

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

**Regulação da expressão do gene de Glicana sintase 1 (*PbFKS1*)
pelo fator transcricional PacC em *Paracoccidioides brasiliensis***

Tatiane Araujo Costa

Brasília, DF
2011

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

**Regulação da expressão do gene de Glicana sintase 1 (PbFKS1)
pelo fator transcricional PacC em *Paracoccidioides brasiliensis***

Tatiane Araujo Costa

Orientador: Prof. Dr. Marcio José Poças Fonseca

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

Brasília, DF
2011

Ficha catalográfica

Costa, Tatiane Araujo

Regulação da expressão do gene de Glicana sintase 1 (*PbFKS1*) pelo fator transcricional PacC em *Paracoccidioides brasiliensis*

Tatiane Araujo Costa – Brasília, 2011

Orientador: Dr. Márcio José Poças Fonseca

Dissertação de Mestrado (Patologia Molecular), Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília – UnB

1.*Paracoccidioides brasiliensis*, Regulação da expressão gênica, *PbFKS1*, CreA, PacC

Trabalho desenvolvido no Laboratório de
Biologia Molecular, da Universidade de Brasília
(UnB), sob orientação do Prof. Dr. Márcio José
Poças Fonseca

Banca Examinadora

Titulares:

Dra. Nilce Maria Martinez-Rossi
Departamento de Genética-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo-RP.

Dra. Lorena da Silveira Derengowski
Departamento de Biologia Celular
Universidade de Brasília (UnB)

Orientador:

Dr. Márcio José Poças Fonseca
Departamento de Biologia Celular
Universidade de Brasília (UnB)

Suplente:

Dr. Marcelo Brígido
Departamento de Biologia Celular
Universidade de Brasília (UnB)

“Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre
ombros de gigantes.”

Isaac Newton

*À minha família, pelo esforço
em me fazer tornar mestre.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Rubens e Generosa, e meus irmãos, Viviane e Éder por todo carinho e amor, tudo que sou hoje devo ao empenho e dedicação de vocês que me mostraram a beleza e a dificuldade da vida, me ensinaram todos os valores em que hoje acredito, me deram educação e me proporcionaram a obtenção de um sonho, hoje quase realizado;

Ao meu namorado Thiago, impossível descrever tamanha admiração e amor que sinto por esta pessoa que de inúmeras e incansáveis formas me conduziu a realização deste sonho, obrigada por tudo, pelos conselhos, pelos estímulos, por me fazer acreditar quando eu achava que não seria possível;

Aos meus familiares e amigos, que mesmo sem compreenderem este trabalho, se interessam e torcem por mim;

Às minhas avós Maria e Olíria que sempre torcem pelo meu sucesso;

Aos meus avôs Alcides (*in memoriam*) e Sebastião (*in memoriam*) que acompanharam o início desta jornada, mas não conseguiram permanecer presentes até que ela se findasse. Saudades eternas;

Aos professores e colegas do Laboratório de Biologia molecular da Universidade de Brasília, onde tive a oportunidade de realizar este projeto;

Ao Cnpq pelo apoio financeiro;

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília;

Ao professor e orientador Marcio José Poças Fonseca, por todo o apoio, atenção, compreensão, enorme ajuda prestada sempre e pelos grandes ensinamentos;

À professora Ildinete Silva Pereira, sempre atenciosa e disposta a ajudar;

Aos membros do lab. MOA que lá ainda se encontram ou que já se foram: Amanda, Ana Carolina, Bárbara, Camila, Calliandra, Eveline, Daniel, Fernanda, Lorena, Luana, Marciano, Mariana, Marília, Miguel, Morgana, Natália, Patrícia, Ricardo, Robson, Sâmia, Thaís e Thiago. Muitos dos quais são amigos verdadeiros. Obrigada pela ajuda, sugestões, parcerias em experimentos. Um “Obrigada” especial a Natália, Thiago, Calliandra e Marciano que colaboraram diretamente no desenvolvimento deste projeto.

À Dona Ivanilde, Dona Fátima e ao Thompson, que permitem o bom funcionamento do laboratório.

A Deus por me fortalecer e me iluminar durante esta etapa, onde aprendi muito sobre como superar as dificuldades. Obrigada por ter colocado em meu caminho pessoas tão especiais, que estão comigo nos momentos de dificuldade e também nos momentos de conquista.

ÍNDICE

RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
LISTA DE FIGURAS	xvi
LISTA DE TABELAS	xviii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xix
1 - INTRODUÇÃO	1
1.1– <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e <i>Paracoccidioidomycose</i>	1
1.2 - <i>Parede Celular de Fungos e virulência</i>	5
1.3 - <i>1,3-β-glicana sintase (FKS1)</i>	6
1.4 – <i>Regulação da expressão gênica em P. brasiliensis</i>	9
1.4.1 – CreA	11
1.4.2 – PacC	13
2 - OBJETIVOS	17
2.1 – <i>Objetivo Geral</i>	17
2.2– <i>Objetivos Específicos</i>	17
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 – <i>Linhagem Microbiológica</i>	18
3.2 – <i>Meios de Cultura – Paracoccidioides brasiliensis</i>	18
3.3 – <i>Antibióticos</i>	18
3.3.1 – <i>Penicilina</i>	18
3.3.2 – <i>Neomicina</i>	18
3.4– <i>Soluções e Soluções Tampão</i>	19
	X

3.4.1 – Solução para lavagem de células de levedura e micélio de <i>P. brasiliensis</i>	19
3.4.2 – Soluções para Extração de Proteínas de <i>P. brasiliensis</i>	19
3.4.3 – Soluções para Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Desnaturante - SDS-PAGE	20
3.4.4 – Soluções para o Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética (EMSA)	21
3.5 – Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética para Análise da Região Promotora do Gene 1,3-β-glicana sintase de <i>P. brasiliensis</i>	22
3.5.1 – Extração de Proteínas de <i>P. brasiliensis</i>	22
3.5.2 – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Desnaturante - SDS-PAGE	23
3.5.3 – Ensaio de Retardo de Mobilidade Eletroforética (EMSA)	24
4 - RESULTADOS	31
4.1 – Busca de possíveis motivos de interação DNA-proteína na Região Promotora do Gene 1,3-β-glicana sintase de <i>P. brasiliensis</i>	31
4.2 – Experimento de Retardo de Mobilidade Eletroforética. Empregando a proteína recombinante CreAHg–GST	32
4.3 - Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética (EMSA) empregando a sonda Pfk1(I) (somente CreA) e extratos protéicos de <i>P. brasiliensis</i>	34
4.3.1 – Sonda Pbfks1(I) + Extrato protéico total de micélio	34
4.3.2 – Sonda Pbfks1(I) + Extrato protéico total de levedura	35
4.4 - Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética (EMSA): sonda Pfk1(II) (somente PacC):	36
4.4.1 – Sonda Pbfks1(II) + Proteína recombinante PacC de <i>P. brasiliensis</i> (rPacCPb-GST)	36
4.4.2 – Sonda Pbfks1(II) + Extrato protéico total de micélio (pH:7)	38
4.4.3 – Sonda Pbfks1(II) + Extrato protéico total de levedura (pH:7)	39
4.4.4 – Sonda Pbfks1(II) + Extrato protéico de micélio (pH:5)	41
4.4.5 – Sonda Pbfks1(II) + Extrato protéico de micélio (pH:9)	42
4.4.6 – Sonda Pbfks1(II) + Extrato protéico de levedura (pH:5)	43
4.4.7 – Sonda Pbfks1(II) + Extrato protéico de levedura (pH:9)	44
4.5 - Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética (EMSA): sonda Pfk1(III) (CreA + PacC):	45
4.5.1 – Sonda Pbfks1(III) + Extrato protéico total de micélio de <i>P. brasiliensis</i> (pH:7) – Competidor Mutado I (CreA)	46
4.5.2 – Sonda Pbfks1(III) + Extrato protéico total de levedura de <i>P. brasiliensis</i> (pH:7) – Competidor Mutado I (CreA)	47
4.5.3 – Sonda Pbfks1(III) + Proteína recombinante PacC de <i>P. brasiliensis</i> (rPacCPb-GST) - Competidor Mutado II (PacC)	49

4.5.4 – Sonda <i>Pbfks1</i> (III) + Extrato protéico total de micélio <i>P. brasiliensis</i> (pH:7) - Competidor Mutado II (PacC)	50
4.5.5 – Sonda <i>Pbfks1</i> (III) + Extrato protéico total de levedura <i>P. brasiliensis</i> (pH:7) - Competidor Mutado II (PacC)	51
4.5.6 – Sonda <i>Pbfks1</i> (III) + Extrato protéico total de micélio de <i>P. brasiliensis</i> (pH:5) - Competidor Mutado II (PacC)	53
4.5.7 – Sonda <i>Pbfks1</i> (III) + Extrato protéico total de micélio de <i>P. brasiliensis</i> (pH:9) - Competidor Mutado II (PacC)	54
4.5.8 – Sonda <i>Pbfks1</i> (III) + Extrato protéico total de levedura <i>P. brasiliensis</i> (pH:5) - Competidor Mutado II (PacC)	54
4.5.9 – Sonda <i>Pbfks1</i> (III) + Extrato protéico total de levedura <i>P. brasiliensis</i> (pH:9) - Competidor Mutado II (PacC)	56
5 - DISCUSSÃO	58
6 - CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	63
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

RESUMO

Paracoccidioides brasiliensis, agente etiológico da paracoccidioidomicose, é um fungo termodimórfico e sua patogenicidade está ligada ao processo de transição dimórfica e a alterações na parede celular. Em *P. brasiliensis*, os principais polímeros que compõem a parede celular são a 1,3- β -glicana e a 1,3- α -glicana, responsáveis pela forma e integridade estrutural. Neste estudo investigou-se a região promotora do gene de 1,3- β -glicana sintase (*PbFKS1*). Foram encontrados na região regulatória de *PbFKS1* dois sítios consensuais para a ligação do fator transcricional CreA, envolvido na repressão por glicose, e dois sítios de interação para o fator PacC, relacionado à regulação da expressão gênica mediada pelo pH extracelular em fungos.

Experimentos de retardo de mobilidade eletroforética (EMSA) foram realizados com três sondas fluorescentes distintas: *Pbfsk1* (I), que apresenta um dos sítios CreA; *Pbfsk1* (II), que representa um sítio para PacC e *Pbfsk1* (III), na qual estão presentes um sítio para CreA e um sítio para PacC espaçados por sete nucleotídeos. Foram empregados, nos experimentos de EMSA, proteínas recombinantes contendo os domínios de ligação ao DNA de CreA e de PacC fusionados à glutathione-S-transferase, e extratos protéicos totais de *P. brasiliensis* nas fases de micélio e de levedura, crescido em pH ácido (5,0), neutro (7,0) ou alcalino (9,0).

Os resultados de EMSA indicaram que os sítios de CreA do gene *PbFKS1* não foram reconhecidos pela proteína rCreA-GST. Quando da incubação com extratos protéicos totais obtidos de células leveduriformes ou miceliais, houve a formação de complexos DNA-proteína, mas esses não envolviam o sítio de reconhecimento de CreA.

Os experimentos realizados com as duas sondas que apresentam o motivo de reconhecimento de PacC indicaram a formação de complexos entre a proteína rPacC-GST e o motivo de reconhecimento específico. Os ensaios feitos com extratos protéicos totais resultaram na detecção de interação DNA-proteína específica no sítio PacC apenas na forma de levedura, cultivada em pH neutro ou alcalino.

Os dados obtidos nesse trabalho indicam que o fator transcricional PacC possa estar envolvido na regulação da expressão do gene *PbFKS1* quando do crescimento leveduriforme, forma celular que ocorre no hospedeiro infectado.

ABSTRACT

Paracoccidioides brasiliensis, the etiological agent of paracoccidioidomycosis, is a thermodimorphic fungus. Pathogenicity is linked to modifications of the cell wall during the dimorphic transition. *P. brasiliensis* major cell wall polymers are 1,3- β -glican and 1,3- α -glican, which are responsible for structural form and integrity. In this study the promoter region of the 1,3- β -glican synthase (*PbFKS1*) gene was investigated. In the *PbFKS1* regulatory region we found two consensus binding sites for the CreA transcription factor, involved in glucose repression, and two interaction sites for the transcription factor PacC, which is related to the gene expression regulation mediated by extracellular pH in fungi.

Electrophoretic mobility shift assays (EMSAs) were performed with three distinct fluorescent probes: *Pbfks1* (I), which presents one of the CreA recognition sites; *Pbfks1* (II), which represents a PacC binding site; and *Pbfks1* (III), in which one site for CreA and one for PacC are spaced by seven nucleotides. For the EMSAs, we employed recombinant proteins containing the CreA or the PacC DNA-binding domain fused to glutathione-S-transferase (rCreA-GST and rPacC-GST, respectively), as well as total proteins extracts obtained from *P. brasiliensis* mycelium and yeast cells grown in acidic (5.0), neutral (7.0) or alkaline (9.0) pH.

EMSAs results indicated that the CreA binding sites present in the *PbFKS1* gene regulatory region were not recognized by the rCreA-GST protein. When probes were incubated with total protein extracts obtained either from yeast or mycelium cells, DNA-protein complexes were formed; nevertheless, these complexes did not involve the CreA specific recognition site.

Experiments performed with the two PacC probes indicated the formation of complexes between rPacC-GST and the specific recognition motive. Total protein extracts assays resulted in the detection of specific DNA-protein interactions in the PacC binding site only in the yeast phase grown in neutral or alkaline pH.

The data obtained in this work indicate that the transcription factor PacC can be involved in the regulation of *PbFSK1* gene expression during the yeast phase growth, which is the cell form that occurs in the infected host.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Árvore filogenética.	3
Figura 2. Seqüência nucleotídica da região promotora do gene <i>PbFKS1</i> .	32
Figura 3: Ensaio de Retardo de Mobilidade Eletroforética (EMSA) utilizando a sonda I <i>H. grisea</i> , sonda <i>Pbfks1</i> (I) e sonda <i>Pbfks1</i> (III) incubadas com proteína recombinante CreAHg-GST.	33
Figura 4: EMSA utilizando a sonda <i>Pbfks1</i> (I) incubada com extrato protéico total de micélio de <i>P. brasiliensis</i>	34
Figura 5: EMSA utilizando a sonda <i>Pbfks1</i> (I) incubada com extrato protéico total de levedura de <i>P. brasiliensis</i> .	35
Figura 6: EMSA utilizando a sonda <i>Pbfks1</i> (II) incubada com proteína recombinante PacCPb-GST	37
Figura 7: EMSA utilizando a sonda <i>Pbfks1</i> (II) inubada com extrato protéico total de micélio de <i>P. brasiliensis</i> (pH:7)	38
Figura 8: EMSA utilizando a sonda <i>Pbfks1</i> (II) incubada com extrato protéico total de levedura de <i>P. brasiliensis</i> (pH:7).	39
Figura 9: EMSA utilizando a sonda <i>Pbfks1</i> (II) e extrato protéico total de micélio de <i>P. brasiliensis</i> (pH:5)	41
Figura 10: EMSA utilizando a sonda <i>Pbfks1</i> (II) incubada com extrato protéico total de micélio de <i>P. brasiliensis</i> (pH:9)	42
Figura 11: EMSA utilizando a sonda <i>Pbfks1</i> (II) incubada com extrato protéico total de levedura de <i>P. brasiliensis</i> (pH:5)	43
Figura 12: EMSA utilizando a sonda <i>Pbfks1</i> (II) incubada com extrato protéico total de levedura de <i>P. brasiliensis</i> (pH:9)	44
Figura 13. Sonda <i>Pbfks1</i> (III) (CreA + PacC)	45
Figura 14: EMSA utilizando a sonda <i>Pbfks1</i> (III) incubada com extrato protéico total de micélio	46

Figura 15: EMSA utilizando a sonda <i>Pbfks1</i> (III) incubada com extrato protéico total de levedura	47
Figura 16: EMSA utilizando a sonda <i>Pbfks1</i> (III) incubada com proteína recombinante PacCPb-GST	49
Figura 17: EMSA utilizando a sonda <i>Pbfks1</i> (III) incubada com extrato protéico total de micélio de <i>P. brasiliensis</i> (pH: 7)	50
Figura 18: EMSA utilizando a sonda <i>Pbfks1</i> (III) incubada com extrato protéico de levedura de <i>P. brasiliensis</i> (pH: 7)	51
Figura 19: EMSA utilizando a sonda <i>Pbfks1</i> (III) incubada com extrato protéico de micélio de <i>P. brasiliensis</i> (pH: 5)	53
Figura 20: EMSA utilizando a sonda <i>Pbfks1</i> (III) incubada com extrato protéico de micélio de <i>P. brasiliensis</i> (pH: 9)	54
Figura 21: EMSA utilizando a sonda <i>Pbfks1</i> (III) incubada com extrato protéico de levedura de <i>P. brasiliensis</i> (pH: 5)	55
Figura 22: EMSA utilizando a sonda <i>Pbfks1</i> (III) incubada com extrato protéico de levedura de <i>P. brasiliensis</i> (pH: 9)	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sítios analisados na região promotora do gene <i>PbFKS1</i>	11
Tabela 2. Sondas utilizadas em EMSA	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Por cento
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de amônia
150X	cento e cinqüenta vezes concentrado
1X	concentração para uso
25X	vinte e cinco vezes concentrado
50X	cinquenta vezes concentrado
5X	cinco vezes concentrado
APS	Persulfato de amônio
cm	centímetro
CreA/CRE1	fator transcricional que media a repressão transcricional em presença de glicose
CreAHg-GST	domínio de ligação ao DNA da proteína CreA de <i>H. grisea</i> fusionado à GST
DEAE	dietilaminoetil
DNA	ácido desoxirribonucléico
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EMSA	Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (e outros)
FAM	fluoróforo carboxifluoresceína
<i>FKS</i>	gene que codifica a 1,3-β-glicana sintase em fungos; ocorrem variações dessa nomenclatura e número de genes identificados, de acordo com os autores citados ao longo deste trabalho
<i>g</i>	unidade de medida da força centrífuga
g	grama
GST	glutathione S-transferase
h	hora
H ₂ O	água

HCl	Ácido clorídrico
HEPES	N-2-hidroxi-etilpiperazina-N'-2-ácido etanosulfônico
KCl	Cloreto de potássio
KDa	quilodalton
M	Molar
mA	miliampere
Mb	megabase
mg	miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	mililitro
mM	milimolar
mRNA	RNA mensageiro
nm	nanômetro
°C	graus Celsius
ORF	região aberta de leitura
p/v	massa/volume
PacC	fator transcricional que media a transcrição em resposta ao pH
PacCPb-GST	domínio de ligação ao DNA da proteína PacC de <i>P. brasiliensis</i> fusionado à GST
pb	pares de base
PbFKS1	gene que codifica a 1,3-β-glicana sintase identificado em <i>P. Brasiliensis</i>
PBS	Tampão Fosfato de sódio
PCM	paracoccidiodomicose
pH	potencial hidrogeniônico
pmol	Picomoles
PMSF	flúor eto fenil metil sulfonil
poli(dl-dC)	polímero sintético de deoxiinosina e deoxicitidina (utilizado como competidor inespecífico em EMSA)
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RNA	ácido ribonucléico

rpm	rotações por minuto
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (condições desnaturantes)
TEB	tampão Tris-EDTA-borato
TEMED	N,N,N', N'-tetrametil etilenodimetilamina
T _m	<i>Melting Temperature</i>
TRIS	tris-(hidroximetil)-aminometano
U	Unidades
V	Volts
v/v	volume/volume
YPD	Yeast Peptone Dextrose (meio YPD)
µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromolar
µm	micrômetro

I - INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

1.1– *Paracoccidioides brasiliensis* e Paracoccidioidomicose

Paracoccidioides brasiliensis é o agente causador da paracoccidioidomicose (PCM), uma micose endêmica na América Latina, também conhecida como blastomicose sul-americana ou doença Lutz-Splendore-Almeida (revisto por Ameen *et al.*, 2009). O fungo causador foi descrito pela primeira vez em 1908 por Adolfo Lutz, mais tarde, em 1912, Afonso Splendore sugeriu o nome *Zymonema brasiliense*, e em 1930, Floriano de Almeida distinguiu seu agente do *Coccidioides immitis* e propôs o nome de *Paracoccidioides brasiliensis*. A doença só foi reconhecida oficialmente como paracoccidioidomicose pela Organização Mundial da Saúde (OMS), em 1971 (Marques, 1998; revisto por Ramos-e-Silva & Saraiva 2008).

A paracoccidioidomicose tem uma multiplicidade de aspectos clínicos, apresentando-se em formas cutâneas e sistêmicas, podendo atacar vários tecidos (Mendes-Giannini, *et al.* 2008), em particular a pele, os gânglios linfáticos, os pulmões, as glândulas supra-renais e o sistema nervoso central (revisto por Ramos-e-Silva & Saraiva 2008).

A PCM é endêmica na América Latina, onde cerca de 10 milhões de pessoas estão infectadas, das quais 2% irão desenvolver a doença (revisto por Ramos-e-Silva & Saraiva, 2008). Entre as doenças infecciosas e parasitárias, no período de 1996-2006, micoses sistêmicas foram a causa subjacente para 3.583 mortes anuais em 1314 (23,6%) dos 5.560 municípios brasileiros. Para as 3.583 mortes por micoses sistêmicas que ocorreram na década de 1996-2006, paracoccidioidomicose (blastomicose inclusive) foi a micose mais citada, com uma média anual de 171 mortes (53,9%) no início do período de estudo e 148 mortes (44,6%) no final. A PCM foi responsável por aproximadamente metade do total de mortes devido a micoses sistêmicas, sendo os estados de São Paulo e Paraná os que apresentaram as maiores taxas de mortalidade (Prado, *et al.* 2009).

Segundo Coutinho e colaboradores. (2002), a PCM atinge predominantemente homens, em uma taxa de 562 para 100 mulheres com idade acima de 15 anos. Sugere-se que esta maior incidência em homens possa ser

atribuída às diferenças hormonais. Neste sentido, vale ressaltar os experimentos nos quais foi observado que o hormônio feminino estrogênio inibe a transição dimórfica *in vitro* (Restrepo *et al.*, 1984) e *in vivo* (Aristizabal *et al.*, 1998). Por muito tempo acreditou-se que o homem era o único hospedeiro de *P. brasiliensis*, até que Naif e colaboradores (1986) isolaram o fungo de vísceras de tatu (*Dasypus novemcinctus*). Em 2004 foi relatado um caso de infecção em um cão adulto com lesões características da manifestação clínica da PCM (Ricci *et al.*, 2004).

A PCM afeta particularmente aqueles que vivem em áreas rurais e trabalham na agricultura, embora existam relatos de casos em regiões periurbanas e como doença oportunista em pessoas infectadas com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Presume-se que muitas pessoas que vivem em áreas endêmicas adquirem o fungo *P. brasiliensis* por meio da inalação de esporos presentes no solo. Entretanto, apenas uma minoria desenvolve a forma clínica, o que depende da resposta imune do hospedeiro. (Revisto por Ameen *et al.*, 2009). As diferentes formas clínicas da doença, e a ocorrência de infecção assintomática, podem ser resultado de fatores relacionados com o hospedeiro, como sexo, idade e estado imunológico, bem como das características do agente infeccioso, especialmente sua virulência (revisto por Ramos-e-Silva & Saraiva 2008).

O diagnóstico da PCM pode ser realizado por exame microscópico do material coletado das ulcerações dos tecidos. Técnicas para detecção de anticorpos, como imunodifusão, imunoeletoforese e ELISA podem ser úteis para a avaliação da terapêutica, que dependerá da gravidade da doença. O *P. brasiliensis*, é sensível a agentes antifúngicos, particularmente os azóis como o itraconazol e o cetoconazol, embora outros antifúngicos como as sulfonamidas e a anfotericina B também sejam utilizadas no tratamento da PCM (revisto por Ameen *et al.*, 2009).

O fungo *P. brasiliensis* inicialmente foi classificado como um deuteromiceto por não ter sido observada uma fase sexual em seu ciclo de vida. Após estudos comparativos de sequências de RNAs ribossomais 18S, foi incluído no grupo dos ascomicetos, tendo sido classificado como um provável membro da ordem Onygenales, juntamente com *H. capsulatum* e *B. dermatitidis*. Achados morfológicos e moleculares mais recentes, propoem que os principais fungos patogênicos que causam micoses sistêmicas sejam classificados como Ajellomycethaceae, uma nova família de fungos que infectam vertebrados, associada ao grupo Onygenales. Essa família inclui fungos dos gêneros *Histoplasma*, *Blastomyces*, *Emmonsia* e

Paracoccidioides (Figura 1) e a posição taxonômica correta destes fungos abriu novas possibilidades de estudo (San-Blas & Niño-Vega, 2008; Richini-Pereira *et al.* 2009).

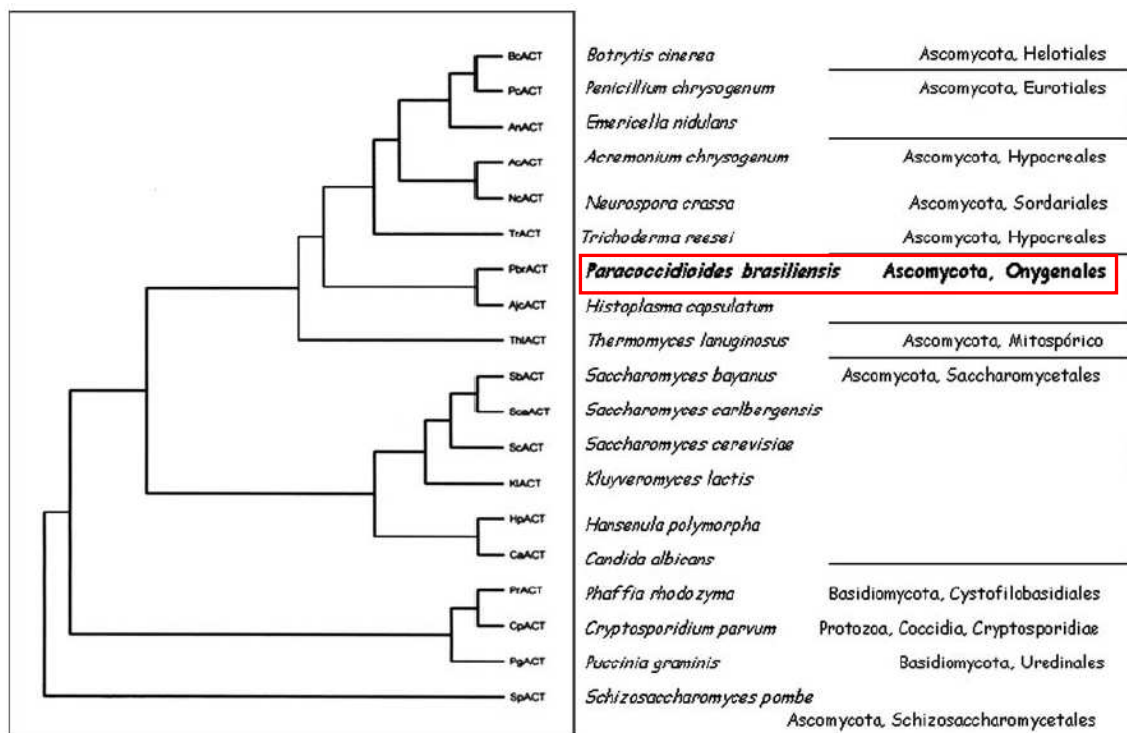


Figura 1: Árvore filogenética.

Comparação filogenética de dermatófitos e fungos dimórficos, com base no DNA ribossomal da subunidade 28S. Em destaque encontra-se o fungo *P. brasiliensis* – ordem Onygenales, família Onygenaceae (filo Ascomycota). Fonte: (San-Blas & Niño-Vega, 2008)

Observa-se uma extensa variabilidade genética entre os isolados de *P. brasiliensis*. Matute e colaboradores (2006) sugerem que existam pelo menos três espécies filogenéticas de *P. brasiliensis*, das quais duas são espécies monofiléticas (PS2, composta por isolados da Venezuela e Brasil, e PS3, composta por isolados da Colômbia), e uma espécie parafilética (S1, com ampla abrangência nas áreas endêmicas). O Pb01, objeto de estudo deste trabalho, é um isolado clínico que diverge dessas três espécies filogenéticas descritas. A análise filogenética de isolados que se assemelham ao genótipo de Pb01, isolados denominados “*Pb01-like*”, permitiu agrupar esses isolados em um grupo filogenético distinto dos grupos S1, PS2 e PS3, e sugere-se a descrição formal de uma nova espécie para esse grupo, denominada *Paracoccidioides lutzii* (Teixeira *et al.*, 2009). Recentemente, o genoma do isolado Pb01, de aproximadamente 32 Mb, foi seqüenciado pelo *Broad*

Institute

(www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html), estimando-se cerca de 9 mil genes.

O *P. brasiliensis* é um fungo termo dimórfico apresentando-se no hospedeiro, ou *in vitro* a 37°C, na forma de levedura, enquanto a forma de micélio é observada à temperatura ambiente, ou *in vitro* a 26°C (revisto por San-Blas & Niño-Vega, 2001). Ambas as formas apresentam células multinucleadas. A hifa de *P. brasiliensis* possui poro septal e uma bicamada de parede celular (San-Blas, 1993). A parede celular do micélio possui espessura variando de 80 a 150 nm, é formada por uma camada externa eletrodensa constituída por β -1,3-glicana, e uma camada interna espessa constituída por fibrilas de quitina. A forma de levedura também possui duas camadas mais espessas, de 200 – 600 nm, sendo a camada externa formada basicamente por α -1,3-glicana e a interna formada por quitina (revisto por San-Blas & Niño-Vega, 2001).

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

A transição dimórfica em *P. brasiliensis* é governada predominantemente pela temperatura e é precedida por alterações moleculares. A identificação de genes diferencialmente expressos e/ou genes requeridos para o dimorfismo é importante para a compreensão dos eventos que ocorrem no estabelecimento da infecção e da doença. A expressão diferencial de genes é essencial em diversos processos biológicos tais como: ciclo celular; resposta ao estresse; diferenciação celular; interação hospedeiro-patógeno; transição dimórfica, entre outros. A habilidade de *P. brasiliensis* iniciar a infecção, invadir o tecido do hospedeiro e sobreviver perante suas defesas está ligada à indução de genes específicos, que tornam possível sua sobrevivência e o eventual estabelecimento da infecção. A expressão diferencial de genes é, portanto, essencial para os processos patológicos. A identificação desses genes pode levar ao entendimento dos mecanismos moleculares da patogênese, bem como apontar novas estratégias de tratamento da paracoccidioidomicose (San-Blas *et al.*, 2002).

Um dos interesses de nosso grupo de pesquisa é o estudo da regulação da expressão gênica durante o processo de infecção, dimorfismo bem como entre os

dois tipos morfológicos, micélio e levedura. Nesse sentido, têm sido utilizadas diversas estratégias relacionadas ao isolamento e caracterização de genes que são diferencialmente expressos entre as duas formas morfológicas de *P. brasiliensis*.

Outra abordagem que permite estabelecer de maneira mais abrangente os genes que são diferencialmente expressos entre os dois tipos celulares de *P. brasiliensis* tem sido utilizada por nosso grupo desde o ano 2001 com o Projeto Genoma Funcional de *Paracoccidioides brasilienses*, cujo objetivo foi a geração de ESTs (do inglês *Expressed Sequence Tags*) a partir de bibliotecas de cDNA das formas de micélio e de levedura de *P. brasiliensis*. Nesse projeto foram geradas 19718 sequências dentre as quais 16351 foram agrupadas em 2655 contigs e o restante descrito como sequências únicas (Felipe *et al.*, 2005). É importante ressaltar que em paralelo, um outro projeto genoma da forma levedura de *P. brasiliensis*, também em condições de cultivo *in vitro*, foi empreendido (Nunes *et al.*, 2005).

1.2 - Parede Celular de Fungos e virulência

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

Em *P. brasiliensis*, a forma de levedura apresenta um maior conteúdo de quitina que a forma de micélio, que por sua vez apresenta um maior conteúdo de proteínas que a forma de levedura (Kanetsuna *et al.*, 1969). Em *P. brasiliensis*, a 1,3- α -glicana predomina na forma de levedura, enquanto que na fase de micélio predomina a 1,3- β -glicana. Dessa forma, a 37° C a síntese de 1,3- α -glicana é aumentada e a 20° C aumenta-se a síntese de 1,3- β -glicana (Kanetsuna *et al.*, 1972).

A α -1,3- glicana é o principal componente da parede celular de leveduras e está relacionada com a virulência devido a sua capacidade de mascarar o mecanismo de reconhecimento do patógeno pelo hospedeiro, como relatado por Rappleye e colaboradores (2007) em *H. capsulatum*.

A parede celular é uma estrutura externa e está presente em todas as células fúngicas. Sua integridade é crucial, e constitui o exoesqueleto que confere força mecânica e resistência osmótica das células fúngicas. Por ser ausente em células de mamíferos, a parede celular é conceitualmente atrativa para as terapias antifúngicas (revisto por Okamoto *et al.*, 2006). Os polissacarídeos 1,3- β -glicana e quitina não são constituintes das células de mamíferos. Assim, antifúngicos que atuem na inibição da síntese desses polissacarídeos poderiam ser altamente seletivos (revisto por Martins *et al.*, 2010). Dentre os antifúngicos já existentes, podemos citar a equinocandina (CSF), anidulafungina (ANF) e a micafungina (MCF) que inibem a 1,3- β -glicana sintase, perturbando a estrutura do crescimento da parede celular, causando instabilidade osmótica e morte celular das leveduras (Garcia-Effron *et al.* 2009).

1.3 - 1,3- β -glicana sintase (FKS1)

O polissacarídeo 1,3- β -glicana é predominante na parede celular da maioria dos fungos, incluindo *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa* e *Coccidioides posadasii* em todas as fases de crescimento. A 1,3- β -glicana é sintetizada a partir de UDP-glicose pela enzima 1,3- β -glicana sintase. A atividade catalítica de 1,3- β -glicana sintase é regulada por uma GTPase da superfamília Ras, a Rho1-GTPase, e pela proteína quinase C (PKC). Rho1-GTPase é uma subunidade regulatória de 1,3- β -glicana sintase que estimula a sua atividade. Essa subunidade também regula a integridade da parede celular por meio de uma via de sinalização, ligando-se e ativando PKC. Em *S. cerevisiae*, a 1,3- β -glicana sintase consiste de uma subunidade catalítica que é codificada por qualquer um de dois genes (*FKS1* ou *FKS2*). A atividade da glicana sintase é essencial na fase de levedura e a eliminação dupla dos genes *FKS1* e *FKS2* é letal, embora algumas deleções simples sejam toleradas, sugerindo funções sobrepostas dos dois polipeptídeos. *FKS2* é necessário para esporulação e um terceiro gene em levedura, *FKS3* não se mostra

essencial para o crescimento nem para a esporulação (revisto por Kellner *et al.*, 2005).

Em *C. albicans* há dois genes *FKS* e em *Schizosaccharomyces pombe* há quatro genes, embora ainda não esteja claro o papel específico de cada um na atividade de glicana sintase. Genes *FKS* de cópia única também foram identificados em *N. crassa*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *P. brasiliensis* e *Yarrowia lipolytica* (revisto por Ha *et al.*, 2006)

Em *C. albicans*, o gene *GSC1* foi descrito por Mio e colaboradores (1997) como responsável por codificar uma unidade catalítica da 1,3- β -glicana sintase. A proteína predita apresenta 210 kDa (Gsc1p), com cerca de 72% de identidade com as proteínas homólogas em *S. cerevisiae*. Além de *GSC1*, *C. albicans* apresenta outro gene que pode estar relacionado à atividade de 1,3- β -glicana sintase, denominado *GSL1*. Apesar de ter uma fase aberta de leitura (ORF) correspondente a apenas 57% da ORF de *GSC1*, a proteína predita *GSL1* apresenta 54% de identidade com Gsc1p. Tanto *GSC1* como *GSL1* são expressos na fase de levedura de *C. albicans*, e quando o crescimento da hifa é induzido, os níveis de mRNA declinam. Em *N. crassa*, foi identificada uma proteína descrita como subunidade de 1,3- β -glicana sintase (Schimoler-O'Rourke *et al.*, 2003).

Kellner e colaboradores (2005) caracterizaram um homólogo do gene 1,3- β -glicana sintase em *C. posadasii* (*FKS1*), cuja proteína predita apresenta alto grau de conservação com as 1,3- β -glicana sintases de fungos filamentosos. O gene *FKS1* de *C. posadasii* é expresso em níveis similares em micélio e em culturas no início da formação das esférulas, e decresce quando as esférulas estão maduras. Em *C. neoformans*, o gene *FKS1* apresenta similaridade com os homólogos de outros fungos e parece ser a única cópia nesse organismo, sendo essencial para a viabilidade (Thompson *et al.*, 1999). Em *Y. lipolytica*, o gene 1,3- β -glicana sintase (*YIFKS1*) codifica uma proteína de 1.961 resíduos de aminoácidos, que apresenta uma alta homologia com as 1,3- β -glicana sintases em *C. albicans*, *S. pombe*, *A. nidulans*, *C. neoformans* e *P. brasiliensis*. A análise de expressão do gene *YIFKS1*, em diferentes condições afetando a parede celular, não revelou diferenças significativas, mas foi demonstrado que *YIFKS1* é essencial para o crescimento, sugerindo que este é também o único homólogo em *Y. lipolytica* (León *et al.*, 2002). Em *Fusarium solani*, um fitopatógeno, foi clonado e seqüenciado o gene *FsFKS1*, que codifica uma proteína predita de 220 kDa, também com alto grau de similaridade

(75 - 88%) às proteínas homólogas em *N. crassa*, *P. brasiliensis*, *A. fumigatus* e *S. cerevisiae* (Ha *et al.*, 2006). O gene *FKS1* do fungo entomopatogênico *Metarhizium acridum* foi recentemente clonado. Análises empregando RNA de interferência demonstraram que em *M. acridum*, *FKS1* está relacionado à resistência a agentes que interferem na estrutura da parede e da membrana celular, à resposta ao estresse osmótico e à conidiação (Yang *et al.* 2011).

Em *P. brasiliensis*, Pereira e colaboradores (2000) caracterizaram um homólogo do gene de 1,3- β -glicana sintase. O gene *Pbfks1* (número de acesso no GenBank AF148715) apresenta uma ORF de 5.942 pb, interrompida por dois íntrons, o primeiro próximo à extremidade 5' e o segundo próximo à extremidade 3' do gene. Em seus experimentos para analisar a estrutura de genes de 1,3- β -glicana sintase de diferentes isolados de *P. brasiliensis*, Okamoto e colaboradores (2006) detectaram a expressão do gene *Pbfks1* em culturas de levedura e observaram que sete dos oito isolados analisados apresentam estruturas gênicas semelhantes a respeito da posição dos introns. De acordo com Pereira e colaboradores (2000), a seqüência deduzida de 1.926 resíduos de aminoácidos corresponde a uma proteína predita de 212 kDa, que apresenta mais de 85% de similaridade com a proteína FksAp de *A. nidulans*, e 71% de similaridade com as proteínas Fks1p e Fks2p de *S. cerevisiae*. Análises computacionais da 1,3- β -glicana sintase de *P. brasiliensis* sugerem uma estrutura similar a uma proteína integral de membrana, apresentando cerca de 16 hélices transmembrana. O domínio catalítico predito é localizado no citoplasma e é hidrofóbico, limitado por dois domínios compostos por seis e dez hélices hidrofóbicas. Apesar de ter sido clonado e caracterizado um único gene, outros dois fragmentos foram identificados e podem estar relacionados à atividade de 1,3- β -glicana sintase. Matute e colaboradores (2008), demonstraram que o gene *FKS* apresenta pouca variação entre diferentes isolados de *P. brasiliensis* e parece estar submetido à seleção positiva.

O genoma funcional de *P. brasiliensis* (Felipe *et al.*, 2005) revelou vários transcritos diferencialmente expressos entre as fases de micélio e levedura. β -1,3-glicana sintase é expressa preferencialmente na fase de micélio e α -1,3-glucana sintase expressa preferencialmente na fase leveduriforme, corroborando o conteúdo desses dois polissacarídeos na parede dos dois tipos celulares distintos.

Recentemente vários artigos da literatura científica vêm relacionando mutações em genes *FKS* com sensibilidade diferencial a drogas como as

equinocandinas, que são inibidores da síntese de β -1,3-D-glicana sintase. Em *C. albicans*, a mutação no gene *GSC1* está relacionada a uma maior resistência a micafungina (Niimi *et al.*, 2010). Castanheira e colaboradores (2010) verificaram que um dentre 32 isolados de *C. albicans*, um dentre 34 isolados de *Candida glabrata* e dois dentre 12 isolados de *Candida tropicalis* apresentaram mutações em *FKS1*. Já os isolados de *Candida krusei*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* testados não apresentaram alterações nesse gene, independentemente da susceptibilidade diferencial a equinocandina. Três isolados de *C. glabrata* apresentaram mutações em *FKS2*. Ainda em *C. glabrata*, isolados clínicos resistentes a equinocandina apresentaram mutação em *FKS1* ou *FKS2* segundo Zimbeck e colaboradores (2010). Em *Aspergillus lentulus*, espécie recentemente descrita e altamente relacionada ao patógeno *A. fumigatus*, susceptibilidades diferenciais a equinocandina não parecem envolver mutações nos genes *FKS* dos diferentes isolados (Staab *et al.*, 2010).

Visto que a síntese de 1,3- β -glicana é importante para a estrutura da parede celular, um maior conhecimento da regulação de 1,3- β -glicana sintase em *P. brasiliensis* será de fundamental importância e poderá fornecer informações sobre a biologia e virulência desse fungo patogênico.

1.4 – Regulação da expressão gênica em *P. brasiliensis*

Na era pós-genômica, tem sido comum o estudo do perfil de expressão gênica de um microrganismo patogênico crescido sob condições determinadas, a fim de se obter informações sobre a biologia, virulência, patogenicidade, interação patógeno-hospedeiro e o desenvolvimento da doença. Em *P. brasiliensis*, a maioria dos estudos está centrada na base molecular do estabelecimento da fase de levedura. Essa abordagem experimental permite a compreensão dos aspectos relacionados à transição dimórfica do fungo, tornando possível a identificação de potenciais moléculas ligadas à patogenicidade, virulência e de outras moléculas que possam ser úteis para o desenvolvimento de drogas antifúngicas (Silva *et al.*, 2008). No entanto, em comparação a outros fungos patogênicos, as informações a respeito de regulação da expressão gênica ainda são limitadas.

Utilizando a técnica de bibliotecas de subtração, Bailão e colaboradores (2006) identificaram em *P. brasiliensis* genes candidatos a serem expressos apenas na adaptação a infecção, estabelecendo uma visão transcricional das respostas nas interações patógeno-hospedeiro.

Andrade e colaboradores (2006) relataram 66 genes diferencialmente expressos nas fases de micélio e levedura. Esses foram caracterizados em duas classes, a primeira que inclui genes envolvidos na manutenção da parede celular, membrana e citoesqueleto, como por exemplo o gene *hex*, super expresso na fase micelial que codifica uma proteína peroxissomal hexagonal responsável pela integridade da célula, e o gene *bgl* que codifica a proteína 1,3- β -glicosidase envolvida na modificação da parede celular durante o dimorfismo. Entre os genes superexpressos na fase de levedura aparecem o verprolin (*vrp*), quitina desacetilase (*cda*) e a α -1,3- glicana sintase (*ags*).

Parente e colaboradores (2008), utilizando o seqüenciamento de ESTs, analisaram um conjunto de genes relacionados à síntese, dobramento, alteração e destino das proteínas expressas durante a fase de transição de micélio para levedura em *P. brasiliensis*. A análise revelou 43 genes que são induzidos durante o processo de transição dimórfica e oito novos genes relacionados a essa transição.

Borges e colaboradores (2010) relataram que a fase de levedura de *P. brasiliensis* expressa diferencialmente genes relacionados à resposta ao estresse, virulência e desenvolvimento. Dentre os descritos como superexpressos está o gene *tps1* que codifica a proteína alfa-trealose-fosfato sintase (TPS1), responsável por respostas ao estresse e morfogênese, de papel central na infecção do fitopatógeno *Magnaporthe grisea*, e associada à esporulação e patogênese de *C. neoformans*, *Cryptococcus gattii* e *Stagnospora nodorum*. O gene *hsp30* mostrou-se ativado por estresses diversos, incluindo choque térmico, choque de etanol, carência de glicose e excesso de sorbato. A produção da proteína DDR48p, requerida em *C. albicans* em resposta a antifúngicos e peróxido de hidrogênio, além de ser essencial na filamentação, também mostrou-se regulada em leveduras de *P. brasiliensis*. Outro gene superexpresso em *P. brasiliensis* é o que codifica o fator transcricional NsdD, necessário para o desenvolvimento sexual de *A. nidulans*.

Em relação a estudos de expressão de *Pbfks1*, Tomazett e colaboradores (2010) analisaram-na por meio de qRT-PCR e verificaram um maior acúmulo do mRNA correspondente na fase de levedura, o que caracterizaria uma discrepância

com o conteúdo da parede celular dessa forma do fungo, na qual predomina a α -1,3-glicana e não a β -1,3-glicana. Os autores acreditam que mecanismos regulatórios pós-transcricionais possam estar envolvidos na produção das enzimas responsáveis pela formação das glicanas de parede. O mesmo foi verificado por Sorais e colaboradores (2010).

Em um outro estudo do mesmo grupo (Tomazett *et al.*, 2011), verificou-se que a expressão de *PbFKS1* é regulada positivamente quando do crescimento do fungo na presença de agentes indutores de estresse e de osmorreguladores da parede celular, como sódio dodecil sulfato, KCl, NaCl e sorbitol.

Tabela 1. Sítios analisados na região promotora do gene *PbFKS1*.

As seqüências consenso reconhecidas pelos fatores de transcrição PacC e CreA são apresentadas na fita molde e na fita complementar. Fungo *Aspergillus nidulans*.

	Sítio na Região Promotora (Sequência Consenso 5' – 3')	Descrição
Fator de transcrição PacC ¹	GCCARG R=A ou G CYTGGC Y=C ou T	Em condições alcalinas e neutras, ativa genes expressos em resposta a essas condições e reprime genes expressos em condições ácidas
Fator de transcrição CreA ²	SYGGRG S=C ou G, Y=C ou T e R=A ou G CYCCRS S=C ou G, Y=C ou T e R=A ou G	Media a repressão por glicose

Fontes: ¹Espeso *et al.*, 1997; ²Cubero & Scazzocchio, 1994.

1.4.1 – CreA

Muitos fungos filamentosos desenvolveram um estilo de vida sapróbio, no qual a concorrência com outros microrganismos por recursos limitados presentes no ambiente é a chave para a sobrevivência. Diferentes mecanismos permitem uma adaptação rápida a mudanças de nutrientes no ambiente. O sistema de repressão catabólica por carbono (CCR) permite a assimilação de fontes de carbono de alto valor nutricional em detrimento de outras com menor valor nutricional, ou de difícil assimilação. Isso é normalmente alcançado por meio da inibição da expressão de genes codificadores de enzimas envolvidas no catabolismo de fontes de carbono

diferentes daquelas requeridas preferencialmente pelo fungo (revisto Portnoy *et al.*, 2011).

A repressão por glicose é um fenômeno comum na regulação de diferentes classes de genes de fungos. Sabe-se que regiões URS (*upstream regulatory sequence*) presentes nos promotores desses genes têm papel chave na repressão transcricional em presença de glicose. O produto do gene *creA/cre1* age negativamente, ligando-se a sequências consenso SYGGRG do DNA na URS, tendo sido descrito inicialmente em *A. nidulans* (Dowzer & Kelly, 1991 e Ilmén *et al.*, 1996, tabela 1). A funcionalidade do sítio de CreA/CRE1 geralmente consiste da ligação a dois motivos 5'-SYGGRG-3' espaçados e tem-se sugerido que a repressão direta só ocorreria por meio de tais sítios de ligação dupla (Portnoy *et al.* 2011).

Em *A.nidulans*, *CREA* está envolvido na regulação da utilização metabólica de prolina, etanol, arabinana, xilose e xilana (revisto por Sun & Glass, 2011). Nesse organismo, CreA também media a repressão do gene regulatório *xlnR*, que controla a expressão de xilanases (Tamayo *et al.*, 2008).

CreA desempenha importante papel na regulação de genes que codificam hidrolases, como xilanases e celulases em *Trichoderma reesei* (Mach *et al.*, 1996; Ilmén *et al.*, 1996) e em *Humicola grisea* (Mello-de-Souza *et al.*, 2011) e de xilanases em *Penicillium canescens* (Diaz *et al.*, 2008; Chulkin *et al.*, 2011).

Não encontramos informações a respeito do sistema regulatório CreA em fungos patogênicos ao homem, mas esse sistema parece desempenhar função na regulação de genes de fatores de virulência em fungos fitopatógenos, como *Gibberella fujikuroi* e *Botrytis cinérea* (Tudzynski *et al.*, 2000), *Sclerotinia sclerotiorum* (Vautard-Mey & Fèvre, 2003), *Cochliobolus carbonum* (Tonukari *et al.*, 2003), *Alternaria citri* (Kato *et al.*, 2007) e no micopatógeno *Beauveria bassiana* (Jin *et al.*, 2011).

O fator de transcrição CreA/CRE1 de ascomicetos multicelulares está relacionado com as proteínas Mig1/Mig2/Mig3 que mediam a repressão por glicose em *S. cerevisiae*. Sob condições de suficiência de glicose, Mig1 reprime a transcrição de 90 genes associados com a utilização de fontes de carbono alternativas como maltose, galactose e sacarose (revisto por Sun & Glass, 2011).

1.4.2 – PacC

Muitos fungos crescem em uma ampla faixa de pH e a expressão de vários de seus genes pode ser mediada pelo pH do meio ambiente. As alterações no pH ambiental provocam respostas adaptativas em vários organismos, incluindo os fungos, e essas respostas afetam o crescimento, fisiologia, diferenciação e a capacidade de infecção. Os fungos podem modificar ativamente o pH do ambiente pela excreção de ácidos orgânicos, como os ácidos oxálico, glucorônico e cítrico que irão acidificar o meio (Prusky *et al.*, 2004) e podem também excretar amônia, alcalinizando o meio. A excreção de amônia é um importante fator de virulência no gênero *Penicillium* (revisto por Kramer-Haimovich *et al.*, 2006).

Em 1986 foram descritos os primeiros genes envolvidos no sensoriamento do pH ambiental em *A. nidulans* (Caddick *et al.*, 1986). Em *A. nidulans*, o fator de transcrição PacC, ativa genes expressos em condições alcalinas e reprime aqueles expressos em condições ácidas. Sete genes estão envolvidos na regulação por pH em *A. nidulans*, PacC: que codifica o fator transcricional e *paIA*, *paIB*, *paIC*, *paIF*, *paIH* e *paII* que codificam diferentes componentes da via de transdução de sinal mediada por alterações de pH de neutro para alcalino, culminando com a ativação funcional de PacC. Esse apresenta três dedos de zinco Cys₂His₂ dos quais apenas o segundo e o terceiro ligam-se ao DNA no sítio (5'-GCCARG-3'). Em condições ácidas, PacC predomina em sua forma completa que apresenta 72 kDa (PacC⁷²). No entanto, na condição de neutra a alcalina PacC sofre duas sucessivas clivagens proteolíticas, sendo a primeira pH-dependente que remove aproximadamente 180 resíduos do C-terminal, produzindo PacC⁵³ (53 kDa). A segunda clivagem proteolítica é independente do pH e é catalisada pelo proteassoma, que remove aproximadamente 245 resíduos do C-terminal, deixando a região dos dedos de zinco intacta e produzindo a forma PacC²⁷ (27 kDa) que reprime genes expressos em pH ácido e ativa genes expressos em pH alcalino. Em condições ácidas, interações envolvendo três regiões do PacC⁷² aparentemente impedem o acesso do proteassoma. No entanto, há formação de uma pequena quantidade de PacC²⁷ independente da sinalização por pH, e é provavelmente atribuída ao equilíbrio entre uma conformação “fechada” e uma conformação “aberta”. Um sinal de localização nuclear sobrepõe-se aos três dedos de zinco e tanto PacC²⁷ quanto PacC⁵³ são

preferencialmente localizados no núcleo (revisto por Peñalva *et al.*, 2008 e por Poças-Fonseca *et al.*, 2008).

Recentemente, Trevisan e colaboradores (2011) mostraram que a transcrição do gene *pacC* de *A. nidulans* é modulada pela resposta à disponibilidade de fontes de fosfato e de carbono no meio de cultura. A concentração de fosfato inorgânico e o pH também afetam o “splicing” alternativo de íntrons do pré-RNA de *palB*, que codifica a protease responsável pela primeira clivagem de PacC. Quando os íntrons I e /ou III não são processados, gera-se uma protease PalB provavelmente inativa. Como PalB inativa está presente em condições nas quais PacC está ativo, os autores postulam a existência de uma via de ativação alternativa, embora não possa ser descartada a possibilidade de atividade para PacC não processado proteolicamente.

A resposta a alterações de pH ambiental parece crucial à virulência em diversos fungos patogênicos, estando mais bem estudada em *C. albicans*. O homólogo *pacC*/RIM101 de *C. albicans*, inicialmente denominado *PRR2*, foi clonado e caracterizado por Ramon e colaboradores (1999). Mutantes nulos *RIM101* de *C. albicans* perderam o padrão de regulação de genes pH-dependentes e exibiram um desenvolvimento defeituoso na fase de hifas. A expressão de *RIM101* mostrou-se dependente de pH alcalino e do produto do gene *PRR1*, homólogo ao *palF* de *A. nidulans* (Porta *et al.*, 1999). O gene *KER1* de *C. albicans*, que codifica uma proteína da membrana plasmática é regulado por RIM101p. Uma linhagem mutante para *KER1* apresentou defeitos na composição e estrutura da parede celular, levando à atenuação da virulência em um modelo de infecção sistêmica em camundongo (Galán *et al.*, 2004).

A capacidade de obter ferro a partir do ambiente é fundamental para patógenos humanos. Bensen e colaboradores (2004) demonstraram que muitos genes possivelmente envolvidos no metabolismo de ferro em *C. albicans* são regulados por RIM101p.

O processamento proteolítico de Rim101p em *C. albicans*, que envolve uma única etapa, é mediado pelo produto do gene *RIM13*, uma protease calpaína-like homóloga a PalB de *A. nidulans*. Mutantes nulos de *RIM13* são mais sensíveis ao cloreto de lítio e à higromicina B, características freqüentemente associadas a defeitos na parede celular (Li *et al.*, 2004). Esses autores também demonstraram que, além da clivagem mediada por RIM13p, que ocorre em pH alcalino, RIM101p

também é proteoliticamente processada em pH ácido, dando origem a um polipeptídeo que poderia governar a regulação de genes independentemente do pH.

Baek e colaboradores (2006) demonstraram que, além de agir como indutor de alguns genes, RIM101p de *C. albicans* também pode agir como repressor de outros genes.

Davis e colaboradores (2002) demonstraram que o gene *MDS3* de *C. albicans* está envolvido na regulação de genes expressos em pH alcalino por meio de um mecanismo independente de RIM101p. Mutantes em *Mds3p* são deficientes na formação de hifas e na virulência. Richard e colaboradores (2005) demonstraram que esses mutantes também são deficientes na maturação do biofilme.

Diversos outros componentes da via RIM101 de *C. albicans* foram posteriormente identificados e, em 2009, Cornet e colaboradores demonstraram que mutantes *RIM9* e *RIM21* perdem a regulação por RIM101p e têm a formação de hifas em pH alcalino comprometida.

Nie e colaboradores (2010) apresentaram evidências de que a transição branco-opaco em mutantes *EFG1* de *C. albicans* seja regulada pelo pH do ambiente: em meio neutro, esses mutantes são opacos, mas se convertem em brancos após a acidificação. Assim, mutantes *EFG1* do tipo “a” foram capazes de acasalar com células α apenas em pH neutro.

Ainda em *C. albicans*, Yuan e colaboradores (2010) demonstraram, nos modelos de infecção de camundongos e de córneas *ex vivo*, que a via RIM101 é importante no desenvolvimento da queratite.

Tricophytum rubrum é um patógeno humano que infecta a pele e unhas. O gene *PacC* de *T. rubrum* foi clonado e sua disrupção resultou em diminuição da conidiação, da secreção de proteases queratinolíticas e na capacidade de crescer em unhas humanas como única fonte de nutrientes (Ferreira-Nozawa *et al.*, 2006).

Peres e colaboradores (2010) identificaram 339 genes de *T. rubrum* superexpressos em pH 5 e 169 superexpressos em condições alcalinas. Vários desses genes codificam proteínas necessárias à infecção e à sobrevivência no hospedeiro. Por meio de bibliotecas de hibridação subtrativa de *T. rubrum* crescido em pH 5 ou pH 8, Silveira e colaboradores (2010) também obtiveram sequências diferencialmente expressas. Dentre as superexpressas em pH ácido, 3,73% foram categorizadas no grupo de resgate celular, defesa e virulência; em pH alcalino, tais sequências atingiram 8,47%. Os genes envolvidos com a diferenciação do tipo

celular corresponderam a 0,8% dos superexpressos em pH ácido e a 2,12% daqueles superexpressos em ambiente alcalino.

Em *Wangiella dermatitidis*, um fungo polimórfico e patogênico a humanos, predominante na forma leveduriforme, variações de pH têm grande importância no polimorfismo e conseqüentemente na virulência. O desenvolvimento de *W. dermatitidis* acontece não somente nas formas de levedura e hifas, mas também na forma de células escleróticas. Quando cultivado em pH próximo ao neutro, adquire predominantemente o morfotipo levedura. Em pH ácido, a forma predominante é a esclerótica. Nesse fungo, o fator de transcrição PacC foi estudado e após clonagem, caracterização e mutação, verificou-se que PacC é importante não somente para o processo adaptativo a diferentes condições de pH do ambiente e condições de estresse em Na⁺, como também influencia a transição de levedura para hifa no processo infeccioso (Wang & Szaniszlo, 2009).

As informações acima indicam que a fonte de carbono e o pH extracelular podem ser cruciais à regulação da expressão de genes de fatores de virulência em fungos. Nesse sentido, o presente trabalho se propõe a investigar a possível influência dos reguladores CREA e PACC na expressão do gene *FKS* de *P. brasiliensis*.

II - OBJETIVOS

2 - OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

Investigar se os fatores de transcrição CreA e PacC podem estar envolvidos na regulação da expressão do gene *FKS1* de *P. brasiliensis* em suas duas formas distintas de crescimento: micélio e levedura.

2.2– Objetivos Específicos

- Identificar, na região regulatória do gene *FKS1*, a ocorrência de possíveis sítios de interação com os fatores de transcrição CreA e PacC.
- Desenhar sondas de oligonucleotídeos que permitam a avaliação funcional, por meio de ensaios de retardo de mobilidade eletroforética (EMSA), dos sítios de interação identificados.
- Avaliação funcional, por EMSA, dos sítios de interação para CreA e PacC presentes na região regulatória de *PbFKS1*, empregando-se proteínas recombinantes e extratos protéicos totais de células de micélio e de levedura, crescidas em meio de cultura tamponado em diferentes valores de pH.

III – MATERIAIS E MÉTODOS

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Linhagem Microbiológica

Paracoccidioides brasiliensis

Para obtenção de culturas de levedura e de micélio de *P. brasiliensis*, foi utilizado o estoque de levedura do isolado Pb01 disponível no Laboratório de Biologia Molecular da UnB. Foi feito um inóculo de leveduras na concentração final de 10^6 células/mL em meio YPD (pH:7,2) contendo 0,05 U/mL de penicilina e 20 µg/mL de neomicina, e a cultura foi crescida a 37°C sob agitação de 250 rpm, por uma semana. Para obtenção de micélio, o mesmo inóculo de leveduras foi realizado, mantendo-se a cultura a 24°C por uma semana para ocorrência da transição dimórfica, com um cultivo adicional de uma semana para o crescimento do micélio.

3.2 – Meios de Cultura – *Paracoccidioides brasiliensis*

Meio YPD

Extrato de levedura	1,0 % (p/v)
Peptona de Caseína	2,0 % (p/v)
Glicose	2,0 % (p/v)

O volume foi completado com H₂O destilada, e o pH ajustado para 7,2. A esterilização foi realizada em autoclave a 120°C, durante 15 minutos.

3.3 – Antibióticos

3.3.1 – Penicilina

Solução estoque: 500,0 U/mL em H₂O destilada estéril
Concentração final de uso: 0,05U/mL.

3.3.2 – Neomicina

Solução estoque: 200,0 mg/mL em H₂O destilada estéril

Concentração final de uso: 20,0 µg/mL.

As soluções de antibióticos foram esterilizadas por filtração utilizando membranas tipo *Millipore* 0,22 µm e estocadas em *freezer* a – 20° C e protegidas da luz.

3.4– Soluções e Soluções Tampão

3.4.1 – Solução para lavagem de células de levedura e micélio de *P. brasiliensis*

Tampão fosfato (PBS) 10X

NaCl	1,5 M
Na ₂ HPO ₄	0,1 M
NaN ₃	0,02%
O pH foi ajustado para 7,2	

3.4.2 – Soluções para Extração de Proteínas de *P. brasiliensis*

Tampão de Lise

HEPES pH 7,5	25,0 mM
KCL	50,0 mM
MgCl ₂	5,0 mM
EDTA	0,1 mM
Glicerina (v/v)	10,0 % (v/v)
DTT	0,5 mM
PMSF	1,0 mM
Pepstatina	1,0 µM
Leupeptina	0,6 µM

O DTT e os inibidores de protease PMSF, Pepstatina e Leupeptina foram adicionados no momento da utilização do tampão.

Tampão de Eluição do Extrato Protéico

HEPES pH 7,9	25,0 mM
KCl	50,0 mM
MgCl ₂	50,0 mM
EDTA	1,0 mM
DTT	1,0 mM

O DTT foi adicionado no momento da utilização do tampão.

Outros reagentes

(NH₄)₂SO₄ na concentração final de 0,4 M

(NH₄)₂SO₄ em pó

Glicerol na concentração final de 20%

3.4.3 – Soluções para Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Desnaturante - SDS-PAGE

Solução de Policrilamida 30% (p/v)

Diluiu-se em H₂O destilada acrilamida e bisacrilamida na proporção de 29:1, respectivamente. Misturou-se no escuro, filtrou-se em papel de filtro e armazenou-se em frasco âmbar coberto com papel alumínio em geladeira (4° C) por no máximo 30 dias.

Tampão de amostra (2X)

Tris-HCl pH 6,8	200,0 mM
SDS	4,0% (v/v)
β -mercaptoetanol	4,0% (v/v)
Glicerol	20,0% (v/v)
Azul de bromofenol	0,1% (p/v)

Foram preparadas alíquotas de 1 mL, estocadas a -20°C.

Tampão de corrida (5X) – pH: 8,3 – Uso 1X

Trizma Base	125,00 mM
Glicina	0,96 M
SDS	0,50 % (p/v)
H ₂ O destilada q.s.p.	1000,00 mL

Solução corante

Azul brilhante de Coomassie R-250	0,25 % (p/v)
Metanol	30,00 % (v/v)
Ácido acético glacial	7,00 % (v/v)

Diluiu-se em H₂O destilada e filtrou-se em papel de filtro.

Solução descorante

Metanol	30,0 % (v/v)
Ácido acético glacial	7,0 % (v/v)

3.4.4 – Soluções para o Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética (EMSA)

Solução de Poliacrilamida

Acrilamida e bisacrilamida foram diluídas em H₂O Milli Q na proporção de 30,0:0,36 (p/v), respectivamente, e a solução foi misturada no escuro, filtrada em papel de filtro para remoção de impurezas e armazenada em frasco âmbar coberto com papel alumínio em geladeira (4^o C) por no máximo 30 dias.

Solução de Alta Concentração de Sal para Purificação da Sonda

Trizma Base	0,06 g
EDTA	0,02 g
NaCl	4,30 g

O volume foi completado com H₂O destilada para 50,0 mL.

TEB 10X

Trizma Base	54,0 g
Ácido Bórico	27,5 g
EDTA	15,0 g

O volume foi completado com H₂O destilada para 500,0 mL, e ajustou-se o pH para 8.

3.5 – Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética para Análise da Região Promotora do Gene 1,3-β-glicana sintase de *P. brasiliensis*

3.5.1 – Extração de Proteínas de *P. brasiliensis*

As culturas de levedura e de micélio (item 3.6) foram centrifugadas a 3.000 g por 5 minutos, sendo o sobrenadante descartado. Seguiaram-se a duas lavagens com PBS 1X estéril e ressuspensão das células em 10 mL de meio YPD tamponado em diferentes valores de pH (5, 7 e 9), da seguinte maneira:

YPD - pH 5 tamponado com 50 mM de citrato de sódio

YPD - pH 7 tamponado com 20 mM de Tris-HCl

YPD - pH 9 tamponado com 20 mM de Tris-HCl

Os meios tiveram os valores de pH ajustados, sendo a esterilização realizada em autoclave a 120°C, durante 15 minutos.

As culturas de levedura e de micélio foram incubadas nos meios de diferentes valores de pH a 37 e 24°C, respectivamente, durante um período de 5 horas.

Decorrido o tempo de incubação as células foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. Seguiu-se maceração com nitrogênio líquido em gral e pistilo de porcelana; imediatamente após foram adicionados 4 mL de tampão de lise.

O material foi submetido a uma vigorosa agitação em tubo *Falcon* contendo pérolas de vidro a fim de otimizar a quebra da parede celular. Posteriormente, o material foi sonicado na potência de 70% com 2 pulsos de 59 segundos, com 3 repetições, mantendo-se a preparação sempre no gelo. Em seguida, adicionou-se $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para a concentração final de 0,4 M, e o material foi submetido a centrifugação a 25.000 g por 90 minutos, a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e adicionou-se $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para a concentração final de 0,405 g/mL, seguindo-se uma nova centrifugação a 7.600 g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 2 mL de tampão de eluição do extrato protéico. A coluna de dessalinização (PD 10 column Pharmacia Biotech) foi equilibrada com 25-30 mL de tampão de lise, tomando-se o cuidado de não deixar a coluna secar. Os 2 mL da preparação de extrato protéico foram então aplicados na coluna. O material foi eluído com 3,5 mL do tampão de lise, e as frações coletadas em tubo *ependorf* contendo glicerol na concentração final na ordem de 20%.

3.5.2 – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Desnaturante - SDS-PAGE

A análise de proteínas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE foi realizada conforme as condições descritas por Azevedo e colaboradores (2003). A preparação do gel de poliacrilamida foi realizada de acordo com o seguinte protocolo:

Reagentes

	Gel Separador 12%	Gel Concentrador 5%
H ₂ O destilada	3,96 mL	3,4 mL
Acrilamida/Bisacrilamida 30% (29:1)	4,8 mL	0,83 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	3,0 mL	-
Tris-HCl 1,0 M pH 6,8	-	0,63 mL
SDS 10%	120,0 µL	50,0µL
TEMED	4,8 µL	5,0 µL
APS 25%	48,0 µL	20,0 µL

A cuba de eletroforese (modelo Mini VE - GE Healthcare) foi montada com as placas de vidro, e seguiu-se a preparação do gel. Primeiramente foi realizada a polimerização do gel separador, preenchendo aproximadamente 2/3 da placa, e adicionou-se água destilada para linearizar o gel separador e retirar as bolhas. Após a polimerização, a água destilada foi descartada e o sistema foi seco com papel de filtro. Em seguida, foi realizada a polimerização do gel concentrador. Após a polimerização, a cuba foi preenchida com tampão de corrida 1X e os poços do gel foram lavados exaustivamente com o mesmo a fim de retirar resíduos de poli(acrilamida) não polimerizada. As amostras de proteínas foram fervidas em tampão de amostra 1X por 5 minutos, e aplicadas no gel. A eletroforese procedeu a 25 mA até que o azul de bromofenol, presente no tampão de amostra, começasse a sair da placa (aproximadamente 4 horas). Após a corrida eletroforética, o gel foi colocado em um recipiente de vidro com fundo plano, coberto com a solução corante e mantido sobre agitação durante uma noite. Posteriormente, o gel foi lavado com solução descorante, e mantido nessa solução sob agitação até que fosse possível a visualização das bandas protéicas (gel translúcido). A solução descorante foi trocada sempre que atingisse a saturação com o corante.

3.5.3 – Ensaio de Retardo de Mobilidade Eletroforética (EMSA)

Os 1255 pares de base imediatamente a montante do sítio de iniciação da tradução do gene de glicana sintase 1 de *P. brasiliensis* (*PbFKS1*) (GenBank AF148715) foram analisados quanto a presença de possíveis motivos CreA (5'-SYGGRG-3', em que S corresponde a C ou G; Y corresponde a uma pirimidina (C ou T) e R corresponde a uma purina (A ou G), que media a repressão transcricional em presença de glicose), e PacC (5'-GCCARG-3', onde R é uma purina A ou G), envolvido na regulação da expressão gênica pelo pH extracelular em fungos.

A partir da identificação desses sítios, foram sintetizados oligonucleotídeos marcados com carboxifluoresceína, empregados como sonda, assim como oligonucleotídeos não-marcados utilizados como competidores específicos e como versões mutadas das sondas.

Como uma tentativa de controle de ligação da proteína CREA, foi utilizada uma sonda correspondente a uma região do promotor do gene *pacC* de *Humicola*

grisea var. *thermoidea* que apresenta dois motivos contíguos para a ligação de CREA (Mello-de- Souza *et al.*, 2011).

A tabela 2 apresenta as sequências dos oligonucleotídeos sintéticos utilizados como sonda ou como competidores nos experimentos de EMSA.

Tabela 2. Sondas utilizadas em EMSA

Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de retardo da mobilidade eletroforética. Os oligonucleotídeos indicados por FAM foram marcados com o fluoróforo carboxifluoresceína. A posição no Promotor é em relação ao sítio de iniciação da tradução (ATG). As regiões referentes aos sítios de ligação a CreA e PacC, bem como os nucleotídeos mutados nos competidores mutados estão destacados em sublinhado.

Sonda	Oligonucleotídeo	Sequência (5' – 3')	Posição no Promotor
Sonda <i>Pbfs1</i> (I) (somente CreA)	<i>senso</i> FAM	TTGCATGCAGCC <u>ACCC</u> CAGCTGTATAGGGCCCA	
	<i>anti-senso</i>	TGGGCCCTATACAGCTGGGGTGGCTGCATGCAA	
Competidor específico	<i>senso</i>	TTGCATGCAGCC <u>ACCC</u> CAGCTGTATAGGGCCCA	- 1197 a - 1229 (<i>Pbfs1</i>)
	<i>anti-senso</i>	TGGGCCCTATACAGCTGGGGTGGCTGCATGCAA	
Competidor Mutado	<i>senso</i>	TTGCATGCAGCCAC <u>CA</u> AGCTGTATAGGGCCCA	
	<i>anti-senso</i>	TGGGCCCTATACAGCTTTGGTGGCTGCATGCAA	
Sonda <i>Pbfs1</i> (II) (somente PacC)	<i>senso</i> FAM	GGTCGTGAGAG <u>GCCA</u> AGCAGCCCTGAC	
	<i>anti-senso</i>	GTCAGGGCTGCTTGGCTCTCACGACC	
Competidor Específico	<i>senso</i>	GGTCGTGAGAG <u>GCCA</u> AGCAGCCCTGAC	- 799 a - 824 (<i>Pbfs1</i>)
	<i>anti-senso</i>	GTCAGGGCTGCTTGGCTCTCACGACC	
Competidor Mutado	<i>senso</i>	GGTCGTGAGAG <u>I</u> CTAGCAGCCCTGAC	
	<i>anti-senso</i>	GTCAGGGCTGCTAGACTCTCACGACC	
Sonda <i>Pbfs1</i> (III) (CreA + PacC)	<i>senso</i> FAM	CATTCTAAT <u>ACCGG</u> AGTGCCACG <u>CTTGGC</u> CAGATCATTTTG	
	<i>anti-senso</i>	CAAAATGATCTGCCAAGCGTGGCACTCCGGTATTAGAATG	
Competidor específico	<i>senso</i>	CATTCTAAT <u>ACCGG</u> AGTGCCACG <u>CTTGGC</u> CAGATCATTTTG	- 758 a - 797 (<i>Pbfs1</i>)
	<i>anti-senso</i>	CAAAATGATCTGCCAAGCGTGGCACTCCGGTATTAGAATG	
Competidor Mutado I (CreA)	<i>senso</i>	CATTCTAATAC <u>CA</u> AGTGCCACGCTTGGCAGATCATTTTG	
	<i>anti-senso</i>	CAAAATGATCTGCCAAGCGTGGCACTTTGGTATTAGAATG	
Competidor Mutado II (PacC)	<i>senso</i> FAM	CCCTCAG <u>CCCC</u> ACGCGTCTTGG <u>CCCC</u> ACGG <u>CCCC</u> GCACGCACA	- 173 a - 215 (<i>HgPacC</i>)
	<i>anti-senso</i>	GGGAGTCGGGGTGCGCAGAACCGGGGTGCCGGGGCGTGCCTGT	

* Mello-de- Souza *et al.*, 2011

O EMSA baseia-se no princípio de que fragmentos de DNA ou oligonucleotídeos complexados a proteínas têm migração eletroforética mais lenta do que fragmentos livres.

Neste trabalho, empregou-se oligonucleotídeos fluorescentes, que permitem a detecção de um sinal correspondente à sonda livre, de migração eletroforética mais rápida, assim como de complexos de interação DNA-proteína, que têm migração retardada.

A fim de verificar a especificidade de determinada interação, utilizou-se nas reações de EMSA, oligonucleotídeos apresentando a mesma sequência da sonda, porém não marcados com fluorescência. Caso a interação seja específica, na presença de excesso molar de competidores “frios”, esses competirão com os fatores protéicos pela ligação com a sonda marcada e o sinal correspondente ao complexo não será mais detectado.

Entretanto, o fato de uma interação DNA-proteína ser específica, não implica que ela esteja acontecendo no sítio de interesse. Para demonstrar isso, empregou-se oligonucleotídeos não-marcados apresentando mutações nos sítios de ligação de CreA ou de PacC. Quando os sinais fluorescentes correspondem à formação de um complexo que envolve especificamente esses sítios, os oligonucleotídeos mutados não serão capazes de promover a interação com as proteínas, assim não competirão com a sonda marcada e a intensidade do sinal permanecerá inalterada.

Se por outro lado, o sinal detectado não envolver os sítios de interesse, mas sim qualquer outra região da sonda, os oligonucleotídeos com mutações específicas nestes sítios, em excesso molar, atuarão como competidores específicos, quelando as proteínas de ligação, e desta forma impedem a visualização de um sinal correspondente à interação DNA-proteína.

Anelamento dos oligonucleotídeos

Sonda marcada com fluoresceína

O oligonucleotídeo *sense* marcado com fluorescência e o oligonucleotídeo *anti-sense* foram diluídos em H₂O Milli Q na concentração final de 1µg/µL. A reação de anelamento das sondas foi realizada de acordo com o seguinte protocolo:

Oligonucleotídeo <i>sense</i>	0,5 µL (0,5 µg)
Oligonucleotídeo <i>anti-sense</i>	0,5 µL (0,5 µg)
Tampão de Anelamento (Tris-HCl 1 M, pH 7,7)	6,0 µL
H ₂ O MilliQ	23,0 µL

Para os ensaios de competição específica ou com sondas mutadas, os oligonucleotídeos foram diluídos em H₂O Milli Q na concentração final de 5µg/µL. A reação de anelamento das sondas foi realizada de acordo com o seguinte protocolo:

Competidores 50 X

Oligonucleotídeo <i>sense</i>	5,0 µL (25,0 µg)
Oligonucleotídeo <i>anti-sense</i>	5,0 µL (25,0 µg)
Tampão de Anelamento (Tris-HCl 1M, pH 7,7)	6,0 µL
H ₂ O MilliQ	14,0 µL

As reações de anelamento foram incubadas em água fervente por cinco minutos e mantidas no banho até que a temperatura diminuísse naturalmente, atingindo a temperatura ambiente. As sondas foram posteriormente guardadas a -20°C.

Purificação da sonda marcada com fluoresceína

A purificação após anelamentoda sonda marcada foi realizada para remoção de contaminações com oligonucleotídeos de fita simples, autoanelados e produtos de degradação. As reações de oligonucleotídeos anelados foram divididas em 3 alíquotas, e aplicadas no gel de poliacrilamida 8%, conforme as condições descritas adiante para a eletroforese dos ensaios de retardo da mobilidade eletroforética. Aplicou-se azul de bromofenol em um poço para acompanhamento visual da corrida. A corrida eletroforética procedeu até que o azul de bromofenol migrasse por aproximadamente 2/3 do gel, para que houvesse uma melhor separação da sonda anelada dos resíduos de contaminação. Após a corrida, o gel foi marcado a cada 1 cm utilizando-se uma lâmina de bisturi e analisado em *scanner* Typhoon 9210 (Molecular Dynamics) de acordo com os seguintes parâmetros: filtro fluoresceína 526SP, intensidade de 1000 V, sensibilidade média, *pixel size* de 200 microns e

plano focal *plane*. Com auxílio das marcações previamente realizadas, a região correspondente à sonda anelada foi localizada, excisada do gel, transferida para um colchão de agarose 1%, e coberta com agarose fundida. Após a solidificação da agarose, foi feito um corte na agarose logo abaixo dos fragmentos de poliacrilamida e encaixou-se um fragmento de membrana DEAE celulose (Sartobind Membrane Adsorbers, Sartorius), utilizando-se agarose fundida para selar essa região perfurada. O gel foi coberto com TEB 0,5X. Para a migração da sonda da poliacrilamida para a membrana DEAE celulose, foi realizada uma eletroforese a 70 V por cerca de 90 minutos a fim de que todo o material da sonda migrasse para a membrana. Após a migração da sonda para a membrana, esta foi transferida para um tubo *ependorf* de 1,5 mL, submersa em 250 µL de solução de alta concentração de sal e incubada a 45°C durante 20 minutos. A solução contendo a sonda eluída foi transferida para novo tubo, repetindo-se a eluição com a mesma membrana e nova solução de alto sal. Os dois volumes foram agrupados e a sonda precipitada com 1 mL de etanol 100% gelado, com incubação a -20°C durante a noite. Seguiu-se uma centrifugação a 13.000 *g* por 30 minutos, lavagem com etanol 70% gelado e secagem ao ar. A sonda precipitada foi ressuspensa em 30 µL de H₂O Milli Q. Para confirmação da purificação da sonda, 1 µL foi aplicado em gel de poliacrilamida a 8%. Aplicou-se azul de bromofenol em um poço para acompanhamento visual da corrida. A eletroforese procedeu a 250 V até que o azul de bromofenol migrasse por aproximadamente 10 cm. Após a corrida eletroforética, o gel foi analisado no *scanner* Typhoon 9210 (Molecular Dynamics) de acordo com os seguintes parâmetros: filtro fluoresceína 526SP, intensidade de 1000 V, sensibilidade média, *pixel size* de 200 microns e plano focal *plane*.

Reações de EMSA

As reações foram realizadas de acordo com o seguinte protocolo:

		[Finais]
Sonda anelada e purificada	1,0 µL	1,5 pmol/ µL
KCl 1M	2,0 µL	200,0 mM
ZnCl ₂ 50µM	1,0 µL	5,0 µM
poli(dI-dC) 1µg/mL	1,0 µL	0,2 µg/ µL
Espermidina 80mM	1,0 µL	8,0 mM
H ₂ O Milli Q	4,0 µL	-

Para reações utilizando competidores específicos ou sondas mutadas, seguiu-se o mesmo protocolo, adicionando-se 0,5 µL, 1,0 µL, 2,0 µL e 3,0 µL do competidor 50X a fim de se realizar reações em que a concentração final de competidor fosse 25X, 50X, 100X e 150X respectivamente, ajustando-se o volume de H₂O Milli Q. Foram adicionados à mistura de reação o extrato protéico ou proteína recombinante, ajustando-se o valor final da reação para 20 µL. As reações foram incubadas no gelo durante 15 minutos, sendo posteriormente aplicadas no gel de poliacrilamida 8% para a corrida eletroforética, conforme as condições descritas a seguir. Para os ensaios com extrato protéico, foram utilizados 2,0 µg de proteína. Além dos extratos protéicos de micélio e levedura de *P. brasiliensis* em diferentes pHs, foram também realizados experimentos empregando a proteína recombinante PacCPb-GST, correspondente ao domínio de ligação ao DNA da proteína PacC de *P. brasiliensis* fusionado à GST, assim como a proteína recombinante CreAHg-GST, correspondente ao domínio de ligação ao DNA da proteína CreA de *H. grisea* fusionado à GST.

Ambas as proteínas recombinantes foram gentilmente cedidas por Thiago de Mello, membro do nosso grupo de pesquisa (Mello-de-Souza *et al.*, 2011)

Corrida Eletroforética

A preparação do gel nativo de poliacrilamida a 8% para os ensaios de retardo da mobilidade eletroforética foi realizada de acordo com o seguinte protocolo:

		[Final]
Poliacrilamida 30,36%	15,00 mL	5,87%
Glicerina 50%	15,00 mL	9,67%
TEB 10X	2,25 mL	0,29X
H ₂ O destilada	45,00 mL	-
Persulfato de amônio 25%	200,00 µL	0,06%
TEMED	50,00 µL	-

Para montagem do gel e corrida eletroforética empregou-se o sistema *SE 600 Electroforesis Unit* (Amershan Biosciences). Após a polimerização do gel, a cuba foi preenchida com TEB 0,25X, e os poços do gel foram lavados exaustivamente a fim de retirar resíduos de poliacrilamida não polimerizada. De modo evitar o super aquecimento e a desnaturação das amostras durante a corrida, o sistema foi resfriado com auxílio de uma coluna de água fria, com dispositivo apropriado conectando uma fonte de água com a cuba de eletroforese. Após uma pré-corrída de 15 minutos a 250 V, as reações foram aplicadas no gel, utilizando-se apenas azul de bromofenol em um dos poços para o acompanhamento visual da corrida. A eletroforese procedeu a 250V até que o azul de bromofenol migrasse por aproximadamente 10 cm (cerca de 1h). Após a corrida eletroforética, o gel foi analisado no *scanner* Typhoon 9210 (Molecular Dynamics) de acordo com os seguintes parâmetros: filtro: fluoresceína 526SP, intensidade de 1000 V, sensibilidade: alta, *pixel size* de 200 microns e plano focal *plane*.

IV- RESULTADOS

4 - RESULTADOS

4.1 – Busca de possíveis motivos de interação DNA-proteína na Região Promotora do Gene 1,3- β -glicana sintase de *P. brasiliensis*

A análise da seqüência promotora do gene *PbFKS1* (número de acesso no GenBank AF148715) foi realizada visando a busca de sítios de interação para os fatores de transcrição CreA, que reprime a expressão de alguns genes na presença de glicose, e para o fator de transcrição PacC, que regula a expressão gênica em resposta ao pH extracelular em fungos. A análise da região promotora do gene *Pbfks1* anteriormente realizada por Daniella Moraes, integrante de nosso grupo de pesquisa, demonstrou também a presença de sítios para os fatores de transcrição FacB, elementos de resposta ao estresse (STRE) e elementos de resposta ao choque térmico (HSE) (Moraes, 2009). A busca pelos sítios CreA e PacC em particular foi motivada pelo interesse de nosso grupo de pesquisa nesses dois mecanismos regulatórios (Poças-Fonseca *et al.* 2008; Benoliel *et al.* 2010; Mello-de-Souza *et al.* 2011). Na figura 2 aparecem, em destaque os sítios de CreA, em amarelo, e PacC, em vermelho. Os retângulos indicam as sequências da região promotora que serão utilizadas como sondas em nossos experimentos.


```

-1235 GTCGGGTTGCAATGCAGCCACCCAGCTGTATAGGGCCCAGCCACGGCAGAAAACATCGGCATACCTGTTTAA
-1163 TTTACCTGAAAAGTTACGTACTCGGGAAATACCTGGAATACCTGTGAATAATACCTCCGTGCCTGAGCCCAT
-1091 TATTGGCTGATCTGTCAATCCCTTACTTGGTATAATGTTCTGTCTGGTTGTCTTGTGTAIGTCAGTTTTG
-1019 TTGCAGATGTTCTTTTTTTTCACTTCCCGCGTCCCTCTCTCTTCTCCTCCCTCCTCTTTCGCCTTCGCTGCG
-947 ACCACCAACTTTATTTTATTTATGTTTCTTGACCACACTCTCTTTTTGTCTTCCTTTCGGTTTGTGCTCT
-875 CTCCCTCTCTCTCTGTTTACCTTCTCACTCGTTCAACGGGTAACCAGGAGGGTCGTGAGASCCAAGCAGCC
-803 CTGACTCATTCTAATAACCGGAGTGCCACGCTTGGCAGATCATTITGCTGTGCCCGCCTCCTGTCGTTGCTGT
-731 TGCTGCTGCGACCGTACCTTCTCGTCTGAGGCCTGCACTATTGGCTGCGTAACCACAACTTCACTCGTTTC
-659 ACAACAAATAATAATATCGAAAGGGGATACAAACGTCTTCTTCTTTCGTCCTTCTTGTTTATCCTTCTTCTC
-587 CTCCCTCCTCCTCCTCCTCCCTCCCAATCCCGTATCTTGTGCTGCATCTTTGCATCATCAATCGCTTG
-515 TTAGGTCCCACCCCCTGGAAACCGTTGTCCCTTTTACCTGGCGTGTGACCACCCACCCCTTCTCCTCCAT
-443 CACTCTCTCGAATCGGTTTCGACCGTCAACTCTCTCTTATCCGGTTTCCAATTACGAGCTACACCTCTCTCC
-371 TATATAGCCCGTCGAAGGAAGAAGAGAAATAAAAGCAGGAAATCCTGCGGGTCTCATCTTTGTGTTGCGTTG
-299 CGTTGCTCTTGCTGTTTGCTTTGCTTCGCTGGCTTTGTTACTTTCGTTGACAAATCGATTTTGCGAGTACAC
-227 CACGACCGTTAACTACCAGGAATATCTTCTTTTGCTTTTCTGTCGACGGATTTTCTTGCTTTTGACAT
-155 CAGAGTAAATGGGTATGATAATATTATAACGTAAGCTTCTTCTTGCTTGGGAGGGATTCGATTAGCTGATT
-83 GCGTGGTTGGAAATCAAATGGCTGACCAAGTTGCATCTATTGCGCCCTACAGTCGAGAAATTTGAATTG
-11 TCCGTTTAACCATG

```

Figura 2. Seqüência nucleotídica da região promotora do gene *PbFKS1*.

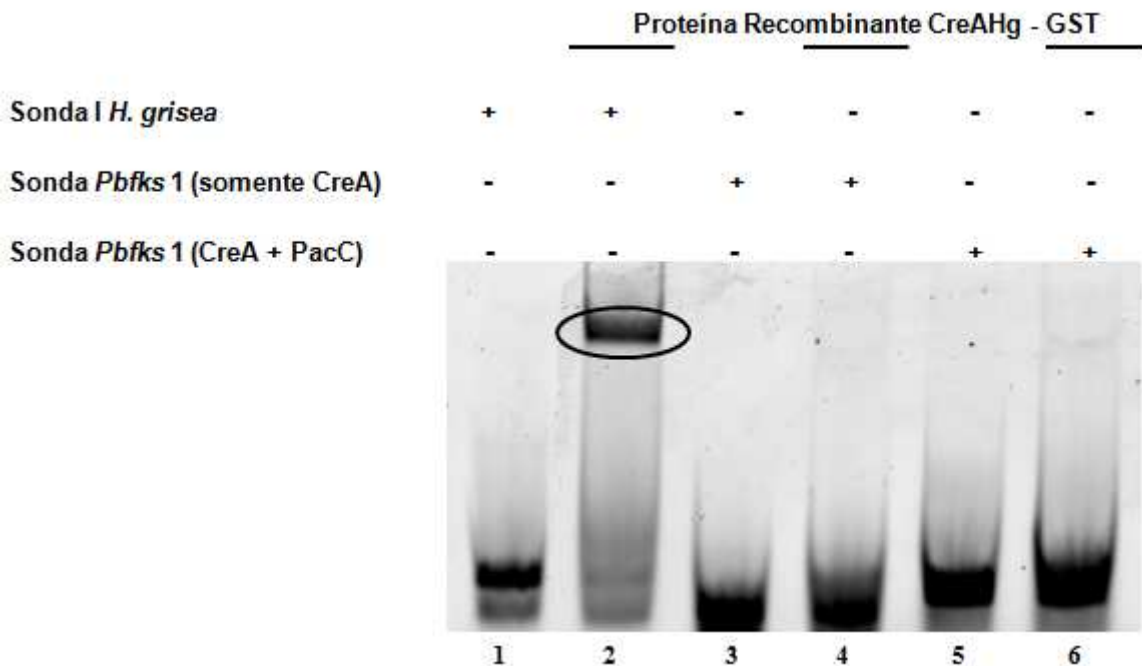
Número de acesso no GenBank AF148715. O sítio de iniciação da tradução está em negrito. Foram destacadas as seqüências consenso dos sítios de ligação para os fatores de transcrição CreA, em amarelo e PacC, em vermelho. Destacadas por um retângulo as regiões utilizadas como sondas nos experimentos de retardo de mobilidade eletroforética.

4.2 – Experimento de Retardo de Mobilidade Eletroforética. Empregando a proteína recombinante CreAHg–GST

Após o desenho das três sondas, assim como dos competidores específicos e mutados realizamos ensaios de retardo de mobilidade eletroforética (EMSA).

Inicialmente foram realizados ensaios com as duas sondas que apresentam sítios para CreA, sonda *Pbfks1(I)* (somente CreA) e sonda *Pbfks1(III)* (CreA + PacC). Empregou-se a proteína recombinante CreAHg –GST que apresenta o domínio de ligação do fator CreA de *H. grisea* fusionado a GST a fim de investigar se o fator de transcrição CreA poderia reconhecer os motivos presentes no promotor de *PbFKS1* (Figura 3). Como controle positivo de ligação utilizou-se a sonda I *H. grisea*, descrita em materiais e métodos, e que apresenta um retardo de mobilidade eletroforética quando incubada com proteína CreAHg –GST conforme descrito por Mello-de-Souza e colaboradores (2011).

A



B

Sonda I *H. grisea* : CCCTCAGCCCCACGCGTCTTGGCCCCACGGCCCCGCACGCACA

Sonda - *Pbfks1*(I): TTGCATGCAGCCCCCCAGCTGTATAGGGCCCA

Sonda - *PbFks1*(III): CATTCTAATACCGGAGTGCCACGCTTGGCAGATCATTTTG

Figura 3: Ensaio de Retardo de Mobilidade Eletroforética (EMSA) utilizando a sonda I *H. grisea*, sonda *Pbfks1*(I) e sonda *Pbfks1*(III) incubadas com proteína recombinante CreAHg-GST.

(A) 1: Sonda I *H. grisea* livre; 2: Sonda I *H. grisea* + proteína recombinante CreAHg - GST; 3: Sonda *Pbfks1*(I) livre; 4: Sonda *Pbfks1*(I) + proteína recombinante CreAHg - GST; 5: Sonda *Pbfks1*(III) livre e 6: Sonda *Pbfks1*(III) + proteína recombinante CreAHg - GST. **(B)** Seqüências das sondas I *H. grisea*, *Pbfks1*(I) e *Pbfks1*(III) respectivamente, destacando-se em sublinhado os sítios de ligação para CreA.

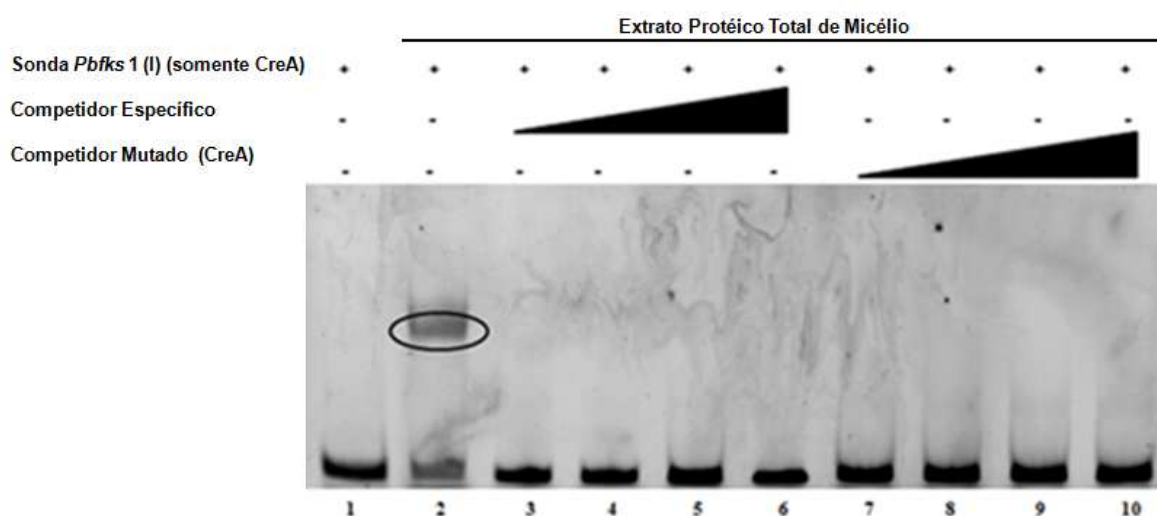
A figura 3 demonstra que a proteína rCreA-GST interagiu com o(s) motivo(s) presentes na sonda de *H. grisea*, levando a um retardo de mobilidade eletroforética (poço 2). No entanto, não houve interação com os motivos presentes no promotor de *PbFKS1* (sonda I: poço 4, sonda III: poço 6).

4.3 - Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética (EMSA) empregando a sonda *Pfks1(l)* (somente CreA) e extratos protéicos de *P. brasiliensis*

4.3.1 – Sonda *Pbfks1(l)* + Extrato protéico total de micélio

Neste ensaio avaliou-se se proteínas presentes no extrato protéico total de micélio de *P. brasiliensis* poderiam interagir com a sonda *Pbfks1(l)* (Figura 4).

A



B

Sonda – *Pbfks1(l)*: TTGCATGCAGCCACCCCCAGCTGTATAGGGCCCA

Competidor Mutado (CreA): TTGCATGCAGCCACCCAAAGCTGTATAGGGCCCA

Figura 4: EMSA utilizando a sonda *Pbfks1(l)* incubada com extrato protéico total de micélio de *P. brasiliensis*

(A) 1: Sonda *Pbfks1(l)* livre; 2: Sonda *Pbfks1(l)* + extrato de micélio; 3, 4, 5 e 6: Sonda *Pbfks1(l)* + extrato de micélio + competidor específico 25X, 50X, 100X e 150X, respectivamente; 7, 8, 9 e 10: Sonda *Pbfks1(l)* + extrato de micélio + competidor Mutado (CreA) 25X, 50X, 100X e 150X, respectivamente. **(B)** Seqüência da sonda *Pbfks1(l)*, destacando em sublinhado o sítio para CreA. Na sonda *Pbfks1(l)* mutada, os sítios modificados encontram-se em duplo sublinhado.

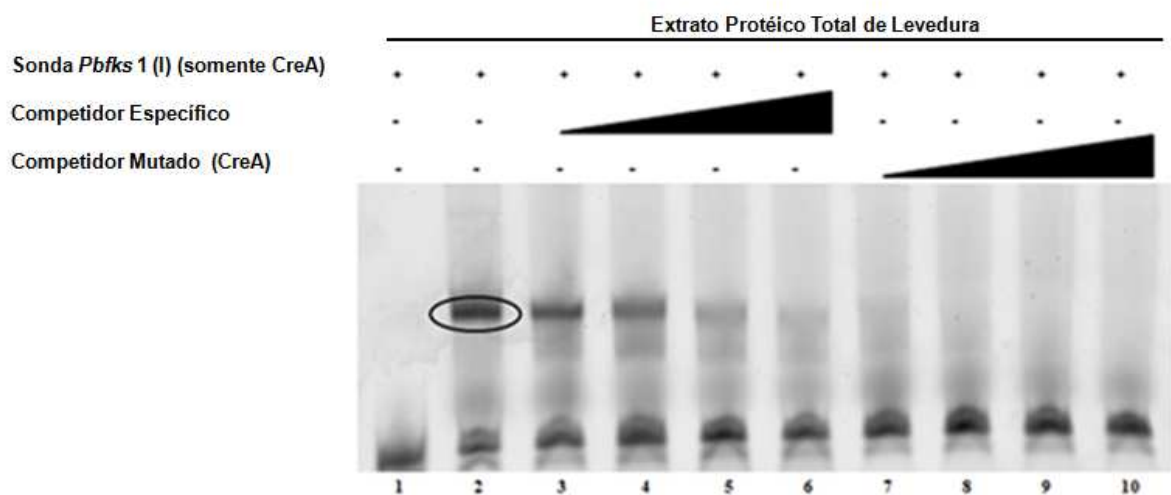
A sonda *Pbfks1(l)*, contendo o motivo CreA apresenta um retardo de mobilidade eletroforética quando incubada com extrato de micélio (poço 2), e verificamos que essa interação é específica visto que na presença de concentrações crescentes do competidor (mesma seqüência da sonda, mas sem marcação fluorescente) esse complexo não é mais detectado (poços 3, 4, 5 e 6). No ensaio

com competidores mutados (poços 7, 8, 9 e 10), também não se observou interação DNA-proteína, sugerindo que a interação apesar de específica, não ocorre no sítio para CreA: caso envolvesse o sítio CreA, as versões mutadas da sonda não teriam sido capazes de interferir na detecção da interação DNA-proteína.

4.3.2 – Sonda *Pbfks1(I)* + Extrato protéico total de levedura

Neste ensaio, investigou-se se proteínas presentes no extrato protéico total de levedura de *P. brasiliensis* interagiriam com a sonda *Pbfks1(I)*, conforme demonstrado na figura 5.

A



B

Sonda – *Pbfks1(I)*: TTGCATGCAGCCACCCCCAGCTGTATAGGGCCCA

Competidor Mutado (CreA): TTGCATGCAGCCACCCAAAGCTGTATAGGGCCCA

Figura 5: EMSA utilizando a sonda *Pbfks1(I)* incubada com extrato protéico total de levedura de *P. brasiliensis*.

(A) 1: Sonda *Pbfks1(I)* livre; 2: Sonda *Pbfks1(I)* + extrato de levedura; 3, 4, 5 e 6: Sonda *Pbfks1(I)* + extrato de levedura + competidor específico 25X, 50X, 100X e 150X, respectivamente; 7, 8, 9 e 10: Sonda *Pbfks1(I)* + extrato de levedura + competidor Mutado (CreA) 25X, 50X, 100X e 150X, respectivamente. **(B)** Seqüência da sonda *Pbfks1(I)*, destacando em sublinhado o sítio para CreA. Na sonda *Pbfks1(I)* mutada, os nucleotídeos modificados encontram-se em duplo sublinhado.

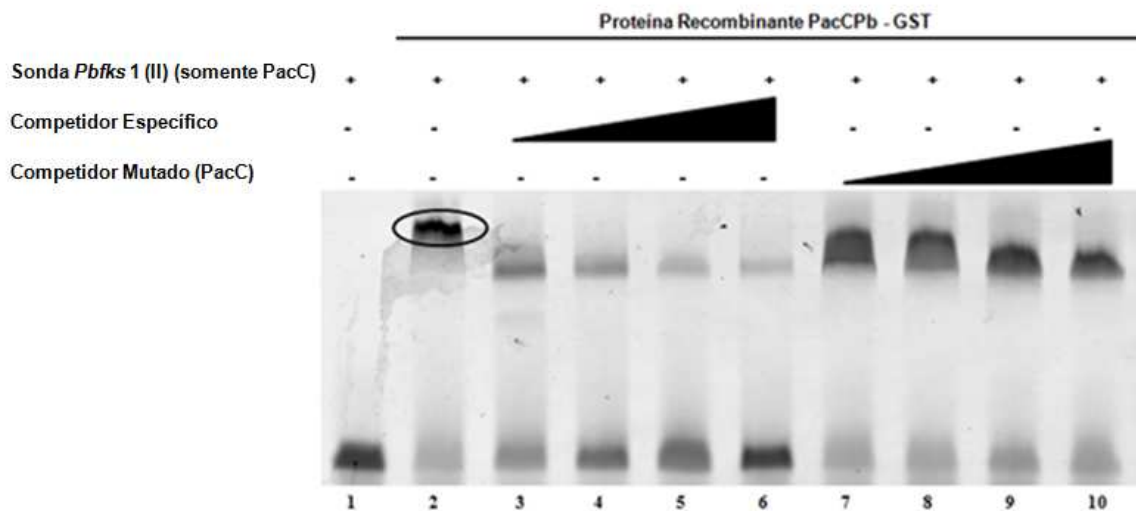
A sonda *Pbfks1(I)* apresenta um retardo de mobilidade eletroforética quando incubada com extrato protéico de levedura de *P. brasiliensis* (poço 2). Ao se realizar o ensaio com competidores específicos em concentrações crescentes (poços 3, 4, 5 e 6), a intensidade do sinal de interação diminui à medida em que se aumenta a quantidade de competidor, demonstrando se tratar de uma interação do tipo específica. No ensaio com os competidores mutados (poços 7, 8, 9 e 10), também é perdido o sinal de interação entre a sonda e o extrato protéico, o que permite inferir que a interação não acontece de fato no sítio de CreA.

4.4 - Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética (EMSA): sonda *Pfks1(II)* (somente PacC):

4.4.1 – Sonda *Pbfks1(II)* + Proteína recombinante PacC de *P. brasiliensis* (rPacCPb-GST)

Neste ensaio, avaliou-se se a proteína recombinante apresentando os domínios em dedo de zinco do fator transcricional PacC de *P. brasiliensis*, fusionados a GST (rPacC-GST) reconheceria o sítio específico presente na sonda *Pbfks1*.

A



B

Sonda - *PbFks*1(II): GGTCGTGAGAGCCAAGCAGCCCTGAC

Competidor Mutado (PacC): GGTCGTGAGAGICTAGCAGCCCTGAC

Figura 6: EMSA utilizando a sonda *Pbfks*1 (II) incubada com proteína recombinante PacCPb-GST

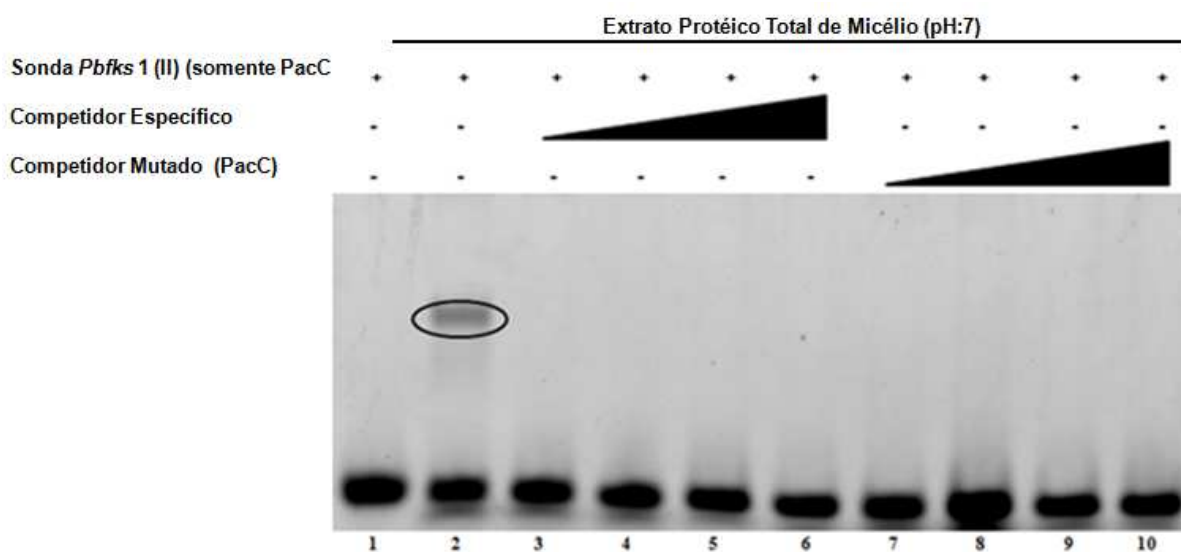
(A) 1: Sonda *Pbfks*1(II) livre; 2: Sonda *Pbfks*1(II) + rPacCPb-GST; 3, 4, 5 e 6: Sonda *Pbfks*1(II) + rPacCPb-GST + competidor específico 25X, 50X, 100X e 150X, respectivamente; 7, 8, 9 e 10: Sonda *Pbfks*1(II) + rPacCPb-GST + competidor Mutado (PacC) 25X, 50X, 100X e 150X, respectivamente. **(B)** Seqüência da sonda *Pbfks*1(II), destacando em sublinhado o sítio para PacC. Na sonda *Pbfks*1(II) mutada, os nucleotídeos modificados encontram-se em duplo sublinhado.

Na figura 6, evidenciou-se um retardo da mobilidade eletroforética quando a sonda *Pbfks*1(II) incubada com proteína recombinante (poço 2), e verificamos que essa interação é específica visto que na presença de concentrações crescentes do competidor, o sinal fluorescente que evidencia esse complexo é reduzido (poços 3, 4, 5 e 6). O ensaio realizado com competidores mutados (poços 7, 8, 9 e 10) indica que a interação de fato envolve o sítio de PacC, uma vez que a mutação impede a competição e a visualização do complexo é mantida.

4.4.2 – Sonda *Pbfks1*(II) + Extrato protéico total de micélio (pH:7)

A sonda *Pbfks1*(II) foi em seguida avaliada quanto a interação com proteínas presentes no extrato total de micélio de *P. brasiliensis* crescido em condições neutras (pH:7) (Figura 7).

A



B

Sonda - *PbFks1*(II): GGTCGTGAGAGCCAAGCAGCCCTGAC

Competidor Mutado (PacC): GGTCGTGAGAGICTIAGCAGCCCTGAC

Figura 7: EMSA utilizando a sonda *Pbfks1* (II) incubada com extrato protéico total de micélio de *P. brasiliensis* (pH:7)

(A) 1: Sonda *Pbfks1*(II) livre; 2: Sonda *Pbfks1*(II) + extrato de micélio de *Pb*; 3, 4, 5 e 6: Sonda *Pbfks1*(II) + extrato de micélio de *Pb* + competidor específico 25X, 50X, 100X e 150X, respectivamente; 7, 8, 9 e 10: Sonda *Pbfks1*(II) + extrato de micélio de *Pb* + competidor Mutado (PacC) 25X, 50X, 100X e 150X, respectivamente. (B) Seqüência da sonda *Pbfks1*(II), destacando em sublinhado o sítio para PacC. Na sonda *Pbfks1*(II) mutada, os nucleotídeos modificados encontram-se em duplo sublinhado.

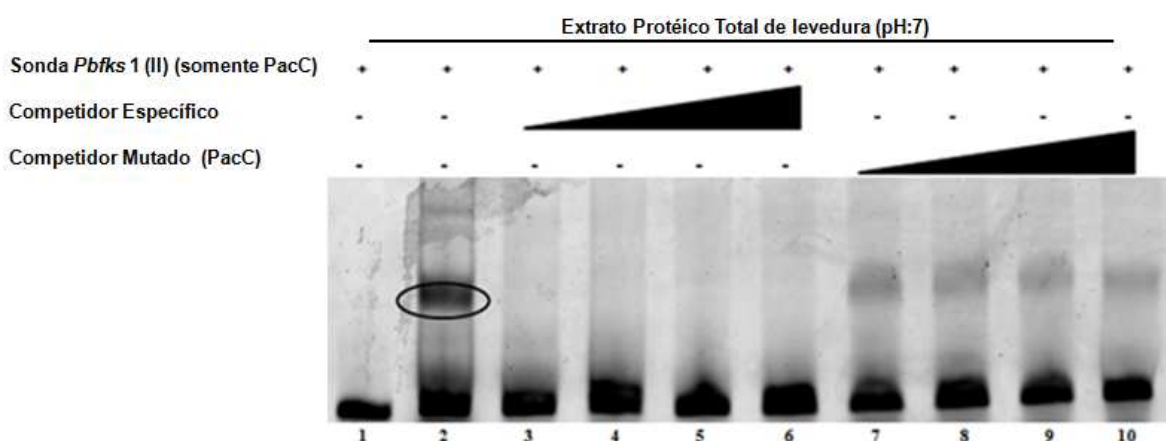
A sonda *Pbfks1*(II) apresenta um retardo de mobilidade eletroforética quando incubada com extrato protéico de micélio de *P. brasiliensis* (poço 2). Ao se realizar o ensaio com competidores específicos em concentrações crescentes (poços 3, 4, 5 e 6) esta interação é abolida, indicando ser específica. No entanto, o ensaio com

competidores mutados (poços 7, 8, 9 e 10) mostra que a interação não acontece no motivo PacC.

4.4.3 – Sonda *Pbfks1*(II) + Extrato protéico total de levedura (pH:7)

Neste ensaio investigou-se se a sonda apresentando um sítio para o fator de transcrição PacC (Sonda *Pbfks1*(II) (somente PacC)), poderia ser reconhecida pelas proteínas presentes no extrato total de levedura de *P. brasiliensis* crescido em condições neutras (pH:7) (figura 8).

A



B

Sonda - *PbFks1*(II): GGTCGTGAGAGCCAAGCAGCCCTGAC

Competidor Mutado (PacC): GGTCGTGAGAGICTAGCAGCCCTGAC

Figura 8: EMSA utilizando a sonda *Pbfks1* (II) incubada com extrato protéico total de levedura de *P. brasiliensis* (pH:7).

(A) 1: Sonda *Pbfks1*(II) livre; 2: Sonda *Pbfks1*(II) + extrato de levedura de Pb; 3, 4, 5 e 6: Sonda *Pbfks1*(II) + extrato de levedura de Pb + competidor específico 25X, 50X, 100X e 150X, respectivamente; 7, 8, 9 e 10: Sonda *Pbfks1*(II) + extrato de levedura de Pb + competidor Mutado (PacC) 25X, 50X, 100X e 150X, respectivamente. **(B)** Seqüência da sonda *Pbfks1*(II), destacando em sublinhado o sítio para PacC. Na sonda *Pbfks1*(II) mutada, os nucleotídeos modificados encontram-se em duplo sublinhado.

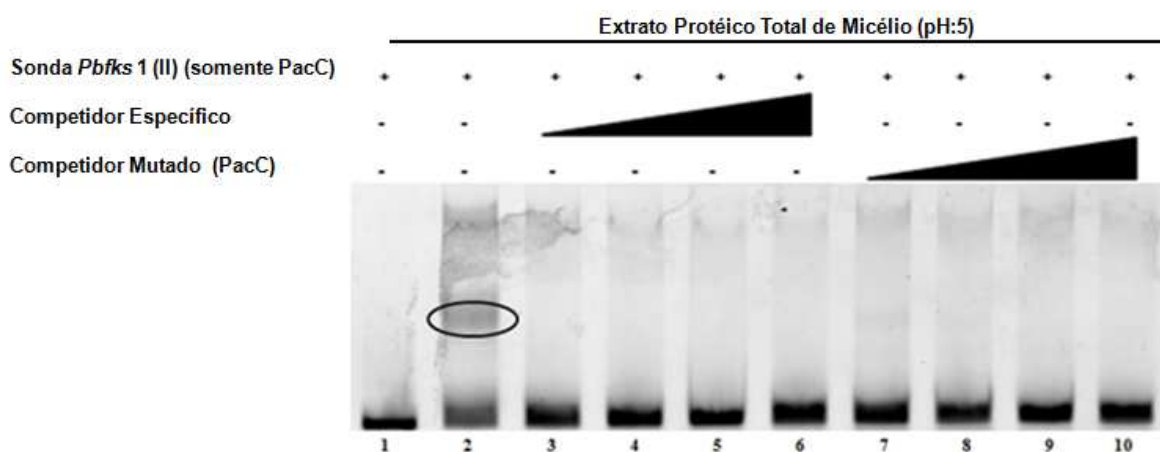
Ao se incubar a sonda *Pbfks1*(II) com extrato protéico de levedura de *P. brasiliensis* crescido em condições neutras (pH:7) (Figura 8), observamos a formação de um sinal de retardo (poço 2). Ao se realizar o ensaio com competidores específicos em concentrações crescentes (poços 3, 4, 5 e 6) esta interação não é mais evidenciada, indicando especificidade. Já nos ensaios com os competidores mutados (poços 7, 8, 9 e 10), podemos observar que o retardo se mantém mesmo em concentrações cada vez maiores de competidor. Este resultado nos permite inferir que a interação DNA-proteína está acontecendo de fato no sítio de PacC.

Foram realizados em seguida experimentos com extratos de micélio e levedura do fungo *P. brasiliensis* crescidos em condições ácidas (pH: 5) e alcalinas (pH: 9).

4.4.4 – Sonda *Pbfks1*(II) + Extrato protéico de micélio (pH:5)

Neste experimento, avaliou-se se a sonda contendo um sítio para o fator de transcrição PacC, Sonda *Pbfks1*(II), apresenta alguma interação com o extrato protéico de micélio de *P. brasiliensis* crescido em condições ácidas (pH:5) (figura 9).

A



B

Sonda - *PbFks1*(II): GGTCGTGAGAGCCAAGCAGCCCTGAC

Competidor Mutado (PacC): GGTCGTGAGAGICTAGCAGCCCTGAC

Figura 9: EMSA utilizando a sonda *Pbfks1* (II) e extrato protéico total de micélio de *P. brasiliensis* (pH:5)

(A) 1: Sonda *Pbfks1*(II) livre; 2: Sonda *Pbfks1*(II) + extrato de micélio de Pb; 3, 4, 5 e 6: Sonda *Pbfks1*(II) + extrato de micélio de Pb + competidor específico 25X, 50X, 100X e 150X, respectivamente; 7, 8, 9 e 10: Sonda *Pbfks1*(II) + extrato de micélio de Pb + competidor Mutado (PacC) 25X, 50X, 100X e 150X, respectivamente. (B) Seqüência da sonda *Pbfks1*(II), destacando em sublinhado o sítio para PacC. Na sonda *Pbfks1*(II) mutada, os nucleotídeos modificados encontram-se em duplo sublinhado.

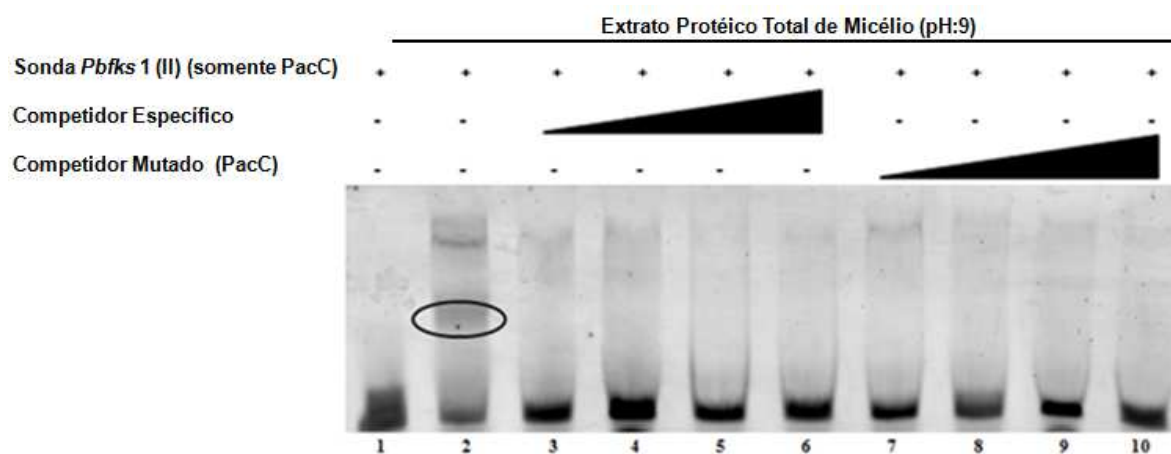
Ao se incubar a sonda *Pbfks1*(II) com extrato protéico de micélio de *P. brasiliensis* crescido em condições ácidas (pH:5), observamos a formação de um *shift* (poço 2), demonstrando que as proteínas do extrato reconhecem alguma seqüência presentes na sonda. Ao se realizar o ensaio com competidores específicos em concentrações crescentes (poços 3, 4, 5 e 6) esta interação não é mais detectada. O mesmo é observado no ensaio com os competidores mutados

(poços 7, 8, 9 e 10), o que nos permite inferir que a interação não envolve o motivo PacC.

Detectou-se também a formação de complexos de maior massa molecular, de intensidade de sinal mais fraca. Tais complexos são de ocorrência relativamente comum em ensaios com extratos protéicos totais.

4.4.5 – Sonda *Pbfks1*(II) + Extrato protéico de micélio (pH:9)

A



B

Sonda - *Pbfks1*(II): GGTCGTGAGAGGCCAAGCAGCCCTGAC

Competidor Mutado (PacC): GGTCGTGAGAGICTAGCAGCCCTGAC

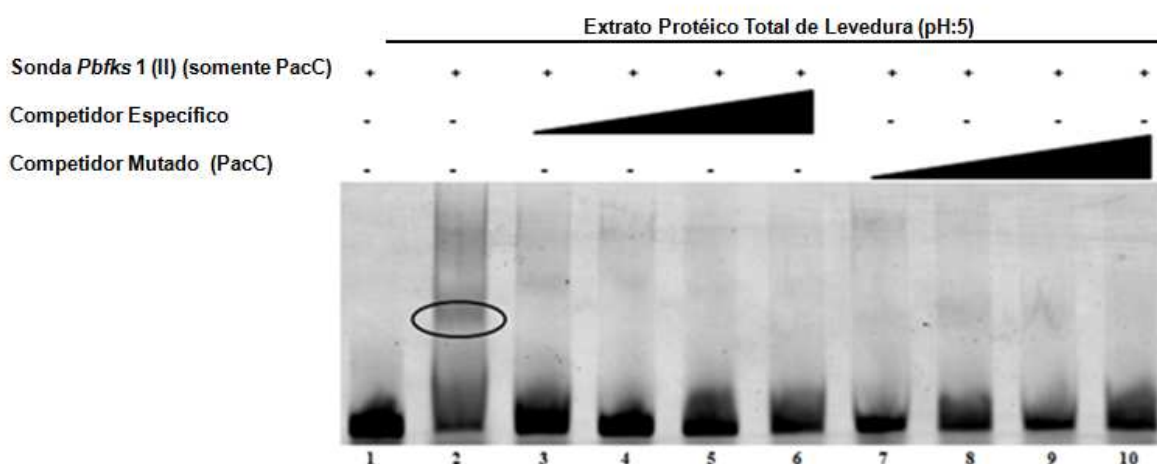
Figura 10: EMSA utilizando a sonda *Pbfks1* (II) incubada com extrato protéico total de micélio de *P. brasiliensis* (pH:9)

(A) 1: Sonda *Pbfks1*(II) livre; 2: Sonda *Pbfks1*(II) + extrato de micélio de Pb; 3, 4, 5 e 6: Sonda *Pbfks1*(II) + extrato de micélio de Pb + competidor específico 25X, 50X, 100X e 150X, respectivamente; 7, 8, 9 e 10: Sonda *Pbfks1*(II) + extrato de micélio de Pb + competidor Mutado (PacC) 25X, 50X, 100X e 150X, respectivamente. **(B)** Seqüência da sonda *Pbfks1*(II), destacando em sublinhado o sítio para PacC. Na sonda *Pbfks1*(II) mutada, os nucleotídeos modificados encontram-se em duplo sublinhado.

Da mesma forma que no ensaio anterior, a sonda *Pbfks1(II)* quando incubada com extrato protéico de micélio de *P. brasiliensis* crescido em condições alcalinas (pH:9) apresenta um retardo de mobilidade eletroforética (poço 2), demonstrando que algum componente do extrato protéico reconhece uma região da sonda. No entanto, ao se realizar o ensaio com competidores específicos em concentrações crescentes (poços 3, 4, 5 e 6) a detecção da interação não mais ocorre. O mesmo é observado no ensaio com os competidores mutados (poços 7, 8, 9 e 10), o que nos permite inferir que a interação não acontece no motivo.

4.4.6 – Sonda *Pbfks1(II)* + Extrato protéico de levedura (pH:5)

A



B

Sonda - *PbFks1(II)*: GGTCGTGAGAGCCAAGCAGCCCTGAC

Competidor Mutado (PacC): GGTCGTGAGAGICTAGCAGCCCTGAC

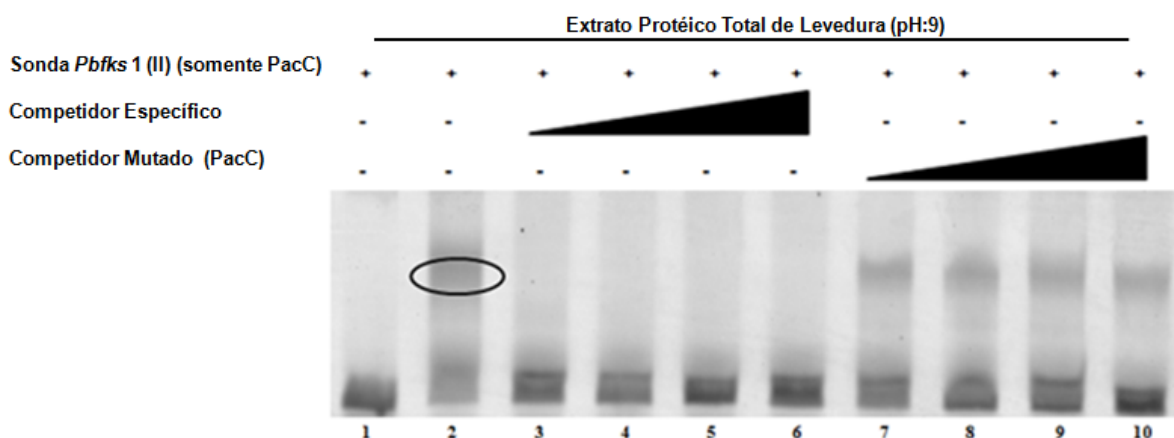
Figura 11: EMSA utilizando a sonda *Pbfks1(II)* incubada com extrato protéico total de levedura de *P. brasiliensis* (pH:5)

(A) 1: Sonda *Pbfks1(II)* livre; 2: Sonda *Pbfks1(II)* + extrato de levedura de Pb; 3, 4, 5 e 6: Sonda *Pbfks1(II)* + extrato de levedura de Pb + competidor específico 25X, 50X, 100X e 150X, respectivamente; 7, 8, 9 e 10: Sonda *Pbfks1(II)* + extrato de levedura de Pb + competidor Mutado (PacC) 25X, 50X, 100X e 150X, respectivamente. **(B)** Seqüência da sonda *Pbfks1(II)*, destacando em sublinhado o sítio para PacC. Na sonda *Pbfks1(II)* mutada, os nucleotídeos modificados encontram-se em duplo sublinhado.

A sonda *Pbfks1(II)* apresenta um retardo da mobilidade eletroforética quando incubada com extrato protéico de levedura de *P. brasiliensis* crescido em condições ácidas (Figura 11, poço 2), e verificamos que essa interação é específica visto que na presença de concentrações crescentes do competidor específico a detecção desse complexo com a sonda marcada com fluorescência é reduzida (poços 3, 4, 5 e 6). O ensaio realizado com competidores mutados (poços 7, 8, 9 e 10) sugere que a interação não envolve o sítio PacC, uma vez que a mutação não impede a competição e o sinal referente à formação do complexo é perdido.

4.4.7 – Sonda *Pbfks1(II)* + Extrato protéico de levedura (pH:9)

A



B

Sonda - *PbFks1(II)*: GGTCGTGAGAGCCAAGCAGCCCTGAC

Competidor Mutado (PacC): GGTCGTGAGAGTCTAGCAGCCCTGAC

Figura 12: EMSA utilizando a sonda *Pbfks1(II)* incubada com extrato protéico total de levedura de *P. brasiliensis* (pH:9)

(A) 1: Sonda *Pbfks1(II)* livre; 2: Sonda *Pbfks1(II)* + extrato de levedura de Pb; 3, 4, 5 e 6: Sonda *Pbfks1(II)* + extrato de levedura de Pb + competidor específico 25X, 50X, 100X e 150X, respectivamente; 7, 8, 9 e 10: Sonda *Pbfks1(II)* + extrato de levedura de Pb + competidor Mutado (PacC) 25X, 50X, 100X e 150X, respectivamente. **(B)** Seqüência da sonda *Pbfks1(II)*, destacando em sublinhado o sítio para PacC. Na sonda *Pbfks1(II)* mutada, os nucleotídeos modificados encontram-se em duplo sublinhado.

A sonda *Pbfks1*(II) apresenta um retardo eletroforético quando incubada com extrato protéico de levedura de *P. brasiliensis* crescido em condições alcalinas (Figura 12, poço 2), e verificamos que essa interação é específica visto que na presença de concentrações crescentes do competidor específico a detecção desse complexo com a sonda marcada com fluorescência é reduzida (poços 3, 4, 5 e 6). O ensaio realizado com competidores mutados (poços 7, 8, 9 e 10) demonstra que a interação está acontecendo no sítio específico para PacC, uma vez que a mutação impede a competição e a detecção do complexo é mantida.

4.5 - Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética (EMSA): sonda *Pfks1*(III) (CreA + PacC):

A figura 13 mostra a sequência da região promotora do gene 1,3- β -glicana sintase de *P. brasiliensis* correspondente à sonda *Pbfks1*(III) (CreA + PacC), que apresenta um sítio de ligação para CreA e um sítio para o fator de transcrição PacC.

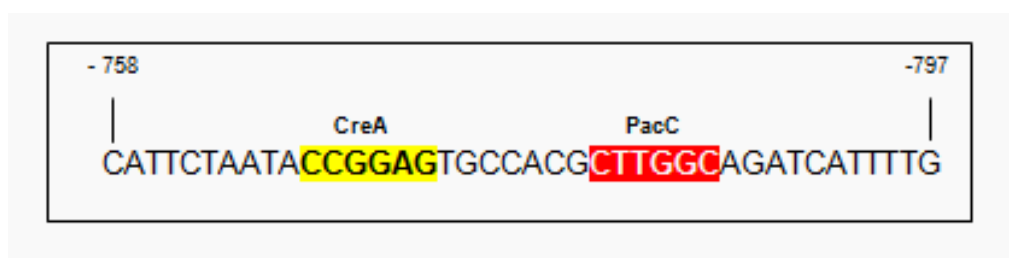


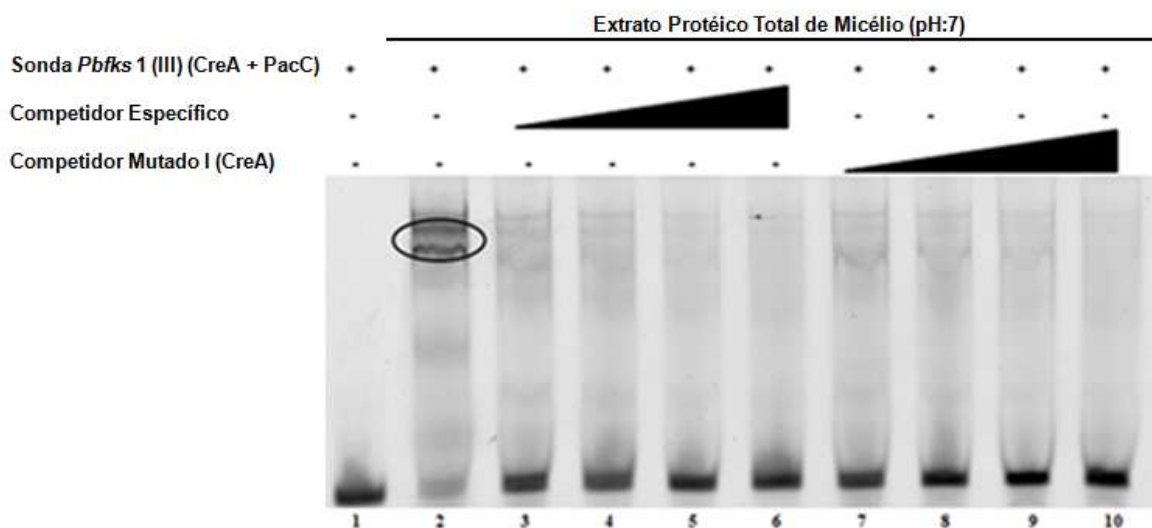
Figura 13. Sonda *Pbfks1*(III) (CreA + PacC)

Seqüência do oligonucleotídeo *senso* utilizado como sonda em EMSA. Em amarelo destaca-se o sítio CreA e em vermelho o sítio para PacC.

Nos primeiros ensaios com a sonda *Pbfks1*(III) (CreA + PacC) utilizou-se extrato de micélio e levedura de *P. brasiliensis*. Nesses ensaios o sítio para a ligação CreA foi mutado.

4.5.1 – Sonda *Pbfks1*(III) + Extrato protéico total de micélio de *P. brasiliensis* (pH:7) – Competidor Mutado I (CreA)

A



B

Sonda - *PbFks1*(III): CATTCTAATACCCGGAGTGCCACG**CTTGGC**CAGATCATTTTG

Competidor Mutado I (CreA): CATTCTAATACCAAAGTGCCACGCTTGGCAGATCATTTTG

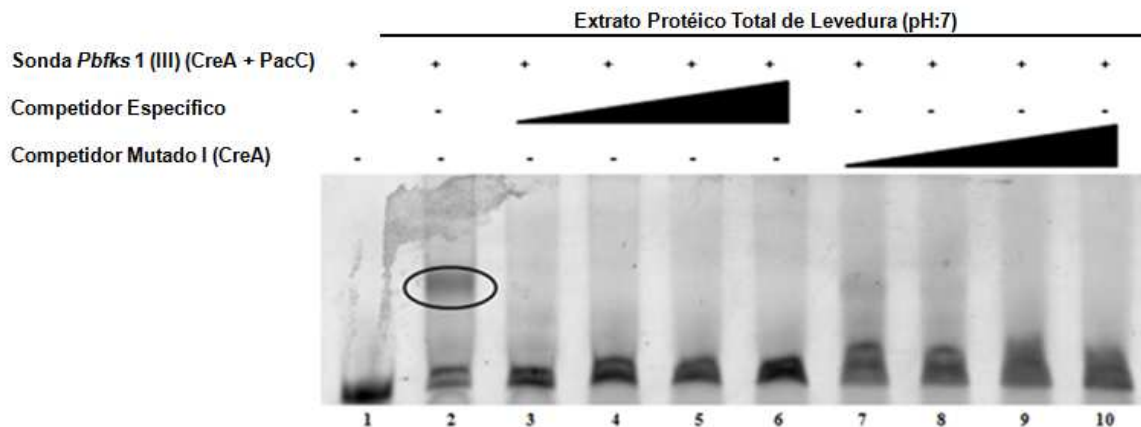
Figura 14: EMSA utilizando a sonda *Pbfks1* (III) incubada com extrato protéico total de micélio

(A) 1: Sonda *Pbfks1*(III) livre; 2: Sonda *Pbfks1*(III) + extrato de micélio de Pb; 3, 4, 5 e 6: Sonda *Pbfks1*(III) + extrato de micélio de Pb + competidor específico 25X, 50X, 100X e 150X, respectivamente; 7, 8, 9 e 10: Sonda *Pbfks1*(III) + extrato de micélio de Pb + competidor Mutado I (CreA) 25X, 50X, 100X e 150X, respectivamente. (B) Seqüência da sonda *Pbfks1*(III), destacando em sublinhado o sítio para CreA e em negrito o sítio para PacC. Na sonda *Pbfks1*(III) mutada, os nucleotídeos modificados encontram-se em duplo sublinhado e a mutação acontece apenas no sítio de CreA.

A sonda *Pbfks1*(III) apresenta um retardo da mobilidade eletroforética quando incubada com extrato protéico de micélio de *P. brasiliensis* pH:7 (Figura 14, poço 2), Verificou-se que essa interação é específica visto que na presença de concentrações crescentes do competidor específico a detecção desse complexo com a sonda marcada com fluorescência foi impossibilitada (poços 3, 4, 5 e 6). O ensaio realizado com competidor mutado no sítio para CreA (poços 7, 8, 9 e 10) sugere que a interação não acontece nesse sítio, uma vez que a mutação não impede a competição e a visualização do complexo não mais é possível.

4.5.2 – Sonda *Pbfks1(III)* + Extrato protéico total de levedura de *P. brasiliensis* (pH:7) – Competidor Mutado I (CreA)

A



B

Sonda - *PbFks1(III)*: CATTCTAATACCCGGAGTGCCACG**CTTGGC**CAGATCATTTTG

Competidor Mutado I (CreA): CATTCTAATACCCAAAGTGCCACG**CTTGGC**CAGATCATTTTG

Figura 15: EMSA utilizando a sonda *Pbfks1(III)* incubada com extrato protéico total de levedura

(A) 1: Sonda *Pbfks1(III)* livre; 2: Sonda *Pbfks1(III)* + extrato de levedura de *Pb*; 3, 4, 5 e 6: Sonda *Pbfks1(III)* + extrato de levedura de *Pb* + competidor específico 25X, 50X, 100X e 150X, respectivamente; 7, 8, 9 e 10: Sonda *Pbfks1(III)* + extrato de levedura de *Pb* + competidor Mutado I (CreA) 25X, 50X, 100X e 150X, respectivamente. **(B)** Seqüência da sonda *Pbfks1(III)*, destacando em sublinhado o sítio para CreA e em negrito o sítio para PacC. Na sonda *Pbfks1(III)* mutada, os nucleotídeos modificados encontram-se em duplo sublinhado e a mutação acontece apenas no sítio de CreA.

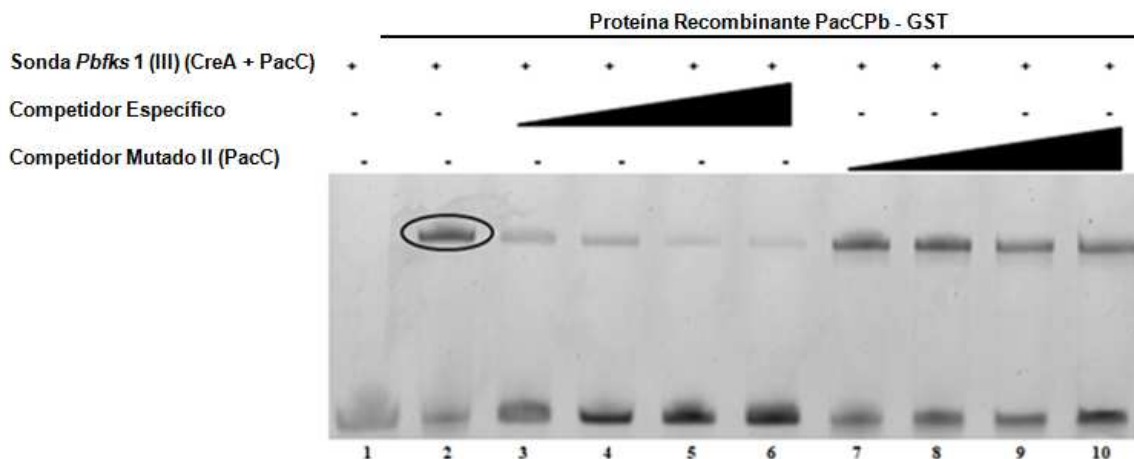
A figura 15, demonstra que a sonda *Pbfks1(III)* apresenta um retardo da mobilidade eletroforética quando incubada com extrato protéico de levedura de *P. brasiliensis* (pH:7) (poço 2). Essa interação é específica, uma vez que concentrações crescentes do competidor específico (poços 3, 4, 5 e 6) provocam a abolição do sinal correspondente ao complexo DNA - proteína. O ensaio realizado com competidores mutados para o sítio de CreA (poços 7, 8, 9 e 10) sugere que a

interação não acontece nesse sítio, uma vez que a mutação não impede a competição.

Após a realização dos ensaios com competidores mutados no sítio de CreA, realizaram-se ensaios utilizando competidores mutados no sítio de reconhecimento para PacC. Como PacC regula a expressão gênica em resposta ao pH extracelular, os ensaios foram realizados com extratos de micélio e levedura crescidos em diferentes valores de pH. Também foram feitos ensaios com a proteína recombinante que apresenta o domínio de ligação ao DNA da proteína PacC de *P. brasiliensis* fusionada à GST.

4.5.3 – Sonda *Pbfks1*(III) + Proteína recombinante PacC de *P. brasiliensis* (rPacCPb-GST) - Competidor Mutado II (PacC)

A



B

Sonda - *PbFks1*(III): CATTCTAATACCGGAGTGCCACG**CTTGGC**CAGATCATTTTG

Competidor Mutado II (PacC): CATTCTAATACCGGAGTGCCACGCTAGACAGATCATTTTG

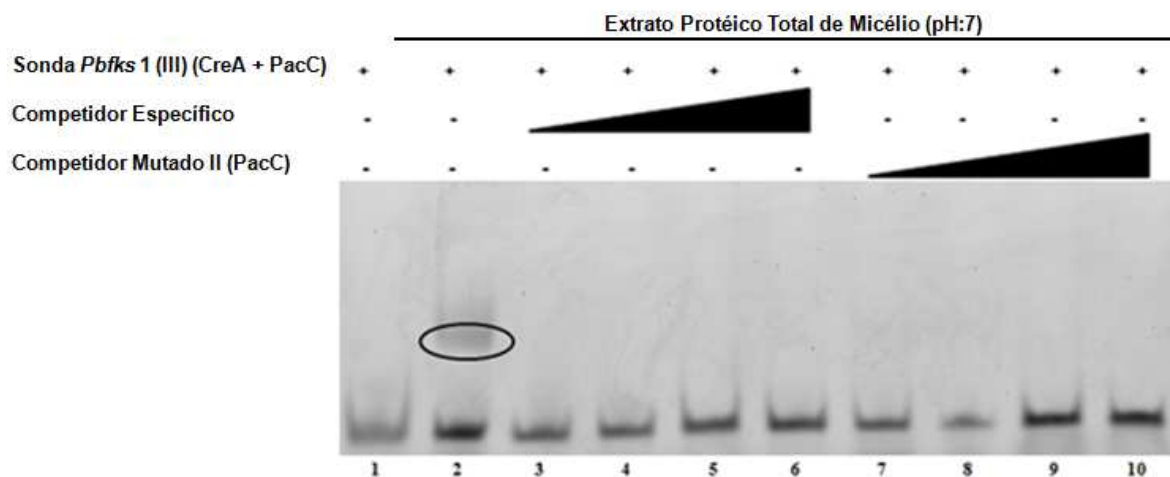
Figura 16: EMSA utilizando a sonda *Pbfks1* (III) incubada com proteína recombinante PacCPb-GST

(A) 1: Sonda *Pbfks1*(III) livre; 2: Sonda *Pbfks1*(III) + rPacCPb-GST; 3, 4, 5 e 6: Sonda *Pbfks1*(III) + rPacCPb-GST + competidor específico 25X, 50X, 100X e 150X, respectivamente; 7, 8, 9 e 10: Sonda *Pbfks1*(III) + rPacCPb-GST + competidor Mutado II (PacC) 25X, 50X, 100X e 150X, respectivamente. (B) Sequência da sonda *Pbfks1*(III), destacando em sublinhado o sítio para CreA e em negrito o sítio para PacC. Na sonda *Pbfks1*(III) mutada, os nucleotídeos modificados encontram-se em duplo sublinhado e a mutação acontece apenas no sítio de PacC.

A sonda *Pbfks1*(III) apresenta um retardo da mobilidade eletroforética quando incubada com proteína PacCPb-GST (Figura 17, poço 2). Essa interação é específica visto que na presença de concentrações crescentes do competidor específico, a intensidade de sinal correspondente à formação desse complexo é reduzida (poços 3, 4, 5 e 6). O ensaio realizado com competidor mutado no sítio para PacC (poços 7, 8, 9 e 10) demonstra que a interação que está acontecendo de fato envolve o sítio de reconhecimento para PacC, uma vez que a mutação impede a competição e a intensidade do sinal é mantida.

4.5.4 – Sonda *Pbfks1*(III) + Extrato protéico total de micélio *P. brasiliensis* (pH:7) - Competidor Mutado II (PacC)

A



B

Sonda - *Pbfks1*(III): CATTCTAATACCGGAGTGCCACG**CTTGGC**AGATCATTTTG

Competidor Mutado (PacC): CATTCTAATACCGGAGTGCCACGCTAGACAGATCATTTTG

Figura 17: EMSA utilizando a sonda *Pbfks1* (III) incubada com extrato protéico total de micélio de *P. brasiliensis* (pH: 7)

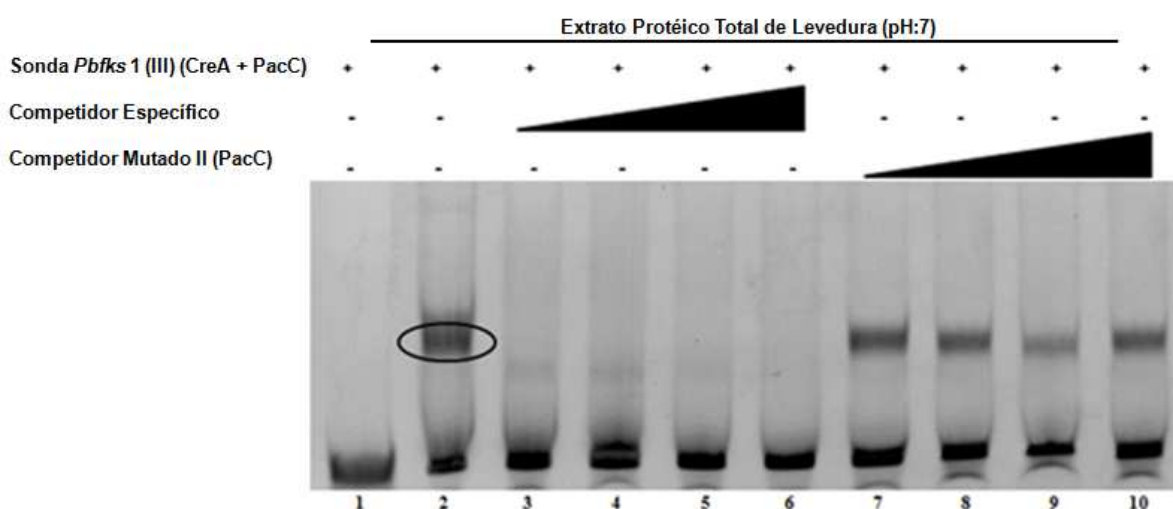
(A) 1: Sonda *Pbfks1*(III) livre; 2: Sonda *Pbfks1*(III) + extrato de micélio de Pb; 3, 4, 5 e 6: Sonda *Pbfks1*(III) + extrato de micélio de Pb + competidor específico 25X, 50X, 100X e 150X, respectivamente; 7, 8, 9 e 10: Sonda *Pbfks1*(III) + extrato de micélio de Pb + competidor Mutado II (PacC) 25X, 50X, 100X e 150X, respectivamente. (B) Seqüência da sonda *Pbfks1*(III), destacando em sublinhado o sítio para CreA e em negrito o sítio para PacC. Na sonda *Pbfks1*(III) mutada, os nucleotídeos modificados encontram-se em duplo sublinhado e a mutação acontece apenas no sítio de PacC.

A sonda *Pbfks1*(III) apresenta um retardo da mobilidade eletroforética quando incubada com extrato protéico de micélio de *P. brasiliensis* crescido em condições neutras (pH:7) (Figura 17, poço 2) Tal interação é específica visto que na presença de concentrações crescentes do competidor específico a detecção desse complexo com a sonda marcada com fluorescência é abolida (poços 3, 4, 5 e 6). O ensaio realizado com competidores mutados (poços 7, 8, 9 e 10) indica que a interação não está acontecendo no motivo PacC, uma vez que o oligonucleotídeo mutado compete com a sonda marcada, impossibilitando a detecção do complexo.

4.5.5 – Sonda *Pbfks1*(III) + Extrato protéico total de levedura *P. brasiliensis* (pH:7) - Competidor Mutado II (PacC)

Em seguida, o experimento foi realizado com extrato protéico total da fase leveduriforme de *P. brasiliensis* cultivado em pH neutro.

A



B

Sonda - *Pbfks1*(III): CATTCTAATACCGGAGTGCCACG**CTTGGC**AGATCATTTTG

Competidor Mutada (PacC): CATTCTAATACCGGAGTGCCACG**CTAGAC**AGATCATTTTG

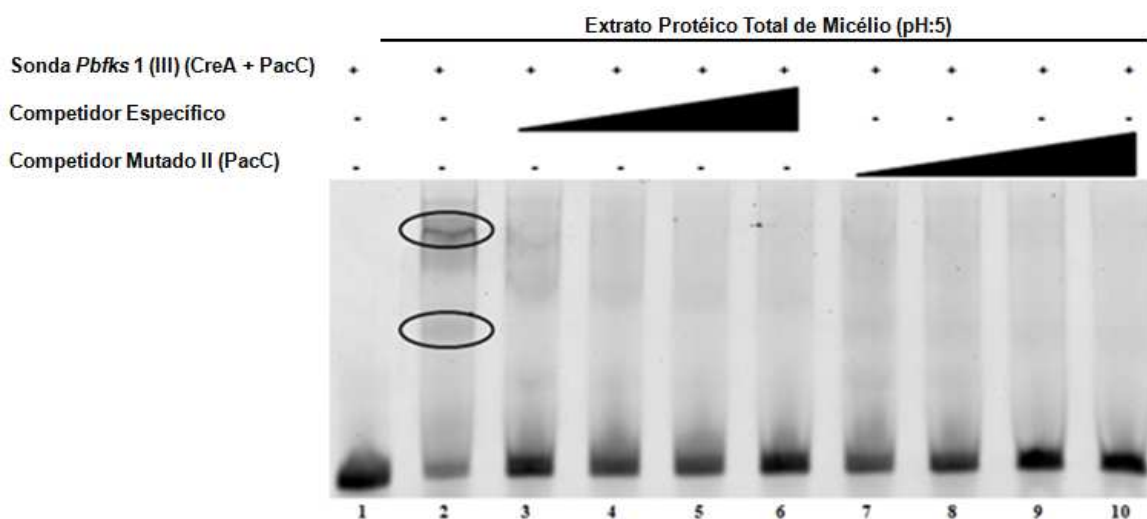
Figura 18: EMSA utilizando a sonda *Pbfks1* (III) incubada com extrato protéico de levedura de *P. brasiliensis* (pH: 7)

(A) 1: Sonda *Pbfks1*(III) livre; 2: Sonda *Pbfks1*(III) + extrato de levedura de Pb; 3, 4, 5 e 6: Sonda *Pbfks1*(III) + extrato de levedura de Pb + competidor específico 25X, 50X, 100X e 150X, respectivamente; 7, 8, 9 e 10: Sonda *Pbfks1*(III) + extrato de levedura de Pb + competidor Mutado II (PacC) 25X, 50X, 100X e 150X, respectivamente. **(B)** Seqüência da sonda *Pbfks1*(III), destacando em sublinhado o sítio para CreA e em negrito o sítio para PacC. Na sonda *Pbfks1*(III) mutada, os nucleotídeos modificados encontram-se em duplo sublinhado e a mutação acontece apenas no sítio de PacC.

Na figura 18, observa-se que a sonda *Pbfks1(III)* apresenta um retardo da mobilidade eletroforética quando incubada com extrato protéico de levedura de *P. brasiliensis* crescido em condições neutras (pH:7) (poço 2). A interação é específica visto que na presença de concentrações crescentes do competidor específico o sinal correspondente a esse complexo é perdido (poços 3, 4, 5 e 6). O ensaio realizado com competidores mutados (poços 7, 8, 9 e 10) indica que a interação está acontecendo no motivo PacC, uma vez que a mutação impede a competição e a detecção do complexo é mantida.

4.5.6 – Sonda *Pbfks1*(III) + Extrato protéico total de micélio de *P. brasiliensis* (pH:5) - Competidor Mutado II (PacC)

A



B

Sonda - *Pbfks1*(III): CATTCTAATACCCGGAGTGCCACG**CTTGGC**AGATCATTTTG

Competidor Mutado (PacC): CATTCTAATACCCGGAGTGCCACG**CTAGAC**AGATCATTTTG

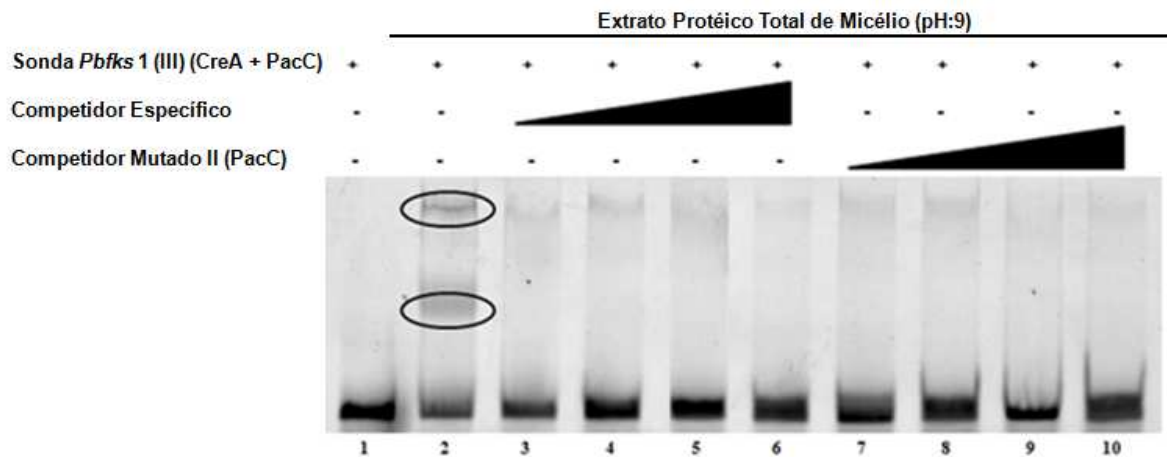
Figura 19: EMSA utilizando a sonda *Pbfks1* (III) incubada com extrato protéico de micélio de *P. brasiliensis* (pH: 5)

(A) 1: Sonda *Pbfks1*(III) livre; 2: Sonda *Pbfks1*(III) + extrato de micélio de Pb; 3, 4, 5 e 6: Sonda *Pbfks1*(III) + extrato de micélio de Pb + competidor específico 25X, 50X, 100X e 150X, respectivamente; 7, 8, 9 e 10: Sonda *Pbfks1*(III) + extrato de micélio de Pb + competidor Mutado II (PacC) 25X, 50X, 100X e 150X, respectivamente. (B) Seqüência da sonda *Pbfks1*(III), destacando em sublinhado o sítio para CreA e em negrito o sítio para PacC. Na sonda *Pbfks1*(III) mutada, os nucleotídeos modificados encontram-se em duplo sublinhado e a mutação acontece apenas no sítio de PacC.

A sonda *Pbfks1*(III) apresenta dois sinais de retardo bem definidos da mobilidade eletroforética quando incubada com extrato protéico de micélio de *P. brasiliensis* crescido em condições ácidas (pH:5) (Figura 19, poço 2).Essas interações são específicas visto que na presença de concentrações crescentes do competidor específico o sinal diminui de intensidade ou desaparece (poços 3, 4, 5 e 6). O mesmo acontece com o ensaio realizado com os competidores mutados (poços 7, 8, 9 e 10) o que nos permite inferir que as interações DNA – proteína não estão relacionados ao motivo PacC.

4.5.7 – Sonda *Pbfks1*(III) + Extrato protéico total de micélio de *P. brasiliensis* (pH:9) - Competidor Mutado II (PacC)

A



B

Sonda - *Pbfks1*(III): CATTCTAATAACGGAGTGCCACG**CTTGGC**AGATCATTTTG

Competidor Mutado (PacC): CATTCTAATAACGGAGTGCCACG**CTAGAC**AGATCATTTTG

Figura 20: EMSA utilizando a sonda *Pbfks1* (III) incubada com extrato protéico de micélio de *P. brasiliensis* (pH: 9)

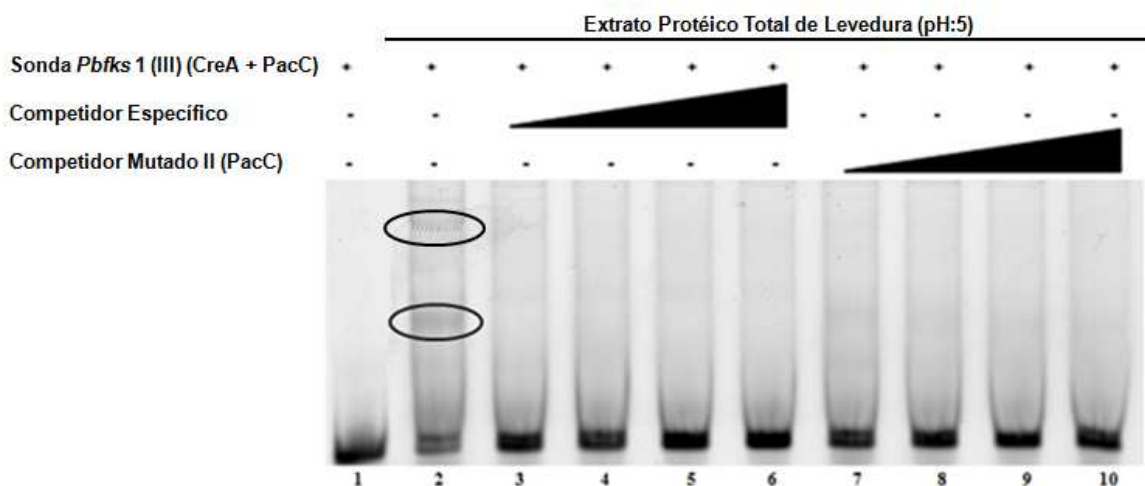
(A) 1: Sonda *Pbfks1*(III) livre; 2: Sonda *Pbfks1*(III) + extrato de micélio de Pb; 3, 4, 5 e 6: Sonda *Pbfks1*(III) + extrato de micélio de Pb + competidor específico 25X, 50X, 100X e 150X, respectivamente; 7, 8, 9 e 10: Sonda *Pbfks1*(III) + extrato de micélio de Pb + competidor Mutado II (PacC) 25X, 50X, 100X e 150X, respectivamente. **(B)** Seqüência da sonda *Pbfks1*(III), destacando em sublinhado o sítio para CreA e em negrito o sítio para PacC. Na sonda *Pbfks1*(III) mutada, os nucleotídeos modificados encontram-se em duplo sublinhado e a mutação acontece apenas no sítio de PacC.

A figura 20 demonstra que o mesmo resultado apresentado para o extrato miceliano em pH ácido (Figura 19) foi verificado para o pH alcalino.

4.5.8 – Sonda *Pbfks1*(III) + Extrato protéico total de levedura *P. brasiliensis* (pH:5) - Competidor Mutado II (PacC)

Os ensaios foram então realizados com a sonda *Pbfks1*(III) incubada com extratos protéicos da forma de levedura de *P. brasiliensis*, dessa vez cultivada em pH ácido e alcalino.

A



B

Sonda - *Pbfks1*(III): CATTCTAATAACGGAGTGCCACG**CTTGGC**AGATCATTTTG

Competidor Mutado (PacC): CATTCTAATAACGGAGTGCCACG**CTAGAC**AGATCATTTTG

Figura 21: EMSA utilizando a sonda *Pbfks1* (III) incubada com extrato protéico de levedura de *P. brasiliensis* (pH: 5)

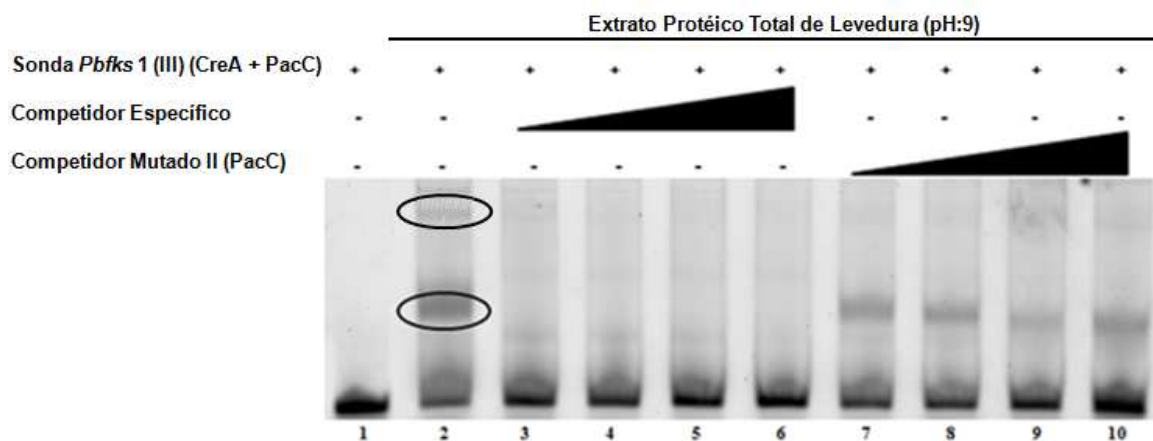
(A) 1: Sonda *Pbfks1*(III) livre; 2: Sonda *Pbfks1*(III) + extrato de levedura de Pb; 3, 4, 5 e 6: Sonda *Pbfks1*(III) + extrato de levedura de Pb + competidor específico 25X, 50X, 100X e 150X, respectivamente; 7, 8, 9 e 10: Sonda *Pbfks1*(III) + extrato de levedura de Pb + competidor Mutado II (PacC) 25X, 50X, 100X e 150X, respectivamente. **(B)** Seqüência da sonda *Pbfks1*(III), destacando em sublinhado o sítio para CreA e negrito o sítio para PacC. Na sonda *Pbfks1*(III) mutada, os nucleotídeos modificados encontram-se em duplo sublinhado e a mutação acontece apenas no sítio de PacC.

A figura 21 demonstra que a sonda *Pbfks1*(III) apresenta dois sinais de retardo da mobilidade eletroforética quando incubada com extrato protéico de levedura de *P. brasiliensis* crescido em condições ácidas (pH:5) (poço 2). Tais interações são específicas, visto que os sinais desaparecem em presença de concentrações crescentes do competidor específico (poços 3, 4, 5 e 6), no entanto não envolvem o sítio de ligação de PacC, já que versões dos oligonucleotídeos

mutados nesse sítio continuam competindo pela formação do complexo (poços 7, 8, 9 e 10).

4.5.9 – Sonda *Pbfks1(III)* + Extrato protéico total de levedura *P. brasiliensis* (pH:9) - Competidor Mutado II (PacC)

A



B

Sonda - *Pbfks1(III)*: CATTCTAATAACCGGAGTGCCACG**CTTGGC**AGATCATTTTG

Competidor Mutado (PacC): CATTCTAATAACCGGAGTGCCACG**CTAGAC**AGATCATTTTG

Figura 22: EMSA utilizando a sonda *Pbfks1(III)* incubada com extrato protéico de levedura de *P. brasiliensis* (pH: 9)

(A) 1: Sonda *Pbfks1(III)* livre; 2: Sonda *Pbfks1(III)* + extrato de levedura de Pb; 3, 4, 5 e 6: Sonda *Pbfks1(III)* + extrato de levedura de Pb + competidor específico 25X, 50X, 100X e 150X, respectivamente; 7, 8, 9 e 10: Sonda *Pbfks1(III)* + extrato de levedura de Pb + competidor Mutado II (PacC) 25X, 50X, 100X e 150X, respectivamente. (B) Seqüência da sonda *Pbfks1(III)*, destacando em sublinhado o sítio para CreA e em negrito o sítio para PacC. Na sonda *Pbfks1(III)* mutada, os sítios modificados encontram-se em duplo sublinhado e a mutação acontece apenas no sítio de PacC.

A partir da figura 22, pode-se observar a ocorrência de dois sinais de retardo de mobilidade eletroforética quando da incubação da sonda *Pbfks1(III)* com extrato protéico total de levedura de *P. brasiliensis* crescida em pH alcalino. O de massa molecular mais alta, apesar de específico, não está relacionado ao motivo de ligação a PacC.

Já o segundo sinal, correspondente a um complexo DNA-proteína de massa molecular mais baixa (poço 2), além de específico – já que desaparece em

concentrações crescentes de competidor (poços 3, 4, 5 e 6) – envolve efetivamente o motivo PacC, pois oligonucleotídeos mutados nesse motivo não são capazes de competir com o sinal formado pela interação da sonda com componentes protéicos presentes no extrato.

V - DISCUSSÃO

5 - DISCUSSÃO

A regulação da expressão gênica em eucariotos é bastante complexa, integrando diferentes mecanismos. No entanto, em vários modelos, incluindo fungos patogênicos, a regulação no nível transcricional parece desempenhar papel preponderante. Portanto, a compreensão da maquinaria que leva à transcrição ou ao silenciamento dos genes é a chave para entender muitos processos biológicos. Ao se analisar a maquinaria transcricional de um gene, considera-se a estrutura primária da região regulatória e a caracterização ou identificação de fatores protéicos que com ela interagem. Em estudos mais refinados, deve-se analisar a cinética e a força dessas interações. Várias são as técnicas de biologia molecular utilizadas nos estudos de regulação da transcrição gênica, dentre elas o sistema de gene repórter, as técnicas de *footprinting*, e as interações específicas DNA-proteína, avaliadas por exemplo, por experimentos de retardo da mobilidade eletroforética (EMSA) (revisto por Barbosa *et al.* 2002).

O ensaio de retardo da mobilidade eletroforética (EMSA), também conhecido como *band shift*, é uma das abordagens experimentais mais úteis para se analisar a interação entre DNA e proteína(s) *in vitro*. Tornou-se difundida após publicações de Garner & Revzin e Fried & Crothers, ambas em 1981. A estratégia fundamenta-se no fato de que a mobilidade eletroforética de um ácido nucléico altera-se quando uma proteína a ele se liga. Os extratos protéicos, proteínas purificadas ou recombinantes de interesse são incubadas com segmentos de DNA de fita dupla marcados com radioativamente ou fluorescência (as sondas) para permitir a formação de um complexo.

A técnica é empregada para verificar se um extrato protéico, proteína purificada ou proteína recombinante interage com uma determinada seqüência de DNA. A mistura é, então, submetida à eletroforese sob condições não desnaturantes. O complexo DNA/proteína formado apresenta uma mobilidade eletroforética mais lenta quando comparada àquela exibida pela sonda livre. As interações DNA/proteína detectadas por EMSA não são necessariamente específicas e, portanto, realizam-se ensaios de competição para se discriminar um evento de ligação inespecífico de um específico, como descrito em materiais e

métodos. Em estudos mais refinados, baseados na identificação precisa da proteína estudada, anticorpos produzidos contra proteínas específicas podem ser utilizados nos ensaios de EMSA. Mutações e deleções podem também ser introduzidas nas sondas para verificar qual(is) a(s) base(s) importantes para estabelecer contato DNA-proteína.

Essas características motivaram a escolha dessa técnica para o estudo dos motivos de ligação de CreA e PacC presentes na região promotora do gene de 1,3- β -glicana-sintase de *P. brasiliensis*. Como sondas, foram empregados oligonucleotídeos sintéticos e como fonte de proteínas de interação utilizou-se extratos protéicos totais e proteínas recombinantes. Extratos protéicos totais ou nucleares são muito úteis para a análise de elementos regulatórios do promotor de um gene, embora a utilização de proteínas purificadas ou proteínas recombinantes permitam um refinamento das informações a respeito da natureza das interações (revisto por Laniel *et al.*, 2001). Como já mencionado, o foco específico em CreA e PacC foi motivado pelo interesse particular de nosso grupo de pesquisa nesses dois mecanismos regulatórios (Poças-Fonseca *et al.*, 2008; Benoliel *et al.*, 2010; Mello-de-Souza *et al.*, 2011).

No presente estudo observou-se que a proteína recombinante CreAHg – GST, que apresenta o domínio de ligação do fator CreA de *H. grisea* fusionado a GST, não reconhece os sítios específicos de CreA presentes nas sondas Pbfks1(I) (um sítio de ligação a CreA) e Pbfks1 (III) (um sítio de ligação a CreA e outro a PacC).

É possível que os domínios de ligação à proteína de *H. grisea* não reconheçam a estrutura dos sítios de interação que ocorrem no promotor do gene *FKS1* de *P. brasiliensis*. No entanto, não se dispunha de alternativas para a proteína heteróloga, uma vez que o sistema CreA não foi ainda caracterizado em *P. brasiliensis*. O controle positivo, empregando uma sonda do próprio *Humicola* (Figura 3), demonstrou que a proteína recombinante era funcional.

A literatura científica relata que CreA/CRE1 se liga ao promotor do gene alvo no motivo 5'-SYGGRG-3', onde S= C ou G; Y= C ou T e R= A ou G. No entanto, diferentes estudos sugerem que a funcionalidade do sítio de ligação requer dois motivos 5'-SYGGRG-3' contíguos, sendo que a repressão direta só ocorreria por meio de tais sítios duplos, como demonstrado em *A. nidulans* e *T. reesei* (revisto por Sun & Glass, 2011 e Portnoy *et al.* 2011). O fato de os motivos presentes nas

sondas *Pbfks1* (I) e *Pbfks1* (II) não serem duplos e contíguos pode justificar a não interação da proteína rCreAHg-GST com as sondas.

Não há evidências na literatura científica que descartassem por completo a funcionalidade de sítios únicos de reconhecimento a CreA em promotores de genes de fungos. É possível que diferentes vias regulatórias empreguem diferentes combinações dos mesmos elementos. Por exemplo, no recente estudo de Gressler e colaboradores (2011), estudou-se a regulação do gene de poliquetídeo sintase (*PKS-NRPS*) uma peptídeo sintase não ribossomal, e do fator de transcrição P00326 de *Aspergillus terreus*, um fungo de importância clínica devido à produção de micotoxinas. Ambos genes mostraram-se reprimidos por glicose. O promotor de *PKS-NRPS* apresenta quatro sítios de ligação para CreA, sendo apenas dois contíguos. Já o promotor de *P00326* apresenta três sítios de reconhecimento por CreA, todos completamente isolados uns dos outros. Mesmo que estudos funcionais desses motivos ainda não tenham sido realizados, diferentes abordagens experimentais, como RT-PCR semiquantitativa, e análises com o gene repórter *lacZ* indicaram a participação de CreA na repressão por glicose dos dois genes.

Em nosso próprio grupo de pesquisa, estudamos a regulação da expressão de oito genes codificadores de hidrolases de *H. grisea*. Os promotores apresentam diferentes números de sítios para CreA, que ocorre em diferentes posições e espaçamentos. Nenhum desses sítios foi caracterizado funcionalmente, ao contrário daqueles presentes nos promotores do próprio CreA e de PacC. No entanto, análises de qRT-PCR comprovaram a repressão por glicose em sete dos oito genes de hidrolase estudados (Mello-de-Souza, *et al.*, 2011).

Nos ensaios realizados com a sonda *Pbfks1*(I) foi possível observar que ao se incubar a sonda com extratos totais de micélio (figura 4) e levedura (figura 5), observou-se uma interação DNA-proteína. Ao se realizar os ensaios com competidores específicos e mutados, foi possível concluir que as interações são específicas, mas que não acontecem no motivo de ligação para CreA. Este tipo de interação “fantasma” é comum em ensaios que empregam extrato protéico total. Esse problema é minimizado quando se emprega extratos nucleares, que no entanto são mais laboriosos de se obter.

Os resultados de EMSAs sugerem que o sítio para CreA da sonda *Pbfks1*(I) não é funcional. No entanto, não se pode descartar a possibilidade de regulação de

Pbfks1 por glicose, ainda que em um mecanismo independente de CreA. Estudos adicionais fazem-se necessários para avaliar essa questão.

O ensaio realizado com a sonda *Pbfks1*(II), que apresenta apenas um sítio para PacC, e a proteína recombinante *PaccPb*-GST demonstrou uma interação DNA-proteína (Figura 6). Tal interação demonstrou-se específica e ocorre diretamente no motivo de ligação a PacC. Quando, para a mesma sonda, empregou-se extrato total de micélio em pH 7 (figura 7) também se observou uma interação DNA-proteína específica mas que não envolvia o sítio PacC. Já com extrato de levedura em pH 7, o complexo DNA-proteína formado de fato envolvia o motivo de reconhecimento de PacC (Figura 8). Obteve-se assim, a primeira evidência de que PacC pudesse estar relacionado à regulação da expressão do gene de *FKS1* e que essa regulação ocorreria exclusivamente quando do crescimento na fase de levedura, que é a forma que se desenvolve no hospedeiro.

A fim de investigar mais profundamente essa hipótese, variou-se as condições de crescimento do fungo *P. brasiliensis*, sendo extratos protéicos totais obtidos em condições ácidas (pH 5) e alcalinas (pH 9).

Os experimentos realizados com extratos protéicos obtidos a partir do crescimento miceliano em pH ácido (Figura 9) e alcalino (Figura 10) comprovaram que, na fase de micélio, independentemente do pH de cultivo, não existe um fator protéico capaz de reconhecer e interagir com o domínio PacC. Com extratos obtidos da fase leveduriforme, verificou-se que em pH alcalino, como em neutro, houve uma interação específica que envolve o domínio de reconhecimento PacC (Figura 12). Esses dados sugerem que PacC possa estar envolvido na regulação do gene de *FKS1* quando da transição de micélio para levedura, podendo portanto representar algum papel na virulência de *P. brasiliensis*.

O gene *pacC* de *P. brasiliensis* foi clonado e caracterizado por nosso grupo de pesquisa (Aguiar, 2006). Também demonstramos, por RT-PCR semiquantitativa, que o transcrito de *PbpacC* acumula-se consideravelmente em pH alcalino (Poças-Fonseca *et al.*, 2008), como demonstrado para os ortólogos descritos até o momento. Uma vez que a via regulatória PacC está envolvida com a virulência de diferentes fungos patogênicos ao homem, como em *C. albicans*, *T. rubrum*, e *W. dermatitidis*, nos interessamos por investigar essa questão em *P. brasiliensis*. Em patógenos do gênero *Candida*, *C. posadasii* e *A. fumigatus*, a síntese de β -1,3-

glicana sintase é necessária à infecção e/ou sobrevivência do fungo no hospedeiro. Desse modo, deve também ser importante à patogênese de *P. brasiliensis*.

Acreditamos que o presente trabalho tenha apresentado as primeiras evidências experimentais para a possível interação entre a via regulatória PacC e a patogenicidade em *P. brasiliensis*, uma vez que a interação desse fator transcricional com o promotor do gene de um possível fator de virulência só ocorre em pH alcalino e na forma do fungo que provoca a paracoccidiodomicose.

VI – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

6 - CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Esse trabalho demonstrou que os dois sítios de reconhecimento para o repressor transcricional CreA, presentes na região regulatória do gene de glicana sintase 1 de *P. brasiliensis*, não são funcionais.

Também se evidenciou que os dois sítios de interação para o fator transcricional PacC são reconhecidos por uma proteína recombinante que apresenta o domínio de ligação ao DNA da proteína PacC e por fator(es) protéico(s) presente(s) no extrato celular total da fase leveduriforme do fungo, mas não da micelial, exclusivamente quando essa é crescida em pH neutro a alcalino.

Analisados em conjunto, os dados sugerem que o fator transcricional PacC possa estar relacionado à regulação da expressão do gene *PbFKS1* na forma do fungo que provoca a paracoccidiodomicose (levedura), podendo assim contribuir para a sua patogenicidade.

De modo a aprofundar esse estudo, estão em andamento os seguintes experimentos:

- Reação de Transcrição Reversa associada a PCR em tempo real (qRT-PCR) para avaliar o acúmulo de transcritos correspondentes ao gene *PbFKS1* e a genes de outros possíveis fatores de virulência (superóxido desmutase, quitina sintase, isocitrato liase, malato sintase, por exemplo) quando *P. brasiliensis* é crescido nas formas de micélio e de levedura, em meios de cultura tamponados em diferentes valores de pH.

- Analisar a função promotora da região 5' não-traduzida do gene *PbFKS1* em sistema gene repórter no modelo heterólogo de *A. nidulans*, para o qual mutantes de diferentes componentes da via regulatória PacC estão disponíveis.

Pretende-se ainda estudar a expressão do gene *PbFKS1* em ambientes ácidos, como no interior de fagossomos, *in vitro* e em modelos animais suscetíveis à paracoccidiodomicose.

**VII – REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguiar SM (2006) Análise estrutural e de expressão do gene *pacC* de *Paracoccidioides brasiliensis*. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília.

Ameen M, Talhari C & Talhari S. (2009) Review article: Advances in paracoccidioidomycosis. *Clinical and Experimental Dermatology*, 35:576–580.

Andrade RV, Paes HC, Nicola AM, De Carvalho MJ, Fachin AL, Cardoso RS, Silva SS, Fernandes L, Silva SP, Donadi EA, Sakamoto-Hojo ET, Passos GA, Soares CM, Brígido MM & Felipe MS (2006) Cell organisation, sulphur metabolism and ion transport-related genes are differentially expressed in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium and yeast cells. *BMC Genomics*, 14(7):208.

Aristizabal, BH, Clemons KV, Stevens DA & Restrepo A. (1998) Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: in vivo inhibition in females. *Infect Immun*, 66(11):5587-5591.

Baek YU, Martin SJ & Davis DA. (2006) Evidence for novel pH-dependent regulation of *Candida albicans* Rim101, a direct transcriptional repressor of the cell wall beta-glycosidase Phr2. *Eukaryot Cell*, 5(9):1550-1559.

Bailão AM, Schrank A, Borges CL, Dutra V, Molinari-Madlum EEWI, Felipe MSS, Mendes-Giannini MJS, Martins WS, Pereira M & Soares MAC. (2006) Differential gene expression by *Paracoccidioides brasiliensis* in host interaction conditions: representational difference analysis identifies candidate genes associated with fungal pathogenesis. *Microbes Infect*, 8(12-13):2686-2697.

Barbosa MD, Lin S, Markwalder JA, Mills JA, DeVito JA, Teleha CA, Garlapati V, Liu C, Thompson A, Trainor GL, Kurilla MG & Pompliano DL (2002) Regulated expression of the *Escherichia coli* *lepB* gene as a tool for cellular testing of antimicrobial compounds that inhibit signal peptidase I in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(11):3549-3554.

Beauvais A, Bruneau JM, Mol PC, Buitrago MJ, Legrand R & Latgé JP (2001) Glucan synthase complex of *Aspergillus fumigatus*. *J Bacteriol*, 183(7):2273-2279.

Benoliel B, Poças-Fonseca MJ, Torres FAG & Moraes LMP. (2010) Expression of a Glucose-tolerant beta-glucosidase from *Humicola grisea* var. *thermoidea* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160:2036-2044.

Bensen ES, Martin SJ, Li M, Berman J & Davis DA. (2004) Transcriptional profiling in *Candida albicans* reveals new adaptive responses to extracellular pH and functions for Rim101p. *Mol Microbiol*, 54(5):1335-1351.

Borges CL, Bailão AM, Bão SN, Pereira M, Parente JÁ & Soares CMA. (2010) Genes Potentially Relevant in the Parasitic Phase of the Fungal Pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia*, 171:1–9.

Caddick MX, Brownlee AG & Arst HN Jr. (1986) Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet*, 203(2):346-353.

Castanheira M, Woosley LN, Diekema DJ, Messer SA, Jones RN & Pfaller MA. (2010) Low prevalence of *fkp1* hot spot 1 mutations in a worldwide collection of *Candida* strains. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(6):2655-2659.

Chulkin AM, Vavilova EA & Benevolenskii SV. (2011) Mutational Analysis of carbon Catabolite Repression in Filamentous Fungus *Penicillium canescens*. *Molecular Biology*, 45(5):804-810.

Cornet M, Richard ML & Gaillardin C. (2009) The homologue of the *Saccharomyces cerevisiae* RIM9 gene is required for ambient pH signalling in *Candida albicans*. *Res Microbiol*, 160(3):219-223.

Coutinho ZF, Silva D, Lazera M, Petri V, Oliveira RM, Sabroza PC & Wanke B. (2002) Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saúde Pública*, 18(5):1441-1454.

Cubero B & Scazzocchio C. (1994) Two different, adjacent and divergent zinc finger binding sites are necessary for CRE-mediated carbon catabolite repression in the proline gene cluster of *Aspergillus nidulans*. *EMBO J*, 15;13(2):407-15.

Davis DA, Bruno VM, Loza L, Filler SG & Mitchell AP. (2002) *Candida albicans* Mds3p, a conserved regulator of pH responses and virulence identified through insertional mutagenesis. *Genetics*, 162(4):1573-1581.

Díaz J, Chávez R, Larrondo LF, Eyzaguirre J & Bull P. (2008) Functional analysis of the endoxylanase B (*xynB*) promoter from *Penicillium purpurogenum*. *Curr Genet*, 54:133-141.

Dowzer CEA & Kelly JM. (1991) Analysis of the *creA* gene, a regulator of carbon source catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell. Biol*, 11(11):5701-5709.

Espeso EA, Tilburn J, Sánchez-Pulido L, Brown CV, Valencia A, Arst HN Jr & Peñalva MA. (1997) Specific DNA recognition by the *Aspergillus nidulans* three zinc finger transcription factor PacC. *J Mol Biol*, 274(4):466-480.

Felipe MS, Andrade RV, Arraes FB, Nicola AM, Maranhão AQ, Torres FA, Silva-Pereira I, Poças-Fonseca MJ, Campos EG, Moraes LM, Andrade PA, Tavares AH, Silva SS, Kyaw CM, Souza DP, Pereira M, Jesuíno RS, Andrade EV, Parente JA, Oliveira GS, Barbosa MS, Martins NF, Fachin AL, Cardoso RS, Passos GA, Almeida NF, Walter ME, Soares CM, Carvalho MJ & Brígido MM; PbGenome Network. (2005) Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus

Paracoccidioides brasiliensis in mycelium and yeast cells. *J Biol Chem*, 280(26):24706-24714.

Ferreira-Nozawa MS, Silveira HC, Ono CJ, Fachin AL, Rossi A & Martinez-Rossi NM. (2006) The pH signaling transcription factor PacC mediates the growth of *Trichophyton rubrum* on human nail *in vitro*. *Med Mycol*, 44(7):641-645.

Fried M & Crothers DM. (1981) Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res*, 11;9(23):6505-6525.

Galán A, Casanova M, Murgui A, MacCallum DM, Odds FC, Gow NA & Martínez JP. (2004) The *Candida albicans* pH-regulated KER1 gene encodes a lysine/glutamic-acid-rich plasma-membrane protein that is involved in cell aggregation. *Microbiology*, 150(8):2641-2651.

Garcia-Effron G, Lee S, Park S, Cleary JD & Perlin DS. (2009) Effect of *Candida glabrata* FKS1 and FKS2 mutations on echinocandin sensitivity and kinetics of 1,3-beta-D-glucan synthase: implication for the existing susceptibility breakpoint. *Antimicrob Agents Chemother*, 53(9):3690-3699.

Garner MM & Revzin A. (1981) A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res*, 10;9(13):3047-3060.

Gressler M, Zaehle C, Scherlach K, Hertweck C & Brock M. (2011) Multifactorial induction of an orphan PKS-NRPS gene cluster in *Aspergillus terreus*. *Chem Biol*, 25;18(2):198-209.

Ha YS, Covert SF & Momany M. (2006) FsFKS1, the 1,3-beta-glucan synthase from the caspofungin-resistant fungus *Fusarium solani*. *Eukaryot Cell*, 5(7):1036-1042.

Ilmén M, Thrane C & Penttilä M. (1996) The glucose repressor gene cre1 of *Trichoderma*: isolation and expression of a full-length and a truncated mutant form. *Mol Gen Genet*, 24;251(4):451-460.

Jin K, Luo Z, Jiang X, Zhang Y, Zhou Y & Pei Y. (2011) Carbon catabolite repressor gene BbCre1 influences carbon source uptake but does not have a big impact on virulence in *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 106:400-406.

Kanetsuna F, Carbonell LM, Moreno RE & Rodriguez J. (1969) Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol*, 97(3):1036-1041.

Kanetsuna F, Carbonell LM, Azuma I & Yamamura Y. (1972) Biochemical studies on the thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol*, 110(1):208-218.

Katoh H, Ohtani K, Yamamoto H & Akimitsu K. (2007) Overexpression of a Gene Encoding a Catabolite Repression Element in *Alternaria citri* Causes Severe Symptoms of Black Rot in Citrus Fruit. *Biochemistry and Cell Biology*, 97(5):557-563.

Kellner EM, Orsborn KI, Siegel EM, Mandel MA, Orbach MJ & Galgiani JN. (2005) *Coccidioides posadasii* Contains a Single 1,3-Glucan Synthase Gene That Appears To Be Essential for Growth. *Eukaryotic Cell*, 4(1):111–120

Klein BS & Tebbets B. (2007) Dimorphism and virulence in fungi. *Curr Opin Microbiol*, 10(4):314-319.

Kramer-Haimovich H, Servi E, Katan T, Rollins J, Okon Y & Prusky D. (2006) Effect of ammonia production by *Colletotrichum gloeosporioides* on pelB activation, pectate lyase secretion, and fruit pathogenicity. *Appl Environ Microbiol*, 72(2):1034-1039.

Laniel MA, Béliveau A & Guérin SL. (2001) Electrophoretic mobility shift assays for the analysis of DNA-protein interactions. *Methods Mol Biol*, 148:13-30.

Latgé JP. (2007) The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol Microbiol*, 66(2):279-290.

León M, Sentandreu R & Zueco, J. (2002) A single FKS homologue in *Yarrowia lipolytica* is essential for viability. *Yeast*, 15;19(12):1003-1014.

Li M, Martin SJ, Bruno VM, Mitchell AP & Davis DA. (2004) *Candida albicans* Rim13p, a protease required for Rim101p processing at acidic and alkaline pHs. *Eukaryot Cell*, 3(3):741-751.

Mach RL, Strauss J, Zeilinger S, Schindler M & Kubicek CP. (1996) Carbon catabolite repression of xylanase I (xyn1) gene expression in *Trichoderma reesei*. *Mol Microbiol*, 21(6):1273-1281.

Marques SA. (1998) Paracoccidioidomycose. *An Bras Dermatol*,73(5):455–469 [in Portuguese].

Martins IM, Cortés JC, Muñoz J, Moreno MB, Ramos M, Clemente-Ramos JA, Durán A & Ribas JC. (2010) Differential activities of three families of specific beta(1,3)glucan synthase inhibitors in wild-type and resistant strains of fission yeast. *J Biol Chem*, 4;286(5):3484-3496.

Matute DR, McEwen JG, Puccia R, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, Rauscher JT, Restrepo A, Morais F, Niño-Vega G & Taylor JW.. (2006) Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol*, 23(1):65-73.

Matute DR, Quesada-Ocampo, LM, Rauscher JT & McEwen JG. (2008) Evidence for positive selection in putative virulence factors within the *Paracoccidioides brasiliensis* species complex. *PLoS Negl Trop Dis*, 17;2(9):e 296.

Mello-de-Sousa TM, Silva-Pereira I & Poças-Fonseca M J (2011) Carbon source and pH-dependent transcriptional regulation of cellulase genes of *Humicola grisea* var. *thermoidea* grown on sugarcane bagasse. *Enzyme and Microbial Technology*, 48:19–26.

Mendes-Giannini MJS, Silva JLM, Silva JF, Donofrio FC, Miranda ET, Andreotti PF & Soares CP. (2008) Interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* with host cells: recent advances. *Mycopathologia*, 165:237–248.

Mio T, Adachi-Shimizu M, Tachibana Y, Tabuchi H, Inoue SB, Yabe T, Yamada-Okabe T, Arisawa M, Watanabe T & Yamada-Okabe H. (1997) Cloning of the *Candida albicans* 84 homolog of *Saccharomyces cerevisiae* GSC1/FKS1 and its involvement in beta-1,3-glucan synthesis. *J Bacteriol*, 179(13):4096-4105.

Moraes, DS (2009). Análise da região promotora dos genes 1,3-β-glicana sintase e quitina sintase 4 de *Paracoccidioides brasiliensis*. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília.

Naiff RD, Ferreira LCP, Barre TV, Naiff MF & Arias JR. (1986) Paracoccidioidomicose enzootica em tatus (*Dasypus novemcinctus*) no Estado do Para. *Rev Inst Med Trop*, 28:19–27.

Nie X, Liu X, Wang H & Chen J. (2010) Deletion of EFG1 promotes *Candida albicans* opaque formation responding to pH via Rim101. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 42(10):735-744.

Niimi K, Monk BC, Hirai A, Hatakenaka K, Umeyama T, Lamping E, Maki K, Tanabe K, Kamimura T, Ikeda F, Uehara Y, Kano R, Hasegawa A, Cannon RD & Niimi M. (2010) Clinically significant micafungin resistance in *Candida albicans* involves modification of a glucan synthase catalytic subunit GSC1 (FKS1) allele followed by loss of heterozygosity. *J Antimicrob Chemother*, 65(5):842-852.

Nunes LR, Costa de Oliveira R, Leite DB, da Silva VS, dos Reis Marques E, da Silva Ferreira ME, Ribeiro DC, de Souza Bernardes LA, Goldman MH, Puccia R, Travassos LR, Batista WL, Nóbrega MP, Nobrega FG, Yang DY, de Bragança Pereira CA, Goldman GH. (2005) Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. *Eukaryot Cell*, 4(12):2115-28.

Okamoto HT, Soares CM & Pereira M. (2006) Comparative analyses of the structure of the 1,3-beta-glucan synthase gene in *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. *Genet Mol Res*, 5(2):407-418.

Parente JA, Borges CL, Bailão AM, Felipe MSS, Pereira M & Soares CMA. (2008) Comparison of transcription of multiple genes during mycelia transition to yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis* reveals insights to fungal differentiation and pathogenesis. *Mycopathologia*, 165:259–273.

Peñalva MA, Tilburn J, Bignell E & Arst HN Jr (2008) Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. *Rev. Trends in Microbiology*, 16(6):291-300.

Pereira M, Felipe MS, Brígido MM, Soares CM & Azevedo MO. (2000) Molecular cloning and characterization of a glucan synthase gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast*, 16(5):451-462.

Peres NTA, Sanches PR, Falcão JP, Silveira HCS, Paião FG, Maranhão FCA, Gras DE, Segato F, Cazzaniga RA, Mazucato M, Cursino-Santos JR, Aquino-Ferreira R, Rossi A & Martinez-Rossi NM. (2010) Transcriptional profiling reveals the expression of novel genes in *Trichophyton rubrum*. *BMC Microbiology*, 8:10-39

Poças-Fonseca MJ, Mello-de-Souza TM & Aguiar SM. (2008) pH-related Transcriptional Regulation of Lignocellulolytic Enzymes and Virulence Factors in Fungi. In: Youssuf Gherbawy; Mahendra Rai; Robert L. Mach. (Org.). *Current Advances in Molecular Mycology*, 1:223-247.

Porta A, Ramon AM & Fonzi WA. (1999) PRR1, a homolog of *Aspergillus nidulans* palf, controls pH-dependent gene expression and filamentation in *Candida albicans*. *J Bacteriol*, 181(24):7516-7523.

Portnoy T, Margeot A, Linke R, Atanasova L, Fekete E, Sándor E, Hartl L, Karaffa L, Druzhinina IS, Seiboth B, Crom SL & Kubicek CP. (2011) The CRE1 carbon catabolite repressor of the fungus *Trichoderma reesei*: a master regulator of carbon assimilation. *BMC Genomics*, 12:269.

Prado M, da Silva MB, Laurenti R, Travessos LR & Taborda CP. (2009) Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104(3): 513-521.

Prusky D, McEvoy JL, Saftner R, Conway WS & Jones R. (2004) Relationship Between Host Acidification and Virulence of *Penicillium* spp. on Apple and Citrus Fruit. *Phytopathology*, 94(1):44-51.

Ramos-e-Silva M & Saraiva LES. (2008) Paracoccidioidomycosis. *Dermatol Clin*, 26:257–269.

Rappleye CA, Eissenberg LG & Goldman WE. (2007) *Histoplasma capsulatum* alpha-(1,3)-glucan blocks innate immune recognition by the beta-glucan receptor. *Proc Natl Acad Sci*, 4:1366–1370.

Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover EP, Feldman D & Stevens DA. (1984) Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect Immun*, 46(2):346-353.

Ricci G, Mota FT, Wakamatsu A, Serafim RC, Borra RC & Franco M. (2004) Canine paracoccidioidomycosis. *Med Mycol*, 42(4):379-383.

Richard ML, Nobile CJ, Bruno VM & Mitchell AP. (2005) *Candida albicans* biofilm-defective mutants. *Eukaryot Cell*, 4(8):1493-1502.

Richini-Pereira VB, Bosco SMG, Theodoro R C, Macoris SAG & Bagagli E. (2009) Molecular approaches for eco-epidemiological studies of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104(4):636-643.

Roncero C. (2002) The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. *Curr Genet*, 41(6):367-378.

San-Blas G & Niño-Vega G. (2008) *Paracoccidioides brasiliensis*: chemical and molecular tools for research on cell walls, antifungals, diagnosis, taxonomy. *Mycopathologia*, 165:183–195.

San-Blas G & Niño-Vega G. (2001) *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and host response. In: Cihlar RL, Caderona RA, eds. *Fungal Pathogenesis. Principles and Clinical Applications*, 205-226.

San-Blas, G. (1993) Biochemical and physiological aspects in the dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Arch Med Res*, 24(3):267-268.

San-Blas G, Niño-Vega G & Iturriaga T. (2002) *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol*, 40(3):225-242.

Schimoler-O'Rourke R, Renault S, Mo W & Selitrennikoff CP. (2003) *Neurospora crassa* FKS protein binds to the (1,3)beta-glucan synthase substrate, UDP-glucose. *Curr Microbiol*, 46(6):408-412.

Silva SS, Paes HC, Soares CMA, Fernandes L & Felipe MSS. (2008) Insights into the pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis* from transcriptome analysis—advances and perspectives. *Mycopathologia*, 165:249–258.

Silveira HCS, Gras DE, Cazzaniga RA, Sanches PR, Rossi A & Martinez-Rossi NM. (2010) Transcriptional profiling reveals genes in the human pathogen *Trichophyton rubrum* that are expressed in response to pH signaling. *Microbial Pathogenesis*, 48:91-96.

Sorais F, Barreto L, Leal JA, Bernabé M, San-Blas G, Niño-Vega GA. (2010) Cell wall glucan synthases and GTPases in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.*, 48(1):35-47.

Staab JF, Kahn JN & Marr KA. (2010) Differential *Aspergillus lentulus* echinocandin susceptibilities are Fksp independent. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(12):4992-4998.

Sun J & Glass NL. (2011) Identification of the CRE-1 Cellulolytic Regulon in *Neurospora crassa*. *Plos One*,6(9):e25654.

- Tamayo EN, Villanueva A, Hasper AA, Graaff LH, Ramón D & Orejas M.** (2008) CreA mediates repression of the regulatory gene *xlnR* which controls the production of xylanolytic enzymes in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology*, 45:984-993.
- Teixeira MM, Theodoro RC, Carvalho MJ, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC, Mendoza L, Bagagli E, San-Blas G & Felipe MS.** (2009) Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol*, 52(2):273-283.
- Thompson JR, Douglas CM, Li W, Jue CK, Pramanik B, Yuan X, Rude TH, Toffaletti DL, Perfect JR & Kurtz M.** (1999) A glucan synthase FKS1 homolog in *Cryptococcus neoformans* is single copy and encodes an essential function. *J Bacteriol*, 181(2):444-453.
- Tomazett PK, Félix CR, Lenzi HL, De Paula FF, De Almeida Soares CM & Pereira M.** (2010) 1,3- β -D-Glucan synthase of *Paracoccidioides brasiliensis*: recombinant protein, expression and cytolocalization in the yeast and mycelium phases. *Fungal Biol*, 114(10):809-816.
- Tomazett PK, Castro Nda S, Lenzi HL, De Almeida Soares CM & Pereira M.** (2011) Response of *Paracoccidioides brasiliensis* Pb01 to stressor agents and cell wall osmoregulators. *Fungal Biol*, 115(1):62-69.
- Tonukari NJ, Scott-Craig JS & Walton JD.** (2003) Isolation of the carbon catabolite repressor (CREA) gene from the plant-pathogenic fungus *Cochliobolus carbonum*. *DNA Seq*, 14(2):103-107.
- Trevisan GL, Oliveira EHD, Peres NTA, Cruz AHS, Martinez-Rossi NM & Rossi A.** (2011) Transcription of *Aspergillus nidulans* *pacC* is modulated by alternative RNA splicing of *palB*. *FEBS Letters*, 585:3442-3445.
- Tudzynski B, Liu S & Kelly JM.** (2000) Carbon catabolite repression in plant pathogenic fungi: isolation and characterization of the *Gibberella fujikuroi* and *Botrytis cinerea* *creA* genes. *FEMS Microbiol Lett*, 1;184(1):9-15.
- Vautard-Mey G & Fèvre M.** (2003) Carbon and pH Modulate the Expression of the Fungal Glucose Repressor Encoding Genes. *Current Microbiology*, 46:146-150.
- Wang Q & Szaniszló PJ.** (2009) Roles of the pH signaling transcription factor PacC in *Wangiella* (Exophiala) *dermatitidis*. *Fungal Genet Biol*, 46(9):657-666.
- Yang M, Jin K & Xia Y.** (2011) MaFKS, a β -1,3-glucan synthase, is involved in cell wall integrity, hyperosmotic pressure tolerance and conidiation in *Metarhizium acridum*. *Curr Genet*, 57(4):253-260.
- Yuan X, Mitchell BM, Hua X, Davis DA & Wilhelmus KR.** (2010) The RIM101 signal transduction pathway regulates *Candida albicans* virulence during experimental keratomycosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51(9):4668-4676.

Zimbeck AJ, Iqbal N, Ahlquist AM, Farley MM, Harrison LH, Chiller T & Lockhart SR. (2010) *FKS* mutations and elevated echinocandin MIC values among *Candida glabrata* isolates from U.S. population-based surveillance. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(12):5042-5047.