UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

FERNANDA GOMES CARDOSO

Vias alternativas mitocondriais: estudos
moleculares e bioquímicos de uma UCP-*like* de
Aspergillus fumigatus

RIBEIRÃO PRETO

2011

FERNANDA GOMES CARDOSO

Vias alternativas mitocondriais: estudos
moleculares e bioquímicos de uma UCP-*like* de
Aspergillus fumigatus

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo
para obtenção do título de
Mestre em Bioquímica.

Área de concentração:
Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio
Akira Uyemura.

RIBEIRÃO PRETO

2011

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Cardoso, Fernanda Gomes

Vias alternativas mitocondriais: estudos moleculares e bioquímicos de uma UCP-like de *Aspergillus fumigatus* – SP. Ribeirão Preto, 2011

146f.:il.; 30cm.

Dissertação de mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Bioquímica

Orientador: Uyemura, Sérgio Akira

1. *Aspergillus fumigatus*. 2. Mitocôndria. 3. Componentes alternativos mitocondriais. 4. Proteínas desacopladoras.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fernanda Gomes Cardoso

Vias alternativas mitocondriais: estudos moleculares e bioquímicos de uma UCP-*like* de *Aspergillus fumigatus*

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Área de concentração: Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

*Dedico esta dissertação à minha mãe, Neide, e
ao meu irmão, Douglas, que sempre
acreditaram no potencial do meu trabalho.*

*Ao Lucas, que tem me incentivado e proporcionado
grande ajuda ao longo desses anos.*

AGRADECIMENTOS

Ao professor e orientador Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura, pela confiança concedida e pelos ensinamentos, a quem devo grande parte dos conhecimentos científicos adquiridos ao longo desses anos.

À Profa. Dra. Andréia Machado Leopoldino, pela ajuda com os experimentos e pelas discussões pertinentes.

Às amigas pós-graduandas Ms. Renata Vilela e Silveli Suzuki, pelo apoio, amizade e sugestões oferecidas durante a nossa convivência.

Às demais amigas do Laboratório de Bioquímica Clínica da FCFRP-USP, que proporcionaram um excelente ambiente de trabalho, e que, direta ou indiretamente contribuíram para o bom andamento das atividades de pesquisa: Camila Sayuri, Carol Alvarenga, Ms. Cristiana Bernadelli, Cibele Cesila, Kátia Otaguiri, Dra. Luciana Almeida e Renata Goto.

Aos funcionários Antonio Zanardo, João Franco e Nancy Ferreira Rodrigues, pela colaboração prestada, contribuindo para o bom andamento deste trabalho.

Às Dras. Taisa Magnani e Valéria Tudella por toda a ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho e por estarem sempre disponíveis nos momentos necessários.

À Profa. Dra. Luciane Carla Alberici pela prontidão e auxílio nos ensaios de respiração mitocondrial.

Ao Prof. Dr. Pietro Ciancaglini e à pós-graduanda Ms. Juliana Sakamoto, pela colaboração e ensinamentos nos ensaios de preparação dos lipossomos.

Ao Prof. Dr. Carlos Curti pela disponibilidade de equipamentos e demais contribuições.

À Profa. Dra. Yara Lucisano Valim e à funcionária Ieda Maria Razaboni pela orientação e pelos ensinamentos no estágio do programa de aperfeiçoamento ao ensino (PAE).

À Profa. Dra. Maria Cristina Nonato e aos seus alunos de pós-graduação, pela colaboração e pela disponibilidade de equipamentos para o desenvolvimento da pesquisa.

A todos os docentes e funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP.

À secretaria do Departamento de Bioquímica e Imunologia, em especial, à Ivone, pela disponibilidade e eficiência na realização de seu trabalho.

Aos professores titulares e suplentes da banca examinadora, por aceitarem a participação e pela colaboração com importantes sugestões.

A todos os amigos do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da FMRP-USP, pela amizade e pela harmoniosa convivência durante esses anos, em especial: Lucas Benício, Ms. Malson Neilson, Letícia Magalhães e Bárbara Pimentel.

Aos demais amigos, pelo convívio e pelos momentos de descontração: Elise Cunha, Greyce Kelly, Rachel Ruas, Franciele Przygodda, Amanda Cruz, Bruna Paiva, Gabriela Gomes, Monique Eller, Lívia Souza, Germano Andrade e Rafael Salgado.

Às agências de fomento FAPESP e CAPES, pelo apoio financeiro e pela bolsa de estudo concedida.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Sumário

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Lista de Figuras.....	iii
Lista de Tabelas.....	vi
Lista de Abreviaturas.....	vii
1. Introdução	1
1.1 <i>Aspergillus fumigatus</i>	3
1.2 Características macro e microscópicas.....	4
1.3 Patogênese.....	6
1.4 Função mitocondrial.....	8
1.5 Componentes alternativos.....	11
1.6 Proteínas desacopladoras.....	14
1.7 Potencial quimioterapêutico.....	18
2. Objetivos	21
3. Material e métodos	23
3.1 Organismos.....	24
3.1.1 <i>A. fumigatus</i>	24
3.1.2 Bactérias.....	24
3.1.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
3.2 Extração de DNA genômico de <i>A. fumigatus</i>	25
3.3 Extração de RNA de <i>A. fumigatus</i>	26
3.4 Reação da transcriptase reversa (RT)...	28
3.5 Eletroforese em gel de agarose.....	29
3.6 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores.....	29
3.7 Reação em cadeia da polimerase (PCR)...	31
3.8 Inserção do gene da UCP-like em plasmídeo de clonagem.....	32
3.9 Inserção do gene da UCP-like em plasmídeos de expressão.....	33
3.10 Preparação de bactérias competentes....	35
3.11 Transformação de bactérias.....	36

3.12	PCR de colônia.....	37
3.13	Preparação e sequenciamento dos DNAs plasmidiais selecionados.....	37
3.14	Preparação de leveduras competentes....	38
3.15	Transformação de leveduras.....	39
3.16	Extração de DNA plasmidial de leveduras para transformação em <i>E. coli</i>	40
3.17	Indução da expressão e produção de esferoplastos de <i>S. cerevisiae</i>	40
3.18	Medida do potencial de membrana mitocondrial.....	42
3.19	Indução em pequena escala da expressão da UCP-like em <i>E. coli</i>	42
3.20	Expressão e purificação da UCP-like recombinante.....	44
3.21	SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio).....	46
3.22	Western Blot.....	47
3.23	Espectrometria de massas.....	48
3.24	Determinação da concentração de proteínas (método do BCA).....	50
3.25	Reconstituição da proteína UCP-like recombinante em lipossomos.....	50
3.26	Medidas de distribuição de tamanho de partícula por espalhamento de luz dinâmico.....	52
3.27	Avaliação da expressão da UCP-like na presença de paraquat e menadiona.....	53
3.28	PCR quantitativo em tempo real (Real Time PCR).....	54
4.	Resultados.....	58
4.1	Extração e isolamento do DNA genômico de <i>A. fumigatus</i>	59

4.2	Clonagem do gene da UCP- <i>like</i> a partir do DNA genômico de <i>A. fumigatus</i>	59
4.3	Clonagem da região codificadora da UCP- <i>like</i> de <i>A. fumigatus</i> por RT-PCR.....	63
4.4	Sequenciamento do gene da UCP- <i>like</i> de <i>A. fumigatus</i>	67
4.5	Análise molecular da sequência deduzida de aminoácidos da UCP- <i>like</i> de <i>A. fumigatus</i>	70
4.6	Clonagem do cDNA da UCP- <i>like</i> no vetor de expressão pYES2.....	73
4.7	Confirmação da transformação de <i>S. cerevisiae</i> INVSc1 com a construção pYES2/UCP- <i>like</i>	78
4.8	Medida do potencial de membrana mitocondrial.....	80
4.9	Clonagem do cDNA da UCP- <i>like</i> no vetor de expressão pET SUMO.....	82
4.10	Expressão da UCP- <i>like</i> recombinante em bactérias.....	83
4.11	Purificação da UCP- <i>like</i> recombinante por cromatografia de afinidade.....	87
4.12	Reconstituição da proteína UCP- <i>like</i> recombinante em lipossomos.....	89
4.13	Avaliação da expressão do gene da UCP- <i>like</i> na presença de radicais livres....	91
5.	Discussão	93
6.	Conclusão	105
7.	Referências bibliográficas	107
	Apêndice(s)	119

Resumo

CARDOSO, F. G. **Vias alternativas mitocondriais: estudos moleculares e bioquímicos de uma UCP-like de *Aspergillus fumigatus***. 2011. 146f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

A. fumigatus é um patógeno oportunista que causa infecções invasivas em hospedeiros imunocomprometidos. Estudos de respiração mitocondrial sugeriram a presença de componentes alternativos em sua cadeia respiratória envolvidos com processos de adaptação a ambientes adversos, como a proteína desacopladora (UCP). UCPs são proteínas mitocondriais cuja atividade dissipa o potencial de membrana gerado durante o transporte de elétrons. Um gene contendo características das três assinaturas moleculares das Proteínas Transferidoras de Energia foi clonado e sequenciado. O alinhamento das sequências genômica e de cDNA mostrou a presença de dois íntrons que, após o *splicing*, codifica uma proteína contendo 341 aminoácidos, com uma massa molecular de 37 kDa e um pI de 10,02. A fim de se avaliar as propriedades bioenergéticas da UCP-like, essa sequência foi clonada no vetor pYES2 e leveduras *S. cerevisiae* foram transformadas. Esferoplastos foram preparados e o potencial elétrico transmembrana mitocondrial ($\Delta\psi$) foi estimado. Os resultados mostraram que o $\Delta\psi$ de esferoplastos de leveduras expressando a proteína UCP-like foi ligeiramente menor e que o decréscimo momentâneo do $\Delta\psi$ associado com a fosforilação do ADP foi mais lento quando comparado com o controle, indicando desacoplamento da respiração. Além disso, esse comportamento dos esferoplastos recombinantes foi similar ao controle quando GDP foi adicionado ao meio de reação, sugerindo uma inibição da proteína por esse composto. Para sua caracterização funcional em sistemas reconstituídos, a sequência foi clonada no vetor pET SUMO. A expressão foi realizada em *E. coli* e a proteína recombinante, purificada por cromatografia em resina de níquel, foi analisada por Western blot com anticorpos anti-(His)6-tag e anti-UCP2 e por espectrometria de massas. A formação dos lipossomos foi confirmada através de medidas de distribuição de partícula por espalhamento de luz dinâmico, as quais sugeriram a formação de vesículas estáveis. Em adição, foi investigada a participação da UCP-like na proteção do *A. fumigatus* contra danos oxidativos. O nível de mRNA foi determinado por PCR em tempo real na presença de paraquat e menadiona. Em *A. fumigatus*, a presença dessas drogas pró-oxidantes resultou em um aumento no nível de mRNA desse gene, sugerindo que essa proteína possa também fazer parte de um sistema de defesa antioxidante do fungo.

Palavras-chave: *Aspergillus fumigatus*, mitocôndria, proteínas desacopladoras.

Abstract

CARDOSO, F. G. **Mitochondrial alternative pathways: molecular and biochemical studies of an UCP-like from *Aspergillus fumigatus***. 2011. 146f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

A. fumigatus is an opportunistic pathogen that causes invasive infections in immunocompromised hosts. Mitochondrial respiration studies suggested the presence of alternative components on its respiration chain, which are involved with the adaptation to hostile environments, such as the uncoupling protein (UCP). UCPS are mitochondrial proteins whose activity dissipates the membrane potential generated during electron transport. A gene containing features of three molecular signatures of Energy Carrier Protein was cloned and sequenced. The alignment between the cDNA and genomic DNA sequences revealed the existence of two introns which after splicing encodes a 341 amino acids protein with a molecular mass of 37 kDa and a pI of 10.02. In order to study bioenergetics properties of UCP-like, the cDNA sequence was cloned into pYES2 vector and transformed in *S. cerevisiae*. Spheroplasts were prepared and the mitochondrial electrical transmembrane potential ($\Delta\psi$) was estimated. The results showed that, compared with control cells, mitochondrial electrical transmembrane potential of transformant spheroplasts was slightly smaller and the transient $\Delta\psi$ decrease associated with ADP phosphorylation was longer, indicating uncoupling of respiration. Moreover, this behavior of recombinant spheroplasts was similar to control cells when GDP was added to the reaction medium, suggesting the inhibition of uncoupling protein. For its functional characterization in reconstituted systems, the cDNA sequence was cloned into pET SUMO vector. The expression was carried out in *E. coli* and the recombinant protein, purified by chromatography on a nickel-chelating resin, was analyzed by Western blot using anti-(His)6-tag or UCP2 antibodies and by mass spectrometry. Liposome formation was confirmed by light scattering, suggesting the formation of stable vesicles. In addition, the participation of UCP-like in *A. fumigatus* protection against oxidative damage was investigated. mRNA level was determined by real time PCR in the presence of paraquat and menadione. In *A. fumigatus*, the presence of these pro-oxidants drugs resulted in increased mRNA level of this gene, suggesting that this protein might also be part of an antioxidant defense system of this fungus.

Keywords: *Aspergillus fumigatus*, mitochondria, uncoupling proteins.

Lista de Figuras

Fig. 1:	<i>Aspergillus fumigatus</i>	5
Fig. 2:	Cadeia respiratória mitocondrial.....	11
Fig. 3:	Cadeia respiratória mitocondrial de plantas.....	12
Fig. 4:	Mapa do vetor pTZ57R/T (Fermentas).....	33
Fig. 5:	Mapa do vetor pYES2 (Invitrogen).....	34
Fig. 6:	Mapa do vetor pET SUMO (Invitrogen).....	35
Fig. 7:	DNA genômico extraído de <i>A. fumigatus</i>	59
Fig. 8:	Produtos de PCR obtidos para a amplificação do gene da UCP-like, com diferentes concentrações de Mg^{2+} e temperaturas de anelamento de 55°C e 60°C..	60
Fig. 9:	Produtos de PCR obtidos com diferentes clones transformados com a construção pTZ/UCP_DNA_Afu.....	62
Fig. 10:	Produtos da digestão com <i>EcoRI</i> e <i>BamHI</i> obtidos de diferentes clones transformados com a construção pTZ/UCP_DNA_Afu.....	63
Fig. 11:	RNA total de <i>A. fumigatus</i>	64
Fig. 12:	Produto de PCR obtido pela amplificação da região codificadora da UCP-like a partir de cDNA de <i>A. fumigatus</i>	65
Fig. 13:	Produtos de PCR obtidos com diferentes clones transformados com a construção pTZ/UCP_cDNA_Afu.....	66
Fig. 14:	Produtos da digestão com <i>EcoRI</i> e <i>BamHI</i> obtidos de diferentes clones transformados com a construção pTZ/UCP_cDNA_Afu.....	67
Fig. 15:	Sequência nucleotídica do gene da UCP-like de <i>A. fumigatus</i> com a dedução dos aminoácidos codificados.....	69

Fig. 16:	Alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos de UCPs de diferentes organismos.....	71
Fig. 17:	Produtos de PCR obtidos com diferentes clones transformados com a construção pTZ/UCP_cDNA_Afu para posterior clonagem no vetor pYES2.....	74
Fig. 18:	Resultado da reação de digestão com as enzimas <i>EcoRI</i> e <i>NotI</i> para clonagem no vetor pYES2.....	75
Fig. 19:	Fotografia dos géis de eletroforese em agarose 1,0% (p/v), em tampão TAE, relativos à confirmação da clonagem pYES2/UCP-like.....	77
Fig. 20:	Produtos obtidos por PCR de colônia após a transformação de bactérias DH10b com o DNA plasmidial de leveduras INVSc1 transformadas com a construção pYES2/UCP-like.....	79
Fig. 21:	Resultado da reação de digestão com as enzimas <i>EcoRI</i> e <i>NotI</i> da construção pYES2/UCP-like.....	80
Fig. 22:	Efeito da proteína UCP-like no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$) de esferoplastos recombinantes de <i>S. cerevisiae</i>	81
Fig. 23:	Produtos de PCR obtidos com diferentes clones transformados com a construção pET SUMO/UCP_cDNA_Afu.....	82
Fig. 24:	Expressão da proteína UCP-like em <i>E. coli</i> .	84
Fig. 25:	Teste de solubilização da proteína UCP-like com diferentes detergentes.....	86
Fig. 26:	Purificação da proteína UCP-like por cromatografia de afinidade.....	87

Fig. 27:	Análise por Western blot da proteína purificada utilizando anticorpos anti-(His)6-tag e anti-UCP2.....	88
Fig. 28:	Resultado obtido da análise por espectrometria de massas da proteína purificada.....	89
Fig. 29:	Resultado da medida de espalhamento de luz.....	91
Fig. 30:	Nível de expressão do gene que codifica para a UCP-like em culturas de <i>A. fumigatus</i> expostas a paraquat e menadiona.	92

Lista de Tabelas

Tabela 1:	Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação do gene XM_750738.2.....	30
Tabela 2:	Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação do gene XM_750738.2 para posterior clonagem no vetor pYES2.....	31
Tabela 3:	Oligonucleotídeos utilizados em experimentos de Real Time PCR.....	55
Tabela 4:	Diluições do DNA genômico presentes na curva de calibração dos oligonucleotídeos..	56
Tabela 5:	Assinaturas moleculares das proteínas transferidoras de energia.....	72
Tabela 6:	Porcentagem de aminoácidos idênticos entre a UCP-like de <i>A. fumigatus</i> e outras UCPs...	73

Lista de Abreviaturas

ADP	Adenosina 5'-difosfato
AOX	Oxidase alternativa
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albumina de soro bovino
cdNA	DNA complementar
CHAPS	3-[(3-Colamidopropil)dimetilamônio]-1-propanosulfonato
CTE	Cadeia transportadora de elétrons
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	Ácido desoxiribonucléico
dNTPs	Desoxiribonucleotídeos
DO	Densidade ótica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	Ácido etilenoglicoltetracético
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FADH₂	Flavina adenina dinucleotídeo reduzida
FAM	6-carboxifluoresceína
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil] etanosulfônico
HNE	4-hidroxinonenal
IPTG	Isopropiltio- β -D-galactosídeo
kb	Kilo bases
kDa	Kilo Daltons
LB	Luria Bertani
LiAc	Acetato de lítio
mA	Miliamper
mRNA	RNA mensageiro
mV	Milivolts

NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NDH	NADH desidrogenase
p/v	Relação peso por volume
PI	Índice de Polidispersão
PBS	Tampão salina fosfato
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PUMP	Proteína desacopladora mitocondrial de plantas
PEG	Poli(et)ilenoglicol
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
RT	Transcriptase reversa
SC-URA⁻	Meio de cultura SC sem uracila
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS
SLS	Lauril sarcosinato de sódio
TAE	Tris-acetato-EDTA
TB	"Terrific Broth"
TBS-T	Tampão salina Tris com Tween 20
TE	Tris-EDTA
TEA	Tetraetilamônio
TEMED	N,N,N',N'- tetrametiletilenodiamina
TES	Ácido N-Tris(hidroximetil)metil-2-aminoetano sulfônico
Tris	Tris-(hidroximetil)aminoetano
UCP	Proteína desacopladora
v/v	Relação volume por volume

1 - Introdução

Aspergillus são espécies ubíquas de fungos saprofíticos que possuem um papel significativo no processo de reciclagem de carbono e nitrogênio na natureza. Embora seu nicho ecológico principal seja o solo ou vegetação em decomposição, as espécies do gênero *Aspergillus* produzem conídios pequenos e hidrofóbicos que se dispersam facilmente pelo ar, podendo sobreviver a diversas condições ambientais (Dagenais & Keller, 2009). O gênero *Aspergillus*, o qual inclui cerca de 250 espécies, fornece um forte impacto na saúde pública, tanto beneficemente, sendo utilizado em aplicações industriais, quanto negativamente, como patógeno humano e de plantas (Gugnani, 2003; Klich, 2006).

A frequência de doenças provocadas por fungos tem aumentado nas últimas décadas, especialmente em pacientes que apresentam comprometimento imunológico. Com o avanço da medicina, da cirurgia e da transplantologia nos últimos trinta anos, houve um grande aumento no número de pacientes susceptíveis a infecções fúngicas (Karkowska-Kuleta et al., 2009). Dentre as espécies de fungos patogênicos pertencentes ao gênero *Aspergillus*, a mais relevante clinicamente, causadora de aproximadamente 90% das infecções sistêmicas, é o *Aspergillus fumigatus* (Brakhage & Langfelder, 2002; Stevens, 2000).

1.1 - *Aspergillus fumigatus*

A. fumigatus é um fungo ascomiceto encontrado por todo o mundo, sendo seus conídios de pequeno tamanho, altamente abundantes no meio ambiente (Gniadek & Macura, 2007). Essa espécie de fungo possui um ciclo biológico bastante simples, apresentando uma alta capacidade de esporulação, a qual resulta na presença de altas concentrações de conídios no ar (1-100 conídios por m³) (Latgé, 2001). Esses conídios são continuamente inalados pelo homem, porém essa inalação raramente provoca algum efeito adverso, uma vez que eles são eficientemente eliminados pela resposta imune inata. Entretanto, o caráter inócuo do *A. fumigatus* tem mudado nos últimos anos devido ao aumento do número de pacientes imunossuprimidos e ao aumento da severidade das terapias imunossupressoras (Latgé, 2001). Por ser termotolerante e utilizar fontes variáveis de carbono e nitrogênio para o seu crescimento, o *A. fumigatus* se tornou um importante patógeno oportunista em humanos (Rhodes, 2006). Pacientes imunocomprometidos podem contrair aspergilose pulmonar invasiva, infecções disseminadas ou infecção no sistema nervoso central (Latgé, 2001; Rhodes & Brakhage, 2006). A alta taxa de mortalidade, a qual varia de 50% a 95% (Abad et al., 2010), está correlacionada com o diagnóstico tardio e o conhecimento relativamente pobre acerca da patogenicidade e

dos fatores de virulência desse fungo (Rementeria et al., 2005; Tekaiia & Latgé, 2005).

1.2 - Características macro e microscópicas

As colônias filamentosas de *A. fumigatus* se desenvolvem rapidamente em meio de cultura contendo ágar-glicose-peptona a 37°C. Nessas condições, as colônias possuem uma coloração verde-acinzentada, são geralmente granulares e formam abundantes conídios.

Microscopicamente, as colônias de *A. fumigatus* apresentam hifas de aproximadamente 4 µm de diâmetro. As hifas são filamentos altamente polarizados que se estendem indefinidamente por suas extremidades. Elas iniciam novas extremidades nas formas de ramificações a partir das regiões sub-apicais e, juntamente com a massa em crescimento, constituem os micélios. As hifas são predominantemente multinucleadas, com paredes cruzadas, denominadas septos, dividindo-a em compartimentos. O crescimento de hifas vegetativas se inicia a partir de um esporo, o qual é o produto da reprodução assexuada (conídio). Os conídios são tipicamente produzidos a partir de uma estrutura diferenciada denominada conidióforo (Sullivan et al., 2005). As cabeças conidiais apresentam ao microscópio óptico aspecto de vesículas em forma de frasco, com uma série de fiálides unisseriadas, recobrando dois terços superiores de sua

superfície. Os conídios possuem de 2-3 μm de diâmetro e são produzidos em cadeias paralelas.

Durante a reprodução assexuada dos ascomicetos, um esporo, contendo um único núcleo, germina formando uma hifa multinucleada, a qual cresce dando origem ao conidióforo. Os núcleos se dividem mitoticamente no interior do conidióforo, permitindo a produção de conídios assexuados haplóides (Figura 1). Uma vez que esses esporos são liberados, através de uma disrupção no meio ambiente, eles podem crescer e se tornar micélios haplóides, dando continuidade ao ciclo (Bennett & Klich, 1992).

Figura 1: *Aspergillus fumigatus*. A) Conidióforo. B) Conídios em germinação (Sullivan et al., 2005).

A. fumigatus, assim como outras espécies fúngicas clinicamente importantes, tem sido tradicionalmente considerado um organismo assexual. Entretanto, estudos recentes têm mostrado evidências de que esse fungo apresenta também um ciclo reprodutivo sexual totalmente funcional (O’Gorman et al., 2009).

1.3 - Patogênese

O gênero *Aspergillus* compreende os mais importantes fungos filamentosos que, sob condições específicas, são capazes de causar sérias infecções em humanos. O termo geral que designa uma doença que pode ser causada por agentes etiológicos pertencentes a esse gênero é aspergilose. Aproximadamente 40 espécies de *Aspergillus* têm sido associadas com infecções em humanos (Klich, 2006); entretanto, a grande maioria dos casos de aspergilose é causada por apenas algumas espécies, especialmente *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus* e *A. flavus* (Sullivan et al., 2005).

O ciclo de vida infeccioso do *Aspergillus* se inicia com a produção de conídios, os quais são facilmente dispersos pelo ar (Falvey & Streifel, 2007; Morris et al., 2000). A rota primária da infecção em humanos é através da inalação desses conídios, seguida por sua deposição nos bronquíolos ou espaços alveolares. Em indivíduos saudáveis, os conídios que não são removidos pelo clearance mucociliar encontram as células epiteliais ou os macrófagos alveolares, os quais são responsáveis pela fagocitose e morte dos conídios. Além disso, os macrófagos iniciam uma resposta pró-inflamatória, a qual recruta neutrófilos para o local da infecção. Os conídios que escapam da morte pelos macrófagos e germinam, se tornam alvo dos neutrófilos, os quais são capazes de destruir as hifas (Dagenais & Keller, 2009).

Apesar de a principal forma de infecção do *A. fumigatus* afetar o trato respiratório, outros locais de infecção como pele, peritônio, ossos, olhos, entre outros, já foram descritos em pacientes saudáveis e imunocomprometidos (Denning, 1998; Pitt, 1994).

As formas clínicas que se desenvolvem durante uma infecção por *Aspergillus* incluem as doenças alérgicas como asma, sinusite alérgica e alveolite, as quais ocorrem por exposição aos conídios ou antígenos de *Aspergillus* na ausência de colonização pelo micélio. Por outro lado, as formas mais graves, como a aspergilose alérgica bronco-pulmonar, aspergiloma e aspergilose invasiva envolvem o crescimento e a colonização pelo micélio (Bodey & Vartivarian, 1989).

A aspergilose pulmonar invasiva, forma mais importante de aspergilose, é uma síndrome cujas características proeminentes incluem o crescimento de filamentos fúngicos no interior do parênquima pulmonar, angioinvasão, trombose intravascular, infarto tecidual e, ocasionalmente, disseminação hematógena (Ben-Ami *et al.*, 2010). O risco de desenvolvimento dessa doença resulta de uma disfunção nos sistemas de defesa do hospedeiro em combinação com atributos do fungo que permitem sua sobrevivência e crescimento no ambiente pulmonar (Schaffner *et al.*, 1982). Existem algumas características que podem ser potenciais fatores de virulência para esse fungo, como por exemplo, termotolerância, resistência ao estresse oxidativo, presença de moléculas de adesão na parede celular,

produção de pigmentos e secreção de enzimas hidrolíticas e toxinas (Abad *et al.*, 2010). Entretanto, a maioria dessas características está envolvida com a proteção do fungo contra condições ambientais adversas e seu papel na patogenicidade ainda não está claro (Alp & Arikan, 2008).

A evolução da infecção pelo *A. fumigatus* para aspergilose invasiva necessita de processos de germinação dos conídios, os quais são essenciais para o ciclo celular e cruciais para o estabelecimento da infecção. A germinação dos conídios está diretamente relacionada com a atividade mitocondrial, a qual se encontra ativa desde os estágios iniciais desse processo para a produção de energia na forma de ATP (Taubitz *et al.*, 2007).

A biologia do *A. fumigatus* ainda é pouco conhecida, mas acredita-se que o esclarecimento de sua sequência genômica (Nierman *et al.*, 2005) possa auxiliar na elucidação dos mecanismos de patogenicidade desse fungo. Além disso, a identificação de fatores de virulência e o reconhecimento de mecanismos de patogenicidade podem levar ao desenvolvimento de novas terapias antifúngicas eficientes.

1.4 - Função mitocondrial

A mitocôndria é uma das mais complexas e importantes organelas encontradas no citoplasma das células eucarióticas e executa uma grande variedade de processos bioquímicos,

incluindo produção de energia, controle redox, homeostase do cálcio e diversas vias metabólicas e biossintéticas (Echtay, 2007). Dentre as muitas funções descritas para as mitocôndrias, a mais significativa é a produção de energia celular através da fosforilação oxidativa.

A fosforilação oxidativa acopla o transporte de elétrons, através da cadeia transportadora de elétrons (CTE), ao bombeamento ativo de prótons através da membrana mitocondrial interna e à formação de ATP pelo complexo F_1F_o -ATP sintetase. Em mamíferos, o sistema responsável pela fosforilação oxidativa é formado por cinco grandes complexos enzimáticos presentes na membrana mitocondrial interna: complexo I (NADH desidrogenase), complexo II (succinato desidrogenase), complexo III (ubiquinona citocromo c oxidorreductase), complexo IV (citocromo oxidase) e complexo V (F_1F_o -ATP sintetase) (Nelson & Cox, 2005).

A oxidação de moléculas de nutrientes reduzidas como carboidratos, lipídios e proteínas, através do metabolismo celular, fornece elétrons na forma de cofatores reduzidos, NADH e $FADH_2$, os quais doam elétrons à CTE. O movimento dos elétrons entre os componentes da CTE é dirigido por um potencial redox. Os equivalentes redutores do NADH são transferidos inicialmente à NADH desidrogenase (complexo I) e o succinato é oxidado pela succinato desidrogenase ligada a FAD (complexo II). Os complexos I e II, então, transferem seus elétrons à ubiquinona, sendo os mesmos transferidos

sequencialmente aos complexos III, citocromo *c*, complexo IV e finalmente ao oxigênio, com formação de água (Nelson & Cox, 2005).

Os complexos I, III e IV bombeiam prótons através da membrana interna, da matriz para o espaço intermembranas, à medida que os elétrons são transportados pela cadeia respiratória. Isso produz uma diferença de potencial eletroquímico através da membrana mitocondrial interna conhecido como força próton motora, consistindo principalmente de um gradiente elétrico (potencial de membrana) e um gradiente químico (diferença de pH). De acordo com o modelo quimiosmótico de Mitchell em associação com o do acoplamento conformacional de Boyer, a energia livre liberada no retorno do H^+ à matriz mitocondrial induz uma alteração conformacional do componente F_1 da F_1F_0 -ATP sintetase (complexo V), liberando o ATP formado em seus sítios catalíticos, a partir de ADP e fosfato inorgânico (P_i) (Boyer *et al.*, 1977; Mitchell, 1961) (Figura 2).

Figura 2: Cadeia respiratória mitocondrial. CI a CV: complexos I a V; Q: ubiquinona; Pi: fosfato inorgânico; c: citocromo *c* (Adaptado de Rotig & Munnich, 2003).

Além do seu papel central no metabolismo energético, as mitocôndrias são as principais fontes de espécies reativas de oxigênio (EROs) e geralmente têm um importante papel em mecanismos fisiológicos de morte celular. Dessa forma, a disfunção mitocondrial tem sido associada com apoptose, envelhecimento, obesidade e condições patológicas diversas como câncer, diabetes e desordens neurodegenerativas como as doenças de Parkinson e Alzheimer (Finkel & Holbrook, 2000; Green & Reed, 1998; Halliwell & Gutteridge, 1999).

1.5 - Componentes alternativos

A cadeia respiratória de mamíferos, plantas, fungos, protozoários e bactérias, além dos sistemas convencionais de transferência de elétrons (complexos I a V), apresentam vias respiratórias alternativas (Nelson & Cox, 2005) (Figura 3).

Figura 3: Cadeia respiratória mitocondrial de plantas. Nos retângulos estão destacados os componentes das vias alternativas mitocondriais. (Adaptado de Rasmusson & Müller, 2006).

As mitocôndrias de plantas e fungos apresentam uma NADH desidrogenase (NDH) insensível à rotenona (inibidor do complexo I), a qual transfere elétrons do NADH presente na matriz mitocondrial diretamente para a ubiquinona, contornando o complexo I e seu concomitante bombeamento de prótons. Além dessa NADH desidrogenase alternativa interna, as mitocôndrias de plantas e fungos podem apresentar ainda uma NADH desidrogenase voltada para a face externa da membrana mitocondrial interna, a qual transfere elétrons do NAD(P)H presente no espaço intermembranas para a ubiquinona, contornando novamente o complexo I (Kerscher, 2000; Michalecka et al., 2004; Rasmusson et al., 1999).

Uma ubiquinol oxidase resistente a cianeto (oxidase alternativa - AOX) transfere elétrons da ubiquinol diretamente para o oxigênio, contornando dois passos nos quais ocorre bombeamento de prótons para o espaço intermembranas

(complexos III e IV). Assim, a energia que deveria ser conservada na forma de ATP é liberada como calor (Affourtit & Moore, 2004; Magnani et al., 2007; Milani et al., 2001; Moore et al., 2002; Suzuki et al., 2004).

A proteína desacopladora (UCP) é encontrada em mitocôndrias do tecido adiposo marrom e de alguns tecidos não-termogênicos em mamíferos, plantas, fungos e protozoários. UCPs estão localizadas na membrana mitocondrial interna, e sua atividade dissipa o gradiente eletroquímico de prótons gerado pela respiração, produzindo calor ao invés de ATP (Echtay, 2007; Jarmuszkiewicz et al., 2000; Jarmuszkiewicz et al., 2010).

A mitocôndria de *A. fumigatus* foi caracterizada em nosso laboratório, sendo demonstrada a presença dos complexos I-V. Além disso, foi sugerida a presença de componentes alternativos mitocondriais, como oxidase alternativa, NADH desidrogenase alternativa e proteína desacopladora (Tudella et al., 2004). Pouco se sabe sobre o papel fisiológico desses componentes alternativos, mas estudos sugerem que eles estejam envolvidos com o processo de adaptação desses organismos a ambientes instáveis, como estresse ao frio, estresse oxidativo, condições anaeróbicas e variações de temperatura (Amora et al., 2000; Calegario et al., 2003; Hanqing et al., 2010; Kimura et al., 2010; Sierra-Campos et al., 2009).

1.6 - Proteínas desacopladoras

O transporte de metabólitos, nucleotídeos e cofatores enzimáticos através da membrana mitocondrial interna é realizado por membros da família de transportadores mitocondriais (Palmieri, 2004). Os membros dessa família apresentam uma estrutura tripartida consistindo de três sequências repetidas em *tandem* de aproximadamente 100 aminoácidos cada uma. Cada repetição contém duas regiões hidrofóbicas que atravessam a membrana como α -hélices, as quais são conectadas por um longo *loop* hidrofílico, localizado no interior da matriz (Palmieri, 2004).

As proteínas desacopladoras são membros da família de transportadores mitocondriais, ativadas por ácidos graxos livres e sensíveis a nucleotídeos de purina, que medeiam o fluxo de prótons através da membrana mitocondrial interna (Vercesi, 2001). Essas proteínas dissipam o gradiente eletroquímico de prótons, gerado pela CTE durante a respiração, na forma de calor (Nicholls & Rial, 1999), levando a um rápido consumo de oxigênio. Dessa forma, os prótons retornam à matriz mitocondrial sem passar pela ATP sintetase (Nicholls & Locke, 1984).

As proteínas desacopladoras são proteínas integrais de membrana que apresentam uma massa molecular variando de 30 a 33 kDa (Vercesi *et al.*, 2006). A primeira proteína desacopladora, UCP1 (também denominada termogenina) foi identificada em 1976 no tecido adiposo marrom, no qual ela

participa do processo de termogênese adaptativa (Ricquier & Kader, 1976). Sob condições não-termogênicas, os nucleotídeos de purina mantêm a UCP1 inibida. A geração de calor no tecido adiposo marrom é desencadeada pela liberação de noradrenalina. Esse hormônio inicia uma cascata lipolítica que leva à liberação de ácidos graxos. Esses ácidos graxos possuem duas funções: servem como substratos para a respiração e como ativadores da UCP1 (Jimenez-Jimenez *et al.*, 2006).

Com a identificação de UCP em plantas superiores em 1995 (Vercesi *et al.*, 1995), foi descoberto que essas proteínas estão amplamente distribuídas em organismos eucariotos, sendo as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* a única exceção, as quais não possuem em seu genoma uma sequência que codifica para essa proteína (el Moualij *et al.*, 1997). A presença generalizada de UCP em eucariotos indica que essa proteína apresente outras funções além da termogênese (Vercesi *et al.*, 2006). Essa presença ubíqua sugere que o desacoplamento fisiológico da fosforilação oxidativa possa ser uma estratégia geral adotada pelos organismos vivos para modular a eficiência energética (Jimenez-Jimenez *et al.*, 2006).

Após a descoberta das proteínas desacopladoras de plantas, genes que codificam para quatro UCPs adicionais de mamíferos foram identificados: UCP2 (Fleury *et al.*, 1997), UCP3 (Boss *et al.*, 1997), UCP4 (Mao *et al.*, 1999) e BMCP1/UCP5 (Sanchis *et al.*, 1998). O papel fisiológico e o mecanismo molecular de transporte e regulação desses quatro homólogos ainda são

incertos. Estudos sugerem que essas proteínas poderiam ser parte de um sistema de defesa antioxidante das células (Cannon *et al.*, 2006; Krauss *et al.*, 2005; Vercesi *et al.*, 2006). As proteínas desacopladoras podem estar relacionadas com diferentes processos fisiológicos como termogênese, oxidação de ácidos graxos, velocidade da disponibilidade de glicose, secreção de insulina, produção de espécies reativas de oxigênio, apoptose e envelhecimento (Argyropoulos & Harper, 2002; Chan *et al.*, 2010).

Nos últimos anos, a atividade de UCPs foi também encontrada em organismos unicelulares, sendo a UCP da ameba primitiva *Acanthamoeba castellanii* a primeira a ser descoberta (Jarmuszkiewicz *et al.*, 1999). Posteriormente, foram identificadas e caracterizadas proteínas desacopladoras de fungos como *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* (Cavalheiro *et al.*, 2004; Jarmuszkiewicz *et al.*, 2000) e de protozoários como *Plasmodium berghei*, *Plasmodium yoelii yoelii* e *Dictyostelium discoideum* (Jarmuszkiewicz *et al.*, 2002; Uyemura *et al.*, 2000; Uyemura *et al.*, 2004). Entretanto, pouco se sabe sobre as sequências gênicas que codificam para essas proteínas em eucariotos inferiores. Recentemente, foi identificada pela primeira vez em um organismo unicelular, uma sequência gênica que confere uma atividade UCP-like à levedura *Yarrowia lipolytica* (Luevano-Martinez *et al.*, 2009).

A cadeia respiratória mitocondrial do fungo *A. fumigatus* foi estudada em 2004, sendo evidenciada uma atividade UCP-like

através de estudos de medidas de respiração mitocondrial e potencial de membrana (Tudella *et al.*, 2004). Entretanto, até o momento, nenhuma sequência gênica que codifica para essa proteína havia sido identificada nesse microrganismo.

As funções da UCP em organismos unicelulares ainda não estão totalmente entendidas. O papel fisiológico dessa proteína em fungos e protozoários pode estar relacionado com a regulação do metabolismo energético e com o controle da produção de EROs pela mitocôndria, influenciando na resposta ao estresse (Jarmuszkiewicz *et al.*, 2010).

As UCPs de mamíferos e de plantas são ativadas por ânion superóxido através de um mecanismo no qual esse composto, presente na matriz mitocondrial, promove a liberação de ferro de proteínas que contêm centros ferro-enxofre. Os íons de ferro reagem com o ânion superóxido formando radicais hidroxilas que, por sua vez, promovem a geração de radicais com centro de carbono, os quais iniciam a peroxidação lipídica, formando produtos de degradação como o 4-hidroxinonenal (HNE) (Vercesi *et al.*, 2006).

A translocação de prótons do espaço intermembranas para a matriz mitocondrial, por diminuir o gradiente eletroquímico de prótons, resulta em um decréscimo na produção do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), atenuando, assim, o dano celular induzido por EROs à custa de uma diminuição na eficiência da fosforilação oxidativa (Chan *et al.*, 2010).

1.7 - Potencial quimioterapêutico

Apesar do crescente aumento da incidência de infecções provocadas por fungos, apenas algumas classes de drogas, com um limitado número de alvos, estão disponíveis para a terapia antifúngica (Martins et al., 2011). O desenho racional e a implementação de novas terapias efetivas são complicados devido, principalmente, às similaridades básicas existentes entre a organização celular do patógeno e de seu hospedeiro. Muitas drogas antifúngicas são tóxicas para o paciente, o que impede o seu uso por tempo prolongado (Ramsdale, 2008).

A maioria das drogas antifúngicas utilizadas atualmente tem como principais alvos: o ergosterol, principal esterol componente das membranas dos fungos; a biossíntese do ergosterol; ou a biossíntese do (1,3)- β -D-glicana, um importante componente da parede celular de fungos (Kauffman, 2006; Odds et al., 2003). As principais classes desses antifúngicos incluem os polienos, azóis, alilaminas, 5-fluorocitosina e equinocandinas (Sanglard & Bille, 2002).

O polieno antifúngico anfotericina B tem sido usado clinicamente por mais de trinta anos (Brajtburg et al., 1990). O principal modo de ação da anfotericina B, assim como de outros antifúngicos polienos, baseia-se em sua afinidade pelo ergosterol. A integração da anfotericina B na membrana celular resulta na formação de poros aquosos, os quais levam a uma alterada permeabilidade da membrana plasmática, a qual é

subsequentemente acompanhada pela perda de cátions, levando à morte celular (Bolard, 1991). Entretanto, os polienos também apresentam uma forte afinidade por esteróis presentes na membrana plasmática do hospedeiro, especialmente pelo colesterol (Bolard & Milhaud, 1996), o que pode ocasionar uma série de efeitos colaterais (Aramwit et al., 2000).

Os triazóis são as maiores classes de drogas antifúngicas de uso clínico, implantadas a aproximadamente duas décadas. Eles são compostos sintéticos heterocíclicos inibidores do citocromo P450_{14DM}, o qual catalisa o último passo na biossíntese do ergosterol. A ação antifúngica do triazol é geralmente fungistática contra leveduras, como espécies do gênero *Candida*, mas fungicida contra infecções por *Aspergillus* (Cowen & Steinbach, 2008).

As equinocandinas, uma classe de lipohexapeptídeos cíclicos, são as mais recentes adições para o arsenal de drogas antifúngicas. Elas atuam como inibidores não-competitivos da β -1,3-glicana sintase a qual é requerida para a síntese de polímeros de glicana, o principal componente da parede celular fúngica. A caspofungina, a primeira forma de equinocandina disponível comercialmente, possui atividade fungicida contra *Candida*, *Aspergillus*, *Histoplasma*, *Coccidioides* e *Blastomyces*. A micafungina é um fungicida contra leveduras (Tawara et al., 2000), entretanto apresenta apenas propriedades fungistáticas contra *Aspergillus* (Ramsdale, 2008).

O desenvolvimento de novas drogas, mais específicas para os microrganismos oportunistas e que apresentem menor toxicidade para o paciente, necessita de um melhor entendimento das interações patógeno-hospedeiro, bem como do estabelecimento e validação de novos alvos quimioterapêuticos (Cottrell & Doering, 2003).

Os sistemas metabólicos de parasitas, por possuírem um papel essencial na sobrevivência e adaptação a ambientes hostis como anaerobiose e estresse oxidativo, são alvos atrativos para a terapia antifúngica. Outro fator de importância terapêutica é a diferença entre os sistemas metabólicos de parasitas e do hospedeiro, fato que possibilita o desenvolvimento de fármacos mais seletivos e menos tóxicos (Nihei *et al.*, 2002; Nihei *et al.*, 2003). Nesse contexto, as mitocôndrias são potenciais alvos para a terapia antifúngica. Além de serem responsáveis pela produção de mais de 90% do ATP celular, essas organelas possuem diversas funções como produção e regulação de EROs, homeostase do cálcio, morte celular programada e importantes processos metabólicos (Newmeyer & Ferguson-Miller, 2003; Pagliarini & Dixon, 2006).

Dessa forma, a identificação e caracterização da proteína desacopladora de *A. fumigatus* pode contribuir para o entendimento de suas funções fisiológicas nesse fungo. Além disso, o possível envolvimento da UCP na formação de EROs na mitocôndria pode ser um alvo atrativo no desenvolvimento racional de quimioterápicos.

2 - objetivos

2.1 - Objetivo geral

Estudar as funções da proteína UCP-like de *A. fumigatus*, através de técnicas moleculares e bioquímicas.

2.2 - Objetivos específicos

- Clonar e sequenciar o gene que codifica a UCP-like de *A. fumigatus*;
- Expressar em leveduras *S. cerevisiae* a proteína UCP-like recombinante de *A. fumigatus*;
- Realizar estudos bioenergéticos através da medida do potencial de membrana utilizando-se esferoplastos recombinantes de *S. cerevisiae*;
- Expressar em *E. coli* e purificar a proteína recombinante;
- Realizar a reconstituição lipossomal da proteína purificada;
- Avaliar os níveis de expressão da proteína UCP-like na presença de paraquat e menadiona.

3 - Material e Métodos

3.1 - Organismos

3.1.1 - *A. fumigatus*

O isolado clínico de *A. fumigatus* foi gentilmente cedido pela Dra. Cláudia O. Rodrigues da University of Miami, EUA. O cultivo do *A. fumigatus* foi realizado em meio sólido YG (glicose 2,0% (p/v), extrato de levedura 0,5% (p/v), solução de elementos traços 0,1% (v/v), ágar 2,0% (p/v)), a 30°C, por 3 a 4 dias e, após o crescimento, os conídios da cultura foram recuperados com PBS e filtração em lã de vidro. As suspensões obtidas foram mantidas a 4°C para estoque ou utilizadas em experimentos.

3.1.2 - Bactérias

As bactérias *Escherichia coli* das linhagens DH10b, genótipo: F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *endA1* *araD139* Δ (*ara*, *leu*)7697 *galU* *galK* λ - *rpsL* *nupG*; Mach1TM-T1^R, genótipo: F⁻ ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *hsdR*(*r_K*⁻*m_K*⁺) Δ *recA1398* *endA1* *tonA*, foram utilizadas como receptoras para transformação, clonagem e propagação de plasmídeos.

As linhagens de *E. coli* Rosetta(DE3)pLysSTM, genótipo: pLysS F⁻*ompT* *hsdS_B* (*r_B*⁻*m_B*⁻)*gal* *dcm* *lacY1*(DE3)pLySSRARE(Cm^R); BL21(DE3), genótipo: F⁻ *ompT* *hsdS_B* (*r_B*⁻*m_B*⁻) *gal* *dcm* (DE3) foram utilizadas para a expressão da proteína UCP-like recombinante.

3.1.3 - *Saccharomyces cerevisiae*

As leveduras *S. cerevisiae* da linhagem INVSc1, genótipo: MATa *his3Δ1 leu2trp1-289 ura3-52*/MATα *his3Δ1 leu2 trp1-289 ura3-52*; fenótipo: His⁻, Leu⁻, Trp⁻, Ura⁻, foram utilizadas para a expressão do gene da UCP-like de *A. fumigatus*.

3.2 - Extração de DNA genômico de *A. fumigatus*

O DNA de *A. fumigatus* foi extraído pelo método descrito por van Burik e colaboradores (1998), com algumas modificações. Os conídios de uma cultura de 48 horas, crescida em meio sólido YG, foram recuperados com PBS estéril e filtração em lã de vidro. Esses conídios foram incubados em meio YG líquido sob agitação constante de 180 rpm por 12 a 16 horas a 30°C. Após esse período, as células foram coletadas por filtração a vácuo, congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e trituradas com gral e pistilo. O procedimento de congelamento e maceração foi repetido até a obtenção de um pó homogêneo. Em seguida, foi adicionado tampão de extração de DNA para *A. fumigatus*. A mistura foi incubada a 56°C por 12 horas. Após esse período, foi adicionado um volume igual de fenol:clorofórmio 1:1 (v/v) e a mistura foi homogeneizada por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 12.000 g, a 4°C e a fase aquosa foi recolhida e transferida para um tubo novo. Foi adicionado, então, o mesmo

volume de clorofórmio e novamente as amostras foram agitadas e centrifugadas. A fase aquosa foi recolhida e a ela foi adicionado acetato de sódio pH 5,2 para uma concentração final de 0,3 mol/L. Em seguida, adicionou-se 2 volumes de etanol absoluto gelado e os tubos foram incubados a -20°C para a precipitação dos ácidos nucleicos. Após 12 a 16 horas, a mistura foi transferida para microtubos e centrifugada por 20 min a 12.000 g, a 4°C. Os sedimentos foram lavados com etanol 70% (v/v) e os tubos foram centrifugados novamente por 2 minutos. Após secagem à temperatura ambiente, o DNA foi ressuspenso em água deionizada.

A determinação da concentração de DNA foi realizada espectrofotometricamente em comprimento de onda de 260 nm, utilizando o aparelho NanoDrop 1000 (Thermo Scientific), e a sua integridade foi verificada em gel de agarose 1,0% (p/v).

3.3 - Extração de RNA de *A. fumigatus*

O RNA foi extraído utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Os conídios de uma cultura crescida em meio sólido YG por aproximadamente 48 horas foram recuperados com PBS estéril e filtração em lã de vidro. Esses conídios foram incubados em meio YG líquido sob agitação constante de 180 rpm por 12 a 16 horas a 30°C. Após esse período, as células foram coletadas

por filtração a vácuo, congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e maceradas com gral e pistilo. O procedimento de congelamento e maceração foi repetido até a obtenção de um pó homogêneo. Em seguida, foi adicionado o reagente TRIzol® na proporção 3:1 (v/v) e a mistura foi homogeneizada. Posteriormente, a mistura foi incubada à temperatura ambiente por 5 minutos e, em seguida, foi centrifugada a 10.000 *g* por 12 minutos a 4°C. Ao sobrenadante foi adicionado fenol na proporção 1:1 (v/v) e a mistura foi homogeneizada. Em seguida, foi realizada uma nova centrifugação e, ao sobrenadante foi adicionado clorofórmio na proporção 0,2:1 (v/v). A mistura foi homogeneizada por inversão e centrifugada novamente. O sobrenadante foi recolhido e a ele foi adicionado isopropanol na proporção de 0,5:1 (v/v). Em seguida, a mistura foi incubada a -80°C para a precipitação dos ácidos nucleicos. Após 12 a 16 horas, foi realizada uma centrifugação a 3.000 *g* por 10 min a 4°C. O sedimento foi lavado com etanol 70% (v/v) preparado com água-DEPC e centrifugado a 3.000 *g* por 5 minutos a 4°C. Após a secagem, o sedimento foi ressuspenso em água tratada com DEPC.

A determinação da concentração de RNA foi realizada espectrofotometricamente em comprimento de onda de 260 nm, utilizando o aparelho NanoDrop 1000 (Thermo Scientific), e a sua integridade foi verificada em gel de agarose 1,2% (p/v) sob condições desnaturantes, segundo Sambrook e colaboradores (1989). A presença de bandas intactas referentes aos rRNAs 28S

e 18S foi utilizada como critério para verificar a qualidade da extração.

3.4 - Reação da transcriptase reversa (RT)

Os RNAs extraídos foram tratados com DNase para eliminar possíveis contaminações com DNA. Cerca de 20 µg de RNA foram incubados a 37°C por 1 hora e 30 minutos com 5 U de DNase I livre de RNase (Promega) em um volume final de 50 µL contendo DTT 5 mmol/L e o tampão apropriado da enzima (Tris-HCl 40 mmol/L pH 8,0; MgSO₄ 10 mmol/L; CaCl₂ 1 mmol/L, fornecido pelo fabricante). O RNA foi extraído utilizando-se uma mistura de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico na proporção de 25:24:1 (Sambrook *et al.*, 1989) e precipitado com acetato de sódio e etanol absoluto conforme descrito anteriormente.

O RNA livre de DNA foi ressuspenso em 12 µL de água-DEPC e submetido à reação de transcrição reversa para a síntese de cDNA utilizando-se a enzima *SuperScriptTM* III Reverse Transcriptase (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Em um microtubo foram colocados 1 µL de uma mistura equimolar de dNTPs 10 mmol/L, 1 µL de oligo (dT)₁₂₋₁₈ 0,5 µg/µL e aproximadamente 20 µg de RNA. Cada amostra foi incubada a 65°C por 5 minutos e então colocada em gelo por pelo menos 1 minuto. Em seguida, foram adicionados 4 µL de tampão 5X FS Buffer (contendo Tris-HCl 250 mmol/L pH 8,3; KCl 375 mmol/L

e MgCl_2 15 mmol/L), 1 μL de DTT 0,1 mol/L e 1 μL de *SuperScriptTM* III RT (Invitrogen). Esses reagentes foram gentilmente misturados e incubados a 50°C por 50 minutos. A reação foi finalizada com uma incubação a 70°C por 15 minutos. Após a reação, foi adicionado RNase A em uma concentração final de 10 $\mu\text{g/mL}$ e a mistura foi incubada a 37°C por aproximadamente 6 horas, para a eliminação de possíveis traços de RNA que não foram transcritos.

3.5 - Eletroforese em gel de agarose

As eletroforeses em gel de agarose foram realizadas de acordo com Sambrook e colaboradores (1989). Os géis foram preparados dissolvendo-se agarose em tampão TAE (Tris-acetato-EDTA). As amostras foram aplicadas no gel adicionadas de tampão de amostra para DNA. As corridas eletroforéticas foram processadas em cuba contendo tampão TAE, sob uma voltagem de 90-130 V, durante aproximadamente 50 minutos. Os géis foram corados com brometo de etídeo e as bandas visualizadas sob luz ultravioleta.

3.6 - Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados a partir do gene que codifica para a possível UCP de *A. fumigatus*

(Tabela 1), sequenciado pelo projeto genoma e depositado no GenBank sob o número de acesso XM_750738.2 (AFUA_2G14980), para amplificação e clonagem no plasmídeo pTZ57R/T (Fermentas). Nesse plasmídeo foram clonados tanto a sequência amplificada a partir do DNA genômico quanto a sequência amplificada a partir do cDNA de *A. fumigatus*.

Tabela 1: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação do gene XM_750738.2.

Oligonucleotídeos	
Senso	5'-ATGTCGGCCGGGGGAGAAC-3'
Anti-senso	5'-TCATTCAGCGACGCGGAA-3'

Para a expressão da proteína recombinante em bactérias, a sequência amplificada a partir do cDNA de *A. fumigatus* utilizando-se os oligonucleotídeos da Tabela 1 foi diretamente clonada no vetor de expressão pET SUMO (Invitrogen).

Para a expressão da proteína recombinante em leveduras, através do vetor pYES2 (Invitrogen), a sequência foi amplificada a partir do cDNA de *A. fumigatus* utilizando-se os oligonucleotídeos da Tabela 2, os quais foram desenhados contendo sítios de restrição para as enzimas *EcoRI* e *NotI*. Além disso, para uma expressão eficiente, o gene foi clonado e expressado carregando uma sequência consensual de KOZAK. Em eucariotos, a sequência KOZAK modula a tradução do mRNA,

podendo aumentar a eficiência da expressão da proteína em leveduras (Kozak, 1986).

Tabela 2: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação do gene XM_750738.2 para posterior clonagem no vetor pYES2.

Oligonucleotídeos	
Senso	5'-GCCCTTGAATTCGCACATCACA AGCATGGCG GCCGGGGGAG-3' (<i>EcoRI</i>)
Anti-senso	5'-GTTGTTTGCGGCCGCGTCATTCAGCGAC GCG- 3' (<i>NotI</i>)

Os sítios de restrição estão sublinhados e a sequência consenso KOZAK está em negrito.

3.7 - Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As amplificações foram realizadas de acordo com Bej e Mahbubani (1994) e Saiki e colaboradores (1985), utilizando-se um Controlador Termal Programável (Mastercycler epgradient Eppendorf). O DNA genômico ou o cDNA de *A. fumigatus* (cerca de 150 ng) foram incubados em uma mistura de reação contendo $MgCl_2$ (ou $MgSO_4$) 3,0 mmol/L, oligonucleotídeos senso e anti-senso 0,4 μ mol/L cada, uma mistura equimolar de dNTPs 0,2 mmol/L, 1,5 U da enzima *Taq* DNA Polymerase recombinante (Invitrogen) ou *Platinum[®]* *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) e seu respectivo tampão de reação. Inicialmente, o DNA foi desnaturado a 94°C por 2 minutos. As condições de amplificação foram: 30 ciclos de 94°C por 2 minutos, 60°C por 1 minuto e

72°C (ou 68°C para o caso da *Taq* High Fidelity) por 1 minuto e 30 segundos.

3.8 - Inserção do gene da UCP-*like* em plasmídeo de clonagem

Os fragmentos de DNA e cDNA amplificados foram extraídos do gel de agarose utilizando-se o kit QIAquick® Gel Extraction (QIAGEN), de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração, o DNA foi quantificado espectrofotometricamente em comprimento de onda de 260 nm, utilizando o aparelho NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). Após a purificação do fragmento de tamanho esperado, o mesmo foi clonado no vetor pTZ57R/T (Fermentas) (Figura 4), utilizando-se o kit InstAclone™ PCR Cloning (Fermentas), de acordo com as recomendações do fabricante, para manutenção e análise da sequência do gene.

Figura 4: Mapa do vetor pTZ57R/T (Fermentas).

3.9 - Inserção do gene da UCP-like em plasmídeos de expressão

Os fragmentos de cDNA da UCP-like de *A. fumigatus* foram clonados em vetores de expressão tanto para sistema eucarioto (utilizando-se leveduras *S. cerevisiae* como hospedeiras) quanto para sistema procarioto (utilizando-se bactérias *E. coli* como hospedeiras).

Para a expressão da proteína recombinante em *S. cerevisiae* INVSc1 foi utilizado o vetor pYES2 (Invitrogen) (Figura 5). Inicialmente, o gene foi clonado no vetor pTZ57R/T utilizando-se oligonucleotídeos contendo sítios de restrição para as enzimas *EcoRI* e *NotI*. Em seguida, foram realizadas reações de clivagem com essas enzimas tanto da construção

pTZ/UCP_cDNA_Afu quanto do vetor pYES2 vazio. Os fragmentos referentes à sequência da UCP-like e ao vetor pYES2, com extremidades coesivas para *EcoRI* e *NotI*, foram purificados a partir do gel de agarose e ligados utilizando-se a enzima T4 DNA Ligase (Fermentas), na proporção molar de 3:1 (inserto:vetor), de acordo com as recomendações do fabricante.

Figura 5: Mapa do vetor pYES2 (Invitrogen).

Para a expressão da proteína recombinante em *E. coli* BL21(DE3), foi utilizado o plasmídeo pET SUMO (Invitrogen) (Figura 6). O produto de PCR purificado foi diretamente clonado nesse vetor, de acordo com as especificações do fabricante.

Figura 6: Mapa do vetor pET SUMO (Invitrogen).

3.10 - Preparação de bactérias competentes

Uma colônia de *E. coli* (DH10b ou BL21(DE3)) foi inoculada em 10 mL de meio LB e incubada durante a noite a 37°C com agitação de 200 rpm. Em seguida, a cultura foi diluída em uma proporção de 1:25 em 250 mL de meio SOB (triptona 2,0% (p/v), extrato de levedura 0,5% (p/v), NaCl 10 mmol/L, KCl 2,0 mmol/L, MgCl₂ 10 mmol/L), e incubada novamente até atingir uma DO_{600nm} de 0,6. Após esse tempo, a cultura foi transferida para tubos de 50 mL estéreis e incubadas em gelo por 10 minutos. Em seguida, as células foram centrifugadas a 2.500 *g* por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas cuidadosamente em 80 mL de solução TB gelada e

incubada em gelo por 10 minutos. Posteriormente, as células foram centrifugadas novamente nas mesmas condições anteriores e ressuspensas em 20 mL de solução TB gelada contendo 1,5 mL de DMSO. As células foram incubadas novamente em gelo por 10 minutos e foram aliquotadas de 100-200 μ L em microtubos e congeladas rapidamente em nitrogênio líquido. As bactérias competentes foram armazenadas a -80°C .

3.11 - Transformação de bactérias

A transformação de bactérias *E. coli* foi realizada por choque térmico, de acordo com Sambrook e colaboradores (1989). Inicialmente, as células competentes foram retiradas do freezer a -80°C e descongeladas em gelo. Foi adicionado meio volume da reação de ligação (ou cerca de 10 ng de DNA plasmidial purificado) a 50-100 μ L de células competentes. A mistura foi incubada em gelo por 30 minutos, seguida de choque térmico a 42°C por 30-45 segundos. Após esse tempo, as células foram colocadas em gelo novamente e foram adicionados 600 μ L de meio SOC. A suspensão de células foi incubada sob agitação de 200 rpm a 37°C por 1 hora. Em seguida, as células foram semeadas em meio LB sólido contendo o antibiótico apropriado e incubadas durante 16 a 18 horas em estufa a 37°C .

3.12 - PCR de colônia

Para as transformações realizadas com reações de ligação, os clones obtidos nas placas seletivas foram submetidos à confirmação da clonagem por PCR de colônia. Para isso, cada colônia foi inoculada na própria reação de amplificação do gene da *UCP-like*, nas mesmas condições descritas no item 3.7. Paralelamente a isso, foi realizado um novo repique das colônias testadas em meio LB contendo o antibiótico apropriado. As colônias positivas, ou seja, aquelas que continham o gene que codifica a *UCP-like*, foram inoculadas em 5-10 mL de meio LB adicionado de antibiótico para posterior manutenção em glicerol no *freezer* a -80°C e extração de DNA plasmidial.

3.13 - Preparação e sequenciamento dos DNAs plasmidiais selecionados

Os clones positivos selecionados para sequenciamento foram submetidos à extração de DNA plasmidial utilizando-se o Kit QIAprep[®] Miniprep (QIAGEN) e preparados para a reação de sequenciamento utilizando-se o kit BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems). Cerca de 250-500 ng de DNA plasmidial, 1 μL do reagente BigDye, contendo os dideoxiribonucleotídeos marcados, 2 μL do tampão de reação e 3,2 pmoles do oligonucleotídeo iniciador foram amplificados

por PCR utilizando o seguinte perfil termal: 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. O produto da amplificação foi precipitado com a adição de 2 µL de acetato de sódio 3,0 mol/L pH 5,2 e 50 µL de etanol absoluto, com incubação em gelo por cerca de 20 minutos. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 20.400 g por 20 minutos a 4°C e, após a lavagem do precipitado com etanol 70% (v/v), a amostra seca foi ressuspensa em tampão de carregamento (fornecido pelo fabricante). A reação de sequenciamento foi realizada segundo Sanger e colaboradores (1977) em um sequenciador automático modelo 3100 (Applied Biosystems), no Laboratório de Virologia, coordenado pelo Prof. Maurício Lacerda Nogueira, na Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.

3.14 - Preparação de leveduras competentes

Uma colônia isolada de *S. cerevisiae* da linhagem INVSc1 foi inoculada em 5 mL de meio YPD e incubada sob agitação de 200 rpm por 16 a 18 horas a 30°C. Após esse período, uma alíquota de 1 mL dessa cultura foi adicionada a 50 mL de meio YPD e a mesma permaneceu a 30°C, sob agitação constante de 200 rpm até atingir uma DO_{600nm} entre 0,4 e 0,6. Em seguida, as células foram centrifugadas a 800 g por 5 minutos e lavadas com 50 mL de tampão TE (Tris-HCl 10 mmol/L; EDTA 1 mmol/L pH 8,0). Posteriormente, as células foram novamente centrifugadas

por 5 minutos, ressuspensas em 1,5 mL de solução TE/LiAc (Tris-HCl 10 mmol/L; EDTA 1 mmol/L pH 8,0 e acetato de lítio 100 mmol/L) e incubadas sob agitação de 200 rpm por 60 minutos a 30°C.

3.15 - Transformação de leveduras

Foram selecionadas colônias contendo plasmídeos com o gene que codifica a UCP-*like* inserido em fase de leitura correta e sem nenhuma alteração de nucleotídeo. Esses plasmídeos (pYES2/UCP-*like*) foram utilizados para transformação em *S. cerevisiae*.

Para cada reação de transformação foram misturados 200 µL de suspensão de células competentes, cerca de 1-5 µg de DNA plasmidial e 200 µg de DNA de esperma de salmão desnaturado (Invitrogen). A mistura foi incubada por 30 minutos a 30°C, com agitação de 200 rpm e, posteriormente, foi adicionado 1,2 mL de solução contendo LiAc 100 mmol/L, PEG-3350 40% (p/v) e tampão TE. Após a homogeneização, a mistura foi incubada por 30 minutos a 42°C. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1.000 g por 5 minutos, lavadas com 1 mL de tampão TE, precipitadas novamente e ressuspensas em 100 µL de tampão TE. Finalmente, as células transformadas foram semeadas em placas contendo meio de cultura seletivo SC-URA⁻.

3.16 - Extração de DNA plasmidial de leveduras para transformação em *E. coli*

Para a liberação do DNA plasmidial de leveduras, os clones selecionados foram incubados a 30°C durante a noite em 1,5 mL de meio líquido SC-URA⁻. Essas culturas foram centrifugadas em microtubos por 1 minuto a 20.000 g. O sobrenadante foi descartado e os sedimentos celulares foram ressuspensos no líquido residual. Em seguida, adicionou-se 0,2 mL de uma solução contendo Triton X-100 2,0% (v/v), SDS 1,0% (p/v), NaCl 100 mmol/L, Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0 e EDTA 1,0 mmol/L. Posteriormente, 0,2 mL de uma mistura de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e 0,3 g de pérolas de vidro foram adicionados em cada tubo. Em seguida, os tubos foram agitados em vortex por 2 minutos e, logo após, foram centrifugados a 20.000 g por 5 minutos. Bactérias *E. coli* da cepa DH10b foram transformadas com 5 µL da fase aquosa.

3.17 - Indução da expressão e produção de esferoplastos de *S. cerevisiae*

Uma colônia transformada foi retirada da placa com meio de cultura SC-URA⁻ contendo glicose 2,0% (p/v) e incubada em meio líquido sob agitação de 200 rpm a 30°C durante a noite. Para a indução da expressão da proteína recombinante, essa cultura

foi diluída para uma DO_{600nm} de 0,4 em meio SC-URA⁻ contendo galactose 2,0% (p/v) e rafinose 1,0% (p/v) e incubada sob agitação de 200 rpm por 24 horas a 30°C. A expressão no plasmídeo pYES2 está sob o controle do promotor da galactose *GAL1* e, dessa forma, a indução da expressão foi realizada pela adição de galactose ao meio de cultura.

Os esferoplastos foram produzidos de acordo com Glab e colaboradores (1990), com algumas modificações. As células de *S. cerevisiae* foram coletadas do meio de cultura líquido (SC-URA⁻galactose/rafinose) por centrifugação a 3.000 g por 5 minutos à temperatura ambiente e lavadas duas vezes com água destilada. Em seguida, as células foram ressuspensas em tampão de pré-incubação na proporção de 4,0 mL de tampão para 1,0 g de células úmidas e incubadas sob agitação de 100 rpm por 30 minutos a 33°C.

Após a pré-incubação, as células foram lavadas duas vezes com água destilada e uma vez com tampão de digestão. Em seguida, foram ressuspensas em tampão de digestão na proporção de 5,0 mL do tampão para 1,0 g de células e adicionou-se 2,0 mg de zymolyase® 20T/grama de células, além de DTT 2 mmol/L. A digestão ocorreu sob agitação a 100 rpm por 45 minutos a 33°C. A formação de esferoplastos foi monitorada ao longo do tempo de digestão pela leitura da DO_{600nm} de diluições das células em água destilada (1:200). A lise celular pela diluição em água é acompanhada por uma diminuição da densidade ótica.

Após a digestão, as células foram centrifugadas a 9.000 g por 5 minutos a 4°C e lavadas duas vezes com tampão de digestão gelado. Posteriormente, o precipitado foi ressuspenso gentilmente em tampão de esferoplastos obtendo-se uma concentração de cerca de $3,0 \times 10^6$ esferoplastos/ μ L.

3.18 - Medida do potencial de membrana mitocondrial

A diferença de potencial de membrana dos esferoplastos de *S. cerevisiae* foi determinada monitorando-se as alterações na fluorescência da safranina O (concentração final de 10 μ M) conforme Petruzza e colaboradores (1992), em um espectrofluorímetro Hitachi - F4500, usando como comprimentos de onda de excitação e emissão 495 e 586 nm, respectivamente. O meio de reação utilizado foi o tampão de esferoplastos acrescido de MgCl_2 5 mmol/L em um volume final de 2 mL a 30°C.

3.19 - Indução em pequena escala da expressão da UCP-like em *E. coli*

Foram selecionados clones contendo plasmídeos com a região codificante para a UCP-like de *A. fumigatus* inserida em fase de leitura correta e sem alteração indesejada de nucleotídeos. Essa construção pET SUMO/UCP foram utilizadas para a transformação de *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS™ ou BL21(DE3), de acordo com o item 3.11.

Uma colônia transformada foi retirada da placa, inoculada em 10 mL de meio LB líquido contendo o antibiótico apropriado e incubada a 37°C por 16 horas sob agitação de 200 rpm.

Após esse período, 500 µL da cultura foram diluídos em 10 mL de meio TB, adicionado de glicose 1% (p/v), contendo o antibiótico apropriado e incubados sob as mesmas condições até a cultura atingir uma DO_{600nm} entre 0,4-0,6. Nesse momento, foi retirada uma alíquota de 500 µL (T_0), a qual foi utilizada como controle negativo da indução da expressão. Ao restante da cultura, adicionou-se IPTG (isopropil-β-D-tiogalactosídeo) em concentrações finais de 0,5 e 1 mmol/L para a indução da expressão da proteína recombinante. Após a adição do indutor da expressão, as culturas foram incubadas em diferentes temperaturas (25, 30 e 37°C) e alíquotas de 500 µL de cultura foram coletadas ao longo de 4 horas (T_1 , T_2 , T_3 e T_4). Essas amostras foram centrifugadas por 30 segundos na velocidade máxima da centrífuga e os sedimentos foram congelados a -20°C. Essas células foram posteriormente ressuspensas em tampão de amostra para SDS-PAGE. A fim de se normalizar a quantidade de proteínas entre as amostras, acrescentou-se 40 µL, 60 µL, 80 µL, 100 µL e 120 µL de tampão de amostra nas alíquotas T_0 , T_1 , T_2 , T_3 e T_4 , respectivamente.

3.20 - Expressão e purificação da UCP-like recombinante

Uma colônia de *E. coli*, cepa Rosetta(DE3)pLysS[™] ou BL21(DE3), transformada com a construção pET SUMO/UCP, foi inoculada em 5 mL de meio LB, na presença de kanamicina (50 µg/mL). Para expressões realizadas com a cepa Rosetta(DE3)pLysS[™], além de kanamicina, foi adicionado ao meio, cloranfenicol (35 µg/mL). Essa cultura foi incubada a 37°C durante 16 horas sob agitação de 200 rpm. Posteriormente, a cultura foi diluída em 1 L de meio TB, adicionado de antibiótico apropriado e glicose 1% (p/v), e incubada a 37°C até a atingir uma DO_{600nm} entre 0,4-0,6. Após esse tempo, adicionou-se IPTG em uma concentração final de 0,5 mmol/L e a cultura foi incubada a 25°C por 4 horas a 200 rpm. Em seguida, a cultura foi centrifugada a 10.000 g por 20 minutos. O precipitado obtido foi ressuspensão em tampão de lise contendo tampão fosfato de sódio 20 mmol/L pH 7,4, NaCl 0,5 mol/L, imidazol 40 mmol/L e glicerol 10% (v/v). Foi realizado um teste de solubilização da proteína, utilizando-se alíquotas de 500 µL de cultura induzida por 4 horas, adicionando-se aos sedimentos bacterianos diferentes detergentes em concentrações de 0,5 ou 1,0%. Foram testadas as seguintes condições:

- 1- Tampão de lise sem detergente;
- 2- Tampão de lise + Igepal 0,5% (v/v);
- 3- Tampão de lise + Igepal 1,0% (v/v);
- 4- Tampão de lise + Triton X-100 0,5% (v/v);

- 5- Tampão de lise + Triton X-100 1,0% (v/v);
- 6- Tampão de lise + CHAPS 0,5% (p/v);
- 7- Tampão de lise + CHAPS 1,0% (p/v);
- 8- Tampão de lise + SLS 0,5% (v/v);
- 9- Tampão de lise + SLS 1,0% (v/v).

Após a determinação do melhor detergente adicionado ao tampão de lise para se obter uma maior quantidade de proteína na forma solúvel, as células induzidas foram ressuspensas nesse tampão contendo um coquetel de inibidores de proteases (Sigma) e sonicadas 3 vezes com pulsos de 25 segundos (com intervalo de 10 segundos entre cada pulso no gelo), usando o sonicador Sonic Dismembrator Model 100 (Fisher Scientific). O lisado foi centrifugado a 13.000 g por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante obtido foi filtrado em membrana de 0,45 µm.

A purificação foi realizada utilizando cromatografia de afinidade acoplada a Bomba P-1 e coletor automático Frac-920 (Amersham Bioscience) com fluxo contínuo de 0,5 mL/min. O lisado total filtrado foi adicionado na coluna contendo aproximadamente 5 mL de resina Sefarose-Ni²⁺ (Amersham Bioscience), previamente equilibrada com tampão de lise e o primeiro fluxo foi coletado, correspondendo a proteínas que não ficaram retidas na coluna.

A coluna foi lavada com 40 mL de tampão de lise e, posteriormente, com esse mesmo tampão acrescido de diferentes concentrações de imidazol, formando um gradiente de eluição:

- 30 mL de tampão com imidazol 100 mmol/L;
- 30 mL de tampão com imidazol 150 mmol/L;
- 30 mL de tampão com imidazol 300 mmol/L;
- 20 mL de tampão com imidazol 500 mmol/L.

A identificação das frações contendo a proteína recombinante foi realizada através de análise por SDS-PAGE. As frações que continham a proteína purificada foram unidas, formando um único *pool*, o qual foi concentrado em coluna Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units (Millipore) com membrana que retém substâncias com peso molecular acima de 10 kDa. Esse mesmo concentrador foi utilizado para realizar diálise da proteína.

3.21 - SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio)

Para a análise das proteínas em SDS-PAGE, adicionou-se tampão de amostra e, em seguida, as mesmas foram desnaturadas por 5 minutos a 98°C. O gel de poliacrilamida-SDS foi produzido segundo Laemmli (1970). O gel de empilhamento foi preparado com concentração de 5% de acrilamida/bisacrilamida em tampão Tris-HCl 1 mol/L pH 6,8 e o gel de separação, com concentração variando de 8 a 12% (dependendo do tamanho da proteína de interesse), em Tris-HCl 1,5 mol/L pH 8,8. A eletroforese se processou com voltagem constante de 100 V,

durante aproximadamente 1 hora e meia. O tampão de corrida utilizado foi Tris-glicina pH 8,3 e, ao final da corrida, o gel foi corado com solução de *Coomassie[®] Brilliantblau R 250* (Merck) e descorado com lavagens em solução descolorante.

3.22 - Western Blot

As proteínas separadas por eletroforese foram transferidas para uma membrana de PVDF, segundo Towbin e colaboradores (1979), através de um sistema Mini Trans-Blot (Bio-Rad). A transferência das proteínas para a membrana de PVDF foi realizada montando-se o gel e a membrana em um sistema "sanduíche" entre papéis de filtro e esponjas. Esse sistema foi colocado em uma cuba eletroforética contendo tampão de transferência e uma corrente de 350 mA foi aplicada por 90 minutos.

Após a transferência, as membranas contendo as proteínas aderidas foram incubadas com tampão TBS-T contendo leite em pó desnatado 5,0% (p/v), por 1 hora, à temperatura ambiente. A membrana foi lavada rapidamente com tampão TBS-T e incubada durante a noite com o anticorpo primário anti-(His)6-tag (Invitrogen) na diluição de 1:3000 ou com o anticorpo anti-UCP2 (Santa Cruz Biotechnology) na diluição de 1:1000, à 4°C, sob agitação constante. Após esse período, a membrana foi lavada por três vezes de 5 minutos com o tampão TBS-T.

O anticorpo secundário marcado com peroxidase, na diluição de 1:5000, foi incubado com a membrana por 2 horas, à temperatura ambiente sob agitação constante e um novo processo de lavagem foi realizado como descrito anteriormente. Após as lavagens, procedeu-se a revelação utilizando o kit "Western blotting detection reagents" (Amersham Biosciences), segundo as instruções do fabricante. A membrana foi incubada com essa mistura por 60 segundos e o excesso de solução foi retirado com papel absorvente. A membrana foi embrulhada em papel filme e colocada em um cassete de autoradiografia para exposição. A marcação dos anticorpos primários foi visualizada em filme fotográfico.

3.23 - Espectrometria de massas

Para a confirmação da identidade da proteína expressa em *E. coli* foi realizada uma análise de sua sequência por espectrometria de massas (MALDI-TOF/TOF-MS), no Laboratório de Química de Proteínas (Hemocentro/FMRP). As bandas contidas no gel SDS-PAGE foram cortadas para serem submetidas à digestão com tripsina. Inicialmente, foram feitas duas lavagens de cada banda com 150 µL de bicarbonato de amônio 100 mM contendo acetonitrila 50% (v/v) para a remoção do SDS e do corante *coomassie blue*. Posteriormente, as amostras contidas nas bandas dos géis foram desidratadas com 200 µL de acetonitrila e

secas em centrífuga a vácuo (Eppendorf). As bandas dos géis foram, então, reidratadas com 20 μL de uma solução de tripsina 0,025 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e, após o completo entumescimento do gel, foi adicionada uma solução de bicarbonato de amônio 0,1 mol/L até cobri-lo completamente. Em seguida, as bandas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após esse tempo, a reação foi interrompida pela adição de 5 μL de ácido fórmico e mantida à temperatura ambiente para a extração dos peptídeos.

Cada solução de peptídeos tripsínicos das amostras foi dessalinizada em micro-tips contendo resina de fase reversa (POROS R2, Perseptive Biosystems, USA) previamente ativada com metanol e equilibrada com ácido fórmico 0,2% (v/v). Cada amostra foi carregada em micro-tip individual e dessalinizada 3 vezes com 100 μL de ácido fórmico 0,2% (v/v), sendo eluída da resina com 30 μL de uma solução de metanol 60% (v/v) em ácido fórmico 5,0% (v/v). Os peptídeos tripsínicos eluídos foram completamente secos em centrífuga a vácuo (Eppendorf), ressuspensos em 8 μL de matriz ácido α -hidroxicinâmico e depositados por gota (2 μL) na placa de aço inoxidável (Maldi-Target-plate). Em seguida, as amostras foram analisadas por MS1 para a obtenção de *peptide mass fingerprint* seguido de análise individual automática dos íons detectados por CID-MS/MS utilizando energia de colisão de 20 keV e pressão parcial de 1,0E-6 mBar de hélio como gás de colisão. Todos os

espectros de massa de MS1 e MS/MS foram analisados no banco de dados MASCOT Peptide Mass Fingerprint.

3.24 - Determinação da concentração de proteínas (método do BCA)

A concentração de proteínas totais foi determinada utilizando o kit BCATM Protein Assay (Thermo Scientific), de acordo com as recomendações do fabricante. Para isso, foi utilizada a proteína albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

3.25 - Reconstituição da proteína UCP-like recombinante em lipossomos

A proteína recombinante UCP-like foi reconstituída em lipossomos conforme Borecky e colaboradores (2001), em colaboração com o Prof. Pietro Ciancaglini, com algumas modificações. A proteína purificada foi dialisada no tampão interno contendo TEA-TES 28,8 mM com TEA 9,2 mM pH 7,2, TEA₂SO₄ 84,4 mM, TEA-EGTA 0,6 mM e SLS 0,5%. Um filme de lipídios foi preparado em clorofórmio através da dissolução de 50 mg de fosfatidilcolina, 2 mg de cardiolipina e 1 mg de ácido fosfatídico. Os tubos contendo os filmes lipídicos foram colocados sob corrente de nitrogênio para a evaporação do clorofórmio. Em seguida, os tubos foram armazenados em um

dessecador para o término da evaporação do solvente, para a completa secagem dos lipídios. O filme lipídico foi, posteriormente, ressuspensão no tampão interno e os tubos foram incubados por 1 hora a 50°C, com agitação a cada 10 minutos. A mistura foi, então, sonicada por 30 segundos e, em seguida, a proteína foi adicionada no tubo correspondente. Os tubos foram incubados em gelo por 1 hora, sob agitação. Adicionou-se 250 mg de resina (Biobeads) em cada tubo para a remoção do detergente e a formação dos lipossomos. Os tubos foram incubados a 4°C por 2 horas, sob agitação. Após esse tempo, a amostra foi centrifugada para a remoção da resina e ao sobrenadante foram adicionados novamente 250 mg de resina. Os tubos foram incubados a 4°C por 30 minutos, sob agitação. A amostra foi centrifugada novamente e o sobrenadante foi ultracentrifugado a 100.000 *g* por 1 hora. Foram realizadas duas preparações: uma contendo apenas os lipídios (lipossomos) e outra contendo os lipídios e a proteína (proteolipossomos). Após esse passo de ultracentrifugação, no tubo que continha apenas os lipídios, o sobrenadante foi recolhido, representando os lipossomos. No tubo que continha lipídios e proteína, o sobrenadante foi descartado e os proteolipossomos presentes no sedimento foram ressuspensos no tampão interno. Tanto os lipossomos quanto os proteolipossomos foram submetidos à análise de espalhamento de luz para se verificar o diâmetro médio das vesículas formadas.

3.26 - Medidas de distribuição de tamanho de partícula por espalhamento de luz dinâmico

As medidas de distribuição de tamanho dos lipossomos e proteolipossomos foram realizadas empregando-se o equipamento da Beckman Coulter (modelo N5 Submicron Particle Size Analyser).

Nos experimentos de espalhamento de luz dinâmico, o diâmetro médio é determinado a partir do coeficiente de difusão das vesículas quando essas se movem ao acaso devido ao movimento Browniano. O coeficiente de difusão das vesículas é calculado a partir da flutuação da intensidade da luz espalhada, expressa através do decaimento da função de correlação:

$$g(\tau) = 1 + e^{(-2Dq^2\tau)} \quad (\text{Equação 1})$$

onde $g(\tau)$ é função de auto-correlação temporal,

D é o coeficiente de difusão das partículas,

q é o módulo do vetor de espalhamento.

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2} \quad (\text{Equação 2})$$

onde λ é o comprimento de onda da radiação,

θ é o ângulo da luz coletada em relação ao feixe incidente.

A intensidade de luz espalhada é modulada através do movimento Browniano das vesículas que se difundem resultando na ampliação da largura da linha do laser (efeito Doppler). Pelo exame da amplitude espectral da luz espalhada, o tamanho da vesícula pode ser calculado.

O raio hidrodinâmico pode ser obtido pela equação de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{K_B T}{6\pi\eta R_H} \quad (\text{Equação 3})$$

onde K_B é a constante de Boltzmann,

T é a temperatura (Kelvin),

η é a viscosidade do solvente,

R_H é o raio hidrodinâmico.

Para a medida do diâmetro médio dos lipossomos, diluíram-se as amostras em água deionizada, até que a intensidade estivesse dentro da faixa requerida pelo equipamento (entre 5×10^4 e 1×10^6).

3.27 - Avaliação da expressão da UCP-like na presença de paraquat e menadiona

A expressão do gene da UCP-like de *A. fumigatus* foi avaliada em diferentes fases de desenvolvimento do fungo, na

presença de paraquat e menadiona. Para isso, uma suspensão de 5×10^8 conídios foi inoculada em 50 mL de meio YG e incubados a 30°C sob agitação de 200 rpm, na presença de paraquat 5,0 mmol/L ou menadiona 0,05 mmol/L. Para a obtenção de conídios, a cultura foi incubada por 4 horas e as células foram recuperadas por centrifugação a 3.000 g por 10 minutos. Para a obtenção de micélios, a cultura foi incubada por 24 horas e a recuperação das células foi realizada por filtração a vácuo. Em seguida, o RNA das células foi extraído e foi realizada a transcrição reversa do mRNA (produção de cDNA) para a posterior avaliação do nível de mRNA por PCR em tempo real.

3.28 - PCR quantitativo em tempo real (Real Time PCR)

A quantificação do nível de expressão do gene *UCP-like* foi realizada em um aparelho de PCR em tempo real Mastercycler® ep *realplex*⁴ (Eppendorf) utilizando *primers* LUX (Invitrogen).

Os oligonucleotídeos utilizados foram desenhados utilizando o programa D-LUX® Designer Software (<http://www.invitrogen.com/content.cfm?pageid=11263>) e estão representados na Tabela 3.

Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados em experimentos de Real Time PCR.

Oligonucleotídeos para UCP- <i>like</i>	
Senso	5'-CGGTACGCAATATCCCCGAATAC[FAM]G-3'
Anti-senso	5'-CTCCCTGGGTACGCACTATCAT-3'
Oligonucleotídeos para GAPDH	
Senso	5'-CGGCGACTGGTGCTGCTAAGGC[FAM]G-3'
Anti-senso	5'-CGGAGACGTTGGAGGTAGGAAC-3'

FAM - 6-carboxifluoresceína.

As possíveis variações na concentração inicial de cDNA entre as amostras foram corrigidas através da normalização com o gene constitutivamente expresso da GAPDH.

Todas as reações de PCR foram realizadas em triplicata, com um volume final de 10 µL, contendo 5 µL do reagente Taq-Man® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 2 µL de cada oligonucleotídeo a uma concentração inicial de 1 µmol/L (para GAPDH) e 0,25 µmol/L (para UCP) e 1 µL do cDNA. O perfil termal utilizado para as reações de PCR foi de 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguido de 40 repetições de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Foram realizadas reações controle contendo apenas o reagente Master Mix e os oligonucleotídeos (NTC).

Inicialmente, foram realizadas curvas de calibração para os oligonucleotídeos, com diferentes concentrações de DNA genômico de *A. fumigatus*. A quantidade inicial do número de cópias dos genes de interesse utilizada na construção das

curvas de calibração foi determinada através de duas considerações: o *A. fumigatus* é um organismo haplóide e, portanto, os genes investigados são representados uma única vez em seu genoma. Além disso, considerando que o tamanho do genoma do *A. fumigatus* é igual a 29,4 Mb (Nierman et al., 2005), um genoma corresponde a aproximadamente 30 fg (10^{-15} gramas). Portanto, teoricamente, cada 30 fg de DNA genômico de *A. fumigatus* correspondem a uma cópia de cada um dos genes do fungo.

Dessa forma, foram realizadas reações com diferentes diluições do DNA genômico do fungo (Tabela 4) e, através de regressão linear, foi determinada a equação da reta correspondente à curva de calibração para cada par de oligonucleotídeos utilizados.

Tabela 4: Diluições do DNA genômico presentes na curva de calibração dos oligonucleotídeos.

Nº de cópias/ μ L	Concentração do DNA
1	30 fg/ μ L
10	300 fg/ μ L
10^2	3 pg/ μ L
10^3	30 pg/ μ L
10^4	300 pg/ μ L
10^5	3 ng/ μ L
10^6	30 ng/ μ L
10^7	300 ng/ μ L

Uma vez estabelecidas as equações das curvas de calibração e, considerando um coeficiente de correlação linear (R^2) maior que 0,99, as amostras provenientes dos diferentes tratamentos foram analisadas.

4 - Resultados

4.1 - Extração e isolamento do DNA genômico de *A. fumigatus*

O DNA isolado foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose, o qual apresentou uma única banda sem arrastes, demonstrando um DNA íntegro (Figura 7).

Figura 7: DNA genômico extraído de *A. fumigatus*. Fotografia da eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v) em tampão TAE.

M: Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen);

1: DNA isolado de *A. fumigatus* (200 ng).

4.2 - Clonagem do gene da UCP-like a partir do DNA genômico de *A. fumigatus*

Após a extração do DNA genômico de *A. fumigatus* foi realizada a amplificação do gene que codifica para a possível UCP desse microrganismo, depositado no GenBank sob o número de acesso XM_750738.2 (AFUA_2G14980). Para isso, foram utilizados os oligonucleotídeos citados na Tabela 1 (item 3.6). Inicialmente, foi realizado um teste para se determinar a

melhor temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores e a melhor concentração de íons magnésio para a amplificação desse gene (Figura 8).

Figura 8: Produtos de PCR obtidos para a amplificação do gene da *UCP-like*, com diferentes concentrações de Mg^{2+} e temperaturas de anelamento de 55°C e 60°C. Fotografia do gel de eletroforese em agarose 1,0% (p/v), em tampão TAE. A seta indica as bandas correspondentes aos fragmentos amplificados de tamanho esperado.

M: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen);

1: 55°C, 1 mmol/L de Mg^{2+} ; 5: 60°C, 1 mmol/L de Mg^{2+} ;

2: 55°C, 2 mmol/L de Mg^{2+} ; 6: 60°C, 2 mmol/L de Mg^{2+} ;

3: 55°C, 3 mmol/L de Mg^{2+} ; 7: 60°C, 3 mmol/L de Mg^{2+} ;

4: 55°C, 4 mmol/L de Mg^{2+} ; 8: 60°C, 4 mmol/L de Mg^{2+} .

Após esse teste de determinação do melhor perfil termal de amplificação e a melhor concentração de íons magnésio, foi concluído que a melhor condição foi de 60°C e 3 mmol/L, respectivamente. Utilizando a concentração final de 1 mmol/L de Mg^{2+} não houve amplificação. As reações realizadas com

temperatura de anelamento de 55°C resultaram em diversas bandas de amplificações inespecíficas, o que também ocorreu com concentração de 4 mmol/L de Mg^{2+} e 60°C.

Para a clonagem do gene da UCP-*like* no vetor pTZ57R/T, após a reação de amplificação, a banda resultante foi extraída do gel de agarose. O produto de PCR purificado foi utilizado para a ligação no vetor em uma razão molar de 3:1 (inserto/vetor). Bactérias Mach1TM-T1^R foram transformadas com a reação de ligação e, para a seleção de clones positivos foi realizado um PCR de colônia, cujo gel está mostrado na Figura 9. Com exceção do clone 9, todos os outros clones selecionados foram positivos para a amplificação de uma banda de tamanho esperado (1.171 pb). Posteriormente, os DNAs plasmidiais dos clones 4, 5 e 6 foram extraídos para a confirmação da clonagem por digestão com enzimas de restrição e sequenciamento.

Figura 9: Produtos de PCR obtidos com diferentes clones transformados com a construção pTZ/UCP_DNA_Afu. Fotografia do gel de eletroforese em agarose 1,0% (p/v), em tampão TAE. A seta indica as bandas correspondentes aos fragmentos amplificados de tamanho esperado.

M: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen);

1 - 10: clones selecionados.

Para a confirmação da clonagem por digestão, os DNAs plasmidiais foram incubados com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI* (Invitrogen). Essas enzimas clivam nas extremidades do sítio de clonagem do vetor pTZ57R/T (Figura 4). A Figura 10 mostra a digestão desses plasmídeos, com a liberação de dois fragmentos de DNA, um de 2.886 pb, relativo ao vetor pTZ57R/T, e outro de 1.171 pb, relativo ao gene da UCP-like clonado.

Figura 10: Produtos da digestão com *EcoRI* e *BamHI* obtidos de diferentes clones transformados com a construção pTZ/UCP_DNA_Afu. Fotografia do gel de eletroforese em agarose 1,0% (p/v), em tampão TAE. As setas indicam as bandas correspondentes aos fragmentos liberados: vetor (2.886 pb) e inserto (1.171 pb).

M: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen);
1: reação de digestão do clone 4 (pTZ/UCP_DNA_Afu);
2: reação de digestão do clone 5 (pTZ/UCP_DNA_Afu);
3: reação de digestão do clone 6 (pTZ/UCP_DNA_Afu).

4.3 - Clonagem da região codificadora da UCP-like de *A. fumigatus* por RT-PCR

Para a expressão da UCP-like para sua posterior caracterização bioenergética e funcional, foi necessária a amplificação da região codificadora dessa proteína a partir de cDNA de *A. fumigatus*. Para isso, realizou-se a extração de RNA total de *A. fumigatus* como descrito no item 3.3.

A Figura 11 representa a eletroforese em gel de agarose do RNA extraído, apresentando duas bandas predominantes que representam as duas subunidades do RNA ribossomal, 28S e 18S.

O RNA extraído foi utilizado para a produção de cDNA pela reação da transcriptase reversa como descrito no item 3.4.

Figura 11: RNA total de *A. fumigatus*. Fotografia do gel de eletroforese em agarose 1,0% (p/v). As setas indicam as duas subunidades ribossomais, 28S e 18S.

Após a produção do cDNA, a região codificadora da UCP-like foi amplificada utilizando os oligonucleotídeos citados na Tabela 1 (item 3.6). Para isso, foram utilizadas as mesmas condições de amplificação descritas anteriormente (item 4.2). O produto de PCR obtido a partir dessa amplificação está mostrado na Figura 12.

Figura 12: Produto de PCR obtido pela amplificação da região codificadora da UCP-like a partir de cDNA de *A. fumigatus*. Fotografia do gel de eletroforese em agarose 1,0% (p/v), em tampão TAE. A seta indica a banda correspondente ao fragmento amplificado de tamanho esperado.

M: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen);

1: produto de PCR.

Embora tenham sido amplificados alguns fragmentos inespecíficos, para a clonagem foi realizada uma purificação da banda de interesse, com tamanho próximo a 1000 pb. Esse fragmento foi clonado no vetor pTZ57R/T, utilizando a razão molar de 3:1 (inserto/vetor), gerando a construção pTZ/UCP_cDNA_Afu. Bactérias Mach1TM-T1^R competentes foram transformadas com a reação de ligação e, para a seleção de clones positivos foi feito um PCR de colônia, representado na Figura 13.

Figura 13: Produtos de PCR obtidos com diferentes clones transformados com a construção pTZ/UCP_cDNA_Afu. Fotografia do gel de eletroforese em agarose 1,0% (p/v), em tampão TAE. A seta indica as bandas correspondentes aos fragmentos amplificados de tamanho esperado.

M: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen);

1 - 8: clones selecionados.

Todos os clones selecionados foram positivos para a amplificação de uma banda de tamanho esperado (1.026 pb). Posteriormente, os DNAs plasmidiais dos clones 1, 5 e 6 foram extraídos para a confirmação da clonagem por digestão e por sequenciamento.

Para a confirmação da clonagem por digestão, os DNAs plasmidiais foram incubados com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI*, da mesma forma como descrito no item anterior. A Figura 14 mostra a digestão desses plasmídeos, a qual liberou dois fragmentos de DNA, um de 2.886 pb, relativo ao vetor pTZ57R/T, e outro de 1.026 pb, relativo ao cDNA da UCP clonado.

Figura 14: Produtos da digestão com *EcoRI* e *BamHI* obtidos de diferentes clones transformados com a construção pTZ/UCP_cDNA_Afu. Fotografia do gel de eletroforese em agarose 1,0% (p/v), em tampão TAE. As setas indicam as bandas correspondentes aos fragmentos liberados: vetor (2.886 pb) e inserto (1.026 pb).

M: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen);

1: reação de digestão do clone 1 (pTZ/UCP_cDNA_Afu);

2: reação de digestão do clone 5 (pTZ/UCP_cDNA_Afu);

3: reação de digestão do clone 6 (pTZ/UCP_cDNA_Afu).

4.4 - Sequenciamento do gene da UCP-like de *A. fumigatus*

Após a amplificação do gene da UCP-like, utilizando como molde o DNA genômico, e do seu cDNA, usando RT-PCR, ambas as sequências obtidas foram clonadas em vetores e a determinação da sequência nucleotídica correspondente foi realizada. O alinhamento das sequências nucleotídicas (gene e cDNA) mostrou que o gene que codifica para essa proteína apresenta 1.171 nucleotídeos, com a sequência interrompida por dois íntrons. O primeiro íntron está compreendido entre os nucleotídeos 158 e

231, contados a partir do códon iniciador, possuindo uma extensão de 73 nucleotídeos. O segundo íntron está localizado entre os nucleotídeos 385 e 457, possuindo uma extensão de 72 nucleotídeos (Figura 15). Após a excisão dos íntrons, o gene da *UCP-like* de *A. fumigatus* codifica uma proteína de 341 aminoácidos, com uma massa molecular de 37 kDa e um pI teórico de 10,02.

1	M S A G G E H L K D E V R L A L K D P A	
	atgtcgggccggggcggaacacctcaaggatgaggtacgtctggcattaaaagaccccgct	60
61	D S D I E H S I Q I I T R E K G T R R Q	
	gatagtgatattgagcattcaatccaaataataacacgagaaaagggcacacgacgtcaa	120
121	V V L S G G I A G L V S R	Intron I
	gtcgttctctcaggtggaatcgccgggctggtctcgcggtgagtacagcctgctctatt	180
181	gttctgagtcgtaattgcagccgctaataccaccaccttttgcgtaaagcagattctgcgt	240
		F C V
241	A P L D V V K I R L Q L Q I H S L S D P	
	cgccccctctagacgtcgtcaagatccgcctccaactacagatccactccctctccgaccc	300
301	A S H H D V V G P I Y K G T L S T M R T	
	ggcctcccaccatgatgtagtcggtcctatatacaaggggaccctttccaccatgaggac	360
361	I I K Q E G I T	Intron II
	gatcatcaagcaagaagggataacagtgcgttttcttaccacccacccgaccaatcaag	420
421	tagaaaaaaaaaagcagctaacggatcttgccaacagggcctctggaaaggcaacattcc	480
		G L W K G N I P
481	A E L M Y V C Y G A L Q F T A Y R T T T	
	cgccgaactcatgtacgtctgctacggcgccctacagttcacagcctatcgcaccacaac	540
541	Q I L A Q L D P H R L P P A L E S F V S	
	ccaaattctcgcacaactcgatccgcaccgtctcccgcccgccctggaatctttcgtctc	600
601	G A V A G G L A T A S T Y P L D L L R T	
	gggcgctgtagccggcgccctcgctacggcgctcgacgtatccactcgacctgctgcgaac	660
661	R F A A Q G T E R I Y T S L L A S V R D	
	gcgcttcgcgggcccagggcaccgagcgcacatctatacctcgctgctggcgctcgggtgcggga	720
721	I A R S E G P A G F F R G C S A A V G Q	
	cattgcgcgggagtgaagggccggcgggattcttccggcggtgcagtgcgggcggtcggcca	780
781	I V P Y M G L F F A T Y E S L R P V L S	
	gatcgtcccgctatatggggctgtttttcgcgacatatgagtcgttgagaccgggtgctgtc	840
841	G L E N M P F G S G D A A A G V I A S V	
	cgggctggaaaacatgccgttcgggtccgggtgatgccgctgcaggagtgattgccagtgt	900
901	L A K S G V F P L D L V R K R L Q V Q G	
	tctggccaagagcgggggtgtttccgcttgacctcgctgcgaaagcgactccaggtccaggg	960
961	P T R T L Y V H R N I P E Y R G V F S T	
	cccaacgcgcacactgtatgtgcatcgcaatatccccgaataccgcggcgctatttagcac	1020
1021	I A M I V R T Q G G V R G G L Y R G G L T V S	
	catcgtctatgatagtgcgtaccagggagtcgggggcctctaccggggactgacgggttag	1080
1081	L I K A A P A S A I T M W T Y E R S L K	
	cttgatcaaggccgcaccagcaagtgccatcaccatgtggacttacgagcgatcggttaa	1140
1141	L L R D F R V A E *	
	actcctccgcgacttccgcgtcgctgaatga	1171

Figura 15: Sequência nucleotídica do gene da UCP-like de *A. fumigatus* com a dedução dos aminoácidos codificados. Os íntrons estão representados em azul.

4.5 - Análise molecular da sequência deduzida de aminoácidos da UCP-like de *A. fumigatus*

A Figura 16 mostra o alinhamento da sequência deduzida de aminoácidos da UCP-like de *A. fumigatus* com as UCPs de mamíferos (UCP1-5), de *Arabidopsis* (AtUCP1) e da levedura *Y. lipolytica* (yUCP). Esse alinhamento revelou uma maior identidade com a proteína AtUCP1 de *A. thaliana* e com a UCP5 de mamíferos (23% cada). As proteínas UCP2 e yUCP apresentam 21% de identidade com a UCP-like de *A. fumigatus*. Já as proteínas UCP1, UCP3 e UCP4 apresentam uma menor identidade com a proteína em estudo, possuindo 18%, 17% e 16% de aminoácidos idênticos, respectivamente. O alinhamento representativo das sequências protéicas dessas UCPs mostra que elas apresentam três regiões conservadas, as quais são as assinaturas moleculares dos transportadores de energia (Tabela 5), com pouca variação nessas sequências em relação a outras UCPs analisadas. A porcentagem de aminoácidos idênticos, da sequência total e das assinaturas moleculares, obtida a partir desse alinhamento está apresentada na Tabela 6.


```

Afu UCP    --MSAGGEHLKDEVRLALKDPADSDIEHSIQIITREKGTRRQVLSGGIA
UCP1       -----MGGLTASDVHPTLG-----VQLFSAGIA
UCP2       -----MVGFKATDVPPTAT-----VKFLGAGTA
UCP3       -----MVGLKPSDVPPTMA-----VKFLGAGTA
UCP4       MSVPE-----EEERLLPLTQRWPRAS-----KFLLSGCA
UCP5       MGIFPGIILIFLRVKFATAAIVSGHQKSTTVSHEMSGLNWKPFVYGGGLA
AtUCP1     -----MVAAGKSDLS--LP-----KTFACSAFA
yUCP       -----MAVILDKQKKQPPKQ----ISTLGGFVAGAIA

```

```

Afu UCP    GLVSRFCVAPLDLVKIRLQQLIHSLSDPASHHDVVGPIYKGTLSMTMTII
UCP1       ACLADVITFPLDTAKVRLQVQGECP-----TSSVIRYKGVLTITAVV
UCP2       ACIADLITFPLDTAKVRLQIQGESQGPVR---ATASAQYRGVMGTILTMV
UCP3       ACFADLVTFPLDTAKVRLQIQGENQ-AVQ---TARLVQYRGVLTILTMV
UCP4       ATVAELATFPLDLTKTRLQMQGEAALARLGDGARESAFYRGMVRTLALGII
UCP5       SIVAEFGTFPVDLTKTRLQVQGSIDARF-----KEIKYRGMFHALFRIC
AtUCP1     ACVGEVCTFPLDTAKVRLQQLKSALAG-----DVTLPKYRGLLGTVGTIA
yUCP       ACGAVTVTFPIELVKTRMQQLGELAAR-----GEAKKVYTSPLQALVKIY
          . . . *:: . * *::*

```

```

Afu UCP    KQEGITGLWKGNIPAEMLVVCYGALQFTAYRTTTQILAQLD---PHRLPP
UCP1       KTEGRMKLYSGLPAGLQRQISSASLRIGLYDTVQEFLLTAGK---ET-APS
UCP2       RTEGPRSLYNGLVAGLQRQMSFASVRIGLYDSVKQFYT-KG---SE-HAS
UCP3       RTEGPCSPYNGLVAGLQRQMSFASIRIGLYDSVKQVYTPKG---AD-NSS
UCP4       EEGLFLKLWQGVTPAIYRHVVYSGGRMVTYEHLEEVVFGKS---EDEHY
UCP5       KEEGVLALYSGIAPALLRQASYGTIKIGIYQSLKRLFVERL---EDET--
AtUCP1     REEGLRSLWKGVVPLHRQCLFGGLRIGMYEPVKNLYVGKD---FVGDV
yUCP       KSEGIKGLQSGLFSAVYVYQIGLNGCRLGLYEPTRKVIANVCNIDLNKENP
          . ** . * .. :: * ..

```

```

Afu UCP    ALESFVSGAVAGGLATASTYPLDLLRTRFAAQGT-----ERIYTSLLAS
UCP1       LGSKILAGLTGAVVFIGOPTFVVKVRLQAQSHLHG--IKPRYTGTYN
UCP2       IGSRLLAGSTGALAVAVAQPTDVVKVRFQAQARAG---GGRRYQSTVNA
UCP3       LTTRILAGCTTGAMAVTCAQPTDVVKVRFQASIHGSPSRSDRKYSGTMDA
UCP4       LWKSVIGGMMAGVIGQFLANPTDLVKVQMOMEKGRKLEKPLRFRGVHHA
UCP5       LLINMICGVVSGVISSTIANPTDVLKIRMQAQG-SLFQG-----SMIGS
AtUCP1     LSKKILAGLTGALGIMVANPTDLVKVRLQAEGKLAAG-APRRYS GALNA
yUCP       VGLNVASGAISGIMGAVAGSPFYLIKTRQQSYSPAFKVGAQTYYSIGDG
          . * : * : . * : : :

```

```

Afu UCP    VRDIARSEGPAGFFRGCSAAVGQIVPYMGLFFATYESLRPVLSGLENMPF
UCP1       YRIIATTEGLTGLWKGTTPNLMRSVIINCTELVTYDLMKEAFVKNNILAD
UCP2       YKTIAREEGFRGLWKGTSPNVARNAIVNCAELVTYDLIKDALLKANLMTD
UCP3       YRTIAREEGVRGLWKGTLPNIMRNAIVNCAEVVTYDILKEKLLDYHLLTD
UCP4       FAKILAEGGIRGLWAGWVPNIQRAALVNMGDLTTYDVTVKHYLVNLTPLED
UCP5       FIDIYQQEGTRGLWRFVVPVTAQRAAIVVGVELPVYDITKKHLILSGMMGD
AtUCP1     YSTIVRQEGVRALWTGLGPNVARNAIINAAELASYDQVKETILKIPGFTD
yUCP       FRQIYGAEGLYRGVDAAILRTGAGSSVQLPIYNWAKELLLKHHITDP
          * * .:: * . : . * : : :

```

```

Afu UCP    GS-GDAAAGVIASVLAKSGVPLDLVRKRLQVQGPTRTLYVHRNIPEYRG
UCP1       DVPCHLVSAIAGFCATAMS SPVDVVKTRFINSPPGQ-----YKS
UCP2       DLPCHFVSAFGAGFCATVVA SPVDVVKTRYMNSALGQ-----YSS
UCP3       NFPCHFVSAFGAGFCATVVA SPVDVVKTRYMNSPPGQ-----YFS
UCP4       NIMTHGLSSSLCSGLVASILGTPADVIKSRIMNQPRDKQGRGL----LYKS
UCP5       TILTHFVSSFTCGLAGALASNPVDVVRTRMMNQ-RAIVGHVD----LYKG
AtUCP1     NVVTHILSGLGAGFFAVCIGSPVDVVKSRMMGDS-GA-----YKG
yUCP       GASTHLVASAMSGLVAVVMNPWDVLMTRMYNQGN-----MYKN
          . : . . . * *:: . * .

```

```

Afu UCP    VFSTIAMIVRTQGVRLYRGLTVSLIKAAPASAITMWTYERSLKLLRDFR
UCP1       VPNCAMKVFTNEGPTAFFKGLVPSFLRLGSWNVIMFVCFEQLKRELSKSR

```

```

UCP2      AGHCALTMLQKEGPRAFYKGFMPSTLRLGSWNVVMFVITYEQLKRALMAAC
UCP3      PLDCMIKMVAQEGPTAFYKGFTPSFLRLGSWNVVMFVITYEQLKRALMKVQ
UCP4      STDCLIQAVQGEFGMSLYKGFPLPSWLRMTTPWSMVFWLTYEKIREMSGVSP
UCP5      TVDGILKMWKHEGFFALYKGFWPNNWLRGPWNIIFFITYEQLKRLQI---
AtUCP1    TIDCFVKTLKSDGPMAFYKGFIPNFGRLGSWNVIMFLTLEQAKKYVRELD
yUCP      PFDCLMKTVSIIEGPFALYKGFGAHLLRIAPHTILTLMFMEQTMKWVWFE
          :*  .:::*  :  .  .  :  *:  .

Afu UCP   VAE----
UCP1      QTMDCAT
UCP2      TSREAPF
UCP3      MLRESPF
UCP4      F-----
UCP5      -----
AtUCP1    ASKRN--
yUCP      GVPF---
```

Figura 16: Alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos de UCPs de diferentes organismos. As regiões mais conservadas entre as proteínas estão destacadas em vermelho. Afu UCP: UCP-like de *A. fumigatus*, UCP1-5: proteínas desacopladoras 1-5 de mamíferos; AtUCP1: proteína desacopladora de plantas (*Arabidopsis thaliana*); yUCP: proteína desacopladora de *Yarrowia lipolytica*. Números de acesso das sequências: Afu UCP (XP_755831), UCP1 (AAH98258), UCP2 (CAA11402), UCP3 (NP_003347), UCP4 (O95847), UCP5 (O95258), AtUCP1 (NP_190979), yUCP (XP_503525).

Tabela 5: Assinaturas moleculares das proteínas transferidoras de energia.

Proteína	1ª Assinatura	2ª Assinatura	3ª Assinatura
Afu UCP	PLDVVKIRLQLQ	PLDLLTRFAAQ	PLDLVRKRLQVQGP
UCP1	PLDTAKVRLQVQ	PTEVVKVRLQAQ	PVDVVKTRFINSPP
UCP2	PLDTAKVRLQIQ	PTDVVKVRFQAQ	PVDVVKTRYMNSAL
UCP3	PLDTAKVRLQIQ	PTDVVKVRFQAS	PVDVVKTRYMNSPP
UCP4	PLDLTKTRLQMQ	PTDLVKVQMOME	PADVKSIRMNQPR
UCP5	PVDLTKTRLQVQ	PTDVLKIRMQAQ	PVDVVRTRMMNQ-R
AtUCP1	PLDTAKVRLQLQ	PTDLVKVRLQAE	PVDVVKSRMMGDS-
yUCP	PIELVKTRMQLQ	PFYLIKTRQQSY	PWDVLMTRMYNQKG

As assinaturas moleculares da UCP-like de *A. fumigatus* foram comparadas com as de outras UCPs. Em vermelho estão os aminoácidos que aparecem nas sequências de outras UCPs e em verde estão os aminoácidos únicos da UCP-like de *A. fumigatus*. Afu UCP: UCP-like de *A. fumigatus*, UCP1-5: proteínas desacopladoras 1-5 de mamíferos; AtUCP1: proteína desacopladora de *A. thaliana*; yUCP: proteína desacopladora de *Y. lipolytica*.

Tabela 6: Porcentagem de aminoácidos idênticos entre a UCP-like de *A. fumigatus* e outras UCPs.

Identidade (%)				
Proteína	Total	1 ^a Assinatura	2 ^a Assinatura	3 ^a Assinatura
UCP1	18	67	33	36
UCP2	21	67	50	29
UCP3	17	67	42	36
UCP4	16	67	25	29
UCP5	23	58	50	43
AtUCP1	23	75	42	29
yUCP	21	58	33	29

UCP1-5: proteínas desacopladoras 1-5 de mamíferos; AtUCP1: proteína desacopladora de *A. thaliana*; yUCP: proteína desacopladora de *Y. lipolytica*.

4.6 - Clonagem do cDNA da UCP-like no vetor de expressão pYES2

A região codificadora da UCP-like de *A. fumigatus* foi clonada no vetor para expressão em leveduras pYES2. Inicialmente, esse cDNA foi clonado no vetor pTZ57R/T com oligonucleotídeos contendo sítios de restrição para as enzimas *EcoRI* e *NotI*. Bactérias *E. coli* DH10b foram transformadas com o produto da reação de ligação (pTZ/UCP_cDNA_Afu) e, para a seleção de clones positivos, foi realizado um PCR de colônia (Figura 17).

Figura 17: Produtos de PCR obtidos com diferentes clones transformados com a construção pTZ/UCP_cDNA_Afu para posterior clonagem no vetor pYES2. Fotografia do gel de eletroforese em agarose 1,0% (p/v), em tampão TAE.

M: Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen);

1 - 8: clones selecionados.

Dos oito clones selecionados, sete foram positivos para a presença do cDNA da UCP-like. Os DNAs plasmidiais dos clones positivos 2 e 3 foram extraídos e sequenciados. Após o sequenciamento, o clone 2 foi selecionado para o próximo passo, uma vez que foi confirmada a clonagem do cDNA de interesse, sem mutações ou *gaps*. O DNA plasmidial desse clone, assim como o plasmídeo pYES2 vazio, foram digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI*. O resultado desse ensaio de restrição está mostrado na Figura 18.

Figura 18: Resultado da reação de digestão com as enzimas *EcoRI* e *NotI* para clonagem no vetor pYES2. Fotografia dos géis de eletroforese em agarose 1,0% (p/v), em tampão TAE.

M: Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen);

1: vetor pYES2 vazio não-digerido;

2: vetor pYES2 vazio digerido;

3: DNA plasmidial do clone 2 (pTZ/UCP_cDNA_Afu) digerido.

Como se pode observar na Figura 18A (canaleta 2), a digestão do plasmídeo pYES2 vazio originou um fragmento de 5,9 kb. A digestão do DNA plasmidial do clone 2 (Figura 18B, canaleta 3), transformado com a construção pTZ/UCP_cDNA_Afu, liberou dois fragmentos: um de 2.886 pb relativo ao vetor pTZ, e outro de 1.026 pb relativo ao cDNA da UCP-like.

Após a reação de clivagem, os produtos digeridos (pYES2 vazio e o cDNA da UCP-like), contendo extremidades coesivas para *EcoRI* e *NotI*, foram purificados a partir do gel de agarose e, em seguida, foi realizada uma reação de ligação, utilizando a enzima T4 DNA ligase. Bactérias *E. coli* DH10b competentes foram transformadas com a reação de ligação

(pYES2/UCP-*like*). Como o vetor pYES2 possui um gene que confere resistência ao antibiótico ampicilina, a seleção de bactérias transformantes para esse vetor foi realizada por plaqueamento em meio de cultura (LB-sólido) contendo esse antibiótico. Após 18 horas de incubação em estufa a 37°C, algumas colônias cresceram no meio seletivo e foram submetidas à confirmação da presença do cDNA da UCP-*like*.

A Figura 19A mostra o resultado obtido para a confirmação da presença do inserto no vetor pYES2 de um dos clones obtidos, realizada por PCR de colônia, utilizando oligonucleotídeos específicos para amplificação do cDNA da UCP-*like*. Além disso, foi realizada uma confirmação por ensaio de digestão do DNA plasmidial com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI* (Figura 19B), o qual liberou dois fragmentos: um de 5,9 kb relativo ao vetor pYES2, e outro de 1.026 pb relativo ao cDNA da UCP-*like*.

Figura 19: Fotografia dos géis de eletroforese em agarose 1,0% (p/v), em tampão TAE, relativos à confirmação da clonagem pYES2/UCP-*like*.

M: Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen);

1: produto amplificado por PCR de colônia do clone 1 (pYES2/UCP-*like*);

2: plasmídeo pYES2/UCP-*like* não-digerido;

3: plasmídeo pYES2/UCP-*like* digerido.

Além da confirmação obtida por PCR de colônia e por ensaio de restrição, foi realizada a determinação da sequência de nucleotídeos do DNA plasmidial desse clone. O resultado revelou uma fase de leitura correta entre a região codificadora da UCP-*like* e a região promotora do plasmídeo pYES2, a qual é essencial para a expressão da proteína recombinante em *S. cerevisiae*, além de ausência de *gaps* e mutações.

4.7 - Confirmação da transformação de *S. cerevisiae* INVSc1 com a construção pYES2/UCP-like

Após a transformação de leveduras *S. cerevisiae* da linhagem INVSc1 com o plasmídeo pYES2/UCP-like, clones foram selecionados em placas contendo meio SC-URA⁻. Para a confirmação da transformação foi realizada uma extração de DNA plasmidial desses clones para uma posterior transformação de bactérias *E. coli* DH10b. Essa transformação de bactérias foi necessária devido ao fato de esse plasmídeo se apresentar em um baixo número de cópias nas leveduras, sendo assim, a detecção da presença do cDNA da UCP-like em *S. cerevisiae* por PCR não foi possível.

Foi realizado um PCR de colônia com as bactérias transformadas com o DNA plasmidial das leveduras INVSc1 (Figura 20). Dessa forma, foi confirmada a presença do plasmídeo pYES2/UCP-like no clone selecionado.

Figura 20: Produtos obtidos por PCR de colônia após a transformação de bactérias DH10b com o DNA plasmidial de leveduras INVSc1 transformadas com a construção pYES2/UCP-like. Fotografia do gel de eletroforese em agarose 1,0% (p/v), em tampão TAE.

M: Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen);
1: controle positivo da reação;
2: controle negativo da reação (reação sem colônia);
3: clone selecionado.

O DNA plasmidial dessa bactéria foi extraído e a presença do cDNA que codifica para a proteína UCP-like foi confirmada por reação de digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI* (Figura 21). Esse clone foi, então, utilizado para os ensaios posteriores de expressão da proteína UCP-like recombinante em leveduras.

Figura 21: Resultado da reação de digestão com as enzimas *EcoRI* e *NotI* da construção pYES2/UCP-like. Fotografia do gel de eletroforese em agarose 1,0% (p/v), em tampão TAE

M: Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen);

1: DNA plasmidial do clone 10.6 não-digerido;

2: DNA plasmidial do clone 10.6 (pYES2/UCP-like) digerido.

4.8 - Medida do potencial de membrana mitocondrial

O potencial elétrico transmembrana mitocondrial ($\Delta\psi$) foi determinado utilizando-se o corante catiônico safranina O. A ligação da safranina à membrana interna polarizada é acompanhada por mudanças na emissão da fluorescência a 586 nm.

As diferenças no desacoplamento mitocondrial de esferoplastos de *S. cerevisiae* transformados com a construção pYES2/UCP-like e com o vetor pYES2 vazio foram analisadas através do monitoramento das mudanças do $\Delta\psi$ durante a fosforilação do ADP sustentada pela oxidação de NADH 1 mmol/L. Após a estabilização da leitura da fluorescência foram adicionados 400 nmoles de ADP, o qual levou a uma diminuição

do potencial de membrana (estado 3). O potencial foi completamente dissipado com a posterior adição de FCCP 20 $\mu\text{mol/L}$.

A Figura 22 mostra que o $\Delta\psi$ de esferoplastos de leveduras expressando a proteína UCP-like foi ligeiramente menor e que o decréscimo momentâneo do $\Delta\psi$ associado com a fosforilação do ADP foi mais lento quando comparado com os esferoplastos controle, indicando desacoplamento da respiração. Além disso, esse comportamento do $\Delta\psi$ dos esferoplastos recombinantes foi similar às células controle quando GDP 2 mmol/L foi adicionado ao meio de reação, sugerindo uma inibição da proteína UCP-like por esse composto (dados não apresentados).

Figura 22: Efeito da proteína UCP-like no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$) de esferoplastos recombinantes de *S. cerevisiae*. Os esferoplastos foram adicionados ao meio de reação contendo safranina O 10 $\mu\text{mol/L}$. As setas indicam as adições de NADH 1 mmol/L, 400 nmoles de ADP e FCCP 20 $\mu\text{mol/L}$.

4.9 - Clonagem do cDNA da UCP-like no vetor de expressão pET SUMO

A região codificadora da UCP-like foi clonada no vetor de expressão bacteriano pET SUMO como descrito no item 3.9. Alguns clones obtidos da transformação foram selecionados para a confirmação da clonagem por PCR de colônia. Dos cinco clones testados, quatro foram positivos para a presença do cDNA da UCP-like (Figura 23).

Figura 23: Produtos de PCR obtidos com diferentes clones transformados com a construção pET SUMO/UCP_cDNA_Afu. Fotografia do gel de eletroforese em agarose 1,0% (p/v), em tampão TAE.

M: Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen);

1 - 5: clones selecionados.

Os DNAs plasmidiais dos clones 1, 2 e 4 foram extraídos e sequenciados. O sequenciamento do clone 4 revelou fase de leitura correta entre o inserto e a região promotora do plasmídeo pET SUMO, além de ausência de *gaps* e mutações, sendo

esse clone selecionado para os experimentos de expressão em bactérias *E. coli*.

4.10 - Expressão da UCP-like recombinante em bactérias

A expressão da UCP-like de *A. fumigatus* em bactérias *E. coli* cepa Rosetta(DE3)pLysS™ foi realizada através da transformação dessas bactérias com o plasmídeo recombinante pET SUMO/UCP_cDNA_Afu. A expressão foi realizada em meio TB líquido com a adição de IPTG, o qual induz a expressão do promotor T7lac. A fim de se observar o padrão de expressão da proteína recombinante, alíquotas de 500 µL da cultura foram retiradas, após a indução com 0,5 mmol/L de IPTG a 25, 30 e 37°C. As proteínas totais das bactérias foram analisadas em SDS-PAGE. Além disso, foi analisada também a presença da proteína de interesse nas frações solúvel e insolúvel após a lise das bactérias (Figura 24).

Figura 24: Expressão da proteína UCP-like em *E. coli*. Fotografia do gel de eletroforese SDS-PAGE 8%, em tampão Tris-Glicina, corado com *coomassie blue*. A seta indica as bandas correspondentes à proteína de tamanho esperado.

M: High-Range Protein Molecular Weight Markers (Invitrogen).

1: Bactérias não induzidas;	6: Fração solúvel (T=4h) a 37°C;
2: Bactérias induzidas (T=4h);	7: Fração insolúvel (T=4h) a 25°C;
3: Fração solúvel (T=0h);	8: Fração insolúvel (T=4h) a 30°C;
4: Fração solúvel (T=4h) a 25°C;	9: Fração insolúvel (T=4h) a 37°C.
5: Fração solúvel (T=4h) a 30°C;	

Após a análise do gel representado na Figura 24, pôde-se verificar que a proteína recombinante foi expressa eficientemente após 4 horas de indução da expressão com IPTG 0,5 mmol/L. A proteína de interesse apresenta um peso molecular de 50 kDa: 37 kDa relativo à UCP-like e 13 kDa relativo à cauda de His e à proteína de fusão SUMO. Para a purificação da proteína recombinante em condições nativas é necessário que ela esteja na forma solúvel. Foi percebido que, quanto menor a temperatura de indução da expressão, maior a quantidade de proteína na forma solúvel. Dessa forma,

padronizou-se a expressão da proteína recombinante a 25°C por 4 horas com IPTG 0,5 mmol/L.

Além da padronização da melhor temperatura para a expressão, foi padronizado também o melhor detergente a ser adicionado ao tampão de lise, a fim de se obter uma maior quantidade de proteína solúvel. Foram utilizados os seguintes detergentes, nas concentrações de 0,5 e 1,0%: Triton X-100, Igepal, SLS e CHAPS (Figura 25). O resultado desse teste de solubilização mostrou que o detergente SLS 0,5% (v/v) foi o que melhor solubilizou a proteína, diminuindo a quantidade de proteína insolúvel presente nos corpos de inclusão.

Figura 25: Teste de solubilização da proteína UCP-like com diferentes detergentes. Fotografia do gel de eletroforese SDS-PAGE 10%, em tampão Tris-Glicina, corado com *coomassie blue*.

M: Protein Mixture Low Molecular Weight (Amersham Biosciences);

- 1: Bactérias não-induzidas;
- 2: Bactérias induzidas (T=4h);
- 3: Triton X-100 1,0% (solúvel);
- 4: Triton X-100 1,0% (insolúvel);
- 5: Sem detergente (solúvel);
- 6: Sem detergente (insolúvel);
- 7: Igepal 0,5% (solúvel);
- 8: Igepal 0,5% (insolúvel);
- 9: Igepal 1,0% (solúvel);
- 10: Igepal 1,0% (insolúvel);

- 11: Triton X-100 0,5% (solúvel);
- 12: Triton X-100 0,5% (insolúvel);
- 13: SLS 0,5% (solúvel);
- 14: SLS 0,5% (insolúvel);
- 15: SLS 1,0% (solúvel);
- 16: SLS 1,0% (insolúvel);
- 17: CHAPS 0,5% (solúvel);
- 18: CHAPS 0,5% (insolúvel);
- 19: CHAPS 1,0% (solúvel);
- 20: CHAPS 1,0% (insolúvel).

4.11 - Purificação da UCP-like recombinante por cromatografia de afinidade

A proteína recombinante UCP-like produzida em bactérias *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS™ foi purificada através de cromatografia de afinidade utilizando resina de níquel. Para isso, as células bacterianas foram lisadas e a fração solúvel foi passada por uma coluna contendo resina de níquel. As proteínas foram coletadas em frações utilizando tampões contendo diferentes concentrações de imidazol. A proteína de interesse foi eluída, na forma purificada, no tampão contendo 300 mM de imidazol (Figura 26).

Figura 26: Purificação da proteína UCP-like por cromatografia de afinidade. Fotografia do gel de eletroforese SDS-PAGE 10%, em tampão Tris-Glicina, corado com *coomassie blue*.

- M: Protein Mixture Low Molecular Weight (Amersham Biosciences);
- 1: Bactérias não-induzidas;
- 2: Bactérias induzidas (T=4h);
- 3: Proteínas que não se ligaram na resina;
- 4: Proteínas que não se ligaram na resina;
- 5-8: Frações de 300 mM de imidazol.

A proteína purificada foi analisada por Western blot utilizando anticorpos anti-(His)6-tag e anti-UCP2 (proteína desacopladora 2 de mamíferos). Em ambas as situações a proteína purificada foi marcada (Figura 27).

Figura 27: Análise por Western blot da proteína purificada utilizando anticorpos anti-(His)6-tag e anti-UCP2.

- 1: Expressão total (T=4h), anticorpo anti-(His)6-tag (1:3000);
- 2: Proteína purificada, anticorpo anti-(His)6-tag (1:3000);
- 3: Proteína purificada, anticorpo anti-UCP2 (1:5000).

Para a confirmação da identidade da proteína expressa e purificada, foi realizada uma análise de sua sequência por espectrometria de massas (MALDI-TOF/TOF-MS). O resultado, mostrado na Figura 28, confirma que a proteína purificada possui três sequências peptídicas idênticas a sequências da UCP-like, o que confirma a purificação da proteína de interesse.

1. [gi|146323026](#) Mass: 37046 Score: 169 Queries matched: 4
mitochondrial deoxynucleotide carrier protein [Aspergillus fumigatus Af293]
☐ Check to include this hit in error tolerant search or archive report

	Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
	1	967.0986	966.0912	967.0358	-0.9446	0	33	25	7	R.SEGPAGFFR.G
☒	2	1102.2561	1101.2488	1102.2835	-1.0347	0	45	1.6	1	K.SGVFPLDLVR.K
☒	3	1122.2901	1121.2827	1122.3145	-1.0318	0	43	2.1	1	R.IYTSLLASVR.D
☒	7	1355.4229	1354.4156	1355.5826	-1.1671	0	49	0.54	1	R.QVVLGGIAGLVSR.F

Proteins matching the same set of peptides:
[gi|182705188](#) Mass: 34315 Score: 169 Queries matched: 4
RecName: Full=Mitochondrial thiamine pyrophosphate carrier 1

Figura 28: Resultado obtido da análise por espectrometria de massas da proteína purificada.

4.12 - Reconstituição da proteína UCP-like recombinante em lipossomos

A proteína UCP-like recombinante purificada foi reconstituída em sistemas lipossomais para a medida de fluxo de H^+ . Inicialmente, foram realizados ensaios para se verificar as condições ideais para permitir a reconstituição da proteína. Os proteolipossomos foram formados com a constituição em massa de lipídios:proteína:detergente de 10:0,1:1.

Para se verificar os diâmetros médios dos lipossomos e proteolipossomos formados foram realizadas medidas por espalhamento de luz dinâmico. Os resultados obtidos estão mostrados na Figura 29. Esses resultados indicam que houve a formação de vesículas estáveis, com diâmetros médios de $182,7 \pm 0,92$ para os lipossomos e $211,2 \pm 0,76$ para os proteolipossomos, com um índice de polidispersão (PI) de 0,433

$\pm 0,007$ para os lipossomos e $0,426 \pm 0,010$ para os proteolipossomos. O PI é um parâmetro que nos fornece informações sobre a distribuição de tamanho das partículas, mostrando o quão homogênea está a solução. Esses valores são coerentes com o esperado e podem indicar que realmente a proteína tenha sido incorporada na membrana lipídica. Para a confirmação da incorporação da proteína foi realizada uma quantificação protéica, utilizando-se o método do BCA. Entretanto, devido à interferência dos lipídios presentes na amostra, esse método não foi adequado. Dessa forma, é necessário se padronizar a técnica de dosagem de proteínas para se eliminar esses interferentes. Sendo assim, outros experimentos são ainda necessários para se obter essa confirmação.

Figura 29: Resultado da medida de espalhamento de luz, realizada em 5 repetições.

A: Lipossomos;

B: Proteolipossomos.

4.13 - Avaliação da expressão do gene da UCP-like na presença de radicais livres

O nível de expressão do gene que codifica para a UCP-like em conídios e hifas de *A. fumigatus* foi quantificado por PCR em tempo real na presença de paraquat e menadiona, drogas doadoras de radicais livres. Como mostrado na Figura 30, tanto em conídios (4h de crescimento) quanto em hifas (24h de crescimento) tratadas com as drogas houve um aumento nos níveis de transcritos de mRNA da UCP-like, sendo esse aumento mais proeminente em hifas tratadas com paraquat.

Figura 30: Nível de expressão do gene que codifica para a UCP-like em culturas de *A. fumigatus* expostas a paraquat e menadiona. Os resultados foram normalizados pelo nível de expressão do gene normalizador GAPDH. Os valores foram comparados com os respectivos controles por análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

5 - Discussão

Com o sequenciamento do genoma de *A. fumigatus* (NIERMAN *et al.*, 2005) foram descritos cerca de 9.630 genes que codificam proteínas, dos quais um terço apresenta função desconhecida (Fedorova & Nierman, 2010). Um grande número de genes e moléculas tem sido identificado e investigado como potenciais fatores de virulência desse fungo. Entretanto, nenhum deles provou ser suficientemente importante para explicar completamente a virulência do *A. fumigatus*. Um profundo entendimento da capacidade de virulência desse fungo pode levar à descoberta de novos possíveis alvos para detecção e tratamento da aspergilose.

Estudos prévios utilizando esferoplastos de *A. fumigatus* identificaram a presença de componentes alternativos em sua cadeia respiratória, com a transferência de elétrons desacoplada à síntese de ATP. Dentre esses componentes alternativos estão uma oxidase alternativa, uma NADH desidrogenase alternativa e uma proteína desacopladora (TUDELLA *et al.* 2004). Essas vias alternativas mitocondriais parecem estar envolvidas com processos de adaptação do fungo a ambientes adversos.

As proteínas desacopladoras são transportadores mitocondriais amplamente distribuídos em organismos eucariotos, entretanto, muito pouco se sabe sobre a exata função dessas proteínas em microrganismos. Apesar das evidências bioquímicas, nenhuma sequência codificando o gene de uma UCP havia sido descrita em *A. fumigatus*.

Através de análises de bioinformática do genoma do fungo *A. fumigatus* (Nierman et al., 2005) foi identificada uma sequência nucleotídica que apresenta algumas características semelhantes às de proteínas desacopladoras mitocondriais de outros organismos. O gene proposto para estudo foi o que se encontra no GenBank sob o número de acesso XM_750738.2 (AFUA_2G14980). A proteína codificada por essa sequência gênica foi denominada nesse trabalho como uma UCP-like de *A. fumigatus*. A análise molecular dessa proteína, realizada através do alinhamento de sua sequência de aminoácidos com as de outras UCPs descritas (UCP1-5 de mamíferos, AtPUMP1 e γ UCP) mostra que, apesar de apresentar uma identidade relativamente baixa, essas sequências apresentam regiões altamente conservadas. As três regiões conservadas são as assinaturas moleculares dos transportadores de energia. Quando comparamos a porcentagem de aminoácidos idênticos nessas sequências, as quais são essenciais para a sua função, obtemos uma maior identidade. A primeira assinatura molecular é a que menos se difere das assinaturas das outras UCPs analisadas, sendo que os únicos aminoácidos que não aparecem nas outras sequências são uma valina na posição 4 e uma isoleucina na posição 7. No lugar da valina, as sequências das proteínas UCP4, UCP5 e γ UCP apresentam uma leucina. Essa substituição, bioquimicamente, pode não causar um efeito tão grande, uma vez que a estrutura das cadeias laterais desses aminoácidos é bastante parecida, sendo ambas alifáticas e não polares. A isoleucina 7 da

primeira assinatura molecular da UCP-like de *A. fumigatus*, nas sequências das proteínas UCP1, UCP2, UCP3 e AtPUMP1 é substituída por uma valina, ambos aminoácidos não polares de cadeia alifática. Na segunda assinatura molecular algumas das diferenças também ocorrem com aminoácidos que apresentam grupos laterais com as mesmas características bioquímicas. Na posição 6 aparece uma arginina na sequência do *A. fumigatus*, enquanto as outras sequências possuem uma lisina, ambos aminoácidos com grupos laterais carregados positivamente em pH fisiológico. Na terceira assinatura molecular ocorrem maiores diferenças nas sequências, entretanto algumas delas também não devem causar efeitos tão drásticos na atividade da proteína, devido a semelhanças entre os grupos laterais dos diferentes aminoácidos. Com exceção do triptofano presente na posição 2 da γ UCP, todos os aminoácidos dessa posição nas outras UCPs analisadas apresentam grupos hidrofóbicos alifáticos. Da mesma forma, na posição 4 dessa assinatura, a UCP-like de *A. fumigatus* apresenta uma leucina, enquanto nas outras sequências essa posição é ocupada por uma valina. A leucina da posição 9 é substituída por outros aminoácidos apolares nas proteínas UCP4, UCP5, AtPUMP1 e γ UCP. Essas diferenças na sequência de aminoácidos entre a UCP-like de *A. fumigatus* e as UCPs dos diferentes organismos analisados podem ser explicadas pela distância evolutiva entre essas espécies. Entretanto, o fato de essas sequências não serem completamente idênticas é importante para seu potencial uso como alvo quimioterapêutico.

Para a busca de inibidores dessa proteína que possam atuar especificamente no fungo é de essencial importância que esse efeito seja o menor possível para o hospedeiro.

Entretanto, apenas pela análise das assinaturas moleculares e pela identidade entre as sequências deduzidas de aminoácidos não é possível identificar precisamente a função dessa proteína. Sendo assim, nesse trabalho foi proposta a clonagem e caracterização funcional da proteína UCP-*like* de *A. fumigatus*. Inicialmente, a fim de se analisar as propriedades bioenergéticas da proteína em estudo, esse gene foi clonado no plasmídeo de expressão em leveduras pYES2. A construção pYES2/UCP-*like* foi utilizada para transformar leveduras *S. cerevisiae*, uma vez que esse microrganismo não possui em seu genoma uma sequência que codifique para a proteína desacopladora (el Moualij *et al.*, 1997).

Foram produzidos esferoplastos das leveduras transformadas, os quais foram utilizados para a medida do potencial elétrico transmembrana mitocondrial ($\Delta\psi$). A medida do $\Delta\psi$ é um importante parâmetro para se avaliar o processo de fosforilação oxidativa. A intensidade desse potencial é fundamental para promover a síntese de ATP via ATP sintetase (complexo V) e pode refletir o grau de participação mitocondrial na geração de energia para a célula. Quando comparados com esferoplastos controle (transformados com o vetor pYES2 vazio), os esferoplastos recombinantes apresentaram um $\Delta\psi$ ligeiramente mais baixo além de um

decréscimo mais demorado no $\Delta\psi$ associado com a fosforilação do ADP. Esse experimento confirmou a atividade desacopladora da UCP-like, uma vez que essa proteína dissipa o gradiente eletroquímico gerado durante a transferência de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial (Bento *et al.*, 2007).

Os reguladores clássicos das proteínas desacopladoras são os ácidos graxos e os nucleotídeos de purina. Os nucleotídeos de purina (ATP, ADP, GTP e GDP) são inibidores e os ácidos graxos são ativadores do fluxo de prótons mediado pela UCP (Borecky *et al.*, 2001; Echtay *et al.*, 2001; Luévano-Martínez *et al.*, 2009). Quando GDP 2 mmol/L foi adicionado ao meio de reação, o $\Delta\psi$ dos esferoplastos das leveduras recombinantes foi semelhante ao das leveduras controle, demonstrando a inibição da atividade dessa proteína por esse composto. Além dos nucleotídeos de purina, outra substância capaz de inibir a atividade da UCP, mais especificamente da UCP2 de mamíferos, é a genipina (Zhang *et al.*, 2006). A proteína UCP2 é um regulador negativo da secreção de insulina (Chan *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001), dessa forma, um aumento em sua expressão nas células β poderia resultar em uma disfunção dessas células e no desenvolvimento de diabetes tipo 2. Consequentemente, um inibidor da proteína UCP2 poderia ser uma droga útil para o tratamento dessa doença, uma vez que, atualmente, não existe uma terapia efetiva para diabetes tipo 2 (Zhang *et al.*, 2006).

Outra metodologia utilizada para se avaliar a atividade da proteína desacopladora é através da medida da respiração

mitocondrial, utilizando-se mitocôndrias isoladas ou esferoplastos das leveduras recombinantes. Entretanto, essa avaliação ainda não foi possível devido ao fato de as preparações mitocondriais se encontrarem altamente desacopladas, sendo difícil a análise do estado 4 da respiração.

Para a obtenção da proteína recombinante purificada para sua posterior caracterização funcional em sistemas reconstituídos, foi realizada a expressão heteróloga dessa proteína em sistema procarioto (bactérias *E. coli*). A maior dificuldade encontrada nesse processo foi a obtenção da proteína na forma solúvel, o que é essencial para a etapa de purificação em condições nativas. Como a UCP-like é uma proteína de membrana, a qual é caracterizada pela presença de domínios hidrofóbicos, a solubilização da mesma se torna difícil. Para tentar minimizar esse problema, o sistema escolhido para a clonagem e expressão da UCP-like foi o vetor pET SUMO. Nesse vetor, o gene de interesse é expresso fusionado à proteína SUMO, um membro da família protéica da ubiquitina, que regula diversos processos celulares, incluindo apoptose, transporte nuclear e progressão do ciclo celular (MULLER *et al.*, 2001). Estudos revelaram que a fusão de uma proteína heteróloga à proteína SUMO pode levar a um aumento nos níveis de expressão, assim como um aumento na solubilidade da proteína recombinante (Li & Hochstrasser, 1999; Mossessova & Lima, 2000; Saitoh *et al.*, 1997).

Após a transformação de bactérias *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS™, a indução da expressão da proteína alvo foi realizada com 0,5 mmol/L de IPTG a 25°C, condições nas quais foi observada uma eficiente expressão ao longo do tempo de indução. No sistema de expressão utilizado, ocorre a transcrição de uma cauda de seis histidinas inserida na região N-terminal da sequência expressa. A histidina é um aminoácido carregado positivamente (em pH 7,0), que possui um anel imidazol como cadeia lateral. Durante o processo de purificação, as histidinas presentes na proteína recombinante apresentam o anel imidazol contendo pares de elétrons livres em seus nitrogênios e disponíveis para a formação de um complexo com os íons Ni^{2+} , presentes na resina de purificação. A purificação da proteína foi realizada utilizando cromatografia de afinidade em resina de Ni^{2+} -sefarose e a eluição da proteína purificada foi realizada através da adição de tampões com quantidades crescentes de imidazol, um competidor da proteína alvo pela ligação ao níquel.

A confirmação da expressão e purificação da UCP-like de *A. fumigatus* foi realizada através de duas análises: Western blot e espectrometria de massas. A proteína purificada foi analisada por Western blot utilizando anticorpos anti-(His)6-tag e anti-UCP2, sendo reconhecida por ambos. Esse reconhecimento permitiu a confirmação da correta expressão da cauda de histidina e a identificação de uma reação cruzada entre anticorpos de mamíferos e a proteína do fungo. A análise

por espectrometria de massas (MALDI-TOF/TOF-MS) permitiu o sequenciamento da proteína expressa, confirmando sua identidade.

O desenvolvimento de protocolos de expressão de proteínas recombinantes e de reconstituição lipossomal tem permitido um detalhado estudo das propriedades de transporte e regulação das proteínas desacopladoras. Nos últimos anos, as propriedades funcionais das UCPs de mamíferos foram avaliadas utilizando-se esse tipo de sistema (Echtay *et al.*, 1999; Echtay *et al.*, 2001), através do qual se pode caracterizar a proteína quanto à especificidade de inibição por nucleotídeos de purina e de ativação por diferentes ácidos graxos. Em 2003, Jaburek & Garlin, utilizando essa metodologia, confirmaram que as proteínas UCP2 e UCP3 são verdadeiramente proteínas desacopladoras e mostraram que elas são qualitativamente idênticas em todas as suas propriedades biofísicas com a UCP1. Além das UCPs de mamíferos, a atividade da AtPUMP1 foi estudada em proteolipossomos, sendo mostrado que o fluxo de H^+ induzido por ácido linoléico é sensível à inibição por nucleotídeos de purina (Borecky *et al.*, 2001). Portanto, além de uma caracterização das propriedades bioenergéticas também é interessante se estudar as propriedades cinéticas das UCPs. Dessa forma, a proteína UCP-like de *A. fumigatus* expressa em *E. coli* foi purificada e reconstituída em proteolipossomos para a sua posterior caracterização funcional, através da medida do fluxo de H^+ . A formação dos lipossomos foi confirmada

através da análise do espalhamento de luz, a qual indicou a formação de vesículas estáveis, com o diâmetro dos proteolipossomos relativamente maior do que dos lipossomos. Entretanto, além da formação das vesículas é necessário que a proteína tenha sido englobada em sua conformação correta, necessária para sua atividade. Outro fator importante é a influência da sequência SUMO fusionada à proteína recombinante durante sua expressão. O ensaio de clivagem dessa sequência com a enzima SUMO protease (Malakhov *et al.*, 2004) não foi bem sucedido. Após alguns testes para se detectar o motivo, foi descoberto que essa enzima não se encontra ativa na presença do detergente aniônico SLS 0,5% (v/v) utilizado para a solubilização da proteína.

A mitocôndria é uma importante fonte intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs), como ânion superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio. EROs mitocondriais são importantes determinantes da função celular, participando de diversas vias de sinalização e de uma variedade de processos degenerativos (Kowaltowski *et al.*, 2009). Dessa forma, mecanismos antioxidantes são essenciais para a proteção celular.

Estudos envolvendo a proteína desacopladora da ameba primitiva *A. castellanii* (AcUCP) mostraram que sua ativação por ácidos graxos resultou em um forte decréscimo da produção de H_2O_2 , enquanto sua inibição por GDP ou BSA aumentou a produção de H_2O_2 . Da mesma forma, a ativação da respiração

mediada por AcAOX com GMP diminuiu significativamente a produção de H_2O_2 , enquanto sua inibição cancelou o efeito indutor do GMP na produção de H_2O_2 . A ativação de ambos os sistemas dissipadores de energia revelou um efeito acumulativo no decréscimo da formação de H_2O_2 (Czarna & Jarmuszkiewicz, 2005). Esses resultados sugerem que a proteção contra o estresse oxidativo mitocondrial possa ser um papel fisiológico da AOX e UCP em organismos unicelulares.

No fungo *A. fumigatus*, foi demonstrado um aumento da expressão da AOX, um componente alternativo mitocondrial, em decorrência da presença de EROs, sugerindo seu importante papel nos mecanismos de defesa antioxidante (Magnani *et al.*, 2007).

O fluxo de prótons mediado pela ativação da UCP dependente de ânion superóxido ocorre via intermediários aldeídicos da peroxidação lipídica, como 4-hidroxinonenal (HNE) (Murphy *et al.*, 2003), que são indutores diretos do fluxo de prótons dependente de UCP em mitocôndrias isoladas (Echtay *et al.*, 2003). Além disso, já foi mostrado que as UCPs podem ser ativadas por ânion superóxido gerado fora da mitocôndria (Echtay *et al.*, 2002).

A fim de se investigar a participação da proteína UCP-like de *A. fumigatus* na proteção contra danos oxidativos, foi determinado o nível de expressão de mRNA por PCR quantitativo em tempo real na presença de paraquat e menadiona, drogas doadoras de radicais livres. Em *A. fumigatus*, a presença de

paraquat provocou um aumento médio de 1,4 vezes no nível de expressão do mRNA em conídios e de 2,2 vezes em hifas, e a presença de menadiona aumentou em 1,8 vezes o nível de mRNA em conídios e em 1,4 vezes em hifas. Os resultados mostram que esse aumento possa ser decorrente de uma resposta ao estresse oxidativo gerado pela aplicação de paraquat e menadiona nas células do fungo. Além disso, um aumento na expressão pode ser um mecanismo de defesa antioxidante, decorrente dos radicais livres formados na mitocôndria do fungo e também em resposta a EROs geradas por macrófagos e neutrófilos durante a infecção fúngica.

A geração de EROs aumentada estimula a atividade da UCP, a qual estimula a respiração. Esse aumento na respiração diminui a concentração de componentes reduzidos da cadeia respiratória que podem atuar como doadores de elétrons para o oxigênio molecular para, assim, controlar a taxa de formação de EROs (Turrens *et al.*, 2003).

6 - Conclusão

Os resultados apresentados nos permitem concluir que:

- A sequência de aminoácidos da UCP-like de *A. fumigatus* apresenta as três assinaturas moleculares das proteínas transferidoras de energia, com elevada similaridade com outras UCPs já descritas;
- A expressão heteróloga dessa proteína em *S. cerevisiae* comprovou sua atividade desacopladora, uma vez que os esferoplastos recombinantes apresentaram um $\Delta\psi$ menor e com um decréscimo mais demorado associado com a fosforilação do ADP;
- A proteína recombinante purificada, expressa em *E. coli*, foi reconhecida por anticorpos anti-(His)6-tag e anti-UCP2;
- A sequência da proteína purificada foi determinada por MALDI-TOF/TOF-MS, o que confirmou a purificação da proteína de interesse;
- Em *A. fumigatus*, a presença de paraquat e menadiona provocou um aumento nos níveis de transcritos do gene da UCP-like, sugerindo sua contribuição em mecanismos de defesa antioxidante.

7 - Referências bibliográficas

- Abad, A., Victoria Fernandez-Molina, J., Bikandi, J., Ramirez, A., Margareto, J., Sendino, J., Luis Hernando, F., Ponton, J., Garaizar, J., Rementeria, A., 2010, What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Rev Iberoam Micol* 27, 155-182.
- Affourtit, C., Moore, A.L., 2004, Purification of the plant alternative oxidase from *Arum maculatum*: measurement, stability and metal requirement. *Biochim Biophys Acta* 1608, 181-189.
- Alp, S., Arikan, S., 2008, Investigation of extracellular elastase, acid proteinase and phospholipase activities as putative virulence factors in clinical isolates of *Aspergillus* species. *J Basic Microbiol* 48, 331-337.
- Amora, Y., Chevionb, M., Levinea, A., 2000, Anoxia pretreatment protects soybean cells against H₂O₂-induced cell death: possible involvement of peroxidases and of alternative oxidase. *FEBS Lett* 477, 175-180.
- Aramwit, P., Yu, B.G., Lavasanifar, A., Samuel, J., Kwon, G.S., 2000, The effect of serum albumin on the aggregation state and toxicity of amphotericin B. *J Pharm Sci* 89, 1589-1593.
- Argyropoulos, G., Harper, M.E., 2002, Uncoupling proteins and thermoregulation. *J Appl Physiol* 92, 2187-2198.
- Bej, A.K., Mahbubani, M.H., 1994, Thermostable DNA polymerase for *in vitro* DNA amplification, In: GRIFFIN, H., GRIFFIN, A. (Eds.) *PCR technology: current innovations*. CRC Press, London, pp. 219-237.
- Ben-Ami, R., Lewis, R.E., Kontoyiannis, D.P., 2010, Enemy of the (immunosuppressed) state: an update on the pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* infection. *Br J Haematol* 150, 406-417.
- Bennett, J.W., Klich, M.A., 1992, *Aspergillus*: biology and industrial applications. *Biotechnology* 23, 1-404.
- Bento, L.M., Fagian, M.M., Vercesi, A.E., Gontijo, J.A., 2007, Effects of NH₄Cl-induced systemic metabolic acidosis on kidney mitochondrial coupling and calcium transport in rats. *Nephrol Dial Transplant* 22, 2817-2823.
- Bodey, G.P., Vartivarian, S., 1989, Aspergillosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 8, 413-437.
- Bolard, J., 1991, Mechanisms of action of anti-candida drug: amphotericin B and its derivatives, In: Prasad, R. (Ed.) *Candida albicans, Cellular and Molecular Biology*. Springer, Verlag, Germany, p. 213.

- Bolard, J., Milhaud, J., 1996, Interaction of the anti-Candida amphotericin B (and other polyene antibiotics) with lipids, In: Prasad, R., Ghannoum, M. (Eds.) *Lipids of Pathogenic Fungi*. CRC Press, p. 253.
- Borecky, J., Maia, I.G., Costa, A.D., Jezek, P., Chaimovich, H., de Andrade, P.B., Vercesi, A.E., Arruda, P., 2001, Functional reconstitution of *Arabidopsis thaliana* plant uncoupling mitochondrial protein (AtPUMP1) expressed in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 505, 240-244.
- Boss, O., Samec, S., Paoloni-Giacobino, A., Rossier, C., Dulloo, A., Seydoux, J., Muzzin, P., Giacobino, J.P., 1997, Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett* 408, 39-42.
- Boyer, P.D., Chance, B., Ernster, L., Mitchell, P., Racker, E., Slater, E.C., 1977, Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. *Annu Rev Biochem* 46, 955-966.
- Brajtburg, J., Powderly, W.G., Kobayashi, G.S., Medoff, G., 1990, Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. *Antimicrob Agents Chemother* 34, 183-188.
- Brakhage, A.A., Langfelder, K., 2002, Menacing mold: the molecular biology of *Aspergillus fumigatus*. *Annu Rev Microbiol* 56, 433-455.
- Calegario, F.F., Cosso, R.G., Fagian, M.M., Almeida, F.V., Jardim, W.F., Jezek, P., Arruda, P., Vercesi, A.E., 2003, Simulation of potato tuber respiration by cold stress is associated with an increased capacity of both plant uncoupling mitochondrial protein (PUMP) and alternative oxidase. *J. Bioenerg. Biomembr.* 35, 211-220.
- Cannon, B., Shabalina, I.G., Kramarova, T.V., Petrovic, N., Nedergaard, J., 2006, Uncoupling proteins: a role in protection against reactive oxygen species--or not? *Biochim Biophys Acta* 1757, 449-458.
- Cavalheiro, R.A., Fortes, F., Borecky, J., Faustinoni, V.C., Schreiber, A.Z., Vercesi, A.E., 2004, Respiration, oxidative phosphorylation, and uncoupling protein in *Candida albicans*. *Braz J Med Biol Res* 37, 1455-1461.
- Chan, C.B., De Leo, D., Joseph, J.W., McQuaid, T.S., Ha, X.F., Xu, F., Tsushima, R.G., Pennefather, P.S., Salapatek, A.M., Wheeler, M.B., 2001, Increased uncoupling protein-2 levels in beta-cells are associated with impaired glucose-stimulated insulin secretion: mechanism of action. *Diabetes* 50, 1302-1310.

- Chan, S.L., Wei, Z., Chigurupati, S., Tu, W., 2010, Compromised respiratory adaptation and thermoregulation in aging and age-related diseases. *Ageing Res Rev* 9, 20-40.
- Chance, B., Williams, G.R., 1956, The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem* 17, 65-134.
- Cottrell, T.R., Doering, T.L., 2003, Silence of the strands: RNA interference in eukaryotic pathogens. *Trends Microbiol* 11, 37-43.
- Cowen, L.E., Steinbach, W.J., 2008, Stress, drugs, and evolution: the role of cellular signaling in fungal drug resistance. *Eukaryot Cell* 7, 747-764.
- Czarna, M., Jarmuszkiewicz, W., 2005, Activation of alternative oxidase and uncoupling protein lowers hydrogen peroxide formation in amoeba *Acanthamoeba castellanii* mitochondria. *FEBS Lett* 579, 3136-3140.
- Dagenais, T.R., Keller, N.P., 2009, Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 22, 447-465.
- Denning, D.W., 1998, Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 26, 781-803; quiz 804-785.
- Echtay, K.S., 2007, Mitochondrial uncoupling proteins--what is their physiological role? *Free Radic Biol Med* 43, 1351-1371.
- Echtay, K.S., Esteves, T.C., Pakay, J.L., Jekabsons, M.B., Lambert, A.J., Portero-Otin, M., Pamplona, R., Vidal-Puig, A.J., Wang, S., Roebuck, S.J., Brand, M.D., 2003, A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. *EMBO J* 22, 4103-4110.
- Echtay, K.S., Liu, Q., Caskey, T., Winkler, E., Frischmuth, K., Bienengraber, M., Klingenberg, M., 1999, Regulation of UCP3 by nucleotides is different from regulation of UCP1. *FEBS Lett* 450, 8-12.
- Echtay, K.S., Roussel, D., St-Pierre, J., Jekabsons, M.B., Cadenas, S., Stuart, J.A., Harper, J.A., Roebuck, S.J., Morrison, A., Pickering, S., Clapham, J.C., Brand, M.D., 2002, Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* 415, 96-99.
- Echtay, K.S., Winkler, E., Frischmuth, K., Klingenberg, M., 2001, Uncoupling proteins 2 and 3 are highly active H(+) transporters and highly nucleotide sensitive when activated by coenzyme Q (ubiquinone). *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1416-1421.

- el Moualij, B., Duyckaerts, C., Lamotte-Brasseur, J., Sluse, F.E., 1997, Phylogenetic classification of the mitochondrial carrier family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13, 573-581.
- Falvey, D.G., Streifel, A.J., 2007, Ten-year air sample analysis of *Aspergillus* prevalence in a university hospital. *J Hosp Infect* 67, 35-41.
- Fedorova, N.D., Nierman, W.C., 2010, Comparative genomics of *Aspergilli*, In: Machida, M., Gomi, K. (Eds.) *Aspergillus. Molecular biology and genomics*. Caister Academic Press, Norfolk, UK, pp. 41-60.
- Finkel, T., Holbrook, N.J., 2000, Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239-247.
- Fleury, C., Neverova, M., Collins, S., Raimbault, S., Champigny, O., Levi-Meyrueis, C., Bouillaud, F., Seldin, M.F., Surwit, R.S., Ricquier, D., Warden, C.H., 1997, Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet* 15, 269-272.
- Glab, N., Wise, R.P., Pring, D.R., Jacq, C., Slonimski, P., 1990, Expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a gene associated with cytoplasmic male sterility from maize: respiratory dysfunction and uncoupling of yeast mitochondria. *Mol Gen Genet* 223, 24-32.
- Gniadek, A., Macura, A.B., 2007, Intensive care unit environment contamination with fungi. *Adv Med Sci* 52, 283-287.
- Green, D.R., Reed, J.C., 1998, Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.
- Gugnani, H.C., 2003, Ecology and taxonomy of pathogenic *aspergilli*. *Front Biosci* 8, s346-357.
- Halliwel, B., Gutteridge, J.M.C., 1999, Free Radicals, In: *Biology and Medicine*. Oxford University Press, New York.
- Hanqing, F., Kun, S., Mingquan, L., Hongyu, L., Xin, L., Yan, L., Yifeng, W., 2010, The expression, function and regulation of mitochondrial alternative oxidase under biotic stresses. *Mol Plant Pathol* 11, 429-440.
- Jaburek, M., Garlid, K.D., 2003, Reconstitution of recombinant uncoupling proteins: UCP1, -2, and -3 have similar affinities for ATP and are unaffected by coenzyme Q10. *J Biol Chem* 278, 25825-25831.
- Jarmuszkiewicz, W., Behrendt, M., Navet, R., Sluse, F.E., 2002, Uncoupling protein and alternative oxidase of *Dictyostelium discoideum*: occurrence, properties and

- protein expression during vegetative life and starvation-induced early development. *FEBS Lett* 532, 459-464.
- Jarmuszkiewicz, W., Milani, G., Fortes, F., Schreiber, A.Z., Sluse, F.E., Vercesi, A.E., 2000, First evidence and characterization of an uncoupling protein in fungi kingdom: CpUCP of *Candida parapsilosis*. *FEBS Lett* 467, 145-149.
- Jarmuszkiewicz, W., Sluse-Goffart, C.M., Hryniewiecka, L., Sluse, F.E., 1999, Identification and characterization of a protozoan uncoupling protein in *Acanthamoeba castellanii*. *J Biol Chem* 274, 23198-23202.
- Jarmuszkiewicz, W., Woyda-Ploszczyca, A., Antos-Krzeminska, N., Sluse, F.E., 2010, Mitochondrial uncoupling proteins in unicellular eukaryotes. *Biochim Biophys Acta* 1797, 792-799.
- Jimenez-Jimenez, J., Zardoya, R., Ledesma, A., Garcia de Lacoba, M., Zaragoza, P., Mar Gonzalez-Barroso, M., Rial, E., 2006, Evolutionarily distinct residues in the uncoupling protein UCP1 are essential for its characteristic basal proton conductance. *J Mol Biol* 359, 1010-1022.
- Karkowska-Kuleta, J., Rapala-Kozik, M., Kozik, A., 2009, Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochim Pol* 56, 211-224.
- Kauffman, C.A., 2006, Clinical efficacy of new antifungal agents. *Curr Opin Microbiol* 9, 483-488.
- Kerscher, S.J., 2000, Diversity and origin of alternative NADH:ubiquinone oxidoreductases. *Biochim Biophys Acta* 1459, 274-283.
- Kimura, K., Kuwayama, H., Amagai, A., Maeda, Y., 2010, Developmental significance of cyanide-resistant respiration under stressed conditions: experiments in *Dictyostelium* cells. *Dev Growth Differ* 52, 645-656.
- Klich, M.A., 2006, Identification of clinically relevant aspergilli. *Med Mycol* 44, 127-131.
- Kowaltowski, A.J., de Souza-Pinto, N.C., Castilho, R.F., Vercesi, A.E., 2009, Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 47, 333-343.
- Kozak, M., 1986, Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 44, 283-292.

- Krauss, S., Zhang, C.Y., Lowell, B.B., 2005, The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 248-261.
- Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Latgé, J.P., 2001, The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol* 9, 382-389.
- Li, S.J., Hochstrasser, M., 1999, A new protease required for cell-cycle progression in yeast. *Nature* 398, 246-251.
- Luevano-Martinez, L.A., Moyano, E., de Lacoba, M.G., Rial, E., Uribe-Carvajal, S., 2009, Identification of the mitochondrial carrier that provides *Yarrowia lipolytica* with a fatty acid-induced and nucleotide-sensitive uncoupling protein-like activity. *Biochim Biophys Acta* 1797, 81-88.
- Magnani, T., Soriani, F.M., Martins, V.P., Nascimento, A.M., Tudella, V.G., Curti, C., Uyemura, S.A., 2007, Cloning and functional expression of the mitochondrial alternative oxidase of *Aspergillus fumigatus* and its induction by oxidative stress. *FEMS Microbiol Lett* 271, 230-238.
- Malakhov, M.P., Mattern, M.R., Malakhova, O.A., Drinker, M., Weeks, S.D., Butt, T.R., 2004, SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. *J Struct Funct Genomics* 5, 75-86.
- Mao, W., Yu, X.X., Zhong, A., Li, W., Brush, J., Sherwood, S.W., Adams, S.H., Pan, G., 1999, UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells. *FEBS Lett* 443, 326-330.
- Martins, V.P., Magnani, T., Curti, C., Uyemura, S.A., 2011, Classical and alternative components of the mitochondrial respiratory chain in pathogenic fungus as potential therapeutic targets. *J Bioenerg Biomembr*.
- Michalecka, A.M., Agius, S.C., Moller, I.M., Rasmusson, A.G., 2004, Identification of a mitochondrial external NADPH dehydrogenase by overexpression in transgenic *Nicotiana glauca*. *Plant J* 37, 415-425.
- Milani, G., Jarmuszkiewicz, W., Sluse-Goffart, C.M., Schreiber, A.Z., Vercesi, A.E., Sluse, F.E., 2001, Respiratory chain network in mitochondria of *Candida parapsilosis*: ADP/O appraisal of the multiple electron pathways. *FEBS Lett* 508, 231-235.

- Mitchell, P., 1961, Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191, 144-148.
- Moore, A.L., Albury, M.S., Crichton, P.G., Affourtit, C., 2002, Function of the alternative oxidase: is it still a scavenger? *Trends Plant Sci* 7, 478-481.
- Morris, G., Kokki, M.H., Anderson, K., Richardson, M.D., 2000, Sampling of *Aspergillus* spores in air. *J Hosp Infect* 44, 81-92.
- Mossessova, E., Lima, C.D., 2000, Ulp1-SUMO crystal structure and genetic analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth in yeast. *Mol Cell* 5, 865-876.
- Muller, S., Hoege, C., Pyrowolakis, G., Jentsch, S., 2001, SUMO, Ubiquitin's Mysterious Cousin. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 202-210.
- Murphy, M.P., Echtay, K.S., Blaikie, F.H., Asin-Cayuela, J., Cocheme, H.M., Green, K., Buckingham, J.A., Taylor, E.R., Hurrell, F., Hughes, G., Miwa, S., Cooper, C.E., Svistunenko, D.A., Smith, R.A., Brand, M.D., 2003, Superoxide activates uncoupling proteins by generating carbon-centered radicals and initiating lipid peroxidation: studies using a mitochondria-targeted spin trap derived from alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron. *J Biol Chem* 278, 48534-48545.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2005, Oxidative Phosphorylation and Photophosphorylation, In: *Lehninger Principles of Biochemistry*. pp. 690-750.
- Newmeyer, D.D., Ferguson-Miller, S., 2003, Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* 112, 481-490.
- Nicholls, D.G., Locke, R.M., 1984, Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev* 64, 1-64.
- Nicholls, D.G., Rial, E., 1999, A history of the first uncoupling protein, UCP1. *J Bioenerg Biomembr* 31, 399-406.
- Nierman, W.C., Pain, A., Anderson, M.J., Wortman, J.R., Kim, H.S., Arroyo, J., Berriman, M., Abe, K., Archer, D.B., Bermejo, C., Bennett, J., Bowyer, P., Chen, D., Collins, M., Coulsen, R., Davies, R., Dyer, P.S., Farman, M., Fedorova, N., Feldblyum, T.V., Fischer, R., Fosker, N., Fraser, A., Garcia, J.L., Garcia, M.J., Goble, A., Goldman, G.H., Gomi, K., Griffith-Jones, S., Gwilliam, R., Haas, B., Haas, H., Harris, D., Horiuchi, H., Huang,

- J., Humphray, S., Jimenez, J., Keller, N., Khouri, H., Kitamoto, K., Kobayashi, T., Konzack, S., Kulkarni, R., Kumagai, T., Lafon, A., Latge, J.P., Li, W., Lord, A., Lu, C., Majoros, W.H., May, G.S., Miller, B.L., Mohamoud, Y., Molina, M., Monod, M., Mouyna, I., Mulligan, S., Murphy, L., O'Neil, S., Paulsen, I., Penalva, M.A., Perteau, M., Price, C., Pritchard, B.L., Quail, M.A., Rabinowitsch, E., Rawlins, N., Rajandream, M.A., Reichard, U., Renauld, H., Robson, G.D., Rodriguez de Cordoba, S., Rodriguez-Pena, J.M., Ronning, C.M., Rutter, S., Salzberg, S.L., Sanchez, M., Sanchez-Ferrero, J.C., Saunders, D., Seeger, K., Squares, R., Squares, S., Takeuchi, M., Tekai, F., Turner, G., Vazquez de Aldana, C.R., Weidman, J., White, O., Woodward, J., Yu, J.H., Fraser, C., Galagan, J.E., Asai, K., Machida, M., Hall, N., Barrell, B., Denning, D.W., 2005, Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 438, 1151-1156.
- Nihei, C., Fukai, Y., Kawai, K., Osanai, A., Yabu, Y., Suzuki, T., Ohta, N., Minagawa, N., Nagai, K., Kita, K., 2003, Purification of active recombinant trypanosome alternative oxidase. *FEBS Lett* 538, 35-40.
- Nihei, C., Fukai, Y., Kita, K., 2002, Trypanosome alternative oxidase as a target of chemotherapy. *Biochim Biophys Acta* 1587, 234-239.
- O'Gorman, C.M., Fuller, H.T., Dyer, P.S., 2009, Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 457, 471-474.
- Odds, F.C., Brown, A.J., Gow, N.A., 2003, Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol* 11, 272-279.
- Pagliarini, D.J., Dixon, J.E., 2006, Mitochondrial modulation: reversible phosphorylation takes center stage? *Trends Biochem Sci* 31, 26-34.
- Palmieri, F., 2004, The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. *Pflugers Arch* 447, 689-709.
- Pitt, J.I., 1994, The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health. *J Med Vet Mycol* 32 Suppl 1, 17-32.
- Ramsdale, M., 2008, Programmed cell death in pathogenic fungi. *Biochim Biophys Acta* 1783, 1369-1380.
- Rasmusson, A.G., Müller, I.M., 2006, Multiple Energy-Conservation Bypasses in Oxidative Phosphorylation of Plant Mitochondria, In: *Plant Physiology*.

- Rasmusson, A.G., Svensson, A.S., Knoop, V., Grohmann, L., Brennicke, A., 1999, Homologues of yeast and bacterial rotenone-insensitive NADH dehydrogenases in higher eukaryotes: two enzymes are present in potato mitochondria. *Plant J* 20, 79-87.
- Rementeria, A., Lopez-Molina, N., Ludwig, A., Vivanco, A.B., Bikandi, J., Ponton, J., Garaizar, J., 2005, Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. *Rev Iberoam Micol* 22, 1-23.
- Rhodes, J.C., 2006, *Aspergillus fumigatus*: growth and virulence. *Med Mycol* 44 Suppl 1, S77-81.
- Rhodes, J.C., Brakhage, A.A., 2006, Molecular determinants of virulence in *Aspergillus fumigatus*, In: Molecular principles of fungal pathogenesis. ASM Press, Washington DC, pp. 333-345.
- Ricquier, D., Kader, J.C., 1976, Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study. *Biochem Biophys Res Commun* 73, 577-583.
- Rotig, A., Munnich, A., 2003, Genetic features of mitochondrial respiratory chain disorders. *J Am Soc Nephrol* 14, 2995-3007.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N., 1985, Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.
- Saitoh, H., Pu, R.T., Dasso, M., 1997, SUMO-1: wrestling with a new ubiquitin-related modifier. *Trends Biochem Sci* 22, 374-376.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989, Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanchis, D., Fleury, C., Chomiki, N., Goubern, M., Huang, Q., Neverova, M., Gregoire, F., Easlick, J., Raimbault, S., Levi-Meyrueis, C., Miroux, B., Collins, S., Seldin, M., Richard, D., Warden, C., Bouillaud, F., Ricquier, D., 1998, BMCP1, a novel mitochondrial carrier with high expression in the central nervous system of humans and rodents, and respiration uncoupling activity in recombinant yeast. *J Biol Chem* 273, 34611-34615.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.

- Sanglard, D., Bille, J., 2002, Current understanding of the modes of action of and resistance mechanisms to conventional and emerging antifungal agents for treatment of *Candida* infection, In: Calderone, R.A. (Ed.) *Candida and Candidiasis*. ASM Press, Washington, p. 349.
- Schaffner, A., Douglas, H., Braude, A., 1982, Selective protection against conidia by mononuclear and against mycelia by polymorphonuclear phagocytes in resistance to *Aspergillus*. Observations on these two lines of defense in vivo and in vitro with human and mouse phagocytes. *J Clin Invest* 69, 617-631.
- Sierra-Campos, E., Velazquez, I., Matuz-Mares, D., Villavicencio-Queijeiro, A., Pardo, J.P., 2009, Functional properties of the *Ustilago maydis* alternative oxidase under oxidative stress conditions. *Mitochondrion* 9, 96-102.
- Stevens, D., 2000, *Aspergillosis*. Cecil textbook of medicine Goldman BJ, ed., 1875-1877.
- Sullivan, D., Moran, G., Coleman, D., 2005, Fungal Diseases of Humans, In: *Fungi*.
- Suzuki, T., Nihei, C., Yabu, Y., Hashimoto, T., Suzuki, M., Yoshida, A., Nagai, K., Hosokawa, T., Minagawa, N., Suzuki, S., Kita, K., Ohta, N., 2004, Molecular cloning and characterization of *Trypanosoma vivax* alternative oxidase (AOX) gene, a target of the trypanocide ascofuranone. *Parasitol Int* 53, 235-245.
- Taubitz, A., Bauer, B., Heesemann, J., Ebel, F., 2007, Role of respiration in the germination process of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Curr Microbiol* 54, 354-360.
- Tawara, S., Ikeda, F., Maki, K., Morishita, Y., Otomo, K., Teratani, N., Goto, T., Tomishima, M., Ohki, H., Yamada, A., Kawabata, K., Takasugi, H., Sakane, K., Tanaka, H., Matsumoto, F., Kuwahara, S., 2000, In vitro activities of a new lipopeptide antifungal agent, FK463, against a variety of clinically important fungi. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 57-62.
- Tekaia, F., Latge, J.P., 2005, *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? *Curr Opin Microbiol* 8, 385-392.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354.
- Tudella, V.G., Curti, C., Soriani, F.M., Santos, A.C., Uyemura, S.A., 2004, In situ evidence of an alternative

- oxidase and an uncoupling protein in the respiratory chain of *Aspergillus fumigatus*. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 162-172.
- Turrens, J.F., 2003, Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552, 335-344.
- Uyemura, S.A., Luo, S., Moreno, S.N., Docampo, R., 2000, Oxidative phosphorylation, Ca^{2+} transport, and fatty acid-induced uncoupling in malaria parasites mitochondria. *J Biol Chem* 275, 9709-9715.
- Uyemura, S.A., Luo, S., Vieira, M., Moreno, S.N., Docampo, R., 2004, Oxidative phosphorylation and rotenone-insensitive malate- and NADH-quinone oxidoreductases in *Plasmodium yoelii yoelii* mitochondria in situ. *J Biol Chem* 279, 385-393.
- van Burik, J.A., Schreckhise, R.W., White, T.C., Bowden, R.A., Myerson, D., 1998, Comparison of six extraction techniques for isolation of DNA from filamentous fungi. *Med Mycol* 36, 299-303.
- Vercesi, A.E., 2001, The discovery of an uncoupling mitochondrial protein in plants. *Biosci Rep* 21, 195-200.
- Vercesi, A.E., Borecky, J., Maia Ide, G., Arruda, P., Cuccovia, I.M., Chaimovich, H., 2006, Plant uncoupling mitochondrial proteins. *Annu Rev Plant Biol* 57, 383-404.
- Vercesi, A.E., Martins, I.S., Silva, M.A.P., Leite, H.M.F., Cuccovia, I.M., Chaimovich, H., 1995, PUMPing plants. *Nature* 375, 324.
- Zhang, C.Y., Baffy, G., Perret, P., Krauss, S., Peroni, O., Grujic, D., Hagen, T., Vidal-Puig, A.J., Boss, O., Kim, Y.B., Zheng, X.X., Wheeler, M.B., Shulman, G.I., Chan, C.B., Lowell, B.B., 2001, Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes. *Cell* 105, 745-755.
- Zhang, C.Y., Parton, L.E., Ye, C.P., Krauss, S., Shen, R., Lin, C.T., Porco, J.A., Jr., Lowell, B.B., 2006, Genipin inhibits UCP2-mediated proton leak and acutely reverses obesity- and high glucose-induced beta cell dysfunction in isolated pancreatic islets. *Cell Metab* 3, 417-427.

Apêndice

Apêndice 1 - Meios de cultivo

1.1 - YG

Glicose.....	2,0% (p/v)
Extrato de Levedura.....	0,5% (p/v)
Solução de elementos traços.....	0,1% (v/v)

As substâncias que compõem o meio foram dissolvidas em água destilada e o pH foi ajustado para 7,0. O meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos. Para o meio sólido (YAG) foi acrescentado ágar 2,0% (p/v) antes da autoclavagem.

1.2 - LB

Tryptona.....	1,0% (p/v)
Extrato de Levedura.....	0,5% (p/v)
NaCl.....	1,0% (p/v)
Ágar.....	1,5% (p/v)

As substâncias que compõem o meio foram dissolvidas em água destilada e o pH da mistura foi ajustado para 7,0. O meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos.

1.3 - SOC

Triptona.....	2,0% (p/v)
Extrato de levedura.....	0,5% (p/v)
NaCl.....	10 mmol/L
KCl.....	2 mmol/L
MgCl ₂	10 mmol/L
Glicose*.....	20 mmol/L

*O meio SOB é o meio SOC sem a adição de glicose.

As substâncias que compõem o meio, exceto MgCl₂ e glicose, foram dissolvidas em água destilada. O meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos. Na hora de usar, foram adicionados MgCl₂ e glicose, a partir de soluções estoque já previamente esterilizadas.

1.4 - YPD

Peptona.....	2,0% (p/v)
Extrato de levedura.....	1,0% (p/v)
Glicose.....	2,0% (p/v)
Ágar.....	1,5% (p/v)

As substâncias que compõem o meio, com exceção da glicose, foram dissolvidas em água destilada. O meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20

minutos. Para o uso, adicionou-se uma solução estoque de glicose 20% (p/v) previamente esterilizada.

1.5 - SC

Base de nitrogênio para

levedura..... 0,67% (p/v)

Fonte de carbono:

Glicose, rafinose ou

galactose..... 2,0% (p/v)

adenina, arginina, cisteína, leucina,	}	0,01% (p/v)
lisina, treonina, triptofano e uracila		

ácido aspártico, histidina, isoleucina,	}	0,005% (p/v)
metionina, prolina, fenilalanina,		
serina, tirosina e valina		

Ágar..... 2,0% (p/v)

O meio SC é definido como um meio de cultura mínimo para leveduras. Em sua preparação, os reagentes foram dissolvidos em água deionizada e, em seguida, o meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 Kgf/cm² por 20 minutos. Após resfriado, dependendo da fonte de carbono utilizada, foi adicionada uma solução estoque estéril de glicose ou rafinose ou galactose para uma concentração final de 2% (p/v). Para o meio seletivo SC-URA⁻ foi omitida a base nitrogenada uracila.

1.6 - TB

Extrato de levedura	2,4% (p/v)
Triptona	1,2% (p/v)
Glicerol	0,4% (v/v)
KH ₂ PO ₄	17,0 mmol/L
K ₂ HPO ₄	72,0 mmol/L

As substâncias que compõem o meio foram dissolvidas em água destilada. O meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos. Após o resfriamento, adicionou-se ao meio uma solução estéril de KH₂PO₄ 0,17 M/K₂HPO₄ 0,72 M previamente esterilizada.

Apêndice 2 - Soluções e tampões

2.1 - Solução de elementos traços

ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	0,38 mol/L
H ₃ BO ₃	0,9 mol/L
MnCl ₂ .4H ₂ O.....	0,13 mol/L
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	0,09 mol/L
CoCl ₂ .5H ₂ O.....	0,03 mol/L
CuSO ₄ .5H ₂ O.....	0,03 mol/L
NH ₄ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O.....	4,8 mmol/L
EDTA.....	0,86 mol/L

As substâncias que compõem a solução foram adicionadas na ordem listada acima e dissolvidas em água destilada. A solução foi fervida e, após o resfriamento, o pH foi ajustado para 6,5-6,8 com KOH e o volume final da solução foi ajustado.

2.2 - Tampão salina fosfato (PBS)

NaCl.....	0,14 mol/L
KCl.....	2,7 mmol/L
Na ₂ HPO ₄	8,1 mmol/L
KH ₂ PO ₄	1,5 mmol/L

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em água destilada e o pH foi ajustado para 7,4. O tampão foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos.

2.3 - Tampão de extração de DNA para *A. fumigatus*

Tris pH 8,0.....	20 mmol/L
EDTA pH 8,0.....	10 mmol/L
NaCl.....	150 mmol/L
SDS.....	0,5% (p/v)
RNAse A.....	10 µg/mL
Proteinase K.....	200 µg/mL

2.4 - Tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE)

EDTA.....	10 mmol/L
Tris-acetato pH 8,0.....	40 mmol/L

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em água destilada e o pH foi ajustado para 8,0. O tampão foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos.

2.5 - Tampão de amostra para DNA

Azul de bromofenol.....	0,25% (p/v)
Xileno Cianol FF.....	0,25% (p/v)
Orange G.....	0,25% (p/v)
Tris-HCl pH 7,5.....	10 mmol/L
EDTA.....	10 mmol/L
Sacarose.....	0,65% (p/v)

2.6 - Solução TB para preparação de bactérias competentes

Pipes pH 7,0.....	10,0 mmol/L
MnCl ₂	55,0 mmol/L
CaCl ₂	15,0 mmol/L
KCl.....	250,0 mmol/L

As substâncias que compõem a solução foram dissolvidas em água deionizada. Em seguida, a solução foi esterilizada por filtração a 0,22 µm e armazenada a 4°C.

2.7 - Tampão de amostra para SDS-PAGE

β-mercaptoetanol.....	2,0% (v/v)
Tris-HCl pH 6,8.....	62,5 mmol/L
Glicerol.....	10,0% (v/v)
SDS.....	2,0% (p/v)
Azul de bromofenol.....	0,1% (p/v)

2.8 - Tampão fosfato de sódio 160 mM, pH 7,4 (8X concentrado)

Na ₂ HPO ₄	0,08 mol/L
NaH ₂ PO ₄	0,08 mol/L

As substâncias que compõem a solução foram dissolvidas em água destilada e o pH foi ajustado para 7,4. Em seguida, a solução foi filtrada a 0,45 µm e armazenada a 4°C. Esse tampão

concentrado foi diluído 8 vezes antes do uso, ficando a solução final com uma concentração de 20 mmol/L.

2.9 - SDS-PAGE

Gel de empilhamento 5%

Acrilamida/Bis-acrilamida.....	5,0% (p/v)
Tris-HCl pH 6,8.....	125 mmol/L
SDS.....	0,1% (p/v)
Persulfato de amônio.....	0,1% (p/v)
TEMED.....	0,1% (v/v)

Gel de separação 8-12%

Acrilamida/Bis-acrilamida.....	8,0%-12,0% (p/v)
Tris-HCl pH 8,8.....	400 mmol/L
SDS.....	0,1% (p/v)
Persulfato de amônio.....	0,1% (p/v)
TEMED.....	0,1% (v/v)

2.10 - Tampão de corrida Tris-Glicina pH 8,3

Tris-HCl pH 8,3.....	25 mmol/L
Glicina.....	250 mmol/L
SDS.....	0,1% (p/v)

2.11 - Solução corante de coomassie

Coomassie (Brilhant Blue R-250).....	0,25% (p/v)
Metanol.....	45,0% (v/v)
Ácido acético.....	10,0% (v/v)

2.12 - Solução descolorante para coomassie

Etanol.....	5,0% (v/v)
Ácido acético.....	7,0% (v/v)

2.13 - Tampão de transferência (Western Blot)

Tris-HCl pH 8,3.....	25,0 mmol/L
Glicina.....	192 mmol/L
Metanol.....	20,0% (v/v)
SDS.....	0,05% (p/v)

2.14 - TBS-T

Tris-HCl pH 7,6.....	0,02 mol/L
NaCl.....	140 mmol/L
Tween 20.....	0,1% (v/v)

2.15 - Tampão de pré-incubação para esferoplastos de *S. cerevisiae*

β -mercaptoetanol.....	100,0 mmol/L
Tris-HCl pH 9,4.....	10,0 mmol/L

2.16 - Tampão de digestão para esferoplastos de *S. cerevisiae*

Sorbitol.....	1,3 mol/L
EGTA.....	1,0 mmol/L
BSA.....	0,2% (p/v)
Fosfato de potássio pH 7,4.....	50,0 mmol/L

2.17 - Tampão de esferoplastos para *S. cerevisiae*

Sacarose.....	0,7 mol/L
EGTA.....	0,5 mmol/L
KCl.....	1,7 mmol/L
KH ₂ PO ₄ pH 6,8.....	10,0 mmol/L