice alar logo em seguida à fita beta três. Os outros

domínios serão mais difíceis de encontrar sem o auxílio de ferramentas mais sofisticadas de análise estrutural. A sequência deduzida do cistron está mostrada à **figura 4**, com destaque para as características mais conservadas.

1	ATG TTG GCC ATG ACG TCG CCA GGT GTC TCT CGT AAG AGA CCC GCA	45
1	Met Leu Ala Met Thr Ser Pro Gly Val Ser Arg Lys Arg Pro Ala	15
46	CCC GGC ACA TCT CCC ATT ATC CGC CAG CAG ATA GCC CCA GCT GCA	90
16	Pro Gly Thr Ser Pro Ile Ile Arg Gln Gln Ile Ala Pro Ala Ala	30
91	GAC ACT CAA CTT TCC AAT GAT CAA TTC CTG CAA TGG GGT CTG TCT	135
31	Asp Thr Gln Leu Ser Asn Asp Gln Phe Leu Gln Trp Gly Leu Ser	45
136	GTC CCC GCT CAT CCA GAC TCC TCC TCC GCT CCC CTT GAC GGC TCG	180
46	Val Pro Ala His Pro Asp Ser Ser Ser Ala Pro Leu Asp Gly Ser	60
181	CCG CAA TAC CCC GTA GCG CCG CAT CCC GTC GAT GTC GAC CCC ATG	225
61	Pro Gln Tyr Pro Val Ala Pro His Pro Val Asp Val Asp Pro Met	75
226	CAA CAT TCG AAT CAA CTC ACG CGG AGG ACC GGT CAC CAA CTC ATC	270
76	Gln His Ser Asn Gln Leu Thr Arg Arg Thr Gly His Gln Leu Ile	90
271	AGC AGA ACC CGA TTA CAG GAT CAA AAC ATG ACC CCA CTG ATT GAC	315
91	Ser Arg Thr Arg Leu Gln Asp Gln Asn Met Thr Pro Leu Ile Asp	105
316	CAG GGT AGA TTA ATA TCG GAC GAC AGG GGT GAC CCC ACA TTG GCG	360
106	Gln Gly Arg Leu Ile Ser Asp Asp Arg Gly Asp Pro Thr Leu Ala	120
361	GAA ACA GAG GCT GAG CTG GAG CAA CGA GCT CTT ATG GCA AAG AAG	405
121	Glu Thr Glu Ala Glu Leu Glu Gln Arg Ala Leu Met Ala Lys Lys	135
406	GAC GCC CAA GCG AAG AGA AAA CAG ATT CCA CCG TTT GTG CAA AAA	450
136	Asp Ala Gln Ala Lys Arg <u>Lys Gln Ile Pro Pro Phe Val Gln Lys</u>	150
451	TTG AGC AGT TTT CTT GAT GAG TCA AAG AAT ACC GAT TTG ATA CGA	495
151	<u>Leu Ser Ser Phe Leu Asp Glu Ser Lys Asn Thr Asp Leu Ile Arg</u>	165
496	TGG TCT GAT GAC GGA AAT TCA TTC ATC GTC TTG GAC GAA GAC GAA	540
166	<u>Trp Ser Asp Asp Gly Asn Ser Phe Ile Val Leu Asp Glu Asp Glu</u>	180
541	TTT GCC AAA ACT TTA ATT CCA GAG CTT TTC AAG CAT AAC AAC TAT	585
181	<u>Phe Ala Lys Thr Leu Ile PRO Glu Leu Phe Lys His Asn ASN Tyr</u>	195
586	GCC TCG TTT GTC CGA CAA CTG AAC ATG TAT GGT TTC CAT AAG AAA	630
196	<u>Ala Ser Phe Val Arg Gln Leu Asn Met Tyr Gly Phe His LYS Lys</u>	210

Figura 4 (esta página e pelas três seguintes). Sequência deduzida do gene *Pbhsf*. Seguiu-se o código genético universal; as abreviaturas dos aminoácidos seguem a convenção da União Internacional de Química Aplicada (IUPAC). Sublinhado, o DBD. Duplamente sublinhada, a alfa-hélice três. Em azul, resíduos conservados entre os DBDs de *P. brasiliensis* e *S. cerevisiae*. Em letras maiúsculas, os resíduos Asn¹⁹⁴, e Lys²⁰⁹, correspondentes a resíduos cuja substituição por alanina confere atividade constitutiva ao homólogo de *S. cerevisiae*; e o resíduo Pro¹⁸⁷, que denota a torção do motivo hélice-volta-hélice dessa família de DBDs.

631	GTT	GGC	CTA	TCC	GAT	AAC	TCG	ATG	CGG	GCT	AGC	GAA	CGC	AAG	AAT	675
211	Val	Gly	Leu	Ser	Asp	Asn	Ser	Met	Arg	Ala	Ser	Glu	Arg	Lys	Asn	225
676	AAG	AGT	CCC	AGT	GAA	TAT	TCA	AAT	CCT	TAC	TTC	AAA	CGC	GGT	CAT	720
226	Lys	Ser	Pro	Ser	Glu	Tyr	Ser	Asn	Pro	Tyr	Phe	Lys	Arg	Gly	His	240
721	CCA	GAC	CTT	CTC	TGG	CTC	ATT	CAG	AAA	CCC	AAG	AAC	GTG	ACC	GGG	765
241	Pro	Asp	Leu	Leu	Trp	Leu	Ile	Gln	Lys	Pro	Lys	Asn	Val	Thr	Gly	255
766	CAA	GGC	CGA	GGA	GCC	GCC	AAA	GGT	GGA	TCA	CGT	ACA	AAG	ATA	GAA	810
256	Gln	Gly	Arg	Gly	Ala	Ala	Lys	Gly	Gly	Ser	Arg	Thr	Lys	Ile	Glu	270
811	GTT	GAT	GGA	GAG	GAT	GGA	GAA	AAT	GAG	GAT	TTT	GGA	GAT	GAA	GGA	855
271	Val	Asp	Gly	Glu	Asp	Gly	Glu	Asn	Glu	Asp	Phe	Gly	Asp	Glu	Gly	285
856	GGT	GGC	ACC	CTA	CAT	GAG	AAA	TCA	AAA	TTC	CGT	GGC	CAA	CTC	TCT	900
286	Gly	Gly	Thr	Leu	His	Glu	Lys	Ser	Lys	Phe	Arg	Gly	Gln	Leu	Ser	300
901	ATC	GGA	GCT	GCA	GAG	GGA	ACG	CTG	GGA	GGT	GAT	CAG	CTG	GCG	AAT	945
301	Ile	Gly	Ala	Ala	Glu	Gly	Thr	Leu	Gly	Gly	Asp	Gln	Leu	Ala	Asn	315
946	GTG	TAC	CGC	GAA	CTT	CAG	AAC	ATT	CGT	CAA	CAG	CAG	CAA	ATA	ATT	990
316	Val	Tyr	Arg	Glu	Leu	Gln	Asn	Ile	Arg	Gln	Gln	Gln	Gln	Ile	Ile	330
991	TCT	TCA	ACT	ATT	AGC	AAA	TTG	CGG	CGA	GAG	CAT	GAA	CAG	CTC	TAT	1035
331	Ser	Ser	Thr	Ile	Ser	Lys	Leu	Arg	Arg	Glu	His	Glu	Gln	Leu	Tyr	345
1036	GGA	CAA	GCA	GCG	ACC	TTC	CAG	GAG	CAA	CAT	ACT	CGT	CAC	GAA	AAT	1080
346	Gly	Gln	Ala	Ala	Thr	Phe	Gln	Glu	Gln	His	Thr	Arg	His	Glu	Asn	360
1081	TCT	ATC	AAT	GCC	ATC	CTC	ACA	TTC	CTA	GCC	ACG	GTA	TAC	AAC	CGA	1125
361	Ser	Ile	Asn	Ala	Ile	Leu	Thr	Phe	Leu	Ala	Thr	Val	Tyr	Asn	Arg	375
1126	AGC	TTA	CAA	GGC	CAC	GAA	GGG	GCT	CAG	GGG	ATT	GTC	AAT	TCG	TTT	1170
376	Ser	Leu	Gln	Gly	His	Glu	Gly	Ala	Gln	Gly	Ile	Val	Asn	Ser	Phe	390
1171	GCT	GGA	GCT	ATA	CCC	CAA	GAT	AAT	AGT	CAG	GGG	AAT	ATT	GTC	AAC	1215
391	Ala	Gly	Ala	Ile	Pro	Gln	Asp	Asn	Ser	Gln	Gly	Asn	Ile	Val	Asn	405
1216	ATG	GAC	AAT	TAT	ATC	GGA	AAT	ATC	AAT	TCA	GAT	CAT	TCT	GCT	CAG	1260
406	Met	Asp	Asn	Tyr	Ile	Gly	Asn	Ile	Asn	Ser	Asp	His	Ser	Ala	Gln	420
1261	CGT	CCT	TTC	AAG	AAG	CAA	CCT	TTG	CTG	CTG	AAG	GCT	CCT	CCT	GTT	1305
421	Arg	Pro	Phe	Lys	Lys	Gln	Pro	Leu	Leu	Leu	Lys	Ala	Pro	Pro	Val	435
1306	ATT	GGT	CCA	GAC	GGA	CAG	CCA	ATA	CAG	CCA	AAC	AAG	TTG	AGC	CTA	1350
436	Ile	Gly	Pro	Asp	Gly	Gln	Pro	Ile	Gln	Pro	Asn	Lys	Leu	Ser	Leu	450
1351	TCT	CCA	GCG	GGC	AGC	CAC	TAT	GAT	TTG	TCC	CAA	GAT	CAT	AGA	CGG	1395
451	Ser	Pro	Ala	Gly	Ser	His	Tyr	Asp	Leu	Ser	Gln	Asp	His	Arg	Arg	465
1396	CTA	TCT	GAT	CAA	ACT	AGT	GTA	ACA	TCC	ACG	AAT	ATT	GAA	GAA	CTC	1440
466	Leu	Ser	Asp	Gln	Thr	Ser	Val	Thr	Ser	Thr	Asn	Ile	Glu	Glu	Leu	480
1441	TAT	GAG	AGC	CCG	CAT	AAC	TCT	GTT	TCC	CAG	CCA	CAA	GTC	TCA	CAC	1485
481	Tyr	Glu	Ser	Pro	His	Asn	Ser	Val	Ser	Gln	Pro	Gln	Val	Ser	His	495
1486	CAA	CAA	CAG	CAA	CAT	GCA	GTG	CAA	AAC	CAA	CGG	ACA	CGG	TCG	CCT	1530

496	Gln	Gln	Gln	Gln	His	Ala	Val	Gln	Asn	Gln	Arg	Thr	Arg	Ser	Pro	510
1531	CAA	GCT	GTA	GAG	GAC	CAA	TCT	ACT	TCC	AAT	TTC	CCC	CAG	AAA	GAC	1575
511	Gln	Ala	Val	Glu	Asp	Gln	Ser	Thr	Ser	Asn	Phe	Pro	Gln	Lys	Asp	525
1576	ATC	ATG	TCC	GTT	ATA	CAG	AAT	TCC	AAC	GCG	AGG	AAT	AAT	CTA	CCC	1620
526	Ile	Met	Ser	Val	Ile	Gln	Asn	Ser	Asn	Ala	Arg	Asn	Asn	Leu	Pro	540
1621	GCC	AAT	CTT	TCT	GAT	TTC	CCA	AGA	ATT	CTC	TCC	TCG	TTT	GAG	ACG	1665
541	Ala	Asn	Leu	Ser	Asp	Phe	Pro	Arg	Ile	Leu	Ser	Ser	Phe	Glu	Thr	555
1666	TCG	GAT	GGT	AAT	TCT	CCT	CTT	ACG	GCG	TCC	CAG	CGA	GCC	GAT	ATG	1710
556	Ser	Asp	Gly	Asn	Ser	Pro	Leu	Thr	Ala	Ser	Gln	Arg	Ala	Asp	Met	570
1711	CTA	CGC	CTC	ATT	GCG	AAC	CAG	AAC	CAT	GTG	TCG	GAT	CCG	ACC	AGC	1755
571	Leu	Arg	Leu	Ile	Ala	Asn	Gln	Asn	His	Val	Ser	Asp	Pro	Thr	Ser	585
1756	TCG	GCT	TCA	AAC	AGT	GCT	CTA	ATC	TCC	CCG	ACT	CCG	CCT	CCC	ATG	1800
586	Ser	Ala	Ser	Asn	Ser	Ala	Leu	Ile	Ser	Pro	Thr	Pro	Pro	Pro	Met	600
1801	CCC	GCT	AGC	TAC	CCC	AAC	CGC	CTT	GCC	AAT	ACG	CGA	GCG	GAG	ATC	1845
601	Pro	Ala	Ser	Tyr	Pro	Asn	Arg	Leu	Ala	Asn	Thr	Arg	Ala	Glu	Ile	615
1846	GAC	AAT	CTT	GTA	AAA	ATG	CAA	GCT	GAA	CAA	GAC	CGC	TCC	GTC	CAG	1890
616	Asp	Asn	Leu	Val	Lys	Met	Gln	Ala	Glu	Gln	Asp	Arg	Ser	Val	Gln	630
1891	AAC	CTC	ACA	AAC	CTA	CTA	CAG	CCT	TTA	AGC	CCC	ACC	GGG	TCA	ATC	1935
631	Asn	Leu	Thr	Asn	Leu	Leu	Gln	Pro	Leu	Ser	Pro	Thr	Gly	Ser	Ile	645
1936	CCT	GGG	CTT	GGC	CCT	AAC	AGC	CTG	ACC	TCT	AGC	GTC	CCA	CCT	CCT	1980
646	Pro	Gly	Leu	Gly	Pro	Asn	Ser	Leu	Thr	Ser	Ser	Val	Pro	Pro	Pro	660
1981	CTG	GAT	CTG	GAC	CAA	ATT	TTC	AAC	AGC	GGG	GAC	TAT	TTT	TCA	GAC	2025
661	Leu	Asp	Leu	Asp	Gln	Ile	Phe	Asn	Ser	Gly	Asp	Tyr	Phe	Ser	Asp	675
2026	TTT	ACA	GAT	ATG	GAG	AAA	GGC	GGG	GGG	GAT	ATT	TCT	GGA	TTC	AAT	2070
676	Phe	Thr	Asp	Met	Glu	Lys	Gly	Gly	Gly	Asp	Ile	Ser	Gly	Phe	Asn	690
2071	CAT	GAT	CTT	CAA	ACC	GGA	CCG	GGA	AAA	GAA	CTT	GAC	TTT	AAA	AGC	2115
691	His	Asp	Leu	Gln	Thr	Gly	Pro	Gly	Lys	Glu	Leu	Asp	Phe	Lys	Ser	705
2116	GAC	AGC	AGC	AAT	CAC	AAC	GGC	AAC	AGC	ACA	GCA	GCA	AAT	GAT	ATC	2160
706	Asp	Ser	Ser	Asn	His	Asn	Gly	Asn	Ser	Thr	Ala	Ala	Asn	Asp	Ile	720
2161	CAC	GCC	AGT	GAT	CTC	TTT	GAT	TTC	GAT	GGT	CTC	CCT	TCC	ACT	ACG	2205
721	His	Ala	Ser	Asp	Leu	Phe	Asp	Phe	Asp	Gly	Leu	Pro	Ser	Thr	Thr	735
2206	ACT	AGC	GAT	CCA	TTT	CGT	TCT	TTG	AAT	GCT	CCC	GTT	GAC	GCA	CAC	2250
736	Thr	Ser	Asp	Pro	Phe	Arg	Ser	Leu	Asn	Ala	Pro	Val	Asp	Ala	His	750
2251	TCA	GTT	CCC	GGT	TAT	TTT	GAG	GGA	CAT	ACA	GGG	TTA	AAC	CGC	GAC	2295
751	Ser	Val	Pro	Gly	Tyr	Phe	Glu	Gly	His	Thr	Gly	Leu	Asn	Arg	Asp	765
2296	AGC	AGC	AAT	CTT	GAA	AAT	ACA	AGG	CCG	GAT	GAT	AGA	TTA	AGC	TCT	2340
766	Ser	Ser	Asn	Leu	Glu	Asn	Thr	Arg	Pro	Asp	Asp	Arg	Leu	Ser	Ser	780
2341	ATC	AAT	TTC	GGG	AGT	GGA	AGA	AGA	GAA	TCA	GAC	GGA	GCT	CGC	ATC	2385
781	Ile	Asn	Phe	Gly	Ser	Gly	Arg	Arg	Glu	Ser	Asp	Gly	Ala	Arg	Ile	795
2386	ACA	GAG	GCG	TTT	TCG	AGT	AGT	GAA	TGT	CCT	AGC	CCA	GCA	ACC	ACA	2430

796	Thr	Glu	Ala	Phe	Ser	Ser	Ser	Glu	Cys	Pro	Ser	Pro	Ala	Thr	Thr	810
2431	AGT	GTT	GAT	GAG	AAT	TTA	CAA	GGG	ATT	GAT	GAT	GGG	AAT	TGT	GCT	2475
811	Ser	Val	Asp	Glu	Asn	Leu	Gln	Gly	Ile	Asp	Asp	Gly	Asn	Cys	Ala	825
2476	AGT	GCT	GGA	GCA	AAG	CCT	TCG	AAC	AAG	AGG	CGC	AGA	AGA	AAC	AGG	2520
826	Ser	Ala	Gly	Ala	Lys	Pro	Ser	Asn	Lys	Arg	Arg	Arg	Arg	Asn	Arg	840
2521	TAG		2523													
	Fim															

Figura 4. (fim)

Novo uso do CLUSTALW2, desta vez usando as seqüências das nove proteínas fúngicas – todas de Eurotiomycetidae – que apresentaram maior similaridade com o PbHsf, mais a seqüência de *S. cerevisiae*, gerou a **figura 5**, em que se realçam as regiões conservadas nas proteínas daquela subclasse.

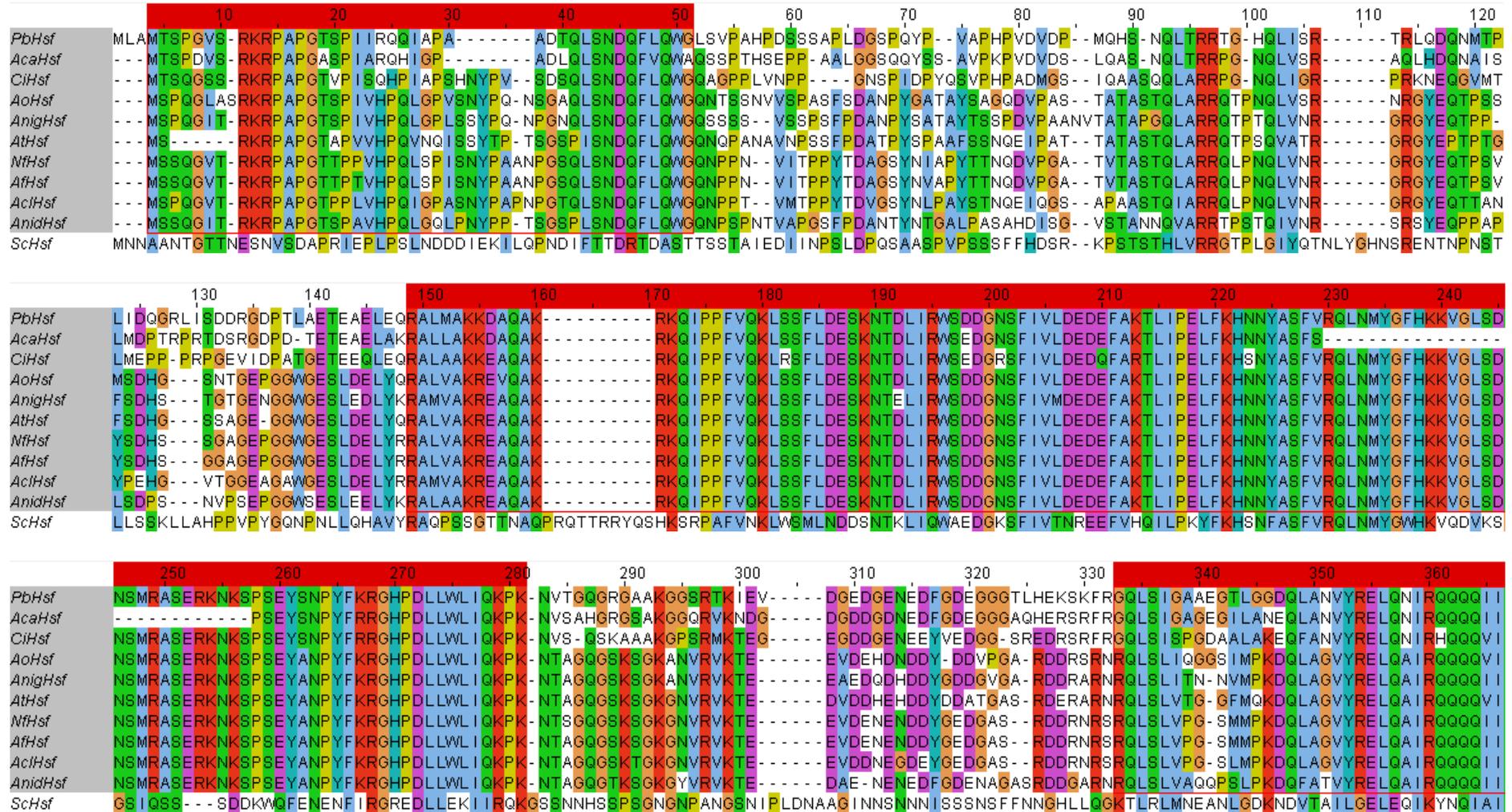
Fica bastante evidente que os fatores de choque térmico dos Eurotiomycetidae compartilham muitas características entre si, e que estas parecem divergir substancialmente da proteína de *S. cerevisiae* na maioria das regiões. Há exceções, contudo. O DBD, neste alinhamento contido entre as posições 170 e 280, é bem conservado com relação a *S. cerevisiae*, conforme discutido no texto. Já a região que, em *S. cerevisiae* corresponderia ao domínio de trimerização, contida dentro da área que vai da posição 330 à 480, embora não pareça conservada nos Eurotiomycetidae à primeira vista, apresenta nas proteínas desses últimos resíduos de leucina e isoleucina conservados em diversas posições, alguns deles com o espaçamento de sete resíduos que marca os zíperes de leucina do fator da levedura (Bonner *et al.*, 1992). Já a região CE2, que, no fator de *S. cerevisiae*, corresponde às posições 574 e 585 do alinhamento, não parece encontrar correspondente nas outras seqüências. As últimas bases da região CTM de *S. cerevisiae*, incluindo resíduos de lisina e arginina (motivo KRAKK) que são essenciais para a atividade do Hsf em alguns contextos de estresse (Sakurai *et al.*, 2001), estão também presentes nos demais fungos, embora o restante da região CTM não esteja.

O domínio de ativação amino-terminal do Hsf de *S. cerevisiae* não tem um equivalente claro nos demais fungos alinhados, que, no entanto, apresentam entre si grande concordância das primeiras 50 posições. Se elas configuram um domínio amino-terminal específico de fungos filamentosos é uma hipótese passível de investigação. O mesmo se aplica a várias regiões no trecho adjacente da região de trimerização, que parecem conservadas nos Eurotiomycetidae e divergentes de *S. cerevisiae*. Elas podem configurar regiões funcionalmente específicas desse grupo de organismos, à maneira dos

domínios exclusivos dos Hsfs de metazoários (Voellmy, 2004). O significado desses achados será uma avenida de investigação para o futuro.

Ainda no terreno especulativo, e lembrando que *P. brasiliensis*, *C. immitis* e *A. capsulatus* são filogeneticamente mais próximos entre si (ordem Onygenales) do que dos demais fungos usados neste alinhamento, é digno de nota que só eles parecem possuir uma inserção de cerca de vinte resíduos, da posição 548 à 569. Sem incluir na análise outros fungos da mesma ordem, não se pode afirmar que essa inserção se trate de uma assinatura cladística.

Figura 5 (esta página e as duas seguintes)



	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480
<i>PbHsf</i>	SSTISKLRREHEQLYGQAATFGEQHTRHENS	INAILTFLATVYNRSLQGHEGAQGVNSFAG-AIPQDNSQGNIVNMDN-----	YIGNINSDH-SAQRPFKKQPLLLKAPPVIGPDGQPIQP									
<i>AcaHsf</i>	SSTISGKLRRREHEQLYGQAATFGEQHTRHENS	INAILTFLATVYNRSLQGEHGIQGVNSFAG-AIPQDTTQRNIVDMND-----	YIGGINVDR-SGQRPFKKQPLLLKAPPVSDRDVQPLQG									
<i>CiHsf</i>	SNTISKLRREHEQLYDQALNFGEQHNRHENS	INAILTFLATVYNRSLQGHGGAQGMINSFAAGTMPQEQQGGNIIDVGD-----	YLGNVESNLNPAQRPTKKQPLLLKAPPAGGQEPSPSRA									
<i>AoHsf</i>	SNTITKLRREHEQLYQAANFGEQHTRHENS	INAILTFLATVYNRSLQGGEGPQNLANSFAG-AISQD--QGNVVDMDGDDYSLSTLGAQHMNS	PGGPRAMKKQPLLLKAAP-SER-----QS									
<i>AnigHsf</i>	SNTISKLRREHEQLYQAANFGEQHTRHENS	INAILTFLATVYNRSLQGGEGPQNLANSFAG-AISQD--QGNVVDMDGDDYTLSTLGASNLNS	PGGQRS MKKQPLLLKAPPGADR-----QS									
<i>AtHsf</i>	SNTISKLRREHEQLYQAANFGEQHTRHENS	INAILTFLATVYNRSLQGGDGPQNLANSFAG-AISQD--QGNVVDVGDYSLSTLGA	PNLNSPSTQRTMKKQPLLLKAPPVTEP-----HG									
<i>NtHsf</i>	SNTISKLRREHEQLYQAANFGEQHNRHENS	INAILTFLATVYNRSLQGGDGPQNLANSFAG-VISQD--QGNVVDVGDYSLALGAANLNS	PNAQRS MKKQPLLLKAPPITTERQ-----NG									
<i>AfHsf</i>	SNTINKLRREHEQLYQAANFGEQHNRHENS	INAILTFLATVYNRSLQGGDGPQNLANSFAG-VISQD--QGNVVDVEDDFLSALGAANLNS	PNAQRS MKKQPLLLKAPPITDRQ-----NG									
<i>AcIhHsf</i>	SNTISKLRREHEQLYQAANFGEQHNRHENS	INAILTFLATVYNRSLQGS DGTQNLANSFAG-VISQD--QGNVVDMDGNFPLSALGAANMNS	PSTQRTLKKQPLLLKAPPVPER-----HG									
<i>AnidHsf</i>	SSTINKLRREHEQLYQAANFGEQHTRHENS	INAILTFLATVYNRSLQGGEG-QNLANSFAG-AISQD--QGNVVDMDGDDYSLGAPSMNS	PGGPRS MKKQPLLLKAPPSPER-----HG									
<i>ScHsf</i>	SKDLLRINKDNE LLWKENMMARERHRTQGALEKMFRLTSLVPLHLDPKMIMDGLGDPKVN---	NEKLNLSANILGLNRD-----	NTGTIDE LKSNDSFINDDRNSFTNATTNARNN-----MS									

	490	500	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600	610
<i>PbHsf</i>	NKLSLSPAGSHYDLSQDHRRLSDGT-SVTSNTNIEELYESPHNSV	SQPVVSHQG-QGHAVQNQRTRSQAAVED-QS	TSNFQKDIMSVIQNSNARNNLP-ANLSDFPRI	LSSFETS	SDGNSPLTA								
<i>AcaHsf</i>	NAISPSSTASPYDTLSHRRLSEHKNSASGNIEEPFGSPHNSASQAP	IPNRGEQQLPVGHQRTSSQS	AQQQSAPNLPERDIMS	AIQNSNARNNPS-SNLSDFPRML	SSFETS	GGNSPLTA							
<i>CiHsf</i>	S--TSSPANNQYDIQQGTNNGHGHRPSTRAGSVEELFES--	VSPQHTGQPPHQQPYTPVSHARSPS-----	DAKYPPQRDIMS	LIQSSNARSNMQ-PAADFP	SVLSSLENAGGHVPLTA								
<i>AoHsf</i>	RATTLSPAAYDGGP-PRGHARHPSAPQGHVEEVFDT--	SPQPKAQPPTEQFPQ-----	RDIMSVIQNSNARNGVPP	TSFADFP	NVLSSLET	SNVPLTP							
<i>AnigHsf</i>	RATTLSPAAYDRSQ-PRGHGRQPSASQPGHVEEVFDT--	SPRPKEAPVRANQQYPQ-----	RDIMSVIQNSNARNGMP	-TTFADFP	NVLSSLET	SGNSPLTP							
<i>AtHsf</i>	RAATLSPAS-TYDRS--SRGHTRQPSATQHGLVEEVFDT--	SPRPKETAQ-SSQQIPQ-----	RDIMSVIQNSNARNGIA	-TTFADFP	NVLSSLET	SGNVPLTP							
<i>NtHsf</i>	RATTLSPAGSTYNRSQ-SRSHSRQPSVAGAGHVEEVFET--	SPTQKDATNSQNRQYPQ-----	SDIMSVIQNTNARNGIP	-TTFAE	FPNVLSSLET	SGNSPLTP							
<i>AfHsf</i>	RATTLSPAGSTYNRSQ-SRSHSRQPSVQAGHVEEVFET--	SPTQKDATNSQNRQYPQ-----	SDIMSVIQNTNARNGIP	-TTFAE	FPNVLSSLET	SGNSPLTP							
<i>AcIhHsf</i>	RATTLSPAASYSYDRSQ-SRNHSRQPSVAGPGHVEEVFET--	SPRPKGTTPSQTQQHPQ-----	RDIMSAIHNSNARNGIP	-TTFADFP	NVLSSLET	SGNSPLTP							
<i>AnidHsf</i>	RAATLSPAATAYDRSQ-SRNNSRQTSQSQGVVEEVFENN--	SPRSKETS	SSQAQQYPQ-----	RDIMSVIQANARNGIP	-TTSYD	FPNVLSSLET	SNVPLTS						
<i>ScHsf</i>	PNDDNSIDTASTNTTNRKKNIDENIKNNNDIINDIIFNTNLANNLSNYSN	NNNAGSPIR-----	PYKQRYLLKNRANS	STSENPSLTPFD-	IESNDRKISEIP	FD							

	620	630	640	650	660	670	680	690	700	710	720	730
<i>PbHsf</i>	--SQRADMLRLIANQNHVSDPTSSAS-NSALI	SPTPPPMPASYP--NRLANTRAE	IDNLVKMQAEQDRSVQNL	TNLLQPLSP	TGSPGLGPN	SLTS	SVPPP-LDLDQIF	NSGDYFSD	FDME			
<i>AcaHsf</i>	--SQRADVLRRLIANQNHASDPTTASPNNALI	TPNPPPMPAGYP--TRLASTRAE	IDNLVKMQAEQDRSVQNL	TSLQPLSP	PNGSPGLDEN	SLNSGVPPP	LDLDQIF	NSDYFSD	IPGMD			
<i>CiHsf</i>	--TQRADMLRLIANESHASDRSAISSPNNALI	TPNPPPMPHSYS--TRLANTRAE	IDNLVKMQAEQDR-----	-----	NVPPP	LDLDQIF	NSGDYFSD	YANME				
<i>AoHsf</i>	--NQRADMLRLMANETSAGDSNPVPSQNNALV	TPTPPPMLGYS--NRLANTRAE	IDNLVKMQAEQDRSVQNL	TNLLQPLSPTGT	IPGMVTG--	DGSVPPP	LDLDQIF	FN-DYFTD	IGDLE			
<i>AnigHsf</i>	--NQRADMLRLMANESNSSGTSPPVSQNNALM	TPTPPPMPHNS--GRLANTRAE	IDNLVKMQAEQDRSVQNL	TNLLQPLSPTGT	IPGIGT--	DGSVPPP	LDLDQIF	FN-DYFTD	IGDLE			
<i>AtHsf</i>	--NQRADMLRLMANESHPTDNLVPSNNALI	INPHPPPMPHNYT--TRLANTS	AEIDNLVKMQAEQDRSVQNL	TNLLQPLSPTGT	IPGVA--	DGNVPPP	LDLDQIF	FN-DYFTD	IGDLE			
<i>NtHsf</i>	--NQRADMLRLMANESHT-DPNI	VPVSNNALITPTPPPMPHNYN--	GRLANTRAE	IDNLMKMQAEQDRSVQNL	TNLLQPLSPTGT	IPGLAGGE	-NGSVPPP	ALDLQIF	FN-DYFTD	IGDLE		
<i>AfHsf</i>	--NQRADMLRLMANESHT-DPNI	VPVSNNALITPTPPPMPHNYN--	GRLASTRAE	IDNLMKMQAEQDRSVQNL	TNLLQPLSPTGT	IPGLAGGE	-NGSVPPP	ALDLQIF	FN-DYFTD	IGDLE		
<i>AcIhHsf</i>	--NQRADMLRLMANETHN-DANI	PVPTNSALITPTPPPMLNYS--	GRLANTRAE	IDNLMKMQAEQDRSVQNL	TNLLQPLSP	NGSPGIAS-E	-NGGVPPP	LDL	DALFNN-DYFTD	IGDLE		
<i>AnidHsf</i>	--NQRADMLRLMANESGTNDSGVTVS	QNNALISPVPPPMPHNS--	ARLADTRSE	IDNLMKMQAEQDRSVQNL	TNLLQPLSP	SGTIPGIGS--	DGTIPPPP	LDQIF	FN-DYFTD	FGDYD		
<i>ScHsf</i>	GEEETDFRPFTRDPNNQTSENTFDPNRF	TMLSDDDLK	KDSDHTNDNKHNSDL	LDNVHRNIDEQ	DARLQNL	ENMVHILSP	GYPNKSFNNK	TSSNTNS	NMESAVNVNSP	GFNLQDYLTGE		

regiões que, à inspeção visual, parecem conservadas dentro dos Eurotiomycetidae. O sublinhado azul indica a região de fosforilação CE2, presente só no fator de *S. cerevisiae*.

5.3. Filogenia do Hsf em Eurotiomycetidae

As mesmas seqüências usadas pela análise anterior foram empregadas na geração de um filograma, com a seqüência de *S. cerevisiae* como grupo externo. O resultado pode ser observado à **figura 6**.

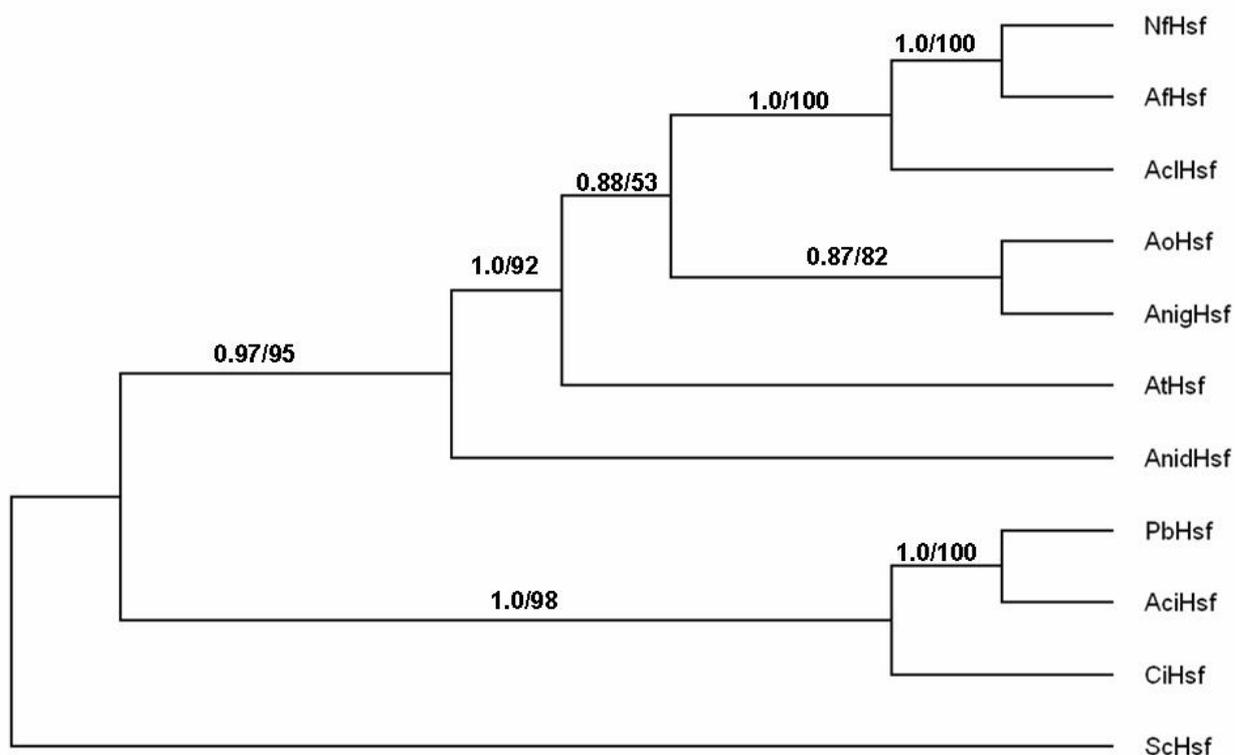


Figura 6. Árvore de inferência Bayesiana/máxima parcimônia dos Hsfs de Eurotiomycetidae, tendo a seqüência da proteína da *S. cerevisiae* como grupo externo. As distâncias dos ramos não são proporcionais ao tempo de divergência. As abreviaturas das proteínas seguem o alinhamento da figura 5. A árvore foi gerada após um milhão de gerações pelo programa MrBayes, com mil Bootstraps por ramo. Os valores junto aos ramos indicam o índice de concordância de Bootstrap (de zero a cem, sendo que valores acima de 75 indicam boa verossimilhança do ramo correspondente) e de probabilidade posterior (de zero a um, com valores acima de 0,95 sendo considerados aceitáveis).

Essa árvore está em bom acordo com a literatura sobre filogenia de fungos. Tendo um membro do subfilo Saccharomycotina como grupo externo, a análise filogenética agrupou os

membros da ordem Onygenales (*A. capsulatus*, *C. immitis* e *P. brasiliensis*) como grupo monofilético distinto dos demais fungos usados. Vale lembrar que o gênero *Aspergillus* e o fungo *N. fischeri* são ambos classificados na ordem Eurotiales, família Trichocomaceae, de modo que não surpreende que todos sejam agrupados à parte. Conclui-se que o Hsf, a julgar por essa análise, é um bom gene para separar os Eurotiomycetidae quanto à ordem, com bons índices de verossimilhança para os ramos correspondentes; embora seja insuficiente para distinguir graus de parentesco entre fungos de uma mesma família, a julgar pelos valores insatisfatórios dos índices para alguns ramos de Trichocomaceae (por exemplo, o grupo monofilético incluindo *A. oryzae* e *A. niger*, em que o índice de probabilidade posterior e a concordância de Bootstrap discordam).

5.4. Clonagem do PbHsf em *S. cerevisiae*

Conforme detalhado na metodologia, o amplicon cistrônico foi clonado no vetor PCR-XL-TOPO[®]. A digestão dos clones candidatos com BglII, que permitiu a seleção de um para transformação da levedura *S. cerevisiae*, se encontra à **figura 7**.

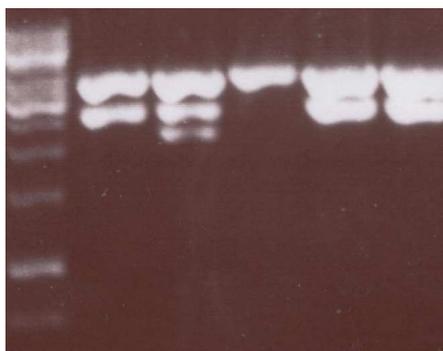


Figura 7. Verificação da inserção do amplicon cistrônico do *Pbhsf* no vetor PCR-XL TOPO[®]. A faixa da extrema esquerda contém 500 ng do marcador de massa molecular GeneRuler[®] 1 kb DNA Ladder (Fermentas), cujas bandas mais intensas, a contar de cima, têm seis e três quilobases. As amostras, a contar da segunda faixa à esquerda, correspondem à totalidade da digestão com BglII do DNA plasmidial das cinco primeiras minipreparações da transformação em ordem crescente (vide texto). Os clones um, quatro e cinco apresentam o padrão esperado: uma banda de cerca de 3,5 kpb correspondente ao vetor e outra, de cerca de 2,5 kpb, correspondente ao amplicon cistrônico. A amostra dois apresenta um padrão anômalo, possivelmente devido a um evento de recombinação, enquanto o clone três só apresenta a banda do vetor. O clone cinco foi escolhido para dar continuidade ao processo de clonagem.

Já no caso da inserção do cistron no vetor YEppgk351, três amostras (números 5, 9 e 24) revelaram o padrão correto de bandas de eletroforese. A **figura 8A** mostra como exemplo o padrão de bandas da amostra 24. Todas foram estocadas a -70°C na presença de glicerol, o plasmídeo foi nomeado YEpChSF (**figura 8B**) e a amostra número 24 foi usada para transformação da linhagem de levedura HS126 (Sakurai & Takemori, 2007).

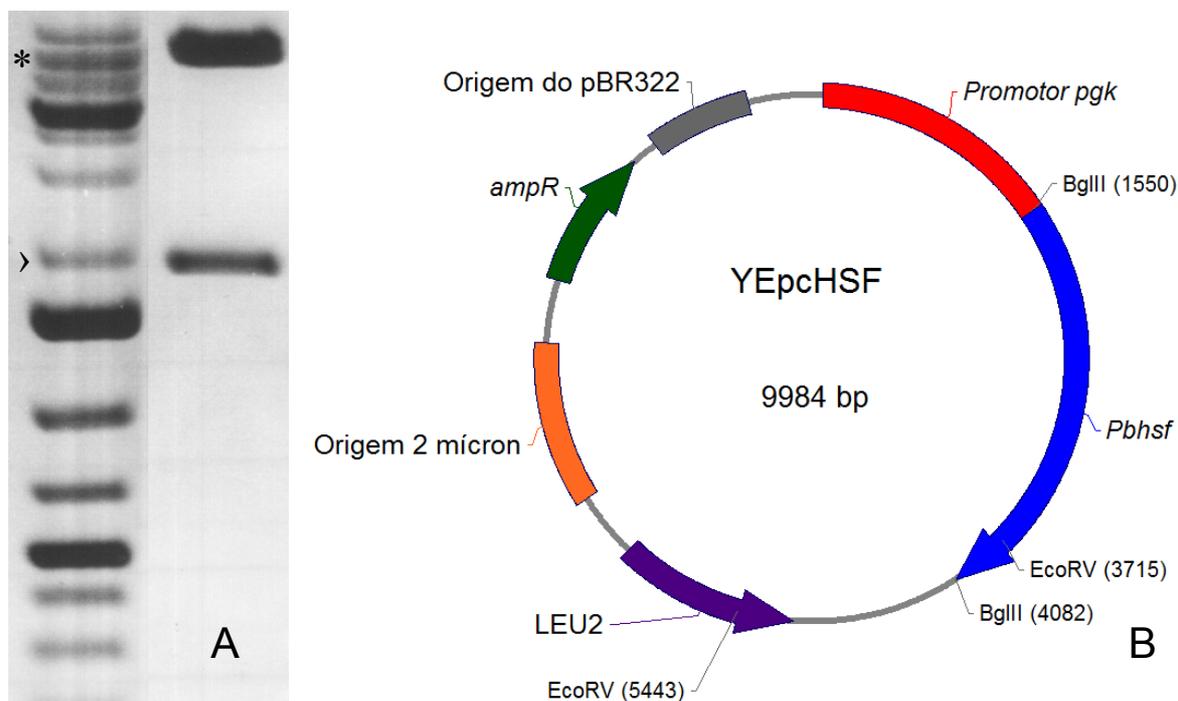


Figura 8. (A) Negativo de foto de gel de eletroforese da digestão para confirmar orientação de um clone da transformação YEpChSF. O poço da esquerda contém 400 ng do marcador O'Gene Ruler[®] 1 kb DNA Ladder Plus (Fermentas); o asterisco e a cabeça de seta denotam as bandas, respectivamente, de dez e dois quilobases. O da direita contém a totalidade do sistema de digestão com EcoRV do clone 24. A foto foi editada digitalmente para remover faixas do gel original que não continham amostras relevantes para este projeto. (B) O vetor binário YEpChSF. As características destacadas são: a origem bacteriana, provinda do plasmídeo clássico pBR322; a origem 2μ para propagação em leveduras; o gene da beta-lactamase (*amp^r*) para seleção de recombinantes bacterianos; o gene *LEU2*, para seleção de leveduras recombinantes (vide texto); o gene *PbhSF*, alvo do presente projeto, sob o comando do promotor *pgk* de *S. cerevisiae*. Indicados com posição entre parênteses estão ainda os sítios das enzimas de restrição usadas para verificação da clonagem do *PbhSF* e sua orientação. Os promotores de *LEU2* e *amp^r* foram omitidos.

A transformação da linhagem HS126 logrou êxito. Após dois dias de incubação a 30°C, surgiram colônias brancas isoladas na placa. A nova cepa foi denominada HCP1. Um controle para experimentos posteriores foi feito transformando-se a cepa HS126 com o plasmídio YEppgk351 pelo mesmo método. A cepa resultante foi denominada HCP2. Oito colônias transformantes de cada uma das novas cepas foram semeadas por espalhamento em duas placas de SD-TA dividida em oito territórios iguais, de modo a confirmar a auxotrofia na ausência de leucina e obter colônias isoladas de cada uma. Ao se confirmar novamente o crescimento, uma colônia de cada placa foi escolhida arbitrariamente para semeadura em cinco mililitros de SD-TA líquido. Após dois dias de crescimento sob agitação a 30 °C, 800 µl de cada cultura foram adicionados a 200 µl de glicerol estéril num tubo criogênico devidamente rotulado; as suspensões foram homogeneizadas, imersas brevemente em nitrogênio líquido e estocadas a -70°C.

5.5. Contra-seleção com 5-FOA e trans-complementação de *S. cerevisiae*

Uma colônia isolada de cada uma das oito regiões da segunda placa foi transferida para uma placa de SD-TAU5 (com 5-FOA a 5,7 mM). Como controle negativo, verificou-se a incapacidade de crescimento – por não possuir o *Pbhsf* para resgatar a perda do gene nativo – da cepa HCP2 nas mesmas condições. Como a solução estoque de 5-FOA (570 mM) tem como solvente o dimetil-sulfóxido (DMSO), confirmou-se que este não apresentaria toxicidade às leveduras pela sua semeadura numa placa SD-Trp-Ade-Ura-DMSO (este último a um por cento v/v; SD-TAUD). Após dois dias de incubação a 30°C, esta placa controle apresentou crescimento vigoroso, tanto de HCP1 como de HCP2, confirmando, assim, que o DMSO não interfere no experimento.

Finalmente, após quatro dias de incubação das duas cepas na placa de SD-TAU5, surgiram colônias descendentes de HCP1, mas não de HCP2, indicando que a perda do plasmídio por HCP1 pôde ser resgatada pelo *Pbhsf* presente no plasmídio YEpcHSF, o que não ocorreu com HCP2. A nova cepa, sem o gene nativo, foi denominada HCP3. O experimento de contra-seleção está ilustrado à **figura 9**. Uma colônia da placa de contra-seleção foi selecionada arbitrariamente e semeada por espalhamento numa nova placa de SD-TAU5, com o objetivo de se gerarem colônias isoladas.

A cepa HCP3 foi repicada para uma nova placa, desta vez de SD-TAU, para demonstrar diretamente a dependência de uracila; em princípio, a presença do agente contra-seletor deixa de ser necessária uma vez perdido o vetor *URA3* (o plasmídio restante se faz preservar tanto pela auxotrofia para leucina, quanto por portar um gene tornado essencial, o

Pbhsf, espera-se que a cepa HCP3 seja capaz de manter o YEpcHsf mesmo se semeada em meio complexo). Foi feito ainda um controle negativo pelo repique numa placa de SD-TA, para comprovar a incapacidade de crescer na ausência de uracila. Os resultados também se encontram à **figura 9**.

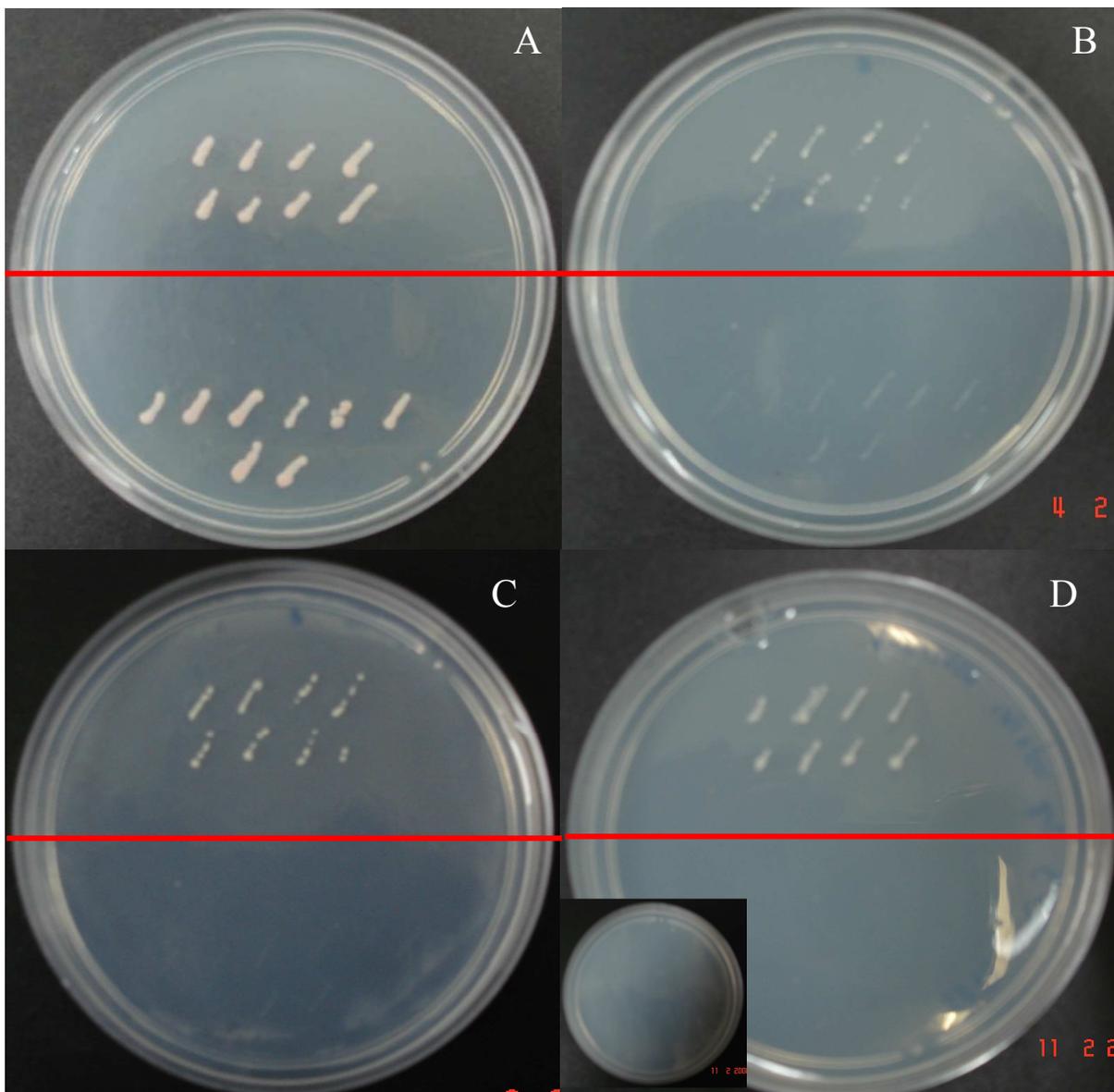


Figura 9. (A) Controle negativo em placa de SD-TAUD. No hemisfério superior, observam-se oito colônias descendentes da transformação que gerou a cepa HCP1; no inferior, igual número de colônias de HCP2. Claramente, a presença de DMSO não interfere no crescimento de quaisquer delas. O tempo de incubação foi de 48 horas. (B e C) Placa de contra-seleção em SD-TAU5. A orientação dos hemisférios e colônias é a mesma de (A). Como se observa, há crescimento de descendentes de HCP1, mas não de HCP2, que não possui o gene *Pbhsf* para resgatar a perda de *HSF1* com o plasmídeo *URA3*. O tempo de incubação é de cinco dias em B e dez em C; o crescimento mais lento provavelmente pode se dever ao fato de que somente uma fração do inóculo original sobreviveu à

presença do 5-FOA. (D) Crescimento de dois dias da cepa HCP3 em SD-TAU. Na imagem menor, o controle negativo da impossibilidade de crescimento da HCP3 em SD-TA.

O passo seguinte foi confirmar a entrada do gene de *P. brasiliensis* e a saída do gene nativo. Isso foi feito por meio de PCRs de colônias, de acordo com a descrição metodológica. A **figura 10** confirma a presença do PbHsf nas leveduras HCP1 e HCP3, e sua ausência de HS126, bem como da presença do ScHsf em HCP1 e HS126, e sua ausência de HCP3.

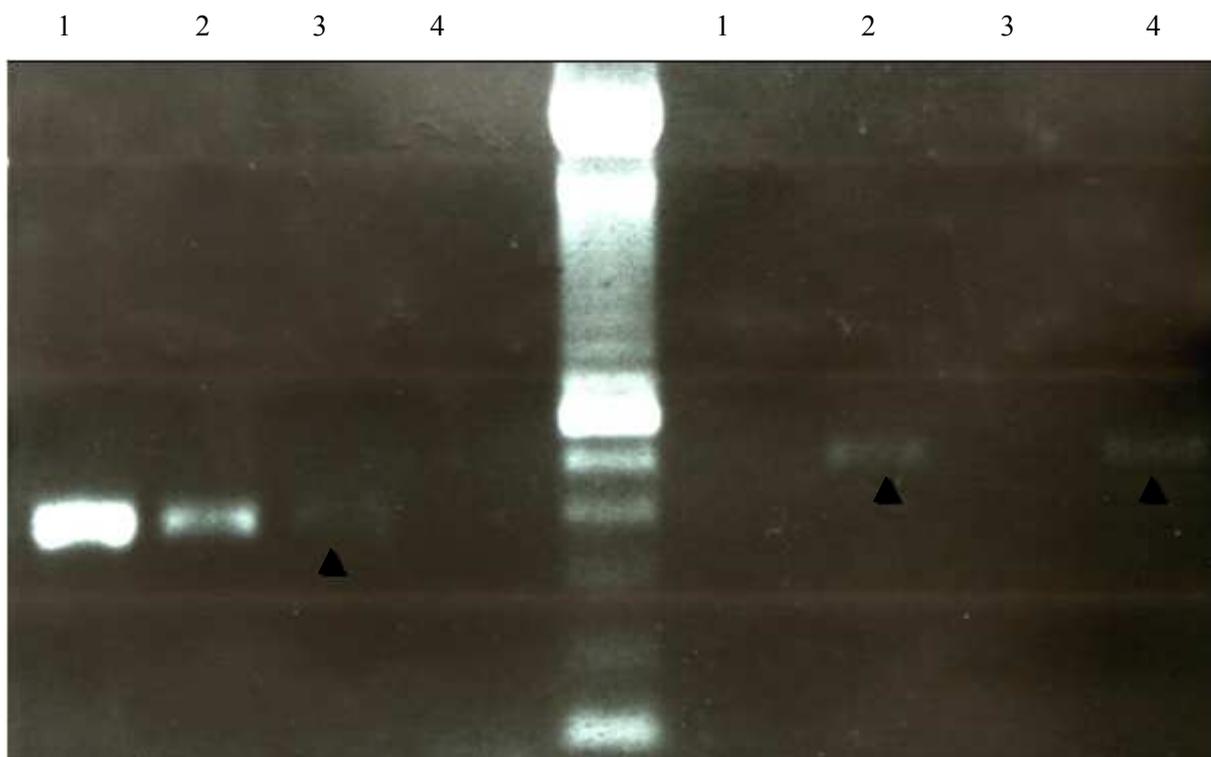


Figura 10. PCR de colônia de levedura para confirmação do genótipo induzido pela *trans*-complementação. 1: vetor YEpcHsf (controle de reação); 2: HCP1; 3: HCP3; 4: HS126. Fileira central: marcador 100 bp DNA Ladder (Invitrogen). À esquerda do marcador: ampliações do fragmento de PbHsf. À direita do marcador: ampliações do fragmento de ScHsf, conforme descrito à metodologia. Dez microlitros de cada reação por fileira foram aplicados no gel. As cabeças de seta indicam os amplicons mais discretos.

5.6. Varredura de promotores à procura de HSEs

Um total de 9.132 ORFs foram anotadas pelo projeto genoma de Pb01; dessas, 655 tinham HSEs nas mil bases a montante da região codificadora, segundo a ferramenta de busca programada com os parâmetros determinados a partir da literatura pelo autor. Esse valor, equivalente a 7,1% dos promotores, é significativamente maior do que o achado para *Saccharomyces cerevisiae* (3% dos promotores; Hahn *et al.*, 2004); no entanto, os dados não

são diretamente comparáveis, já que a varredura em *S. cerevisiae* foi funcional, por imunoprecipitação de cromatina seguida de microarranjo, e não simplesmente *in silico*. Em princípio, é possível que uma fração desses HSEs identificados computacionalmente não seja funcional, como é possível que restem ORFs sem um HSE óbvio que, no entanto, se liguem ao Hsf (Hahn *et al.*, 2004). Além disso, alguns HSEs podem escapar à busca informatizada por possuírem variações de espaçamento entre os núcleos nGAAn que sejam toleradas para ancoragem dos monômeros, mas que escapam aos parâmetros rígidos de varredura. Por exemplo, o promotor do gene da proteína Ryp1 contém a seqüência CGAAAGTCACTTCGAAAACCTTCA, que se aproxima muito de um HSE descompassado, e que foi identificada manualmente pelo autor. Até que se comparem os dados aqui apresentados com experimentos funcionais, não é possível afirmar qual é o subconjunto exato de genes que responde ao fator Pbhsf.

Entretanto, é provável que os genes identificados por essa varredura sejam suscetíveis ao Hsf, uma vez que a simples inclusão do HSE num promotor qualquer já o torna responsivo em experimentos de expressão (Torres *et al.*, 1995). Logo, a lista completa servirá de guia para o restante da discussão.

Excluíram-se dos 655 promotores aqueles que correspondiam a proteínas desconhecidas, ou que haviam sido classificadas não por sua função, mas pela presença de algum motivo conservado. Restaram, do total, 169 promotores de genes cujas proteínas têm funções conhecidas e que contêm HSEs. Sua distribuição se encontra à **figura 11**, e a lista completa, no apêndice.

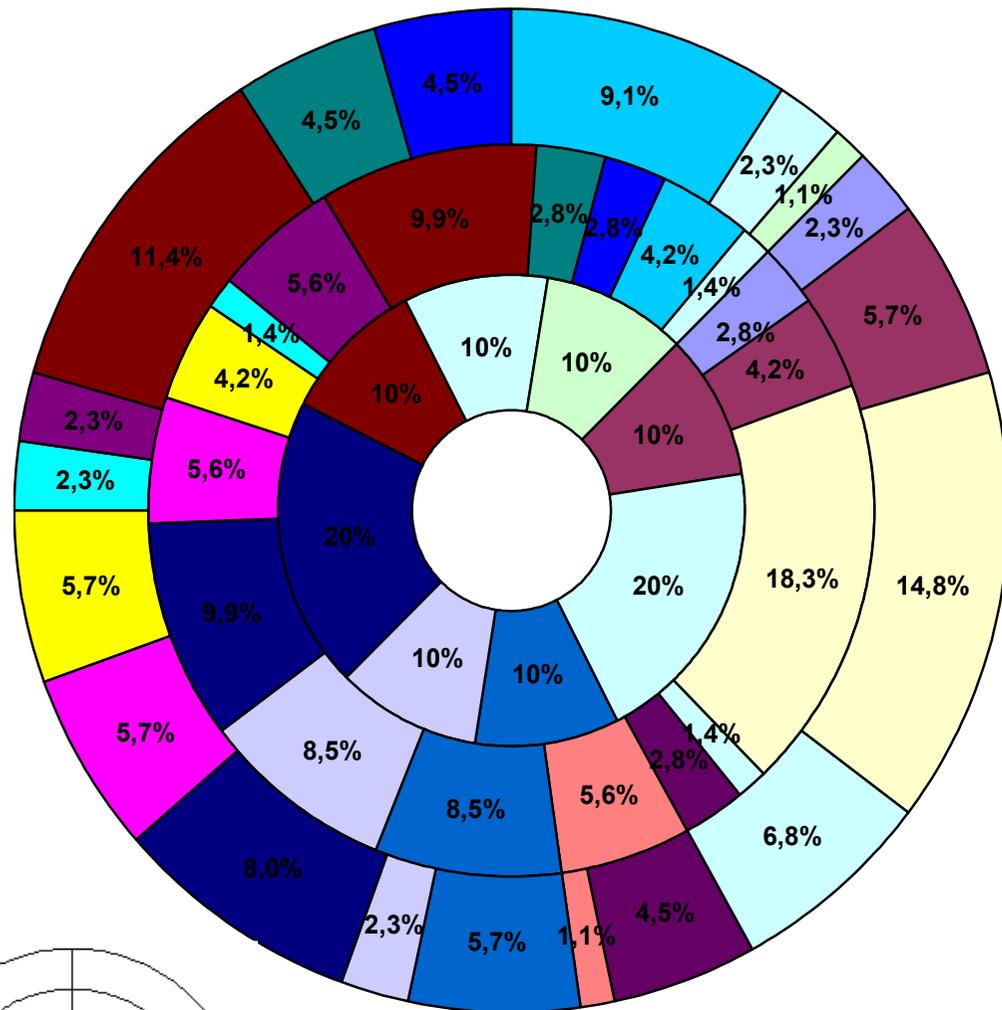
Dezenove categorias COG se encontram representadas na distribuição de HSEs, o que está em pleno acordo com a percepção, discutida à introdução, de que o Hsf possui funções regulatórias que transcendem o simples controle de proteínas de choque térmico. Com efeito, embora, no caso dos ncHSEs, a categoria mais representada seja a de modificações pós-traducionais e renovação de proteínas, incluindo chaperonas, tem-se por evidente que outras categorias contribuem com um grande número de representantes, como o metabolismo secundário, o tráfego de vesículas e a tradução. Insinua-se a possibilidade de que essa ampla distribuição – mais ampla do que a de *S. cerevisiae*, por exemplo – reflita o papel postulado do Hsf como regulador global dos fenômenos de reprogramação morfogênética associados à transição dimórfica. Entretanto, à luz da recente descoberta das proteínas Ryp, qualquer inferência desse tipo na ausência de provas funcionais mais próximas da fisiologia do fungo – em oposição a evidências indiretas como a da *trans*-complementação – é temerária. Fato é que a estrutura característica dos Hsfs de *Eurotiomycetidae* sugere especialização evolutiva desse

fator de transcrição nas espécies desse clado, o que justifica o aprofundamento das investigações.

Chama a atenção, por exemplo, o fato de que genes-chaves de diversas vias de transdução de sinal – como a proteína fosfatase 2A, proteína ativadora da GTPase morfogenética Ran e a própria proteína cinase C – possuam HSEs em seus promotores. Se entendermos o Hsf como um regulador global do dimorfismo – hipótese que só poderá ser comprovada com estudos funcionais aprofundados – o fato de representantes de vias distintas sofrerem modulação por ele é esperado. O fato de que, conforme discutido à introdução, a transição dimórfica em fungos patogênicos parece ser deflagrada por um conjunto estreito de proteínas significa que ainda estamos por descobrir os mecanismos pelos quais a cascata inicial de eventos (envolvendo Drk1 e proteínas Ryp) se desdobra em alterações globais na expressão gênica. É possível que diversas vias de transdução de sinal estejam implicadas no processo, e a diversidade de genes que possui HSEs sugere o tipo de padrão que se esperaria de um fator envolvido em fenômenos morfogenéticos em larga escala.

Em suma, o principal mérito desse projeto foi o de lançar as bases para um estudo mais aprofundado desse fator de transcrição em fungos dimórficos, o que, conforme se discutiu antes, é plenamente justificável em vista do pouco que se sabe sobre a regulação da expressão gênica nesses organismos. O autor, ciente das limitações dos resultados, expressa a convicção de que a hipótese de trabalho permanece válida e, conforme se discutirá nos experimentos incompletos do apêndice, acrescenta que as ferramentas para continuidade da linha de pesquisa se encontram prontas.

Distribuição dos promotores por categoria de HSE



- Estrutura e dinâmica da cromatina
- Tráfego intracelular, secreção e transporte de vesículas
- Modificação pós-traducional, reposição de proteínas e chaperonas
- Transporte e metabolismo de íons inorgânicos
- Transporte e metabolismo de nucleotídeos
- Processamento e modificação de RNA
- Mecanismos de transdução de sinal
- Transporte e metabolismo de lipídios
- Tradução, estrutura e biogênese de ribossomos
- Transcrição
- Produção e conversão de energia
- Biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários
- Replicação, recombinação e reparo
- Metabolismo e transporte de aminoácidos
- Biogênese da parede celular, e das estruturas membranasas
- Metabolismo e transporte de açúcares
- Metabolismo e transporte de coenzimas
- Controle do ciclo celular, da divisão celular e da partição de cromossomos
- Citoesqueleto

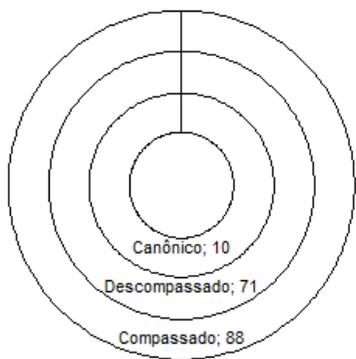


Figura 11 (página anterior). Distribuição funcional, das três classes de HSE nos promotores de genes de função conhecida de Pb01, de acordo com as categorias COG. As percentagens em cada setor indicam a proporção de genes daquela classe sobre o total de genes categorizados em cujos promotores um HSE daquele tipo foi encontrado. O gráfico menor à esquerda inferior contém a ordem das classes de HSE do maior, seguidas do número absoluto de promotores de genes categorizados por classe.

6. Conclusões e perspectivas

Em vista dos resultados obtidos, duas constatações se impõem: i) o Hsf de *P. brasiliensis* é estruturalmente distinto do de *S. cerevisiae*, mas é capaz de substituir este último; e ii) a similaridade entre a proteína de *P. brasiliensis* e os homólogos de outros Eurotiomycetidae, aliada à verificação da existência de HSEs em uma grande variedade de genes, sugere que houve especialização filogenética desse gene nessa superclasse, e que o Hsf nesses fungos pode coordenar outros processos que não a mera resposta ao estresse.

Lançaram-se ainda as bases para estudos mais aprofundados desse fator geral de transcrição em fungos dimórficos. A clonagem da seqüência codante num vetor de expressão de levedura, a identificação de promotores que contêm HSEs e a geração de uma cepa de levedura *trans*-complementada permitirão que diversas abordagens prossigam com a elucidação dos papéis do Hsf nos processos morfogenéticos de fungos dimórficos, se houver. Nos estudos agora possíveis, frente aos resultados obtidos neste trabalho, incluem-se:

- Ensaio de retardo de eletroforético (EMSA): esses experimentos permitirão investigar, usando HSEs dos promotores nativos de Pb01, evidências de que o Hsf se ligue a eles.
- Estudos de expressão: os mesmos HSEs serão clonados num vetor de expressão de *S. cerevisiae*, que será usado para transformar a cepa HCP3, e se poderá aferir a habilidade do fator de aumentar a expressão de um gene repórter em resposta à elevação da temperatura.
- Imunoprecipitação de cromatina seguida de microarranjo ou piroseqüenciamento: esclarecer-se-á quais promotores de Pb01 se associam ao Hsf em condições de interesse, e estes dados funcionais poderão ser correlacionados com a varredura dos promotores detalhada nesta dissertação. Para esses estudos, será usado o anticorpo descrito no apêndice.

- Estudos de associação: por meio de ensaios de duplo-híbrido, realizados em *S. cerevisiae*, a ocorrência de complexos entre Hsf e proteínas Ryp (especialmente Ryp1) poderá ser avaliada. A interação com Drk1 poderá ser analisada pelo sistema da ubiquitina partida, recentemente usado por Joseph Heitman *et al.* para estudar interações de proteínas citoplasmáticas em *C. neoformans* (Xue *et al.*, 2008).
- Estudos da função de Hsf por meio de mutagênese: com a identificação, no homólogo de *P. brasiliensis*, de resíduos cuja modificação – caso a proteína se comporte como a de *S. cerevisiae* – confere atividade constitutiva à proteína (vide resultados e discussão), os efeitos da transformação da levedura de brotamento ou do próprio *P. brasiliensis* com essas formas poderão esclarecer melhor o papel do Hsf no ciclo de vida desse fungo patogênico.

Os conhecimentos gerados no presente projeto certamente contribuirão para um melhor entendimento dos processos de controle da expressão gênica nos fungos termodimórficos.

7. Referências

- Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; e Walter, P. (2002) *Molecular biology of the cell*. Quarta Edição, Garland Science, Nova Iorque, EUA. Páginas de 356 a 359.
- Almeida, A. J.; Carmona, J. A.; Cunha, C.; Carvalho, A.; Rappleye, C. A.; Goldman, W. E.; Hoykaas, P. J.; Leão, C.; Ludovico, P.; e Rodrigues F. (2007b) Towards a molecular genetic system for the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal genetics and biology* 44(12):1387-98.
- Almeida, A. J.; Matute, D. R.; Carmona, J. A.; Martins, M.; Torres, I.; McEwen, J. G.; Restrepo, A.; Leão, C.; Ludovico, P.; e Rodrigues, F. (2007a) Genome size and ploidy of *Paracoccidioides brasiliensis* reveals a haploid DNA content: flow cytometry and GP43 sequence analysis. *Fungal genetics and biology* 44(1):25-31.
- Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; e Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* 215(3):403-10.
- Amorós, M. e Estruch, F. (2001) Hsf1p and Msn2/4p cooperate in the expression of *Saccharomyces cerevisiae* genes HSP26 and HSP104 in a gene- and stress type-dependent manner. *Molecular microbiology* 39(6):1523-32.

- Aristizábal, B. H.; Clemons, K. V.; Cock, A. M.; Restrepo, A.; e Stevens, D. A. (2002) Experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice: influence of the hormonal status of the host on tissue responses. *Medical mycology* 40(2):169-78.
- Arraes, F. B.; Benoliel, B.; Burtet, R. T.; Costa, P. L.; Galdino, A. S.; Lima, L. H.; Marinho-Silva, C.; Oliveira-Pereira, L.; Pfrimer, P.; Procópio-Silva, L.; Reis, V. C.; e Felipe, M. S. (2005) General metabolism of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Genetics and molecular research* 4(2):290-308.
- Bagagli, E.; Bosco, M. G.; Theodoro, R. C.; e 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. *Infection, genetics and evolution* 6(5):344-51.
- Bailão, A. M.; Shrank, A.; Borges, C. L.; Parente, J. A.; Dutra, V.; Felipe, M. S.; Fiúza, R. B.; Pereira, M.; de Almeida Soares, C. M. (2007) The transcriptional profile of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells is influenced by human plasma. *FEMS immunology and medical microbiology* 51(1):43-57.
- Bayram, Ö.; Krapmann, S.; Ni, M.; Bok, J. W.; Helmstaedt, K.; Valerius, O.; Braus-Stromeyer, S.; Kwon, N.; Keller, N. P.; Yu, J.; e Braus, G. H. (2008) VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science* 320(5882):1504-6.
- Benson, D. A.; Karsch-Mizrachi, I.; Lipman, D. J.; Ostell, J.; e Wheeler, D. L. (2007) GenBank. *Nucleic acids research* 35(Database issue):D21-D25.
- Bjellqvist, B.; Hughes, G. J.; Pasquali, Ch.; Paquet, N.; Ravier, F.; Sanchez, J.-Ch.; Frutiger, S.; e Hochstrasser, D. F. (1993) The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis* 14(10):1023-31.
- Bonner, J. J.; Carlson, T.; Fackenthal, D. L.; Paddock, D.; Storey, K.; e Lea, K. (2000b) Complex regulation of the yeast heat shock transcription factor. *Molecular biology of the cell* 11(5):1739-51.
- Bonner, J. J.; Chen, D.; Storey, K.; Tushan, M.; e Lea, K. (2000a) Structural analysis of yeast HSF by site-specific crosslinking. *Journal of molecular biology* 302(3):581-92.
- Bonner, J. J.; Heyward, S.; e Fackenthal, D. L. (1992) Temperature-dependent regulation of a heterologous transcriptional activation domain fused to yeast heat shock transcription factor. *Molecular and cellular biology* 12(3):1021-30.

- Boy-Marcotte, E.; Lagniel, G.; Perrot, M.; Bussereau, F.; Boudsocq, A.; Jacquet, M.; e La-barre, J. (1999) The heat shock response in yeast: differential regulations and contributions of the Msn2p/Msn4p and Hsf1p regulons. *Molecular microbiology* 33(2):274-83.
- Brummer, E.; Castaneda, E.; e Restrepo, A. (1993) Paracoccidioidomycosis: an update. *Clinical microbiological reviews* 6(2):89-117.
- Bulman, A. L.; Hubl, S. T.; e Nelson, H. C. M. (2001) The DNA-binding domain of yeast heat shock transcription factor independently regulates both the N- and C-terminal activation domains. *The journal of biological chemistry* 276(43):40254-62.
- Butcher, D. (1995) Muller's ratchet, epistasis and mutation effects. *Genetics* 141(1):431-7.
- Campos, E. G.; Jesuino, R. S.; Dantas, A. S.; Brígido, M. M.; e Felipe, M. S. S. (2005) Oxidative stress response in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Genetics and molecular research* 4(2):409-29.
- Chen, Y.; Barlev, N. A.; Westergaard, O.; e Jakobsen, B. K. (1993) Identification of the C-terminal activator domain in yeast heat shock factor: independent control of transient and sustained transcriptional activity. *The EMBO journal* 12(13):5007-18.
- Cicero, M. P.; Hubl, S. T.; Harrison, C. J.; Littlefield, O.; Hardy, J. A.; e Nelson, H. C. M. (2001) The wing in yeast heat shock transcription factor (HSF) DNA-binding domain is required for full activity. *Nucleic acids research* 29(8):1715-23.
- Damberger, F. F.; Pelton, J. G.; Liu, C.; Cho, H.; Harrison, C. J.; Nelson, H. C. M.; e Wemmer, D. E. (1995) Refined solution structure and dynamics of the DNA-binding domain of the heat shock factor from *Kluyveromyces lactis*. *Journal of molecular biology* 254(4):704-19.
- Davidson, J. F.; Whyte, B.; Bissinger, P. H.; e Schiestl, R. H. (1996) Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(10):5116-21.
- Duina, A. A.; Kalton, H. M.; e Gaber, R. F. (1998) Requirement for Hsp90 and a CyP-40-type cyclophilin in negative regulation of the heat shock response. *The journal of biological chemistry* 270(30):18974-8.
- Erkine, A. M.; Magrogan, S. F.; Sekinger, E. A.; e Gross, D. S. (1999) Cooperative binding of heat shock factor to the yeast *HSP82* promoter *in vivo* and *in vitro*. *Molecular and cellular biology* 19(3):1627-39.
- Fariselli, P. & Casadio, R. (2001) Prediction of disulfide connectivity in proteins. *Bioinformatics* 17(10):957-64.

- Felipe, M. S. S.; Torres, F. A. G.; Maranhão, A. Q.; Silva-Pereira, I.; Poças-Fonseca, M. J.; Campos, E. G.; Moraes, L. M. P.; Arraes, F. B. M.; Carvalho, M. J. A.; Andrade, R. V.; Nicola, A. M.; Teixeira, M. M.; Jesuíno, R. S. A.; Pereira, M.; Soares, C. M. A.; e Brígido, M. M. (2005b) Functional genome of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *FEMS immunology and medical microbiology* 45(3):369-81.
- Felipe, M. S.; Andrade, R. V.; Arraes, F. B. M.; Nicola, A. M.; Maranhão, A. Q.; Torres, F. A. G.; Silva-Pereira, I.; Poças-Fonseca, M. J.; Campos, E. G.; Moraes, L. M. P.; Albuquerque, P. A.; Tavares, A. H.; Silva, S. S.; Kyaw, C. M.; Souza, D. P.; Pereira, M.; Jesuino, R. S.; Andrade, E. V.; Parente, J. A.; Oliveira, G. S.; Martins, N. F.; Fachin, A. L.; Cardoso, R. S.; Passos, G. A.; Almeida, N. F.; Walter, M. E.; Soares, C. M.; Carvalho, M. J. A.; Brígido, M. M.; e PbGenome Network (2005a) Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *The Journal of Biological Chemistry* 280(26):24706-14.
- Felipe, M. S.; Andrade, R. V.; Petrofeza, S. S.; Maranhão, A. Q.; Torres, F. A. G.; Albuquerque, P.; Arraes, F. B. M.; Arruda, M.; Azevedo, M. O.; Baptista, A. J.; Bataus, L. A.; Borges, C. L.; Campos, E. G.; Cruz, M. R.; Daher, B. S.; Dantas, A.; Ferreira M. A.; Ghil, G. V.; Jesuino, R. S.; Kyaw, C. M.; Leitão, L.; Martins, C. R.; Moraes, L. M. P.; Neves, E. O.; Nicola, A. M.; Alves, E. S.; Parente, J. A.; Pereira, M.; Poças-Fonseca, M. J.; Resende, R. O.; Ribeiro, B. M.; Saldanha, R. R.; Santos, S. C.; Silva-Pereira, I.; Silva, M. A.; Silveira, E.; Simões, I. C.; Soares, R. B.; Souza, D. P.; Souza, M. T.; Andrade, E. V.; Xavier, M. A.; Veiga, H. P.; Venâncio, E. J.; Carvalho, M. J. A.; Oliveira, A. G.; Inoue, M. K.; Almeida, N. F.; Walter, M. E.; Soares, C. M.; Brígido, M. M. (2003) Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. *Yeast* 20(3):263-71.
- Fernandes, L.; Paes, H. C.; Tavares, A. H. F. P.; Silva, S. S.; Dantas, A.; Soares, C. M. A.; Torres, F. A. G.; e Felipe, M. S. (2008) Transcriptional profile of *ras1* and *ras2* and the potential role of farnesylation in the dimorphism of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. *FEMS yeast research* 8(2):300-10.
- Fitzpatrick, D. A.; Logue, M. E.; Stajich, J. E.; e Butler, G. (2006) A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. *BMC evolutionary biology* 6:99

- Flick, K. E.; Gonzalez, L., Jr.; Harrison, C. J.; e Nelson, H. C. M. (1994) Yeast heat shock transcription factor contains a flexible linker between the DNA-binding and trimerization domains. *The journal of biological chemistry* 269(17):12475-81.
- Freitas, F. Z.; e Bertolini, M. C. (2004) Genomic organization of the *Neurospora crassa gsn* gene: possible involvement of the STRE and HSE elements in the modulation of transcription during heat shock. *Molecular genetics and genomics* 272(5):550-61.
- Gajiwala, K. S.; e Burley, S. K. (2000) Winged helix proteins. *Current opinion in structural biology* 10(1):110-6.
- Gallo, G. J.; Prentice, H; e Kingston, R. E. (1993) Heat Shock Factor Is Required for Growth at Normal Temperatures in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular and cellular biology* 13(2):749-61.
- Gallo, G. J.; Schuetz, T. J.; e Kingston, R. E. (1991) Regulation of Heat Shock Factor in *Schizosaccharomyces pombe* More Closely Resembles Regulation in Mammals than in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 11(1):281-8.
- Guarro, J.; Gené, J.; e Stchigel, A. M. (1999) Developments in fungal taxonomy. *Clinical microbiological reviews* 12(3):454-500.
- Hahn, J.; Hu, Z.; Thiele, D. J.; e Iyer, V. R. (2004a) Genome-wide analysis of the biology of stress responses through heat shock transcription factor. *Molecular and cellular biology* 24(12):5249-56.
- Halladay, J. T.; e Craig, E. A. (1995) A heat shock transcription factor with reduced activity suppresses a yeast HSP70 mutant. *Molecular and cellular biology* 15(9):4890-7.
- Hashikawa, N.; Yamamoto, N.; e Sakurai, H. (2007) Different mechanisms are involved in the transcriptional activation by yeast heat shock transcription factor through two different types of heat shock elements. *The journal of biological chemistry* 282(14):10333-40.
- Hjorth-Sørensen, B.; Hoffmann, E. R.; Lissin, N. M.; Sewell, A. K.; e Jakobsen, B. K. (2001) Activation of heat shock transcription factor in yeast is not influenced by the levels of expression of heat shock proteins. *Molecular microbiology* 39(4):914-23.
- Høj, A.; e Jakobsen, B. K. (1994) A short element required for turning off heat shock transcription factor: evidence that phosphorylation enhances deactivation. *The EMBO journal* 13(11):2617-24.
- Huang, X.; e Madan, A. (1999) CAP3: a DNA sequence assembly program. *Genome research* 9(9):868-77.

- Hubl, S. T.; Owens, J. C.; e Nelson, H. C. M. (1994) Mutational analysis of the DNA-binding domain of yeast heat shock transcription factor. *Nature structural biology* 1(9):615-20.
- Huelsenbeck, J. P. & Ronquist, F. (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17(8):754-5.
- Jakobsen, B. K.; e Pelham, H. R. (1988) Constitutive binding of yeast heat shock factor to DNA *in vivo*. *Molecular and cellular biology* 8(11):5040-2.
- Larkin, M. A.; Blackshields, G.; Brown, N. P.; Chenna, R.; McGettigan, P. A.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I. M.; Wilm, A.; Lopez, R.; Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; e Higgins, D. G.; (2007) ClustalW and ClustalX version 2.0. *Bioinformatics* 23(21):2947-8.
- Leal, C. V.; Montes, B. A.; Mesa, A. C.; Rua, A. L.; Corredor, M.; Restrepo, A.; e McEwen, J. G. (2004) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Medical mycology* 42(4):391-5.
- Lin, J. T.; e Lis, J. T. (1999) Glycogen synthase phosphatase interacts with heat shock factor to activate *CUP1* gene transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 19(5):3237-45.
- Liu, X.; e Thiele, D. J. (1996) Oxidative stress induces heat shock factor phosphorylation and HSF-dependent activation of yeast metallothionein gene transcription. *Genes & development* 10(5):592-603.
- Matute, D. R.; McEwen, J. G.; Puccia, R.; Montes, B. A.; San-Blas, G.; Bagagli, E.; Rauscher, J. T.; Restrepo, A.; Morais, F.; Niño-Veja, G.; e Taylor, J. W. (2006) Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Molecular biology and evolution* 23(1):65-73.
- Meyer, U.; Monnerjahn, C.; Techel, D.; e Rensing, L. (2000) Interaction of the *Neurospora crassa* heat shock factor with the heat shock element during heat shock and different developmental stages. *FEMS microbiology letters* 185(2):255-61.
- Meyer, U. & Rensing, L. (1998) A non-radioactive electrophoretic mobility shift assay for the detection of heat shock element (HSE)-binding activity in *Neurospora crassa*. *Fungal genetics newsletter* 45:25-7 (<http://www.fgsc.net/fgn45/45meyer.html>)
- Nemecek, J. C.; Wüthrich, M.; Klein, B. S. (2006) Global control of dimorphism and virulence in fungi. *Science* 312(5773):583-8.
- Nguyen, V. Q. & Sil, A. (2008) Temperature-induced switch to the pathogenic yeast form of *Histoplasma capsulatum* requires Ryp1, a conserved transcriptional regulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(12):4880-5.

- Nieto-Sotelo, J.; Wiederrecht, G.; Okuda, A.; e Parker, C. S. (1990) The yeast heat shock transcription factor contains a transcriptional activation domain whose activity is repressed under nonshock conditions. *Cell* 62(4):807-17.
- Nover, L.; Bharti, K.; Döring, P.; Mishra, S. K.; Ganguli, A.; e Scharf, K. (2001) *Arabidopsis* and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? *Cell stress & chaperones* 6(3):177-89.
- Nunes, L. R.; Costa de Oliveira, R.; Leite, D. B.; da Silva, V. S.; dos Reis Marques, E.; da Silva Ferreira, M. E.; Ribeiro, D. C.; de Souza Bernardes, L. A.; Goldman, M. H.; Puccia, R.; Travassos, L. R.; Batista, W. L.; Nóbrega, M. P.; Nóbrega, F. G.; Yang, D. Y.; de Bragança Pereira, C. A.; e Goldman, G. H. (2005) Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. *Eukaryotic cell* 4(2):2115-28.
- Nwaka, S.; Mechler, B.; von Ahsen, O.; e Holzer, H. (1996) The heat shock factor and mitochondrial Hsp70 are necessary for survival of heat shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 399(2-3):259-63.
- Parker, C. S.; e Topol, J. (1984) A *Drosophila* RNA polymerase II transcription factor binds to the regulatory site of an hsp 70 gene. *Cell* 37(1):273-83.
- O’Gorman, C. M.; Fuller, H. T.; e Dyer, P. S. (2009) Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 457(7228):471-4.
- Perisic O.; Xiao, H.; e Lis, J. T. (1989) Stable binding of *Drosophila* heat shock factor to head-to-head and tail-to-tail repeats of a conserved 5 bp recognition unit. *Cell* 59(5):797-806.
- Quevillon, E.; Silventoinen, V.; Pillai, S.; Harte, N.; Mulder, N.; Apweiler, R.; e Lopez, R. (2005) InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic acids research* 33(Web Server Issue):W116-W120.
- Raitt, D. C.; Johnson, A. L.; Erkin, A. M.; Makino, K.; Morgan, B.; Gross, D. S.; e Johnston, L. H. (2000) The Skn7 response regulator of *Saccharomyces cerevisiae* interacts with Hsf1 *in vivo* and is required for the induction of heat shock genes by oxidative stress. *Molecular biology of the cell* 11(7):2335-47.
- Rappleye, C. A.; e Goldman, W. E. (2006) Defining virulence genes in dimorphic fungi. *Annual review of microbiology* 60:281-303.

- Rappleye, C. A.; Eissenberg, L. G.; e Goldman, W. E. (2007) *Histoplasma capsulatum* α -(1,3)-glucan blocks innate immune recognition by the β -glucan receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(4):1366-70.
- Restrepo, A.; Jiménez, B. E. (1980) Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium. *Journal of Clinical Microbiology* 12(2):279-81.
- Sakurai, H. ; e Takemori, Y. (2007) Interaction between transcription factors (HSFs) and divergent binding sequences. *The journal of biological chemistry* 282(18): 13334-41.
- Sakurai, H.; e Fukasawa, T. (2001) A novel domain of the yeast heat shock factor that regulates its activation function. *Biochemical and biophysical research communications* 285(3):696-701.
- Sambrook, J.; e Russell, D. W. (editores) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Volume 1, capítulo 1, protocolo 26. Terceira edição (2001), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Woodbury, NY, EUA.
- Santoro, N.; Johansson, N.; e Thiele, D. J. (1998) Heat shock element architecture is an important determinant in the temperature and transactivation domain requirements for heat shock transcription factor. *Molecular and cellular biology* 18(11):6340-52.
- Sewell, A. K.; Yokoya, F.; Yu, W.; Myiagawa, T.; Murayama, T.; e Winge, D. R. (1995) Mutated Yeast Heat Shock Transcription Factor Exhibits Elevated Basal Transcriptional Activation and Confers Metal Resistance. *The journal of biological chemistry* 270(42):25079-86.
- Smith, B. J.; e Yaffe, M. P. (1991) Uncoupling thermotolerance from the induction of heat shock proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(24):11091-4.
- Soares, R. B. A; Velho, T. A. F.; Moraes, L. M. P.; Azevedo, M. O.; Soares, C. M. A.; e Felipe, M. S. S. (2005) Hygromycin-B resistance phenotype acquired in *Paracoccidioides brasiliensis* via plasmid DNA integration. *Medical mycology* 43(8):719-23.
- Sorger, P. K. (1990) Yeast heat shock factor contains separable transient and sustained response transcriptional activators. *Cell* 62(4):793-805.
- Sorger, P. K.; e Nelson, H. C. M. (1989) Trimerization of a yeast transcriptional activator via a coiled-coil motif. *Cell* 59(5):807-13.
- Sorger, P. K.; e Pelham, H. R. (1988) Yeast heat shock factor is an essential DNA-binding protein that exhibits temperature-dependent phosphorylation. *Cell* 54(6):855-64.

- Tachibana, T.; Astumi, S.; Shioda, R.; Ueno, M.; Uritani, M.; Ushimaru, T. (2002) A novel non-conventional heat shock element regulates expression of *MDJ1* encoding a DnaJ homolog in *Saccharomyces cerevisiae*. *The journal of biological chemistry* 277(25):22140-6.
- Tamai, K. T.; Liu, X.; Silar, P. ; Sosinowski, T.; e Thiele, D. J. (1994) Heat shock transcription factor activates yeast metallothionein gene expression in response to heat and glucose starvation via distinct signalling pathways. *Molecular and cellular biology* 14(12):8155-65.
- Tatusov, R. L.; Fedorova, N. D.; Jackson, J. D.; Jacobs, A. R.; Kiryutin, B.; Koonin, E. V.; Krylov, D. M.; Mazumder, R.; Mekhedov, S. L.; Nikolskaya, A. N.; Rao, B. S.; Smirnov, S.; Sverdlov, A. V.; Vasudevan, S.; Wolf, Y. I.; Yin, J. J.; e Natale, D. A. (2003) The COG database: an updated version includes eukaryotes. *BMC Bioinformatics* 4:41.
- Tavares A. H. F. P.; Silva, S. S.; Dantas, A.; Campos, E. G.; Andrade, R. V.; Maranhão, A. Q.; Brígido, M. M.; Passos-Silva, D. G.; Fachin, A. L.; Teixeira, S. M.; Passos, G. A.; Soares, C. M.; Bocca, A. L.; Carvalho, M. J. A., Silva-Pereira I.; e Felipe, M. S. (2007) Early transcriptional response of *Paracoccidioides brasiliensis* upon internalization by murine macrophages. *Microbes and infection* 9(5):583-90.
- Terçarioli, G. R.; Bagagli, E.; Reis, G. M.; Theodoro, R. C.; Bosco, S. M. G.; Macoris, S. A. G.; e Richini-Pereira, V. B. (2007) Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. *BMC microbiology* 7:92.
- Torres, F. A. G.; e Bonner, J. J. (1995) Genetic identification of the site of DNA contact in the yeast heat shock transcription factor. *Molecular and cellular biology* 15(9):5063-70.
- Truman, A. W.; Millson, S. H.; Nuttall, J. M.; Mollapour, M.; Prodromou, C.; e Piper, P. W. (2007) In the yeast heat shock response, Hsf1-directed induction of Hsp90 facilitates the activation of the Slt2 (Mpk1) mitogen-activated protein kinase required for cell integrity. *Eukaryotic cell* 6(4):744-52.
- Voellmy, R. (2004) On mechanisms that control heat shock transcription factor activity in metazoan cells. *Cell stress & chaperones* 9(2):122-33.
- Webster, R. H. & Sil, A. (2008) Conserved factors Ryp2 and Ryp3 control cell morphology and infectious spore formation in the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(38):14573-8.

- Wiederrecht, G.; Seto, D.; e Parker, C. S. (1988) Isolation of the gene encoding the *S. cerevisiae* heat shock transcription factor. *Cell* 54(6):841-53.
- Xue, C.; Hsueh, Y. P.; Chen, L.; e Heitman, J. (2008) The RGS protein Crg2 regulates both pheromone and cAMP signalling in *Cryptococcus neoformans*. *Molecular microbiology* 70(2):379-95.
- Yuen, K.; Pascal, G.; Wong, S. S. Y.; Glaser, P.; Woo, P. C. Y.; Kunst, F.; Cai, J. J.; Cheung, E. Y. L.; Médigue, C.; e Danchin, A. (2003) Exploring the *Penicillium marneffe* genome. *Archives of microbiology* 179(5):339-53.
- Zarzov, P.; Boucherie, H.; e Mann, C. (1997) A yeast heat shock transcription factor (Hsf1) mutant is defective in both Hsc82/Hsp82 synthesis and spindle pole body duplication. *Journal of cell science* 110(16):1879-91.

8. Apêndice

8.1. Abreviaturas, siglas, unidades, conversões para o Sistema Internacional (SI)

EDTA: ácido etileno-diamino-tetracético

zero grau = 273 K

g : $9,82 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$

Tris: 2-amino-2-(hidróxi-metil)-1,3-propanodiol

Aceleração em $g=1,118\cdot 10^{-5}\cdot R\cdot S^2$, onde R é o raio da centrífuga em centímetros e S , a velocidade em revoluções por minuto (rpm)

A_n : absorbância no comprimento de onda de n nanômetros

8.2. Soluções complexas (unidades SI, notação científica)

Meio BHI (infusão de cérebro e coração): extrato de cérebro e coração a 3,7% (m/v), glicose a 0,8% (m/v)

Meio Luria-Bertani (LB): 1% (m/v) de peptona ou triptona, 0,5% (m/v) de extrato de levedura, 1% (m/v) de NaCl, pH 7,2

Meio McVeigh-Morton Modificado: glicose a 1% (m/v), KH_2PO_4 a 11 mM, MgSO_4 a 2 mM, CaCl_2 milimolar, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 15 mM, L-asparagina a 15 mM,, L-cistina a 0,83 mM, tiamina a 1,8 μM , niacina a 4,9 μM , pantotenato de cálcio a 25 μM , inositol a 0,6 μM , biotina a 41 nM, riboflavina a 0,3 μM , ácido fólico a 2,3 μM , cloreto de colina a 7,2 μM , hidrocloreto de

piridoxina a 4,9 μM , ácido bórico a 0,9 μM , CuSO_4 a 0,63 μM , sulfato de amônio ferroso a 3,6 μM , MnSO_4 a 0,2 μM , heptamolíbdate de amônio a 29 nM, e ZnSO_4 a 2,8 μM , pH 7,2.

Meio SD: meio YNB 1X com glicose a 2% (m/v)

Meio SOB: 2% (m/v) de peptona ou triptona, 0,5% (m/v) de extrato de levedura, 0,05% (m/v) de extrato de levedura, KCl a 2,5 mM, MgCl_2 e MgSO_4 a 5 mM cada, pH 7,2

Meio SOC: meio SOB com glicose a 2 mM

Meio YNB (20X): Base nitrogenada de levedura com sulfato de amônio (Difco), à concentração de 13,4% (m/v)

Meio YPD: peptona ou triptona a 2% (m/v), extrato de levedura a 1% (m/v), glicose a 2% (m/v)

Versões sólidas dos meios acima: acrescentar ágar à concentração de 2% (m/v)

Solução I: glicose a 50 mM, Tris a 25 mM, EDTA a 10 mM, pH 8 ajustado com HCl

Solução II: NaOH a 2 mM, SDS a 1% (m/v), preparada com antecedência mínima

Solução III: preparada a partir de acetato de potássio e ácido acético, de modo a resultar numa concentração de acetato de 5 M, e de potássio de 3 M

Solução de transformação de leveduras em passo único: ditiotreitól a 100 mM, acetato de lítio a 200 mM, polietileno-glicol (polímero de 3,5 kDa) a 40% (m/v). Preparada à hora da transformação.

STE: TE com NaCl a 100 mM

Tampão de bloqueio: caseína a 6% (m/v), PVP-40 a 1% (m/v), azida sódica a 3 mM, EDTA a 10 mM, NaCl a 150 mM, Na_2HPO_4 a 34,9 mM, NaH_2PO_4 a 40,1 mM, pH 6,8

Tampão de lavagem I: Tween 20 a 0,3% (v/v) em tampão fosfato

Tampão de lavagem II: Tween 20 a 0,3% (v/v), Tris a 50 mM, NaCl a 150 mM, pH 7,4

Tampão de lise de Meyer & Rensing: Tris-Cl a 200 mM, glicerol a 10% (v/v), DTT a 10 mM, pH 8,0

Tampão fosfato: NaCl a 68 mM, Na_2HPO_4 a 58,2 mM, NaH_2PO_4 a 16,8 mM, pH 7,4

TBE (0,5X): Tris a 45 mM, ácido bórico a 45 mM, EDTA a 1 mM

TE/RNase: TE com RNase a 20 $\mu\text{g/ml}$

TE: Tris a 10 mM, EDTA a 1 mM, pH 8 ajustado com HCl

8.3. Tabela 1: oligonucleotídios

Nome	Seqüência (5'→3')	Uso	Observações
PbTF1	ctgttcatgctctcgccgcaat	PCR de colônia de <i>S. cerevisiae</i> para confirmação da presença do <i>Pbhsf</i> .	
ScHSFF	cagcaaatcttctctacctctaatg	PCR de colônia de <i>S. cerevisiae</i> para confirmação da ausência do gene nativo <i>hsf</i> .	
ScHSFR	ccaaccaatctatacggtcacaatag		
ScPbHSFF	tagatctataatg <u>ttggccatgacgtcgccaggtgc</u>	Obtenção do amplicon cistrônico para clonagem em <i>S. cerevisiae</i> .	Negrito: sítio de BglII Vermelho: degenerações que melhoram o consenso de Kozak. Duplo sublinhado: códon de iniciação Sublinhado: região complementar ao <i>PbHsf</i> .
ScPbHSFR	tagatctgcttca <u>acacgatctcttacc</u> ccaaaccagtatg		
Pb5HSF-F	atccgattactcgatgcgggctagcgaac	Seqüenciamento escalonado da região 3' do <i>Pbhsf</i> e PCR de colônia de levedura para confirmação da presença do gene.	
3PbHSF-R2	cggacagccaatacagccaacaagttgag	Seqüenciamento escalonado da região 3' do <i>Pbhsf</i>	
3RHSFMAX	cgccttgccaatacgcgagcggagatcgacaatc		
Pb3HSFR2	tgtcctagcccagcaaccacaagtgttg		
Pb5HSFR	gtacgtgatccacctttggcggctcctc	Seqüenciamento escalonado da região 5' do <i>Pbhsf</i>	
5PbHSF-End	tcgggttctgctgatgagttggtgac		
GSP1R-HSF	tgccacctcttcatctccaaaatcctc	5' RACE	
GSP2R-HSF	gcagaggggaacgctgggaggtgatc	3' RACE	

8.4. Tabela 2: genótipos das cepas de microrganismos usadas

Organismo	Cepa	Genótipo	Origem	Uso
<i>E. coli</i>	XL1-Blue [®]	<i>endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB+ lacIq Δ(lacZ)M15] hsdR17(rK- mK+)</i>	Stratagene	Clonagem plasmidial
	EPI300 [®]	<i>F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80dlacZ ΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara,leu)7697 galU galK λ- rpsL nupG trfA</i>	Epicentre Biotechnologies	
<i>S. cerevisiae</i>	HS126	<i>MATα ade2 his3 leu2 trp1 ura3 can1 hsf1::HIS3 YCp-URA3-HSF1</i>	Dr. Hiroshi Sakurai (vide texto)	Cepa base para clonagem dos vetores YEp usados no projeto
	HCP1	<i>MATα ade2 his3 leu2 trp1 ura3 can1 hsf1::HIS3 YCp-URA3-HSF1 YEp-LEU2-Pbhsf</i>	Este projeto	<i>trans</i> -complementação do gene <i>HSF1</i> pelo homólogo de <i>P. brasiliensis</i>
	HCP2	<i>MATα ade2 his3 leu2 trp1 ura3 can1 hsf1::HIS3 YCp-URA3-HSF1 Yep-LEU2</i>		Controle negativo da <i>trans</i> -complementação
	HCP3	<i>MATα ade2 his3 leu2 trp1 ura3 can1 hsf1::HIS3 YEp-LEU2-Pbhsf</i>		Cepa <i>trans</i> -complementada para uso em ensaios de EMSA

8.5. Tabela 3: Possibilidades combinatórias de HSEs

Tipo de HSE	Seqüências (5'→3')
Canônicos	nGAAnTTCnnGAAn
	nTTCnnGAAnnTTCn
Não canônicos	
Compassados (<i>step-type</i>)	nTTCn(5 bases)nTTCn(5 bases)nTTCn
	nGAAn(5 bases)nGAAn(5 bases)nGAAn
Descompassados (<i>gap-type</i>)	nTTCnnGAAn(5 bases)nGAAn
	nTTCn(5 bases)nTTCnnGAAn
	nGAAn(5 bases)nGAAnnTTCn
	nGAAnnTTCn(5 bases)nTTCn

Em todos os casos, n é qualquer base e os espaços de cinco bases podem ter qualquer composição (mmmn).

8.6. ORFs categorizadas de Pb01 cujos promotores contêm HSEs

Observação: fornece-se entre parênteses o número da ORF de acordo com o banco de dados do Broad Institute

HSE canônico

- Controle do ciclo celular, da divisão celular e da partição de cromossomos.

Proteína cwf8 de controle do ciclo celular (PAAG_02580)

- Metabolismo e transporte de aminoácidos

Prefenato desidrogenase (PAAG_01432)

- Transporte e metabolismo de lipídios

Dioxigenase da clivagem de carotenóides (PAAG_08792)

- Tradução, estrutura e biogênese de ribossomos

Proteína S24 da subunidade ribossomal 40S (PAAG_06882)

Fator de alongação Tu (PAAG_02921)

- Transporte e metabolismo de íons inorgânicos

Arilsulfatase (PAAG_06812)

Transportador de cobre de alta afinidade (PAAG_05251)

- Mecanismos de transdução de sinal

Serina/treonina proteína cinase gad8 (PAAG_06467)

- Tráfego intracelular, secreção e transporte de vesículas

Nexina seletora 3 (PAAG_07039)

- Citoesqueleto

Alfa-centractina (PAAG_06972)

HSE não-canônico compassado (“step-type”)

- Processamento e modificação de RNA

Proteína ESF1 de processamento do pré-rRNA (PAAG_02272)

- Estrutura e dinâmica da cromatina

Proteína heterocromatínica HP1 (PAAG_08183)

Histona desacetilase phd1 (PAAG_06808)

- Produção e conversão de energia

Oxidoreductase (PAAG_00647)

Subunidade de 20,8 kDa da NADH:ubiquinona redutase (PAAG_03051)

Subunidade de 105 kDa da NADH:ubiquinona redutase (PAAG_04539)

Acetil-CoA hidrolase (PAAG_04856)

Oxidoreductase ligante de zinco ToxD (PAAG_06110)

- Controle do ciclo celular, da divisão celular e da partição de cromossomos

Proteína pof6 com domínio caixa-F (PAAG_06091)

Proteína do ciclo de divisão celular (PAAG_05518)

- Metabolismo e transporte de aminoácidos

Glutamato desidrogenase NAD-específica (PAAG_01002)

3-isopropilmalato desidrogenase (PAAG_01527)

Arginase (PAAG_01969)

Serina 3-desidrogenase (PAAG_02354)

L-tirosina descarboxilase (PAAG_02604)

Glutamato descarboxilase (PAAG_04483)

Proteína transportadora de colina (PAAG_04546)

3-isopropilmalato desidrogenase A (PAAG_05328)

Pepsina A (PAAG_07583)

Permease específica para prolina (PAAG_07749)

- Transporte e metabolismo de nucleotídeos

Adenosina desaminase tRNA-específica (PAAG_01495)

Variante da subunidade R2 da ribonucleotídeo redutase (PAAG_02499)

Membro da família de transportadores de nucleosídeos (PAAG_08262)

Pseudouridina sintase (PAAG_08795)

- Metabolismo e transporte de açúcares

2-deóxi-D-gluconato 3-desidrogenase (PAAG_02680)

1,3-glucana beta-glicosidade (PAAG_05357)

Glicose 6-fosfato isomerase (PAAG_06526)

Manitol desidrogenase (PAAG_06863)

- Metabolismo e transporte de coenzimas

5-aminolevulinato sintase (PAAG_00397)

6,7-dimetil-8-ribitol-lumazina sintase (PAAG_00851)

Porfobilinogênio desaminase (PAAG_02418)

S-adenosilmetionina sintetase (PAAG_02901)

Pantotenato cinase (PAAG_03852)

Fosfopantotenato cisteína ligase (PAAG_03857)

Diidrofolato redutase (PAAG_05944)

Transportador de ácido nicotínico de alta afinidade (PAAG_07720)

- Transporte e metabolismo de lipídios

Triacilglicerol lipase (PAAG_03194)

Acetil-CoA acetiltransferase (PAAG_03447)

- Tradução, estrutura e biogênese de ribossomos

Arginil-tRNA sintetase (PAAG_00150)

Proteína BMS1 da biogênese ribossomal (PAAG_00590)

Proteína ribossomal L27-A da subunidade 60S (PAAG_01939)

tRNA (uracil-5)-metiltransferase (PAAG_02395)

Proilil-tRNA sintetase (PAAG_03048)

Proteína do ribossomo mitocondrial MRPL25 (PAAG_03276)

Pequena ribonucleoproteína nuclear SmG (PAAG_04790)

- Transcrição

Fator de transcrição APSES (MbpA; PAAG_00034)

Fator de alongação 1-alfa (PAAG_02024)

Fator spt5 de alongação da transcrição (PAAG_03189)

Fator de transcrição C6 (PAAG_07943)

Fator GATA (PAAG_08854)

- Replicação, recombinação e reparo

RNA helicase dependente de ATP com o domínio caixa-DEAD (PAAG_01932)

Endonuclease mus81 da junção de cromátides (PAAG_07155)

- Biogênese da parede celular e das estruturas membranosas

Glucosamina-frutose-6-fosfato aminotransferase (PAAG_00850)

Transportador de UDP-N-acetilglucosamina (PAAG_04988)

Quitina sintase D (PAAG_07751)

Subunidade 1 da D-alanina-poli-fosforibitol ligase (PAAG_08527)

- Modificação pós-traducional, reposição de proteínas e chaperonas

Subunidade tim23 da translocase de importação da membrana interna mitocondrial (PAAG_00019)

Peptidil-prolil *cis-trans* isomerase B (PAAG_00739)
Hsp30 (PAAG_00871)
Subunidade 12 do complexo signalossômico COP9 (PAAG_00951)
Proteína SEC11 de processamento da seqüência sinal (PAAG_02085)
Tiorredoxina (PAAG_03290)
CaaX prenil-proteinase Rce1 (PAAG_03593)
Manosil-oligossacarídeo glicosidase (PAAG_04602)
Enzima processadora do fator A (PAAG_04661)
Kexina (PAAG_07022)
Ubiquitina hidrolase carbóxi-terminal (PAAG_07030)
Hsp88 (PAAG_07750)
Metacaspase-1 (PAAG_07849)
Doliquil-fosfato-manose-proteína manosiltransferase (PAAG_08431)

- Transporte e metabolismo de íons inorgânicos

Transportador de amônia MEP1 (PAAG_01019)
Quelato férrico redutase (PAAG_02079)
Superóxido dismutase (PAAG_02926)
ATPase transportadora de cálcio da membrana plasmática (PAAG_03034)
Componente da flavoproteína sulfito redutase (PAAG_08148)
Permease dependente de ATP MDL2 (PAAG_08261)

- Biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários

Aldeído desidrogenase (PAAG_03910)
Tirosinase (PAAG_06439)

- Mecanismos de transdução de sinal

Proteína ativadora da GTPase Ran (PAAG_01293)
Inositol polifosfato multikinase (PAAG_02384)
Proteína cinase C (PAAG_02441)
CDP-diacilglicerol-inositol 3-fosfatidiltransferase (PAAG_05326)
Serina/treonina proteína fosfatase 2A (PAAG_07267)

- Tráfego intracelular, secreção e transporte de vesículas

Exportina 1 (PAAG_00302)
Proteína SEC16 de montagem do complexo de revestimento COPII (PAAG_04591)
Proteína carreadora mitocondrial LEU5 (PAAG_06580)
Proteína ligante de GTP RAB2 (PAAG_08430)
Receptor 2 de retenção de proteínas no lúmen do retículo endoplasmático (PAAG_08960)

- Citoesqueleto

Proteína Sla2 de controle da montagem do citoesqueleto (PAAG_05871)

HSE não-canônico descompassado (“gap-type”)

- Processamento e modificação de RNA

Proteína exportadora de RNAs poli-A(+) (PAAG_00339)
Proteína ESF1 de processamento do pré-RNA (PAAG_02272)
Proteína associada ao fator de excisão de íntrons U2AF (PAAG_03030)
Proteína processadora de mRNA Mss51 (PAAG_08323)

- Estrutura e dinâmica da cromatina

Histona H4.2 (PAAG_00126)
Histona acetil-transferase ESA1 (PAAG_02263)

- Produção e conversão de energia

Subunidade beta do componente E1 do complexo piruvato desidrogenase (PAAG_01534)
Álcool oxidase (PAAG_01979)
3-hidróxi-fenil-acetato 6-hidroxilase (PAAG_02928)

- Controle do ciclo celular, da divisão celular e da partição de cromossomos

Proteína Rad24 do ponto de controle de danos no DNA (PAAG_06751)

- Metabolismo e transporte de aminoácidos

Proteína da família da asparaginase (PAAG_02397)
Diidropicolinato sintase (PAAG_03143)
Gama-glutamil transpeptidase (PAAG_06130)
Cinurenina 3-mono-oxigenase (PAAG_06396)
Permease de aminoácidos (PAAG_07935)
Cisteína dioxigenase (PAAG_08649)

- Transporte e metabolismo de nucleotídeos

Deóxi-citidilato deaminase (PAAG_00286)
Timidilato sintase (PAAG_08597)

- Metabolismo e transporte de açúcares

Glucana 1,3-betaglucosidase (PAAG_05357)
Sorbitol desidrogenase (PAAG_08336)

- Metabolismo e transporte de coenzimas

Ácido 2,5-diceto-D-glucônico redutase A (PAAG_05780)
4-cumarato CoA-ligase (PAAG_05989)
Nicotinato fosfo-ribosil-transferase (PAAG_09118)

- Transporte e metabolismo de lipídios

Proteína de importação peroxissomal de ácidos graxos de cadeia longa (PAAG_00938)
Esterol O-acetil-transferase (PAAG_01841)
3-oxoacil-(proteína-carreadora-de-acil) redutase (PAAG_03123)
7-desidrocolesterol redutase (PAAG_04766)
3-cetoacil-CoA tiolase (PAAG_07746)

Retinol desidrogenase (PAAG_07863)

- Tradução, estrutura e biogênese de ribossomos

Proteína associada à ribonucleoproteína de 13 kDa (PAAG_00775)

Fator de alongação 1-alfa (PAAG_01264)

Proteína S15 da subunidade 40S (PAAG_04690)

Fator 6 de iniciação da tradução eucariótica (PAAG_04958)

Aspartil tRNA sintetase (PAAG_05117)

Proteína S13-1 da subunidade 40S (PAAG_05704)

Proteína S25 da subunidade 40S (PAAG_08540)

- Transcrição

Subunidade RPA2 da RNA polimerase dirigida por DNA (PAAG_01151)

Subunidade 3 do complexo 1 de cointegração do sinal ativador (PAAG_01589)

Proteína do complexo de transcrição CCR4-NOT (PAAG_03336)

Subunidade 6 do mediador da transcrição pela RNA polimerase II (PAAG_03538)

- Replicação, recombinação e reparo

RNA helicase suv3 dependente de ATP (PAAG_02276)

RNA helicase DBP10 dependente de ATP (PAAG_03969)

Proteína de reparo de pareamento incorreto de DNA (PAAG_04357)

Fator cdc45 de iniciação da replicação do DNA (PAAG_05345)

- Biogênese da parede celular e das estruturas membranosas

Regulador 2 da quitina sintase (PAAG_04860)

Fosfolipase C2 (PAAG_06005)

- Modificação pós-traducional, reposição de proteínas e chaperonas

GPI-inositol deacilase (PAAG_00165)

Proteína similar à Hsp70 (PAAG_02140)

Protease La 2 dependente de ATP (PAAG_02417)

Candidapepsina 4 (PAAG_03619)

Hsp10 mitocondrial (PAAG_05142)

Transamidase da âncora de GPI (PAAG_05346)

Hsp STI1 (PAAG_06811)

Ubiquitina carbóxi-terminal hidrolase (PAAG_07030)

Chaperona dnaK (PAAG_07444)

Metacaspase-1 (PAAG_07849)

Ubiquitina carbóxi-terminal hidrolase (PAAG_08925)

GPI manosil-transferase (PAAG_08949)

- Transporte e metabolismo de íons inorgânicos

Transportador vacuolar de íons cálcio (PAAG_00255)

- Biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários

Formil-coenzima A transferase (PAAG_01935)
Tirosinase (PAAG_06439)

- Mecanismos de transdução de sinal

Fosfatidil-inositol 4-cinase LSB6 (PAAG_00616)
Cinase C eta b (PAAG_01236)
Fosfatidil-inositol 3-cinase Tor2 (PAAG_01410)
Proteína palC reguladora da resposta ao pH (PAAG_01660)
Arrestina (PAAG_03520)
GTPase Rab4b da família Ras (PAAG_08335)

- Tráfego intracelular, secreção e transporte de vesículas

Anexina A7 (PAAG_00136)
Fator de ADP-ribosilação (PAAG_01152)
Carioferina Kap123 (PAAG_01278)