Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

A importância da proteína fosfatase *sitA* na adesão, integridade da parede celular, biofilme e virulência de *Aspergillus fumigatus*.

Vinícius Leite Pedro Bom

Ribeirão Preto

2016

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

A importância da proteína fosfatase *sitA* na adesão, integridade da parede celular, biofilme e virulência de *Aspergillus fumigatus*.

Dissertação de Mestrado apresentado do
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica para obtenção do Título de
Mestre em Bioquímica

Área de Concentração: Bioquímica

Orientado: Vinícius Leite Pedro Bom

Orientador: Gustavo Henrique Goldman

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

Ribeirão Preto

2016

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

Bom, Vinícius Leite Pedro

A importância da proteína fosfatase *sitA* na adesão, integridade da parede celular, biofilme e virulência de *Aspergillus fumigatus*. Ribeirão Preto, 2016

X p.: il: 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentado a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Bioquímica

1. *Aspergillus fumigatus*. 2. Proteína fosfatase. 3. *sitA*. 4. *pkC*.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Vinícius Leite Pedro Bom

A importância da proteína fosfatase *sitA* na adesão, integridade da parede celular, biofilme e virulência de *Aspergillus fumigatus*.

Dissertação de Mestrado apresentado do
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica para obtenção do Título de
Mestre em Bioquímica

Área de Concentração: Bioquímica

Orientado: Vinícius Leite Pedro Bom

Orientador: Gustavo Henrique Goldman

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico,

Aos meus pais Jussara e Luiz, por todo carinho,
amor, exemplo de vida e por todo incentivo.

A minha irmã Gabrielle, por todo carinho.

À minha namorada Lilian, por todo amor, carinho
e por estar sempre presente em todos os
momentos.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador, prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman, obrigado por todo conhecimento transmitido, pela oportunidade deste trabalho e pela paciência durante esses anos de aprendizado.

À CAPES, pela bolsa de mestrado concedida.

À FAPESP, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro durante este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Às professoras. Dra. Maria Helena de Souza Goldman, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras USP, Ribeirão Preto, profa. Dra. Márcia Regina von Zeska Kress e profa. Dra. Márcia Eliana da Silva Ferreira, Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP, Ribeirão Preto, por todo suporte técnico e gentilmente permitir o uso de seus aparelhos e reagentes.

Aos colegas de laboratório, Ariane, Adriana, Ana Cristina, Elodie, Enyara, Laure, Laura, Leandro, Lilian, Lizziane, Marçal, Nilton, Neil, Patrícia, Paula, Pollyne, Simone, Santiago, Thaila, por toda a ajuda e por criarem um ótimo ambiente de trabalho.

Aos técnicos Livia, Marcela e Paulo, por estarem sempre dispostos a ajudar, por toda paciência e pela boa companhia.

Aos meus pais Jussara e Luiz, por todo amor, carinho, paciência, por estarem comigo em todos os momentos e serem meus exemplos de vida, que me ajudaram a me tornar o que sou hoje, sem eles nada disso seria possível.

À toda minha família, em especial minha madrinha Denise e minha irmã Gabrielle por todo o incentivo e força durante esta etapa.

À minha namorada Lilian, mulher que amo e admiro imensamente, por estar presente em todos os momentos, sempre me apoiando e me incentivando a seguir em frente e superar meus obstáculos, por todo amor e carinho.

Aos meus grandes amigos Alysson, Amauri, Arthur, Bruno, Leonardo, Murilo, Pedro, Rafael, Thiago e Rodrigo, por todo carinho e companheirismo, sempre fazendo acreditar nos meus sonhos e por estarem presentes na minha vida desde muito tempo, me ajudando sempre a passar pelos momentos difíceis e a curtir os ótimos.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, juntamente com todos os funcionários e professores do departamento de Bioquímica.

À todas as instituições que contribuíram, de alguma forma, na realização deste projeto.

“A dúvida é o princípio da sabedoria.”

Aristóteles

Resumo

BOM, V.L.P. A importância da proteína fosfatase *sitA* na adesão, integridade da parede celular, biofilme e virulência de *Aspergillus fumigatus*. 2016. 149f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Aspergillus fumigatus é um fungo patogênico oportunista capaz de infectar pacientes imunocomprometidos causando eventualmente infecções disseminadas difíceis de serem controladas e com alta taxa de mortalidade dos indivíduos infectados. Para um melhor entendimento de como esse fungo age no hospedeiro é importante saber como as vias de sinalização que regulam esses fatores de virulência são orquestradas. Proteínas fosfatases são centrais em uma grande variedade de vias de transdução de sinal. Neste trabalho, nós caracterizamos a proteína fosfatase 2A (PP2A) SitA, a proteína homóloga de Sit4 em *Saccharomyces cerevisiae*. O gene *sitA* não é essencial e por isso fomos capazes de construir um mutante nulo em *A. fumigatus*. A cepa $\Delta sitA$ apresenta aumento na fosforilação da MpkA, é mais sensível à agentes que causam dano na parede celular, tem um aumento na quantidade de β -1,3-glicano e quitina, e também tem problemas na adesão e formação de biofilme. O mutante $\Delta sitA$ é mais sensível a vários metais e íons, como $MnCl_2$, $CaCl_2$, $LiCl$, entretanto é mais resistente à $ZnSO_4$. O mutante $\Delta sitA$ é avirulento em modelo de aspergilose pulmonar invasiva em camundongos. Esses resultados revelam que a fosfatase SitA está envolvida na via de integridade da parede celular de *A. fumigatus* possivelmente modulando a atividade de PkcA/MpkA.

Palavras-chave: 1. *Aspergillus fumigatus*. 2. Proteína fosfatase. 3. *sitA*. 4. *pkC*.

Abstract

BOM, V.L.P. The *Aspergillus fumigatus* *sitA* Phosphatase Homologue Is important for Adhesion, Cell Wall Integrity, Biofilm Formation, and Virulence. 2016. 149f. Dissertation (Master). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Aspergillus fumigatus is an opportunistic pathogenic fungus able to infect immunocompromised patients causing eventually disseminated infections that are difficult to be controlled, and lead to high mortality rates. It is important to understand how are orchestrated the signalling pathways that regulate these factors involved in virulence. Protein phosphatases are central to numerous signal transduction pathways. Here we characterize *A. fumigatus* protein phosphatase 2A (PP2A) SitA, the *S. cerevisiae* Sit4p homologue. The *sitA* gene is not an essential gene and we were able to construct an *A. fumigatus* null mutant. The $\Delta sitA$ strain had increased MpkA phosphorylation, was more sensitive to cell wall damaging agents, had increased β -1,3-glycan and chitin, and was impaired in biofilm formation. The $\square sitA$ strain is more sensitive to several metals and ions such as $MnCl_2$, $CaCl_2$, and $LiCl$, however, it is more resistant to $ZnSO_4$. The $\Delta sitA$ strain was avirulent in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis. These results stress the importance of *A. fumigatus* SitA as a possible modulator of PkcA/MpkA activity and its involvement in the cell wall integrity pathway.

Keywords: 1. *Aspergillus fumigatus*. 2. Protein phosphatase. 3. *sitA*. 4. *pkC*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 . Árvore filogenética de homólogos de <i>sitA</i> em fungos.....	52
FIGURA 02. Análise de Southern Blot para o mutante nulo $\Delta sitA$	55
FIGURA 03. Crescimento radial em Meio Completo e Meio Mínimo.....	56
FIGURA 04. Teste de sensibilidade à estresse iônico.....	57
FIGURA 05. Teste de sensibilidade a Rapamicina.....	58
FIGURA 06. Sensibilidade do mutante $\Delta sitA$ a agentes que causam danos à parede celular.....	59
FIGURA 07. Detecção da composição de β -1,3-glicanos e quitina na superfície celular.....	60
FIGURA 08. Sensibilidade do mutante $\Delta sitA$ a antifúngicos.....	61
FIGURA 09. Microscopia eletrônica de transmissão.....	62
FIGURA 10. Ensaio demonstrando a hidrofobicidade, adesão e formação de biofilme.....	65
FIGURA 11. Microscopia eletrônica de varredura.....	66
FIGURA 12. Sensibilidade a inibidores de proteína quinase C.....	71
FIGURA 13. A virulência do mutante $\Delta sitA$ de <i>A. fumigatus</i>	74
FIGURA 14. Reconhecimento de macrófagos e secreção de TNF- α por MDMOs.....	75

LISTA DE TABELAS

TABELA 01. Sequência de oligonucleotídeos dos primers utilizados nesse estudo.....	33
TABELA 02. Proteínas de superfície identificadas no tipo selvagem e no mutante Δ sitA.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ASPGD	Aspergillus Genome Data Base
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Albumina de Soro Bovino
cDNA	DNA complementar
DEPC	Dietil pirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Desóxirribonucleotídes trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
EDTA	Ácido Etilenodiamina Tetraacético
<i>g</i>	Gravidade
Kb	Kilo bases
Mb	Mega bases
MDMO	Macrófagos Derivados de Medula Óssea
mM	Mili molar
MM	Meio Mínimo
mRNA	RNA mensageiro
ORF	Região Aberta de Leitura (“Open Reading Frame”)
PBS	Salina Fosfato Tamponada
p/v	peso/volume
pyrG	gene orotidina-5'-fosfato descarboxilase de <i>A. fumigatu</i>
r^2	Coeficiente de correlação
rpm	Rotação por minuto
RT-PCR	Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia da polimerase
SBF	Soro Bovino Fetal
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SSC	Solução Salina Citrato
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TE	Tampão Tris-EDTA

TRIS **Tris-(hidroximetil)-aminometano**

U **Unidade**

v/v **volume/volume**

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	v
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 <i>Aspergillus fumigatus</i>	2
1.2 Aspergilose.....	3
1.3 A estrutura da parede celular.....	6
1.4 A via de integridade da parede celular.....	11
1.5 A proteína fosfatase <i>SIT4</i>	15
2. OBJETIVOS.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1 Declaração de Ética.....	22
3.2 - Cepas e Meios de Cultura.....	22
3.2.1 Sc-URA- (meio mínimo).....	22
3.2.2 YPD.....	23
3.2.3 L.B. (Lúria Bertani).....	23
3.2.4 Meio Mínimo (MM).....	23
3.2.5 Meio Mínimo modificado (AMM).....	24

3.2.6 Meio Completo (YAG, YUU, YG e YG+UU).....	24
3.2.7 Meio RPMI 1640 (Gibco).....	25
3.3 – Soluções e Tampões.....	25
3.3.1 Salina Fosfato Tamponada (PBS).....	25
3.3.2 Tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 50x concentrado....	25
3.3.3 Tampão de ressuspensão de plasmídios.....	26
3.3.4 Tampão de extração de DNA.....	26
3.3.5 Tampão de amostra para eletroforese de DNA.....	26
3.3.6 Tampão MOPS 10x concentrado.....	26
3.3.7 Tampão de amostra para eletroforese de RNA.....	27
3.3.8 Tampão Tris-EDTA (TE) 1x.....	27
3.3.9 Tampão Acetato de Sódio 100mmol/L p.H. 4,6.....	27
3.3.10 Acetato de Lítio 1x.....	27
3.3.11 Solução de Elementos Traços.....	28
3.3.12 Solução de Sais 20x para Meio Mínimo.....	28
3.3.13 Solução de Sais 20x para Meio Mínimo modificado (AMM).....	28
3.3.14 Solução 1 (protocolo de esferoplastização de <i>A. fumigatus</i>).....	29
3.3.15 Solução 2 (protocolo de esferoplastização de <i>A. fumigatus</i>).....	29
3.3.16 - Solução 3 (protocolo de esferoplastização de <i>A. fumigatus</i>).....	29

3.3.17 Solução 4 (protocolo de esferoplastização de <i>A. fumigatus</i>).....	29
3.3.18 Solução 5 (protocolo de esferoplastização de <i>A. fumigatus</i>).....	30
3.3.19 Solução Salina Citrato (SSC) 20x concentrada.....	30
3.3.20 Solução de lise para extração de plasmídios.....	30
3.3.21 Solução de neutralização para extração de plasmídio	31
3.3.22 Solução de SDS 10%.....	31
3.3.23 Solução de fixação para microscopia.....	31
3.3.24 Solução de Calcoflúor (CFW).....	32
3.3.25 Tampão de extração de Proteínas.....	32
3.4 - Protocolos adotados.....	32
3.4.1 Construção do cassete de deleção pela técnica de recombinação “ <i>in vivo</i> ” em <i>S. cerevisiae</i>	32
3.4.2 Preparo de células competentes de <i>S. cerevisiae</i> e transformação.....	33
3.4.3 Extração de DNA de <i>S. cerevisiae</i>	34
3.4.4 Preparo de células eletrocompetentes.....	35
3.4.5 Preparação em pequena escala de DNA plasmidial.....	35
3.4.6 Produção de esferoplastos de <i>A. fumigatus</i>	36
3.4.7 Transformação de <i>A. fumigatus</i>	37
3.4.8 Southern Blot alcalino.....	37
3.4.9 Marcação de sonda não radioativa.....	38

3.4.10 Hibridação e revelação das membranas de Southern Blot.....	38
3.4.11 Extração e manipulação de RNA.....	39
3.4.12 Ensaios Fenotípicos.....	40
3.4.13 Ensaios de formação de biofilme e adesão.....	40
3.4.14 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	41
3.4.15 Microscopia eletrônica de transmissão.....	41
3.4.16 Microscopias para determinação de quitina e β -(1,3)-glicanas.....	42
3.4.17 Análise das proteínas de superfície dos conídios.....	43
3.4.18 Modelo de aspergilose pulmonar em camundongos...	44
3.4.19 Histopatologia e Carga Fúngica pulmonar.....	45
3.4.20 Índice de Fagocitose.....	46
3.4.21 Destruição de conídios por macrófagos alveolares.....	47
3.4.22 Determinação dos níveis de TNF- α	48
3.4.23 Inibição de PkcA.....	48
3.4.24 Western Blotting.....	49
4. Resultados.....	50
4.1 Identificação do homólogo de Sit4 em <i>Aspergillus fumigatus</i>.....	51
4.2 O mutante ΔsitA tem problemas na integridade da parede celular.....	53

4.3 A capacidade de adesão de Δ sitA de <i>A. fumigatus</i> é reduzido.....	63
4.4 O mutante Δ sitA é mais sensível a inibidores de proteína quinase C.....	70
4.5 SitA é importante para a virulência de <i>A. fumigatus</i> em camundongos.....	72
5. Discussão.....	76
6. Conclusão.....	81
7. Referências Bibliográficas.....	83
8. APÊNDICE.....	112
8.1 Apêndice A – Artigo publicado: “The <i>Aspergillus fumigatus</i> sitA Phosphatase Homologue Is Important for Adhesion, Cell Wall Integrity, Biofilm Formation, and Virulence”. Eukariotic Cell. V. 14, p. 728-744, 2015.....	113

1.1 – *Aspergillus fumigatus*

O gênero *Aspergillus* possui mais de 180 espécies (Samson, 1999), incluindo *Aspergillus fumigatus*, um fungo saprofítico, de distribuição ubíqua na natureza e capaz de colonizar diversos ambientes. *A. fumigatus* está associado à decomposição de matéria orgânica e possui um papel muito importante na reciclagem de nitrogênio e carbono, além de um amplo repertório enzimático (Mullins et al, 1976; Debeaupuis et al, 1997).

Os conídios de *A. fumigatus* são caracterizados pela sua coloração verde-acinzentada, possuem entre 2,5 a 3µm de diâmetro, capacitando-os a alcançar os alvéolos pulmonares, (De Hoog G.S. e Guarro J, 1995; Pitt, 1994; Rùchel e Reichard, 1999). A micromorfologia desta espécie apresenta hifas hialinas e septadas com paredes paralelas. A região apical das hifas apresenta, ao microscópio óptico, um aspecto de vesículas em forma de frasco, com uma série de fiáldes uniseriadas, recobrimdo dois terços superiores da superfície. *A. fumigatus* é uma espécie termófila, que pode crescer em temperaturas superiores a 55°C e sobreviver a temperaturas acima de 70°C (Samson, 1999; Latgé, 1999).

A existência de uma forma teleomórfica (capacidade do fungo de se reproduzir sexuadamente) de *A. fumigatus* foi durante muito tempo uma questão de debate. Embora tenha sido descrito pela primeira vez há 145 anos, sua capacidade de reprodução foi comprovada apenas recentemente (O’Gorman et al, 2009), apesar de um “screening” no genoma ter revelado 215 genes envolvidos no desenvolvimento sexual (Galagan et al, 2005; Dyer et al, 2009). Algumas possíveis explicações para o fato do ciclo sexual em *A. fumigatus* não ter sido reportado até hoje podem ser o fato de os parâmetros ambientais na natureza necessários para iniciar o ciclo sexual raramente são encontrados, ou a produção de cleistotécios pode ser confinada a substratos ainda não sistematicamente monitorados (Dyer et al, 1992).

A. fumigatus possui algumas características fisiológicas que permitem análises moleculares precisas. Os conídios são uninucleares e haplóides, permitindo o isolamento de clones e facilitando a seleção de mutantes através do uso de técnicas moleculares clássicas (D'Enfert et al, 1999). Este gênero já teve o seu genoma sequenciado (<http://www.aspgd.org/>) e, atualmente diferentes métodos de transformação e marcadores genéticos estão bem estabelecidos (Brakhage e Langfelder, 2002).

É cada vez mais óbvio que *A. fumigatus* possui características biológicas que lhe permitem suprimir e/ou escapar do sistema imune residual de pacientes imunocomprometidos, tornando-o um patógeno oportunista agressivo. Os determinantes de virulência de *A. fumigatus* tais como aquisição de ferro, produção de gliotoxina, melanina, síntese de policetídeos, termo-tolerância, resistência à variações de pH e ao estresse osmótico, enzimas com atividade anti-oxidantes, proteases, toxinas, composição da parede celular, parecem ser no mínimo diferentes entre a espécie não patogênica *A. nidulans* (Brackhage, 2005).

1.2 - Aspergilose

A patogenicidade entre fungos, com raras exceções, não é necessária para a manutenção ou disseminação das espécies. A capacidade dos fungos em causar doenças parece estar relacionada ao estado imunológico do paciente (Wanke et al, 2000). A frequência dessas infecções tem aumentado significativamente ao longo das últimas três décadas. (Brackhage, 2005) devido o aumento drástico relacionado à excessiva morbidade e relacionado ao aumento de pacientes submetidos a transplantes de órgãos, medula óssea, transfusão de sangue, pacientes com AIDS, doenças neoplásicas, terapias imunossupressivas, idade avançada e nascimentos prematuros (Pfaller e Diekema, 2004; Bodey & Vartivarian, 1989; Ito & Lyons, 2002; Pegues et al, 2002; Duchini et al, 2002). Desta forma, o estabelecimento de uma infecção fúngica bem como seu desenvolvimento em tecidos hospedeiros requer certa

agressividade do fungo sobre o hospedeiro quando este estiver debilitado (Latgé & Calderone, 2002).

A taxa de mortalidade por infecção invasiva de *C. albicans* tem diminuído drasticamente com o uso profilático de fluconazol. Entretanto, muitos centros reportaram um grande aumento nas infecções causadas por outros fungos (Marr et al, 2002). Dentre eles, o maior causador de doenças pulmonares invasivas é *A. fumigatus*, responsável pelo desenvolvimento da aspergilose. A aspergilose é um termo geral que designa a doença causada por agentes etiológicos pertencentes ao gênero *Aspergillus*. Este gênero compreende várias espécies oportunistas que podem causar doenças invasivas, dentre elas *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. terreus* e *A. nidulans*, entretanto, cerca de 90% dos casos de aspergilose invasiva são causados por *A. fumigatus* (Loudon et al, 1994; Hogan et al, 1996). Diagnósticos específicos ainda são limitados assim como as intervenções terapêuticas, o que leva a aspergilose a altos níveis de mortalidade, variando de 30% a 90% (Brakhage, 2005). Comparado ao *A. fumigatus*, as demais espécies do gênero *Aspergillus* estão frequentemente associadas à colonização isolada ou sinusites apenas. Em pacientes com transplante de células-tronco, a média de sobrevivência em um ano é de apenas 20% de todos os pacientes com infecções fúngicas (Marr et al, 2002). Com os avanços significativos feitos para a prevenção de infecções como citomegalovirose e candidíase, os fungos filamentosos apresentam-se como a principal causa de morte de pacientes imunocomprometidos. Marr e colaboradores (2002) estudaram a epidemiologia de infecções fúngicas invasivas de um grande centro de transplantes durante 15 anos. O estudo constatou que o índice de aspergilose no mínimo triplicou. Além disso, em pacientes submetidos ao transplante de coração, *Aspergillus* foi o patógeno oportunista com maior índice de mortalidade (Montoya et al, 2003). Estatísticas revelam que nos Estados Unidos o custo total de tratamentos para aspergilose em 1996 foi de aproximadamente 633 milhões de dólares (Stevens, 2004).

Em geral, *A. fumigatus* pode causar três tipos de infecções: no primeiro tipo, pacientes imunocompetentes acometidos pela infecção por *A. fumigatus*

não manifestam a doença clinicamente. Neste caso, a infecção é facilmente revertida através da remoção do agente causal pelo próprio organismo. Clinicamente, os pacientes apresentam reações alérgicas, tais como: asma, sinusite alérgica e alveolite. Um segundo tipo pode causar infecções mais graves, como: aspergilose alérgica bronco-pulmonar a qual ocorre principalmente em pacientes portadores de asma atópica ou fibrose cística, que pode causar desde asma até a destruição dos pulmões (Latgé, 1999); aspergiloma, que atinge pacientes com históricos de doenças pulmonares pré-existentes, formando uma massa esferóide de hifas embebidas em matriz protéica, fibrinas e estruturas esporulantes na periferia (Latgé, 1999) e no terceiro tipo, a aspergilose invasiva que representa a forma mais severa da doença atinge de 5 a 10% de pacientes transplantados (Rivera et al, 2006), causa lesões granulomatosas nos pulmões e brônquios e pode se disseminar para o encéfalo, trato gastrointestinal e rins (Latgé, 1999). Estes dois últimos casos geralmente requerem intervenção terapêutica e apresentam altos níveis de mortalidade e ocorrem majoritariamente em pacientes imunocomprometidos ou imunossuprimidos, (Bodey & Vartivarian, 1989; Shibuya et al, 2004; Denning, 1998; Ellis, 1999).

Assim como as demais células vivas, o fungo *A. fumigatus* enfrenta desafios para sobreviver a alterações ambientais. Centenas de conídios desse fungo vindos do ambiente são inalados diariamente pelo hospedeiro e imediatamente passam por drásticas mudanças nas condições do ambiente, tais como redução da pressão de oxigênio, aumento na temperatura, etc (Brakhage., 2005; Chazalet et al, 1998; Hospenthal et al, 1998). Em pacientes imunocompetentes, a limpeza mucociliar e a defesa por macrófagos normalmente impede a infecção de *A. fumigatus*. O reconhecimento de microorganismos invasores pelo sistema imune inato é o primeiro passo fundamental na defesa do paciente. Os macrófagos alveolares, principais células residentes dos alvéolos pulmonares, juntamente com os neutrófilos (os quais são ativamente recrutados durante a inflamação), são as principais células envolvidas na destruição de conídios e hifas de *A. fumigatus*.

Inicialmente os macrófagos fagocitam e matam os conídios produzindo espécies reativas de oxigênio (ROS, reactive oxygen species) (Philippe et al; 2003). Além dos macrófagos, leucócitos polimorfonucleares também são capazes de fagocitar e matar conídios dormentes. Os conídios que escapam dos macrófagos alveolares conseguem se desenvolver e formar hifas, mas são atacados por neutrófilos, a segunda linha de defesa fagocítica celular. Os neutrófilos aderem à superfície das hifas, já que as hifas são grandes demais para ser fagocitadas, e o contato entre os neutrófilos e a hifa desencadeia a degranulação, uma explosão respiratória e secretam intermediários reativos de oxigênio (Meshulam et al, 1995; Jahn et al, 1996). Entretanto, pacientes imunocomprometidos, com o sistema imune debilitado permitem a entrada dos conídios para germinar e invadir os tecidos pulmonares (Ellis, 1999; Rüchel e Reichard, 1999). Por fim, células epiteliais e endoteliais internalizam conídios, servindo como foco de infecção (Paris et al, 1997).

Nesse contexto, *A. fumigatus* pode ser considerado como o principal fungo patogênico em humanos, seguido de *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* e *Candida albicans* (Mayer et al, 2013).

1.3 - A estrutura da parede celular

Os fungos têm a capacidade de colonizar diversos ambientes, tais como solos, plantas, animais, fontes termais, excrementos de pássaros, ambientes aquáticos, salinas, superfícies rochosas e até mesmo ambientes com temperaturas congelantes. Toda essa plasticidade deve-se à habilidade que estes organismos possuem de regular e alterar a expressão gênica de diversas vias de sinalização responsáveis pela resposta às mudanças de temperaturas, pH, limitações de nutrientes, estresses oxidativo e osmótico (Fuchs e Mylonakis, 2009). A principal defesa dos fungos para sobreviver a essas mudanças ambientais é a parede celular.

A parede celular dos fungos é uma organela altamente complexa responsável pela definição da forma das células fúngicas, proteção contra

estresses osmóticos e danos estruturais, entre outros (Lesage e Bussey, 2006). A parede está intimamente em contato com a membrana citoplasmática (Svoboda, 2004), é essencial no crescimento celular, diferenciação e reprodução (Smits et al, 2001; Durán and Nombela, 2004) e está em uma constante remodelamento durante o crescimento e desenvolvimento celular (Adams, 2004). Tais funções requerem um alto nível de controle para não comprometer sua função protetora enquanto altera sua forma e tamanho. A parede celular é uma estrutura única encontrada em fungos e plantas. Embora a composição da parede celular possa variar entre os fungos, sua composição consiste basicamente de α - e β -glicanos (o principal componente da bicamada da parede celular), derivados de N-acetilglucosamina, manoproteínas e outros tipos de glicoproteínas (Fuchs e Mylonakis, 2009). Devido aos danos infligidos, a parede celular pode ser reparada e ainda aumentar a biossíntese da parede celular e a integração de componentes quando exposta à um ambiente favorável ou hostil. A quitina, um homopolímero de N-acetilglicosamina associada por ligações $\beta(1-4)$, é um componente essencial na formação da parede celular e septos de todos os fungos patogênicos, sendo também encontrada nos cistos da ameba, nas cascas de ovos, no revestimento intestinal de nemátodos e no exoesqueleto de invertebrados vetores de doenças em humanos, como mosquitos, carrapatos e caramujos (Lenardon et al, 2010; Munro e Gow, 2001; Latgé, 2007). A cadeia primária de polissacarídeos nascente de quitina se dobra sobre si própria criando uma cadeia antiparalela, formando ligações de hidrogênio que aumentam a rigidez do carboidrato em crescimento, dando origem as microfibrilas mais resistentes da natureza, sendo mais rígida que o osso e o aço, em uma comparação peso por peso (Lenardon et al, 2010). A rede 3D das microfibrilas de quitina se associam covalentemente a $\beta(1,3)$ -glicanos, uma estrutura secundária de polissacarídeos amplamente encontrada principalmente nas paredes celulares de fungos (Klis et al, 2006). Uma parte da quitina dos fungos é sintetizada e deacetilada em quitosana pela ação de uma ou mais quitina deacetilases. Em *C. albicans*, menos de 5% da quitina é deacetilada, enquanto que a maioria dos zigomicetos e o basidiomiceto *C. neoformans* possuem mais de dois terços de quitosana deacetilada (Bartnicki-Garcia, 1968; Baker et al,

2007). A deacetilação de quitina em quitosana torna o polímero mais elástico e protege contra a ação de quitinases.

A aparente simplicidade da estrutura primária de quitina mascara a complexidade por trás de seu processo biossintético. A quitina é sintetizada por uma ampla família de enzimas denominadas quitinas sintases (CHS, *Chitin Synthase*), que é dividida em sete subclasses. A atividade da classe I dessas enzimas é a mais bem compreendida em ensaios bioquímicos *in vitro*, porém essa classe contribui apenas para a síntese de uma pequena fração de quitina na parede celular. Mutantes com deleções de CHSs classe I são altamente viáveis e apresentam suaves fenótipos em condições sem estresse (Munro e Gow, 2001). A classe II dessas enzimas é frequentemente não mensurável em ensaios enzimáticos e produzem pequena quantidade de quitinas, porém a deleção dessas enzimas resulta em efeitos deletérios na viabilidade celular através de processos vitais como a formação de septos (Munro et al, 2001). A classe IV de CHS produz uma quantidade substancial de quitina, porém a maioria dos mutantes são viáveis, embora alguns apresentem atenuação na virulência (Bulawa et al, 1995). As classes IV, V e VII compartilham certa homologia em suas sequências, e as proteínas de classe V e algumas classes VII possuem domínios do tipo miosina. As proteínas CHS do tipo III, V, VI e VII foram identificadas apenas em fungos filamentosos e alguns fungos dimórficos, mas estão ausentes em leveduras como *S. cerevisiae* e *C. albicans*. A multiplicidade de enzimas CHS sugere que elas possam ter atividades redundantes na síntese da parede celular. Está claro que a expressão e a atividade de CHS é altamente regulada durante o ciclo celular em condições de estresse, como uma resposta à potenciais agentes que causem dano à integridade da parede celular, tais como enzimas com atividade lítica, antibióticos ou agentes oxidantes gerados dentro dos fagolisossomos ou linfócitos. Entretanto, a importância funcional das classes de CHSs não está clara e parece ser variável entre as espécies fúngicas (Munro e Gow, 2001; Latgé, 2007). Assim, o papel de diversas CHSs está sendo investigado principalmente por análises de cepas mutantes contendo a deleção dessas CHSs (Lenardon et al, 2010).

Em 1980, Enrico Cabib e colaboradores descreveram um trabalho sobre a síntese de β -(1,3)-glicanos em *S. cerevisiae* e, desde então tem sido amplamente estudado em diversos organismos, tais como *N. crassa* (Hrmova et al, 1989), *A. nidulans* (Kelly et al, 1996), *A. fumigatus* (Beauvais et al, 1993; Kurtz et al, 1994), *S. pombe* (Ribas et al, 1991), *C. albicans* (Orlean, 1982), *C. neoformans* (Thompson et al, 1999), *Fusarium solani* (Young-sil et al, 2006). Embora existam em diversos organismos, todas as enzimas são complexos associados à membrana que utilizam UDP-glicose como substrato e produzem uma cadeia linear de polissacarídeo (Douglas C.M., 2001). Em *S. cerevisiae*, dois genes estão relacionados à β -(1,3)-glicano sintase, *FKS1* e *FKS2* (Mazur et al, 1995). As duas proteínas Fks1p e Fks2p, com 87% de homologia são consideradas subunidades do complexo enzimático da enzima β -(1,3)-glicano sintase e, a deleção simultânea desses dois genes é letal em *S. cerevisiae* (Mazur et al, 1995). A atividade da β (1,3)-glicano sintase em *S. cerevisiae* requer Rho1p, uma proteína que não só interage com Fks, mas também com a proteína quinase C (Pkc1p), que é conhecido como regulador da cascata de sinalização da MAPK e da via de organização do citoesqueleto de actina (Mazur et al, 1996; Qadota et al, 1996; Kamada et al, 1996; Nonaka et al, 1995; Drgonova et al, 1996). Como um regulador multifuncional, Rho1p atua como um interruptor que interage com diversas proteínas, dentre elas o fator de troca de guaninucleotídeos codificados por *ROM1* e *ROM2* (Delley e Hall, 1999) que pode trocar Rho1p ligado a GTP por GDP e, proteínas ativadoras de GTPases tais como Bem2p, Sac7p e Lrg1p, que estimulam a transição da forma GTP ativa para a forma GDP menos ativa (Watanabe et al, 2001). Além disso, Rho1p precisa ser modificada pós-traducionalmente para estimular a atividade β (1,3)-glicano sintase, se ligando diretamente a Fks1p (Inoue et al, 1999). A regulação transcripcional da expressão dos genes *FKS* em *S. cerevisiae* reflete um complexo circuito em resposta a diversos sinais de estresse, crescimento e desenvolvimento. Durante o crescimento vegetativo, *FKS1* é preferencialmente expresso (Abe et al, 2001), entretanto *FKS2* é altamente expresso durante estresses causados por alta temperatura, crescimento em meio sem glicose,

perda de *FKS1*, em resposta a fatores de sexuais e/ou início de esporulação (Mazur et al, 1995; Zhao et al, 1998).

Em muitas espécies, como em *C. albicans*, a maior classe de proteínas de parede celular está ligada por GPIs à $\beta(1,3)$ -glicanos e quitina por ligações ramificadas $\beta(1,6)$ -glicanos (Klis et al, 2006).

Como relatado anteriormente, a internalização dos esporos por macrófagos é o componente chave da primeira linha de defesa contra infecções fúngicas, incluindo aspergilose (Dagenais et al, 2010). Uma série de estudos relacionados à fagocitose de esporos tem apresentado um entendimento parcial desse processo complexo (Dagenais et al, 2010). O reconhecimento do esporo é um passo essencial para a fagocitose e a ativação dos macrófagos. Neste processo, moléculas de superfície denominadas MAMPs (*microbe-associated molecular patterns*, Didierlaurent et al, 2002) são componentes essenciais. A MAMP mais bem caracterizada em fungos é a $\beta(1,3)$ -glicana a qual é reconhecida em humanos pelo receptor dectina-1 (Brown, G. D. e S. Gordon, 2001). Em geral, os esporos prontamente fagocitados apresentam grande quantidade de $\beta(1,3)$ -glicano na superfície. Por outro lado, esporos contendo pequenas quantidades de $\beta(1,3)$ -glicano superficial, como é o caso de esporos dormentes, estão associadas à baixa taxa de fagocitose (Luther et al, 2007). Neste sentido foi demonstrado que a cepa mutante de *A. fumigatus* $\Delta pksP$ (conídio sem pigmento), apresenta altas concentrações de $\beta(1,3)$ -glicano na superfície dos conídios e, conseqüentemente sofre altas taxas de internalização de seus conídios (Jahn et al, 2002)

Adicionalmente ao reconhecimento de $\beta(1,3)$ -glicanos, outras moléculas têm sido especuladas como participando no evento de fagocitose dos esporos (Dagenais et al, 2010). Metabólitos difundidos por esporos têm sido reportados por afetar macrófagos, auxiliando no estabelecimento da aspergilose (Mitchell et al, 1997). Estes metabólitos, tais como gliotoxina (Müllbacher e Eichner, 1984) e fumigatoxina (Fischer et al, 1999) agem de maneira a inibir a fagocitose (Bertout et al, 2002). A arquitetura dos esporos também influencia na internalização celular e a camada mais externa da parede celular dos conídios de *Aspergillus* é

composta de microfibrilas protéicas chamadas de “rodlets”. Essas proteínas são hidrofobinas codificadas primariamente por RodA, que conferem propriedades fisicoquímicas que medeiam a dispersão conidial e, possivelmente, interações celulares (Girardin et al, 1999, Thau et al, 1994). Em particular, mutantes $\Delta rodA$ que perderam a camada de “rodlets”, são mais sensíveis à morte por macrófagos (Paris et al, 2003).

1.4 - A via de integridade da parede celular

Em *S. cerevisiae*, a via de integridade da parede celular (CWI, *cell wall integrity*) regula a síntese da parede durante o ciclo celular e possui atividade reparadora quando a parede é danificada (revisada em Levin, 2005). Elementos essenciais nessa via incluem uma série de sensores da membrana plasmática, que atuam através de GTPases tipo-Rho, através de uma cascata de proteínas efetoras. Uma das proteínas efetoras mais importantes nessa via é Pkc1p (calcium-dependent protein kinase), uma proteína quinase que regula uma série de genes relacionados à parede celular e morfogênese via cascata de MAP (Mitogen Activated Protein) quinases. Vias similares existem em outras leveduras, como *Schizosaccharomyces pombe* (Perez e Calonge, 2002), *C. albicans* (Monge et al, 2006) e *C. neoformans* (Gerik et al, 2005). A via de sinalização da MAPK é altamente conservada, formando uma via linear ativada pela fosforilação de resíduos de treonina e tirosina em um motivo altamente conservado, de três proteínas quinases: a MAPK, MAPK quinase (MAPKK) e a MAPK quinase quinase (MAPKKK). Em *S. cerevisiae*, Pkc1 ativa Bck1 (MAPKKK), a qual fosforila Mkk1 e Mkk2 (proteínas redundantes da MAPKK), e então fosforila Slt2/Mpk1 (MAPK). Finalmente, fatores de transcrição e outras proteínas alvos são regulados pela modulação da MAPK (Valiante et al, 2008).

Embora uma equivalência completa da via de CWI em leveduras ainda não seja demonstrada em fungos filamentosos, várias linhas de evidência parecem existir. Em *A. niger*, estresses causados por diversos agentes, incluindo CFW (*Calcofluor White*), um composto fluorescente que se liga às cadeias nascentes de quitina desestabilizando desta forma a integridade da parede

(Elorza et al, 1983), resultam em um aumento na transcrição dos genes de síntese de parede celular GfaA (Ram et al, 2004) e AgsA (Damveld et al, 2005b), que codificam respectivamente a glutamina:frutose-6-fosfato aminotransferase e a α -1,3-glicano sintase. A expressão desses genes é regulada pelo fator de transcrição Rlm1p, o qual possui papel ortólogo em levedura na via de CWI. (Damveld et al, 2005a). Similarmente, em *A. nidulans*, a deleção de MpkA, ortólogo do componente da cascata da MAP quinase, Mpk1 (Bussink e Osmani, 1999), ou o mau funcionamento de RhoA, ortólogo de Rho1 em leveduras (Guest et al, 2004), produzem fenótipos consistentes com o papel dessas proteínas na via de integridade da parede celular, como alteração na germinação, defeitos na ramificação e alteração na parede celular. Os genes ortólogos para o restante dos componentes da via de CWI em levedura foram identificados em genomas de fungos filamentosos por pesquisas *in silico* (Muthuvijayan e Marten, 2004; Fernandes et al, 2005) e assim, as principais vias que regulam o metabolismo da parede celular tanto de leveduras quanto fungos filamentosos são aparentemente bem conservadas, embora algumas diferenças sejam esperadas (Teepe et al, 2006).

A análise do genoma de *A. fumigatus* revelou a presença de 4 genes que codificam MAP quinases, nomeadas SakA (ortólogo de Hog1), MpkA, MpkB e MpkC (May et al, 2005). A SakA possui 82% de identidade com a MAP quinase Hog1 de *S. cerevisiae*. A via Hog1 de *S. cerevisiae* é ativada durante a adaptação à alta osmolaridade (Brewster et al, 1993). O Mutante $\Delta sakA$ em *A. fumigatus* está envolvido na regulação da germinação de conídios, estresse osmótico e privação de fontes de carbono e nitrogênio (May et al, 2005; May, 2008; Reyes et al, 2006; Valiante et al, 2008; Valiante et al, 2009; Xue et al, 2004). A MpkC possui 65% de identidade com a Hog1. Os mutantes nulos de $\Delta mpkC$ em *A. fumigatus* são incapazes de crescer em meios contendo sorbitol e manitol como fonte de carbono (Reyes et al, 2006). Com relação à sequência de aminoácidos, SakA e MpkC possuem alto grau de similaridade (68%) e, segundo *Hagiwara et al.* (2014) ambas participam da via de HOG, sendo que SakA possui um papel predominante na fase de hifa e, SakA e MpkC cooperativamente conferem resistência aos conídios via fator de transcrição

AtfA. O MpkB possui 60% de identidade com Fus3, e 61% com Kss1 de *S. cerevisiae*. Em *S. cerevisiae*, as vias reguladas por Fus3 e Kss1 contribuem para reprodução, crescimento invasivo e vegetativo (Wang e Dohlman, 2005; Bardwell, 2005). O MpkA compartilha 68% de identidade com Slt2/Mpk1 de *S. cerevisiae* (Lee et al, 1993). Homólogos de MpkA tem sido relacionados com a via de integridade da parede celular (Valiante et al, 2008).

Diante da importância que desempenha, a parede celular tem sido amplamente estudada como possível alvo para combater o desenvolvimento de fungos filamentosos incluindo *A. fumigatus* (Bruneau et al, 2001). A vantagem no estudo da parede celular reside no fato de que essa estrutura não é encontrada em mamíferos, sendo assim um potencial alvo para o desenvolvimento de terapias sem riscos à saúde do paciente (Valiante et al, 2009). Apesar de sua importância, a parede celular fúngica ainda é pouco entendida em termos de biossíntese, composição e os mecanismos de sinalização desencadeados durante o crescimento vegetativo e em condições de estresse. Alguns genes envolvidos no metabolismo da parede celular de *A. fumigatus* foram isolados (Beauvais e Latgé, 2001), de forma que seu conhecimento juntamente com estudos bioquímicos começaram a nos dar algumas pistas sobre a síntese de componentes da parede celular (Latgé et al, 2005).

Uma das proteínas efetoras mais importantes nessa via é a proteína quinase C (Pkc). Em *S. cerevisiae*, Pkc1 aciona a via de cascata de sinalização da MAP quinase em resposta a um dano na parede celular, ativando assim a resposta transcricional (Heinisch, 1999). A PKC também regula o transportador da quitina sintase (Chs3, Valdivia e Schekman, 2003). Pck1 e Pck2 de *S. pombe* regulam a síntese de glicanos (Calonge et al, 2000, Katayama et al, 1999; Arellano et al, 1999).

PKCs foram isoladas de outros fungos, incluindo fungos dimórficos e filamentosos (Schmitz e Heinisch, 2003; Heung et al, 2004; Oeser, 1998; Morawetz et al, 1996; Zhang et al, 2001; Paravicini et al, 1996; Ambra e Macino, 200; Aquino-Pinero e Rodriguez-Del Valle, 2002). A deleção de PKC1 no fungo pleomórfico *C. albicans* resultou em lise celular, a qual foi revertida com aumento da osmolaridade do meio de cultura (Paravacini et al, 1996). Estudos em *N.*

crassa identificaram PKC como componente na resposta à luz azul (Arpaia et al, 1999; Franchi e Macino, 2005).

As PKCs desempenham um papel importante na regulação do crescimento e na sobrevivência de células animais através da via de transdução de sinais que causam a hidrólise lipídica. Pelo menos 10 isozimas de PKC foram identificadas em mamíferos (Gallegos et al, 2006; Newton, 2001, 2003). Essas são classificadas em três subfamílias baseadas na variabilidade de sua estrutura, nos domínios reguladores e nos cofatores requeridos para a ativação: (i) a PKC convencional ou clássica que requer Ca^{2+} , diacilglicerol (DAG) e fosfatidilserina (FS) para a ativação; (ii) novas PKCs que requerem FS e DAG para sua ativação; e (iii) uma PKC atípica que não requer DAG ou Ca^{2+} , apenas FS. Os domínios reguladores para todas as isozimas de PKC em mamíferos têm duas funções principais: elas marcam apropriadamente a localização celular das quinases e regulam a sua atividade alterando a ligação de uma sequência de um pseudosubstrato que inativa o sítio ativo (Newton, 2001, 2003). A ligação de cofatores como DAG libera a autoinibição através de modificações conformacionais e libera o sítio ativo para a fosforilação de substratos.

O genoma de *N. crassa* possui um único gene de PKC (NPKC) predito (Franchi et al, 2005). O mutante nocaute produzido pelo Projeto Genoma de *Neurospora* (Colot et al, 2006) é letal, indicando um papel essencial para essa proteína quinase em *Neurospora*. A sua sequência de aminoácidos mostra que, como outras PKCs em fungos, é mais similar à nova PKC de mamíferos do que as PKCs convencionais, que é predita como sendo Ca^{2+} dependente (Schmitz e Heinisch, 2003).

As leveduras possuem uma ou duas PKCs que compartilham a mesma estrutura das PKCs em mamíferos. Um gene PKC (PKC1) de *S. cerevisiae* e duas (*pck1+*, *pck2+*) de *S. pombe* foram identificadas e intensivamente estudadas. Essas PKCs possuem domínios serina/treonina quinase, domínios reguladores (*viz.*, domínios C1, C2 e HR1) e uma sequência de pseudosubstratos. Em *S. cerevisiae*, os domínios C1 e HR1 estão envolvidos na interação com GTPase Rho1 (Schmitz et al, 2001, 2002; Nonaka et al, 1995). Embora as funções do domínio C2 permaneçam pouco entendidas, o domínio

C2 da Pkc1 fusionado à GFP está localizado no fuso mitótico (Denis e Cyert, 2005). Os pseudosubstratos são sequências curtas de aminoácidos que se assemelham a sequências de proteínas substrato, exceto pelo resíduo do fosforeceptor, que é ocupado por uma alanina. As sequências de pseudosubstratos são preditas por ocupar o sítio catalítico e manter a molécula de PKC em um estado inativo (Nonaka et al, 1995; Watanabe et al, 1994). As PKCs de *S. cerevisiae* e *S. pombe* estão envolvidas na regulação da parede celular através de diversos mecanismos (Schmitz, 2003; Perez e Calonge, 2002).

1.5 - A proteína fosfatase *SIT4*

Em muitos processos celulares, as reações reversíveis de fosforilação/defosforilação desempenham um papel importante na regulação de atividades protéicas e na localização subcelular. Como enzimas que neutralizam a função de proteínas quinases, proteínas fosfatases são bem estabelecidas como coordenadores-chaves de diversos eventos biológicos (Son e Osmani, 2009). Três critérios principais são utilizados para classificar as proteínas fosfatases: (i) a homologia da sequência, (ii) a estrutura e (iii) os mecanismos catalíticos relacionados à especificidade pelo substrato. De acordo com essas características, as fosfatases são divididas em três grupos principais: (i) as fosfatases serina/treonina clássicas, (ii) as proteínas tirosina fosfatase e as (iii) as proteínas fosfatases com catálise baseada em aspartato (Moorhead et al, 2007).

As proteínas fosfatases Ser/Thr clássicas podem ainda ser divididas em fosfoproteínas fosfatases (PPP, phosphoprotein phosphatase) e proteína fosfatase dependente de Mg^{+2}/Mn^{+2} (PPM). Todos os membros da família PPP apresentam grande semelhança entre as suas sequências e possuem um motivo catalítico de fosfoesterase em comum altamente conservado (PP2Ac). Quanto as funções biológicas, estas podem variar desde a regulação mitótica (PPI) (Doonan e Morris, 1989), a resposta imunológica (PP2B) (Beals et al, 1997), a resposta ao dano ao DNA (PP4) (Gingras et al, 2005) e sinalização da luz azul em plantas (PP7) (Moller et al, 2003). As proteínas fosfatases do tipo PP2C

fazem parte da família PPM e são caracterizadas pela similaridade de sua estrutura com o domínio catalítico das PPPs, apesar da ausência de qualquer similaridade na sequência (Moorhead et al, 2007). A superfamília da proteína tirosina fosfatase (PTP) é distinta pelo seu motivo catalítico Cx5R compartilhada por todas as proteínas da família. Essas consistem da PTP clássica, a fosfatase dupla-específica (DSPs), fosfatases tipo Cdc25 e as fosfatases de baixo peso molecular. As PTPs estão relacionadas a funções de adesão celular, sinalização célula-célula, podendo não somente defosforilar resíduos de tirosina como também possuindo atividade relacionada à resíduos de Ser/Thr. Elas influenciam a saída da mitose (Visintin et al, 1998), a sinalização de PIP3 (Goberdhan et al, 1999), a regulação da entrada na fase mitótica pela ativação da proteína quinase dependente de ciclina (Cdk1) (Gautier et al., 1991). As fosfatases baseadas na catálise de aspartato são definidas por compartilhar o motivo DXDXT/V (CPDs). O primeiro membro descoberto em *S. cerevisiae*, FCP1, é uma fosfatase essencial na coordenação na condição do domínio C-terminal da subunidade maior da RNA polimerase II (RNAP II CTD) e assim regula a atividade transcricional da maquinaria (Kobor et al, 1999). Adicionalmente a essas principais famílias de proteínas fosfatases, SSU72 e as tirosina fosfatases são consideradas dois tipos separados de fosfatases, embora ambas possuam similaridade significativas em suas sequências com as PTPs (Ganem et al., 2003; Meinhart et al, 2005). No momento, a Cdc25 e a Cdc14 da superfamília PTP e PP1 e PP2A da família das fosfatases Ser/Thr clássicas são as proteínas fosfatases com funções mitóticas mais bem estudadas (Son e Osmani, 2009).

Em *S. cerevisiae*, proteínas fosfatases Msg5p e Sdp1p defosforilam Mpk1, contribuindo para a regulação dessa via de transdução de sinal (Martín et al, 2005). Angeles de la Torre-Ruiz et al (2002) e Di Como e Arndt (1996) reportaram que a correta regulação de ambas atividades basal e induzida das vias PKC1-MAPK e TOR (Target of Rapamycin) requerem a função da proteína Sit4p. A Sit4p é uma proteína fosfatase do tipo 2A serina-treonina que funciona na transição de G1/S do ciclo mitótico com localização nuclear e que modula funções mediadas por Pkc1p, incluindo a via de integridade da parede celular e

organização do citoesqueleto de actina (Sutton et al, 1991; Angeles de la Torre-Ruiz et al, 2002; Zabrocki et al, 2002; Huh et al, 2003).

As vias de sinalização das proteínas Pkc1p e TOR são bem conservadas em leveduras e em diversos fungos desempenhando papel relevante na resposta ao estresse e a sobrevivência. Além de regular as atividades de crescimento e metabolismo em células normais, essas vias também regulam respostas celulares a estresse da parede celular durante o ciclo celular, choque térmico, e outros agentes que possam comprometer a integridade celular (Kamada et al, 1995; Gray et al, 1997; de Nobel et al, 2000).

Em *S. cerevisiae*, a via de TOR é constituída de duas proteínas – Tor1p e Tor2p, que estão localizadas em dois complexos protéicos TORC1 e TORC2 (Loewith et al, 2002; Wedaman et al, 2003). O complexo TORC1 é sensível a tratamentos com rapamicina e contém as proteínas Tor1p ou Tor2p, Kog1p, Tco89p e Lst8p (Loewith et al, 2002; Zheng et al, 1995; Helliwell et al, 1998; Hall, 1996). Já o complexo TORC2 é resistente ao tratamento com rapamicina contém Tor2p, Avo1p, Avo2p, Avo3p, Bit61p, e Lst8p (Loewith et al, 2003; Zheng et al, 1995). Estudos recentes de localização subcelular demonstraram que Tor1p encontra-se de forma concentrada nas membranas vacuolares enquanto Tor2p está predominantemente pontuada em estruturas próximas à superfície citoplasmática da membrana plasmática (Sturgill et al, 2008). Essas diferenças na composição, sensibilidade à rapamicina e na localização celular confirmam a hipótese de que esses complexos trabalham separadamente (Loewith et al, 2002; Zheng et al, 1995; Sturgill et al, 2008). A via de sinalização TOR é importante para o sensoramento de nutrientes e acredita-se que desempenha um papel importante na extensão da vida celular (Lavoie e Whiteway, 2008; Kaeberlein et al, 2005; Kaeberlein e Kapahi, 2009; Selman et al, 2009).

Embora TOR seja uma via tanto estruturalmente quanto funcionalmente conservada desde leveduras até humanos, seus papéis não são idênticos biologicamente entre as espécies e precisam de uma caracterização mais detalhada. Rho1p é regulada por dois mecanismos, um mecanismo TOR independente que é ativado pelo estresse causado na parede celular e um mecanismo separado TORC2-dependente que regula a reorganização do

citoesqueleto de actina através da Rho1p-dependente da ativação de PKC1 (Newton, 2010).

O gene *SIT4* de *S. cerevisiae* codifica uma proteína fosfatase que é responsável pela defosforilação de Npr1p *in vivo* durante a privação de nutrientes (Schmidt et al, 1998). Quando ativa, TORC1 fosforila Tap42p, que então se liga em Sit4p e a mantém inativa (Jiang e Broach, 1999), dessa forma, a atividade de Sit4p é negativamente regulada por TORC1 (Di como e Arndt, 1996). Em estudos anteriores, Npr1p manteve-se em um estado hiperfosforilado no mutante *sit4Δ* tratado com rapamicina, indicando que a defosforilação é diretamente dependente da atividade de Sit4p (Jacinto, 2007; Jacinto et al, 2001).

Como descrito anteriormente, Sit4 participa de vários processos celulares tais como a via de Tor mediada por resposta a nutrientes (Di Como e Arndt, 1996; Beck e Hall; 1999, Jiang e Broach, 1999), a via de sinalização de PKC (Angeles de la Torre-Ruiz et al, 2002), a regulação da homeostase de íons monovalentes e pH intracelular (Masuda et al, 2000). A Sit4 possui também um papel importante na regulação do ciclo celular, já que é necessária para a correta transição de G1 para a fase S (Sutton e Arndt, 1991; Mann et al, 1993) e por isso mutantes nulos para *SIT4* apresentam crescimento reduzido (Sutton e Arndt, 1991; Di Como et al, 1995; Sutton e Freiman, 1997; Clotet et al, 1999). Este atraso é causado em partes pelo papel de *Sit4* no controle transcricional das ciclinas *CLN1* e *CLN2* em G1 e, também no controle de *SWI4*, que codifica uma proteína ligadora de DNA necessária para a regulação transcricional de *CLN1/CLN2* (Fernandez-Sarabia et al, 1992; Di Como et al, 1995). Acredita-se que *Sit4* também regula *CLN3* através da ativação da expressão de *CLN1* e *CLN2* através de *BCK2* (Di como et al, 1995).

Recentemente, visando uma melhor compreensão das funções das proteínas fosfatases de *A. fumigatus*, nosso grupo identificou 32 genes que codificam proteínas fosfatases, dos quais 24 foram deletados (Winkelströter et al, 2015). Dentre os genes deletados nesta coleção de mutantes de proteínas fosfatases, nós identificamos SitA, a proteína fosfatase homóloga de Sit4p de *S. cerevisiae*.

Com isso, o objetivo do presente trabalho é:

- (i) Isolar e caracterizar fenotipicamente o mutante Δ SitA;
- (ii) Analisar a virulência de Δ SitA em modelo de aspergilose pulmonar invasiva em camundongos.

3.1 - Declarações de Ética

Os princípios utilizados em nossos estudos são baseados na Declaração de direitos animais descritos pela UNESCO em 27 de Janeiro de 1978, nos artigos 8º e 14º.

Todos os protocolos usados no presente estudo foram aprovados pelo comitê de ética para experimentos animais do Campus de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (Número de permissão: 08.1.1277.53.6; estudo na interação de *Aspergillus fumigatus* com animais). Todos os animais foram agrupados em gaiolas ventiladas contendo cinco animais cada e foram cuidados de acordo com os princípios determinados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Princípios Éticos na Experimentação Animal – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, COBEA) e Guia de Princípios para Pesquisa Envolvendo Animais e Seres Humanos, Sociedade Americana de Fisiologia. Visando minimizar o sofrimento, os animais foram clinicamente monitorados pelo menos duas vezes ao dia e animais moribundos (definido por letargia, dispnéia, hipotermia e perda de peso) foram humanamente sacrificados. Todos os animais utilizados foram sacrificados por deslocamento cervical.

3.2 - Cepas e Meios de Cultura

3.2.1 - Sc-URA- (meio mínimo)

Base de Nitrogênio para Levedura 0,67% (p/v)

Glicose 2,00% (p/v)

Lisina; Leucina; Triptofano 0,01% (p/v)

Histidina 0,005% (p/v)

Água desatilada q.s.p. 1.000 mL

O meio SC é definido como um meio mínimo de cultura de leveduras. As substâncias que compõem o meio foram adicionadas em água destilada e foram esterilizados por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos.

3.2.2 – YPD

Peptona 20 g

Extrato de levedura 10 g

Dextrose 40 g

Ágar 15 g

Água desatilada q.s.p. 1.000 mL

As substâncias que compõem o meio foram adicionadas em água destilada e foram esterilizados por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos.

3.2.3 - L.B. (Lúria Bertani)

Bactotripton 10 g

Extrato de levedura 5 g

Cloreto de Sódio 10 g

Ágar 18 g

Água destilada q.s.p. 1.000 mL

As substâncias que compõem o meio foram adicionadas em água destilada e foram esterilizados por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos.

3.2.4 - Meio Mínimo (MM)

Solução de Sais 5,0% (p/v)

Dextrose 1,0% (p/v)

Solução de elementos traços 0,1% (p/v)

Ágar (Difco) 2% (p/v)

Água desatilada q.s.p. 1.000 mL

As substâncias que compõem o meio foram adicionadas em água destilada e foram esterilizados por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20

minutos. Para MM 2x glicose, acrescentou-se duas vezes a quantidade de glicose.

3.2.5 - Meio Mínimo modificado (AMM)

Solução de Sais para AMM 5% (p/v)

Glicose 1% (p/v)

KCl 0,6 M

Ágar (Difco) 2% (p/v)

Água desatilada q.s.p. 1.000 mL

As substâncias que compõem o meio foram adicionadas em água destilada e foram esterilizados por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos. Ao meio autoclavado foi adicionado tartarato de amônio (Sigma) 10 mM ou nitrato de amônio (Sigma) 10 mM.

3.2.6 - Meio Completo (YAG, YUU, YG e YG+UU)

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

Glicose 2,0% (p/v)

Ágar 2,0% (p/v)

Solução de elementos traços 0,1% (p/v)

Água desatilada q.s.p. 1.000 mL

As substâncias que compõem o meio foram adicionadas em água destilada e foram esterilizados por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos. YUU indica o meio de cultura completo YAG com a suplementação de uridina 4 mmol/L e uracila 10 mmol/L. O meio de regeneração de esferoplastos, utilizado na transformação de *A. fumigatus* consiste do meio completo suplementado com KCl 0,6 mmol/L. Os meios YG e YG+UU são iguais em composição, respectivamente com YAG e YUU, exceto pela ausência de ágar 2% (p/v). Para meio Top Ágar, utilizado na regeneração de esferoplastos, apenas 1% (p/v) de ágar foi adicionado. Para YAG 2x glicose, acrescentou-se duas vezes a quantidade de glicose.

3.2.7 – Meio RPMI 1640 (Gibco)

Um sachê de RPMI 1640 dissolvido em 1 Litro de água destilada, podendo ser suplementado com soro fetal bovino (FBS, Gibco), HEPES (2,4 g/L, J.T. Baker), LCCM (L-929 cell conditioned media), L-glutamina e então filtrado com o sistema a vácuo Stericup and Steritop (Millipore).

3.3 – Soluções e Tampões

3.3.1 - Salina Fosfato Tamponada (PBS)

NaCl 8,00 g

KCl 0,20 g

Na₂HPO₄ 1,15 g

KH₂PO₄ 0,20 g

Água desatilada q.s.p. 1.000 mL

As substâncias que compõem o meio foram adicionadas 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.

3.3.2 - Tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 50x concentrado

Tris Base 242 g

Ácido Acético Glacial 57 mL

EDTA 0,5 M pH 8,0 100 mL

Água desatilada q.s.p. 1.000 mL

As substâncias que compõem o meio foram adicionados 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.

3.3.3 - Tampão de ressuspensão de plasmídios

EDTA 10 mmol/L

Tris HCl pH 8,0 25 mmol/L

Glicose 50 mmol/L

As substâncias que compõem o meio foram adicionados 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.

3.3.4 - Tampão de extração de DNA

Tris-HCl pH 8,5 200 mmol/L

Cloreto de Sódio 250 mmol/L

EDTA 25 nmol/L

SDS 5% (p/v)

Água desatilada q.s.p. 1.000 mL

3.3.5 - Tampão de amostra para eletroforese de DNA

EDTA 10 mmol/L

Tris-HCl pH 7,5 10 mmol/L

Azul de bromofenol 0,25% (p/v)

Xileno cianol FF 0,25% (p/v)

Orange G 0,25% (p/v)

Sacarose 65,00%

Dissolveu-se os componentes no volume necessário

3.3.6 - Tampão MOPS 10x concentrado

MOPS 0,2 mol/L

Acetato de sódio 0,5 mol/L

EDTA 0,01 mol/L

As substâncias foram dissolvidas em água destilada tratada com dietil pirocarbonato (DEPC) 0,1% e o tampão foi ajustado para pH 7,0.

3.3.7 - Tampão de amostra para eletroforese de RNA

Azul de bromofenol 0,1 mg/mL

Glicerol 50% (p/v)

Tampão MOPS 1x

As substâncias foram dissolvidas no volume necessário

3.3.8 - Tampão Tris-EDTA (TE) 1x

EDTA 1 mmol/L

Tris-HCl pH 7,5 10 mmol/L

As substâncias que compõem o meio foram adicionados em água destilada e o pH foi ajustado para 7,5. O tampão foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos.

3.3.9 - Tampão Acetato de Sódio 100mmol/L pH 4,6

Acetato de sódio anidro 8,2 g

Água destilada q.s.p. 1.000 mL

A substância foi dissolvida em 800 mL de água destilada, ajustado o pH para 4,6 com Ácido acético glacial e então completado para o volume final.

3.3.10 - Acetato de Lítio 1x

Acetato de Lítio pH 7,5 100 mmol/L

O reagente foi dissolvido em água destilada e seu pH ajustado para 7,5. O tampão foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1kgf/cm² por 20 minutos.

3.3.11 - Solução de Elementos Traços

ZnSO₄.7H₂O 11 g

H₃BO₃ 5,5 g

MnCl₂.4H₂O 2,5 g

FeSO₄.7H₂O 2,5 g

CoCl₂.5H₂O 0,8 g

CuSO₄.5.H₂O 0,8 g

(NH₄)Mo₇O₂₄.4H₂O 0,55 g

EDTA 25 g

Água destilada q.s.p. 100 mL

As substâncias que compõem a solução foram adicionadas na ordem listada em água destilada, a solução foi então fervida e após o resfriamento o pH foi ajustado entre 6,5 e 6,8 com KOH e o volume foi ajustado para 100 mL.

3.3.12 - Solução de Sais 20x para Meio Mínimo

NaNO₃ 120 g

KCl 10,4 g

MgSO₄.7H₂O 10,4 g

KH₂PO₄ 30 g

Água destilada q.s.p. 1.000 mL

As substâncias foram dissolvidas em água destilada.

3.3.13 - Solução de Sais 20x para Meio Mínimo modificado (AMM)

KCl 140 mM

KH₂PO₄ 220 mM

MgSO₄.7H₂O 40 mM

FeSO₄.7H₂O 0,0 9mM

ZnSO₄.7H₂O 0,02 mM

O pH foi ajustado para 6,5.

3.3.14 - Solução 1 (protocolo de esferoplastização de *A. fumigatus*)

(NH₄)₂SO₄ 0,8 mol/L

Ácido cítrico 0,1 mol/L

Água destilada q.s.p. 1.000 mL

As substâncias foram dissolvidas em água destilada e o pH ajustado para 6,0 com hidróxido de sódio. A solução foi esterilizada por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos.

3.3.15 - Solução 2 (protocolo de esferoplastização de *A. fumigatus*)

Extrato de levedura 2% (p/v)

Sacarose 2% (p/v)

Água destilada q.s.p. 1.000 mL

As substâncias foram dissolvidas em água destilada e a solução foi esterilizada por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos.

3.3.16 - Solução 3 (protocolo de esferoplastização de *A. fumigatus*)

(NH₄)₂SO₄ 0,4 mol/L

Ácido cítrico 0,05 mol/L

Sacarose 1% (p/v)

Água destilada q.s.p. 1.000 mL

As substâncias foram dissolvidas em água destilada e o pH ajustado para 6,0. A solução foi esterilizada por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos.

3.3.17 - Solução 4 (protocolo de esferoplastização de *A. fumigatus*)

Polietilenoglicol 6000 25% (p/v)

CaCl₂ 100 mmol/L

KCl 600 mmol/L

Tris-HCl 10 mmol/L

Água deionizada q.s.p. 100 mL

As substâncias foram dissolvidas em água deionizada e o pH ajustado para 7,5. A solução foi esterilizada por calor úmido em autoclave a 120°C e 1kgf/cm² por 20 minutos.

3.3.18 - Solução 5 (protocolo de esferoplastização de *A. fumigatus*)

CaCl₂ 50 mmol/L

KCl 600 mmol/L

MES 10 mmol/L

Água deionizada q.s.p. 100 mL

As substâncias foram dissolvidas em água deionizada e o pH ajustado para 6,0. A solução foi esterilizada por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos.

3.3.19 - Solução Salina Citrato (SSC) 20x concentrada

NaCl 3 mol/L

Na₃C₆H₅O₇·2H₂O 300 mmol/L

As substâncias foram dissolvidas em água destilada e o pH ajustado para 7,0.

3.3.20 - Solução de lise para extração de plasmídios

NaOH 0,2 mol/L

SDS 1% (p/v)

A solução foi preparada no momento do uso a partir das soluções estoques de NaOH 4 mol/L e SDS 10%.

3.3.21 - Solução de neutralização para extração de plasmídios

Acetato de potássio 3 mol/L

Ácido acético glacial 7,5 mL

Água destilada q.s.p. 500 mL

O Acetato de potássio foi dissolvido em água destilada e então acrescentou-se o Ácido acético glacial. O volume da solução foi ajustada para 500 mL e esterilizada por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos.

3.3.22 - Solução de SDS 10%

SDS 10 g

Água destilada q.s.p. 100 mL

A substância foi dissolvida em água destilada e ajustada seu volume para 100 mL.

3.3.23 - Solução de fixação para microscopia

Formaldeído 3,7% (v/v)

PBS 50 mmol/L

Tween 80 0,2% (p/v)

As substâncias foram dissolvidas em Solução fosfato salina.

3.3.24 - Solução de Calcoflúor (CFW)

Calcofluor 1 mg/mL

1 mg de calcoflúor (Blankophor BBH, Standard SV-2460, Miles Organic Product Division) foi dissolvido em água destilada. A solução foi mantida fora do alcance da luz a -20°C.

3.3.25 - Tampão de extração de Proteínas

Tris 50 mM

NaF 50 mM

DTT 1 mM

Na₃VO₄ 1 mM

Complete Mini 1U/10mL

Coquetel Inibidor de fosfatase P004 10 µL

3.4 - Protocolos adotados

3.4.1 - Construção do cassete de deleção pela técnica de recombinação “*in vivo*” em *S. cerevisiae*

A deleção do gene desse trabalho foi realizado como descrito por Colot e colaboradores (2006) em *N. crassa*. A figura mostra um esquema da recombinação homóloga que acontece em *S. cerevisiae* e que foi utilizado na construção dos cassetes de deleções clonados no vetor pRS426.

Para a construção de cassetes de deleção, todas as reações de PCR foram realizadas em volume final de 20 µl utilizando uma DNA polimerase de alta fidelidade (Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase, New England Biolabs®, inc). O DNA da linhagem CEA17 ΔakuBku80 de *A. fumigatus* foi utilizado como molde para amplificação dos fragmentos de aproximadamente 1,5 kb das regiões 5' e 3' que flanqueiam a região aberta de leitura (ORF) do gene de interesse. O vetor pCDA21 (CAHVEROCHE et al, 2000) foi utilizado para

amplificar o fragmento contendo o marcador genético de auxotrofia, gene *pyrG* de *A. fumigatus*, com tamanho aproximado de 1,9 kb.

A amplificação das regiões flangeadoras da ORF do gene alvo foram realizadas com 500 ng de DNA genômico e com 20 µM de primers específicos das regiões 5' e 3', e o *pyrG* amplificado a partir de 200 ng do plasmídio pCDA21. Todos os fragmentos amplificados apresentam extremidades homólogas entre si para permitir a recombinação homóloga entre os mesmos e o vetor pRS426 “*in vivo*” em *S. cerevisiae*. O vetor pRS426, antes de ser utilizado na construção do cassete precisa ser linearizado com a ação de enzimas de restrição (*EcoRI* e *BamHI*), de forma a expor as regiões homólogas aos fragmentos amplificados pela PCR.

Com a confirmação de colônias positivas da recombinação dos fragmentos no plasmídio pRS426 na levedura (PCR), um clone positivo foi selecionado e a partir desse, o cassete completo de deleção foi amplificado por PCR utilizando os primers 5F e 3R. O produto da PCR foi então fracionado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e a banda específica purificada do gel e utilizada na transformação de *A. fumigatus*.

Primer	Sequência nucleotídica
Afu6g11470 pRS426 5fw	5'-GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGCGGGATCTTGGTCAATTGTACC-3'
Afu6g11470 <i>pyrG</i> 5rv	5'- GCCTCCTCTCAGACAGAATGGTGCGGGTGC GGACGAACG -3'
Afu6g11470 <i>pyrG</i> 3fw	5'- GCATTGTTTGAGGCGAATTCCCTAGCATGCTTGATGGTCTG -3'
Afu6g11470 pRS426 3rv	5'-GCGGTTAACAATTTCTCTCTGGAAACAGCCCTGATTATTCATTCCCGC-3'
Afu6g11470 ORF fw	5'-ATGGTGGACAACAAGATCCCTGAGCCGGG-3'
Afu6g11470 ORF rv	5'-GAGGTATTCTACAAGAAGTACTCGCTGCGGCCG-3'
Afu6g11470 5'ext fw	5'-CCAGCCCTCCGACGGCCGCC-3'

Tabela 01 – Sequência de oligonucleotídeos dos primers utilizados nesse estudo.

3.4.2 - Preparo de células competentes de *S. cerevisiae* e transformação

Uma colônia isolada de *S. cerevisiae* da cepa FGSC 9721, (cedida pelo Fungal Genetic Stock Center) foi inoculada em 10 mL de YPD e incubada a 30°C overnight (O.N., 16 horas). Após esse período uma alíquota é semeada em 50 mL de YPD (para DO_{600nm} de 0,1) e a cultura permaneceu a 30°C sob agitação

constante até alcançar uma DO_{600nm} entre 0,4 e 0,6. As células foram então centrifugadas a 600 g por 2 minutos e lavados com tampão TE 1x. Em seguida as células foram novamente centrifugadas e ressuspensas em 1,5 mL de solução TE/LioAc 1x e incubadas à 30°C por 1 hora, sob leve agitação. Para cada reação de transformação foram misturados 200 µl de suspensão de células, de 1-5 µg de DNA plasmidial, diferentes concentrações dos fragmentos de DNA purificados, provenientes das PCRs para a construção dos cassetes de deleção e 200 µg de esperma de salmão (previamente desnaturado a 99°C por 5 minutos), em seguida 600 µL de solução contendo LioAc 1x/PEG-3350 40% (p/v), gentilmente homogeneizados e então incubados por 30 minutos a 42°C. As células foram então centrifugadas a 2.500 g por 1 minuto, ressuspensas em 1 mL de TE 1x, precipitadas novamente e então ressuspensas em 100 µL de TE 1x, que foram então plaqueadas em meio SC-URA-.

Como controles, um grupo foi transformado com o plasmídio pRS426 fechado, para checar a viabilidade das células e outro grupo transformado sem DNA de esperma de salmão e sem fragmentos de DNA, para checar possíveis contaminações.

3.4.3 - Extração de DNA de *S. cerevisiae*

Cerca de 10 colônias transformantes de *S. cerevisiae* foram selecionados e semeados em meio SC-URA- líquido e incubados por 48 horas a 30°C e agitação constante. Após este período, as células foram centrifugadas a 2.500 g por 5 minutos e em seguida ressuspensas em 1 mL de tampão de extração de DNA de leveduras e, à esta solução foi adicionado o mesmo volume de pérolas de vidro (previamente tratadas com ácido nítrico 1 M para retirar as impurezas). Os tubos contendo as células com as pérolas foram acoplados a um vortex e agitados vigorosamente durante 10 minutos. Após esse período o sobrenadante foi transferido para novos tubos contendo o mesmo volume de uma mistura fenol:clorofórmio (1:1) e novamente vortexados por mais 10 minutos. Em seguida a mistura foi centrifugada a 16.000 g durante 15 minutos, e a fase superior (aquosa) contendo o DNA genômico foi recuperado. O DNA foi precipitado com

a adição de 600 µL de isopropanol e centrifugação a 16.000 g por 10 minutos. O DNA foi então lavado com 100 µL de etanol 70% (v/v) gelado e novamente centrifugado por 2 minutos a 16.000 g, o material foi secado à temperatura ambiente e o DNA então ressuspense em 50 µL de água deionizada estéril, com a adição de 1 µL de RNase A (10mg/mL) e incubados por 1 hora a 37°C. A concentração e pureza foram determinadas espectrofotometricamente, de acordo com Sambrook & Russel (2001).

3.4.4 - Preparo de células eletrocompetentes

Uma colônia isolada da linhagem de *E. coli* DH10β foi incubada em 10 mL de meio de cultura LB por 16 horas a 37°C e 200 rpm. Esse pré-inóculo foi então adicionado à 1 L de meio LB e mantido a 37°C e agitação de 250 rpm até a cultura atingir uma DO_{600nm} de 0,4 a 0,5. O frasco de cultura foi resfriado em banho de gelo por 30 minutos e as células foram recuperadas por centrifugação. Em seguida, as células foram equilibradas em 10 mL de solução aquosa de glicerol 10% (v/v), resfriada a 4°C e centrifugadas. O precipitado foi ressuspense em glicerol 10% (v/v) com volume necessário para atingir uma concentração de 1 a 3x10¹⁰ células/mL. A suspensão de células eletrocompetentes foi aliquoteada em microtubos e estocada a -80°C até o momento do uso.

3.4.5 - Preparação em pequena escala de DNA plasmidial

A extração de plasmídios foi realizada de acordo com Sambrook & Russel (2001). Cada colônia selecionada foi semeada separadamente em tubos contendo 5 mL de meio de cultura LB contendo o antibiótico apropriado e cultivado sob agitação de 150 rpm por 12 horas a 37°C. Cerca de 1,5 mL da suspensão de células de cada tubo foram transferidos para tubos de microcentrifuga e centrifugados a 16.000 rpm por 1 minuto a 4°C. As células foram ressuspensas em 100 µL do tampão de ressuspensão e foram adicionados 1 µL de RNase A (10 mg/mL) e 200µL de solução de lise. A mistura foi homogeneizada gentilmente por 4-5 vezes. Foram adicionados 150 µL de

acetato de sódio 3 mol/L pH 5,4. A suspensão foi centrifugada a 16.000 g durante 15 minutos a 4°C. Ao sobrenadante, foram adicionados 400 µL de clorofórmio e a mistura foi então vortexada. Em seguida, os materiais foram centrifugados a 16.000 g por 4 minutos a 4°C, a fase aquosa coletada e o DNA plasmidial foi precipitado com 1 mL de etanol absoluto. A mistura foi centrifugada a 16.000 g por 15 minutos a 4°C. O sedimento contendo DNA plasmidial foi então lavado com etanol 70% (v/v), seco e ressuspenso em água deionizada estéril.

3.4.6 - Produção de esferoplastos de *A. fumigatus*

Para as transformações de *A. fumigatus*, a linhagem Δ akuBku80 foi utilizada. Essa linhagem foi obtida em nosso laboratório e se trata de um mutante cujo gene ku80 homólogo de *A. nidulans* (nkuA) está inativado (da Silva Ferreira et al, 2006). Como se sabe os produtos dos genes ku70 e 80 são essenciais no processo de “non homologous end joining” (NHEJ) no reparo do material genético, que causa um direcionamento de todo o DNA exógeno introduzido na célula para a via de recombinação homóloga (Ninomiya et al, 2004), aumentando consideravelmente a inserção do cassete de deleção no locus do gene de interesse e dessa forma, melhorando a eficiência da transformação (Oakley, B. R.; dados não publicados).

A transformação seguiu a metodologia descrita por Tilburn et al, (1983), porém com algumas modificações. Um pré-inóculo de aproximadamente 107 conídios da cepa Δ akuBku80(pyrG-) foram crescidos em 50 ml de meio YG+UU a 37°C por 16 horas. Após esse período, o micélio foi coletado por centrifugação a 2.000 g por 10 minutos e ressuspenso em 20 mL de solução 1, suplementado com 6,5 ml de solução MgSO₄ 1mol/L. Separadamente, 400 mg de BSA e 300 mg de Glicanex (Novo Nordisk) foram dissolvidos em 20 mL de solução 2, em seguida esterilizados em filtros de 0,45 µm e então adicionado aos micélios. A enzima Glicanex apresenta diversas atividades, entre elas glicanase, quinase e protease, para a digestão da parede celular dos tubos germinativos, na presença do estabilizador osmótico BSA. Os micélios foram então incubados por 5 horas a 30°C e agitação constante de 70 rpm. Após esse período, os esferoplastos

foram filtrados em seringas contendo lã de vidro estéril. A suspensão de esferoplastos foi então centrifugada a 3.000 g por 10 minutos e 4°C e em seguida lavadas duas vezes com solução 3 para remoção do excesso de enzima, uma alíquota dos esferoplastos foi então observado em microscópio de campo claro para checar sua viabilidade e então utilizados na transformação.

3.4.7 - Transformação de *A. fumigatus*

A transformação foi realizada como descrito por Tilburn et. al. (1983), porém com algumas modificações.

Os esferoplastos foram ressuspensos em um volume de 50 µL de solução 5 por transformação e incubados por 10 minutos em gelo. Em seguida 100 µL por reação de solução 4 foi adicionado à suspensão de esferoplastos (a solução 4, contendo PEG, promove a fusão das membranas dos esferoplastos), gentilmente misturada e então aliquoteados 150 µl da suspensão contendo esferoplastos em tubos separados e o DNA a ser transformado adicionado (4-20 µg do DNA ressuspense em no máximo 20 µL) e incubados no gelo por 20 minutos. Após esse período, 1 mL da solução 4 foi adicionado e homogeneizado na suspensão, que foi incubada à temperatura ambiente por 20 minutos. Toda a suspensão foi então diluída em 30 mL de meio YAG Top Ágar contendo KCl 0,6 mol/L. As placas foram incubadas de 4 a 5 dias a 37°C para verificar o crescimento dos clones transformados.

3.4.8 - Southern Blot alcalino

Para demonstrar que a integração do cassete foi transformado homologamente no *loci* correto de *A. fumigatus* foi feito Southern Blot, descrito por Sambrook et al (1989).

O gel de agarose foi submetido à eletroforese para separação do DNA digerido com uma enzima de restrição apropriada e, após a corrida, tratada com solução depurinizante (HCl 0,25 mol/L) por 15 minutos. Após esse tratamento, o gel foi colocado sobre papel 3MM conectado à um reservatório contendo uma

solução de NaOH 0,4 mol/L. Sobre o gel foi colocada a membrana de nylon (Hybond-N+, Amersham-Pharmacia, USA) e 3 papéis 3MM do tamanho do gel previamente embebidos em solução de NaOH 0,4 mol/L. Acima desse bloco foram empilhadas várias camadas de papel absorvente com um peso de aproximadamente 0,5 kg (400 cm³/Kg) colocado por cima. Um plástico filme foi colocado entre as bordas do gel e do papel 3MM para evitar o contato entre o reservatório de NaOH e os papéis acima do gel e ao redor do reservatório para evitar a evaporação do NaOH. Após 12 horas de transferência, o sistema de transferência foi desmontado e a membrana de nylon foi lavada com SSC 2x. O DNA foi fixado à membrana utilizando o aparelho Stratalinker 1800 (Stratagene, USA), utilizando sua função “autocrosslink” (Southern, 1975).

3.4.9 - Marcação de sonda não radioativa

Como uma alternativa à marcação das membranas utilizando ³²P, utilizamos o kit Amersham AlkPhos Direct Labeling and Detection System (GE Healthcare Life Science).

Primeiramente, foi necessário diluir 20 µL da solução crosslinker em 80µL água destilada para preparar a solução de uso. Em paralelo, diluímos o DNA que será utilizado na sonda para uma concentração de 10 ng/mL, uma alíquota de 10 µL do DNA foi então desnaturado em água fervente por 5 minutos e imediatamente resfriado em gelo, em seguida uma rápida centrifugação para trazer o conteúdo de volta ao fundo do microtubo. Em seguida, ao DNA deve ser adicionado 10 µL do tampão de reação, 2 µL do reagente de marcação e 10 µL da solução de crosslinker, incubar por 30 minutos a 37°C por 30 minutos.

3.4.10 - Hibridação e revelação das membranas de Southern Blot

As membranas de nylon utilizadas (Hybond N+,GE) foram pré-hibridadas com o volume necessário de solução de hibridização (kit Amersham AlkPhos), com a adição de 0,4 M de NaCl e 4% (p/v) do reagente de bloqueio, por pelo menos 15 minutos a 55°C. As sondas foram então adicionadas e incubadas por

pelo menos 16 horas. As membranas foram então lavadas com SSC 2x 0,1% SDS a 65°C por 10 minutos duas vezes e em seguida lavadas mais duas vezes com SSC 1x 0,1% SDS a 65°C por 5 minutos. Para detecção adicionamos o reagente de detecção CDP-STAR (GE Healthcare Life Sciences), cobrindo toda a membrana e deixando por 5 minutos. Em seguida, o excesso do reagente de detecção foi removido e as membranas expostas a filmes autorradiográficos (Amersham Hyperfilm ECL, 18 x 24cm, GE Healthcare Life Sciences) por 1 hora e então finalmente revelados.

3.4.11 - Extração e manipulação de RNA

Cerca de 1×10^{10} conídios das linhagens selvagem e mutante foram inoculados em balões de erlenmeyer contendo MM e incubados por 10 horas a 37°C. Os micélios foram filtrados a vácuo e imediatamente congelados em nitrogênio líquido para evitar degradação do material. Para romper a parede celular do fungo, os micélios foram triturados em nitrogênio líquido com a utilização de cadinho e pistilo estéreis. O RNA foi extraído utilizando Trizol (Invitrogen, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. O RNA foi quantificado espectrofotometricamente em comprimento de onda de 260 nm e a integridade verificada em gel de agarose 1,2% sob condições desnaturantes corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz UV de acordo com Sambrook e Russel (2001), adotando como critério a integridade das bandas referentes aos RNAs ribossomais 28S e 18S, sendo a intensidade da primeira banda duas vezes mais forte que a segunda. Os RNAs a serem utilizados no RT-PCR foram tratados com DNase livre de RNase, em um volume final de 50 µl contendo 1x tampão de DNase (40mM Tris-HCl pH 7,5 e 6mM MgCl₂), 2,5 µl DTT 100 mM (Ditiotreitol, Invitrogen, USA), 1 µL de RNase out (40 U/µL, Invitrogen, USA), 10 µL de DNase (1 U/µL, Promega, Madison, USA) e 20 µg do RNA de interesse. A reação foi incubada a 37°C por 1 hora, seguindo-se a etapa de purificação pelo método de fenol:clorofórmio (1:1) e precipitação do RNA com acetato de sódio 0,3 M por 16 horas a -80°C para aumentar o rendimento. A ausência de DNA foi verificada por RT-PCR utilizando uma sonda fluorescente

do gene constitutivo *tubC* de *A. fumigatus*. Amostras com detecção de sinal negativo foram utilizadas para a síntese de cDNA.

Para a produção de cDNA nas reações de RT-PCR, foram utilizados 20 µg de RNA total contido num volume final de 6 µL e 1,5 de Oligo dTV (estoque 100 µM). A mistura foi aquecida a 75°C por 10 minutos, rapidamente centrifugada e mantida em gelo. Em seguida foram adicionados 5 µL de First Strand Buffer (5x, Invitrogen), 2,5 µL de dNTP (10 mM cada). Os tubos foram aquecidos a 42°C por 5 minutos para termostatizar a reação e em seguida 1 µL da enzima transcriptase reversa (Superscript II, Invitrogen USA, 200 U/µL) foi adicionado. A reação foi incubada a 42°C por 1 hora e trinta minutos para síntese do cDNA.

3.4.12 - Ensaios Fenotípicos

Para checar as diferenças no crescimento entre a cepa parental, a cepa deletada e cepa restituída, 1×10^5 conídios frescos foram semeados pontualmente em diferentes meios de cultivo e seus halos de crescimento foram medidos em 24, 48, 72 e 96 horas. Outro método utilizado foi analisar o crescimento inicial de conídios em uma série de diluições, tanto em temperaturas diferentes, presença ou ausência de agentes que causam estresse osmótico ou oxidativo e agentes que causam danos na parede celular ou no DNA. Os drop-outs foram realizados utilizando 5 µL de uma suspensão inicial de 2×10^7 e então fazendo uma diluição seriada de 10x da cepa selvagem e dos mutantes (concentração final de conídios por ponto de 1×10^5 até 1×10^2) em diferentes meios e crescidos por 48 horas a 37°C.

3.4.13 – Ensaios de formação de biofilme e adesão

Os ensaios de cristal violeta e biofilme foram realizados segundo Mowat et al (2007) e Shopova et al (2013) respectivamente. Para determinar a habilidade de formar biofilme, 1×10^4 conídios foram inoculados em 200 µL de meio MM ou YG líquido em uma microplaca de poliestireno de 96 poços e então

incubados sem agitação por 24 horas a 37°C. Após esse período, a placa foi lavada diversas vezes com PBS, secada na bancada e em seguida adicionado 200 µL de cristal violeta 0,5% durante 5 minutos a temperatura ambiente. O micélio corado foi então lavado diversas vezes com água destilada, até que todo o excesso de cristal violeta fosse removido e então novamente secado na bancada. Finalmente, o cristal violeta foi eluído em 200 µL de etanol 100% e a absorbância medida em 590 nm.

Para checar a formação de biofilme, 1×10^6 conídios frescos foram adicionados em 20 mL de RPMI 1640 tamponado com HEPES e glutamina (Life Technologies) em placas de petri de poliestireno estéreis. Após uma aderência inicial de 4 horas de incubação estática a 37°C, os conídios não aderidos foram lavados três vezes com PBS-0,1% Tween 80 estéril. Em seguida, 20 mL de meio RPMI fresco foram adicionados aos conídios aderidos e cultivados durante 96 horas a 37°C. Os micélios foram raspados da superfície das placas e filtrados em miracloth (Merck), o peso-seco do biofilme produzido foi então analisado.

3.4.14 - Microscopia Eletrônica de Varredura

Conídios das cepas selvagens e do mutante $\Delta sitA$ foram inoculados em meio RPMI em placas de 24 poços de cultura de células com lamínulas Thermanox (13 mm). Após 24 horas de incubação a 37°C os biofilmes foram processados e trabalhados como descrito previamente (Erlandsen et al, 2004). Previamente, os biofilmes foram lavados 2x com PBS e fixados em 2% paraformaldeído, 2% glutaraldeído e 0,15% [p/v] de alcian blue em 0,15 M de cacodilato de sódio (pH 7.4). Os biofilmes foram então corados com partículas de ouro e visualizados com o microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6400 em com vácuo a 10 kV.

3.4.15 – Microscopia eletrônica de transmissão

A preparação das amostras foi feita como descrito previamente (Walker et al, 2008), porém com algumas modificações. Previamente, células foram

coletadas e os “pellets” foram fixados em tampão PBS 0,1 M contendo glutaraldeído 2,5% (v/v) por 24 horas a 4°C. As amostras foram então encapsuladas em agarose de baixo ponto de fusão 3% (p/v) antes do processamento para estimular a resina seguindo um cronograma de 24 horas no processador de tecidos Lynx (fixação secundária com 1% OsO₄, contraste com 1% acetato de uranila, desidratação com etanol e, infiltração com acetato/Spurr). Uma infiltração adicional foi feita sob vácuo a 60°C antes da incorporação em cápsulas (TAAB laboratório e Microscopia, Reino Unido) e polimerização a 60°C por 48 horas. Secções de cortes semi-finos (0,5 µm) foram coradas com azul de toluidina para identificar as áreas de melhor densidade de células. Cortes ultra-finos (60 nm) utilizando lâmina de diamante Diatome no ultramicrotome Leica UC6 e corado com acetato de uranila e citrato de chumbo para ser analisado no microscópio de transmissão de elétrons JEM-1400Plus (JEOL [Reino Unido] Ltd., Hertfordshire, Reino Unido), as imagens foram capturadas com câmera AMT UltraVue e analisadas no software AMT Image Capture Engine V602 (Deben United Kingdom Ltd., Suffolk, United Kingdom).

3.4.16 - Microscopias para determinação de quitina e β -(1,3)-glicanas

Para determinar a quantidade de β -(1,3)-glicanas o procedimento utilizado foi realizado de acordo com Shepardson et al (2013) e Chung et al (2014). Previamente, 106 esporos de *A. fumigatus* foram incubados por 8 horas a 37°C em placas de 24 poços com lamínulas circulares de 13 mm estéreis, contendo 1 mL de MM filtrado (para retirar resíduos que possam interferir na microscopia), irradiados com luz UV, para cessar o crescimento celular. Em seguida as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS 1x estéril por 5 minutos à temperatura ambiente e então bloqueados com solução de bloqueio (PBS 0,01 M; soro de cabra 2%; BSA 1%; Triton X-100 0,1%; Tween 20 0,05%; azida de sódio 0,05%; pH 7.2) por 30 minutos a temperatura ambiente, com leve agitação. Após esse período, foi adicionado à solução de bloqueio 1 µg/ml de Dectin-hFc (Invivogen) e novamente incubado por 1 hora à temperatura ambiente e leve agitação. Em seguida, 20 µL de IgG1 de cabra conjugado com DyLight 594 (1:50,

AbCam, USA) e incubados a temperatura ambiente por 1 hora e leve agitação. Depois de corado, as lamínulas foram então lavadas uma vez em PBS 1x e visualizadas.

Para coloração da quitina, 5x10⁶ conídios foram incubados em 5 mL de MM em placas de petri (60 mm x 15 mm) por 8 horas a 37°C. Os tubos germinativos foram irradiados com luz UV e em seguida tratados com 2 µg/mL de CFW por 5 minutos e depois lavados 1x com PBS.

As células coradas foram visualizadas sob condições idênticas para comparação utilizando microscópio de fluorescência Zeiss Observer.Z1 (Jena, Germany) em objetiva de 100x com imersão de óleo (EC Plan-Neofluar, abertura numérica 1.3) equipado com módulo de epifluorescência e lâmpada de mercúrio HBO 100 W. As imagens em campo claro com contraste de fase e em campo escuro de fluorescência foram capturadas com câmera AxioCan (Carl Zeiss), visualizadas e processadas com o programa Axio Vision versão 3.1. Para quantificar a fluorescência, utilizamos o software ImageJ, que calcula a média de fluorescência da área total do fungo.

3.4.17 - Análise das proteínas de superfície dos conídios

A proteína total da superfície dos conídios foi extraída como descrito por Beauvais *et al.* (2013). Primeiramente, 2x10⁹ esporos de três amostras independentes das cepas selvagem e $\Delta sitA$ foram tratadas com 200 µL de solução de NaCl 0,5 M e incubadas à temperatura ambiente por 2 horas. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante foi recolhido, liofilizado e depois ressuspenso em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,8 e ureia 8 M. As proteínas foram então quantificadas pelo método de Bradford com o kit Protein Assay Dye Reagent Concentrate Concentrate (Bio-Rad, cód. 500-0006, Lote L9700067 Rev J). A preparação das amostras para a espectrometria de massa consiste em três etapas: (I) redução e alquilação da proteína adicionando 2.5 µl de ditioneitol na concentração de 1 mg DTT/mg de proteína e incubado por duas horas em temperatura ambiente seguido pela alquilação pela adição de 5 µL de iodoacetamida (IA) na razão de 3 mg IA/mg

de proteína e incubação de uma hora à temperatura ambiente; (II) digestão enzimática das proteínas com tripsina. As amostras foram diluídas cinco vezes em bicarbonato de amônio pH $\geq 8,0$ com volume final de 300 μ L. As amostras foram então incubadas com 1 μ g de tripsina (Promega, V511A, Lot 30551310) a 37°C por 16 horas; e (III) por último a limpeza/dessalinização das amostras usando as colunas OASIS HLB Cartridge 1cc (cat. number: 186000383, Waters). As colunas foram equilibradas com uma solução contendo 5% de acetonitrila, ácido fórmico 0,1%, e a eluição do material foi feito utilizando acetonitrila 80%.

As amostras foram secas e aplicadas no espectrômetro de massa LTQ Orbitrap ELITE (Thermo-Finnigan) acoplado à um sistema de cromatografia de nano-fluxo (LC-MS/MS). Os dados adquiridos foram automaticamente processados pelo CPAS (Computational Proteomics Analysis System) (Rauch et al, 2006). Os peptídeos identificados foram agrupados em proteínas usando o algoritmo Protein Prophet e uma lista de proteínas identificadas foi estabelecida utilizando um erro menor que 2%. Os dados foram então comparados com o banco de dados de proteoma de *Aspergillus fumigatus* (Af293 ou A1163) no site www.aspgd.org.

3.4.18 - Modelo de aspergilose pulmonar em camundongos

O modelo de aspergilose pulmonar em camundongos foi realizada de acordo com Dinamarco et al (2012). Camundongos fêmeas de seis semanas (linhagem BALB/c; pesando entre 20 e 22 g) foram alojadas em gaiolas ventiladas em grupos de 5 animais. Os camundongos foram então suprimidos com ciclofosfamida na concentração de 150 mg/kg, administrado via intraperitonal nos dias -4, -1 e 2 antes e depois da infecção. Hidrocortisona (200 mg/kg) foi injetada subcutaneamente no dia -3. Os conídios de *A. fumigatus* utilizado na infecção foram crescidos em meio completo YAG dois dias antes da infecção. Conídios frescos foram ressuspensos em PBS (Phosphate Buffer saline) (8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g de Na₂HPO₄, 0,24 g de KH₂PO₄ em 1 litro de água destilada e pH 7,4) e filtrado em Miracloth (Calbiochem). A suspensão de conídios frescos foi então centrifugado a 3.000 g por 5 minutos, lavado três

vezes com PBS, contado utilizando um hematocítômetro e então ressuspenso em uma concentração de 5×10^6 conídios/mL. A viabilidade das suspensões de conídios utilizadas na infecção dos camundongos foi feita através de diluições seriadas, sendo plaqueadas em meio YAG e incubadas a 37°C e em seguida contadas as unidades formadoras de colônias.

Os camundongos foram anestesiados com a inalação de halotano e em seguida infectados com 1×10^5 conídios em 20 µL de PBS. Como controle negativo um grupo de cinco camundongos recebeu apenas PBS. Os camundongos foram então pesados a cada 24 horas e avaliados pelo menos duas vezes ao dia. Camundongos que apresentaram uma perda de 20% do seu peso após a infecção foram sacrificados. Os cálculos estatísticos da sobrevivência dos camundongos foram feitos utilizando o kit de análises do Prisma, utilizando os testes "Gehan-Breslow-Wilcoxon Test" e "Log-rank (Mantel-Cox) Test", os quais foram considerados estatisticamente significativos valores menores que $P < 0,05$. Adicionalmente, três dias após a infecção, dois camundongos de cada grupo foram sacrificados e os pulmões foram removidos, fixados e processados para análises histológicas.

3.4.19 - Histopatologia e Carga Fúngica pulmonar

Após 72 horas, um grupo de animais foi sacrificado e os pulmões removidos e fixados por 24 horas em formaldeído-PBS 3,7%. As amostras foram então lavadas várias vezes em etanol 70% antes da desidratação do material em uma série de soluções aumentando gradativamente a concentração de álcool. Finalmente as amostras foram diafanizadas e em seguida embebidas em parafina. Para cada amostra, secções sequenciais de 5 µm foram coletadas em lâminas de vidro e coradas com GMS (Gomori methenamine silver) ou hematoxilina e eosina (HE) seguindo o protocolo padronizado (Greenberger, 2002). Previamente, os cortes foram deparafinizados, oxidados com 4% de ácido crômico, corados com solução de metenamina de prata e re-corado com hematoxilina. Secções dos tecidos foram também corados com hematoxilina e

eosina para análise histológica a fim de verificar os danos no pulmão. Todas as lâminas foram lavadas, preservadas em meio de montagem e seladas com lamínulas. As análises histológicas foram feitas utilizando o microscópio Axioplan 2 imaging microscope (Carl Zeiss) com as ampliações estabelecidas em campo claro.

Para investigar a carga fúngica nos pulmões, os camundongos foram infectados como descrito acima, porém com um inóculo de 1×10^6 conídios/20 μL . O inóculo mais concentrado em comparação com o inóculo utilizado na curva de sobrevivência foi utilizado para aumentar a detecção de DNA do fungo. Os animais foram sacrificados 72 horas após a infecção e os pulmões removidos foram congelados em nitrogênio líquido imediatamente. As amostras foram então homogeneizadas por vortexação com beads de vidro e o DNA foi extraído com o método de fenol-clorofórmio. A qualidade e quantidade do DNA foi medida utilizando o NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific). Pelo menos 500 μg do DNA total foi utilizado para PCR em tempo real quantitativo. Um primer e uma sonda Lux (Invitrogen) foi utilizado para amplificar uma região do rRNA 18S de *A. fumigatus* (primer, 5'-CTTAAATAGCCCGGTCCGCATT-3'; probe, 5'-CATCACAGACCTGTTATTGCCG-3') e uma região intrônica de GAPDH (glyceraldeído-3-fosfato desidrogenase) (primer, 5'-CGAGGGACTTGGAGGACACAG-3'; sonda, 5'-GGGCAAGGCTAAAGGTCAGCG-3'). Seis pontos da curva padrão foram calculadas utilizando diluições seriadas do gDNA das cepas de *A. fumigatus* utilizadas neste estudo e também do camundongo não infectado. A quantidade de DNA do fungo e do camundongo foi obtida pelos valores do threshold cycle (CT) de uma curva padrão apropriada. A carga fúngica foi determinada através da razão entre picogramas de DNA do fungo e microgramas de DNA do camundongo.

3.4.20 - Índice de Fagocitose

Para estimar a porcentagem de conídios fagocitados, macrófagos alveolares foram coletados dos pulmões de camundongos BALB/c (8 a 10

semanas) utilizando um cateter intravenoso (Angiocath, Becton Dickinson) . Seis camundongos por experimento foram sacrificados, a traqueia foi então exposta e o cateter introduzido. Para lavar os pulmões, 1 mL de meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) foi utilizado três vezes . O sobrenadante foi removido e o pellet foi lavado três vezes com meio RPMI e ressuspenso em 1 mL de meio RPMI-10% Soro fetal bovino (FBS) (Gibco). As células foram contadas com um hematocitômetro. O ensaio fagocítico foi realizado de acordo com Mech et al (2011), porém com algumas modificações. Previamente, em uma placa de 24 poços contendo uma lamínula de 15 mm por poço, 2×10^4 macrófagos foram incubados com 1 mL de RPMI-FBS a 37°C com 5% CO₂ por 1 hora. Em seguida, os poços foram lavados com 1 mL de meio para remover as células não aderentes. Em cada poço, 1 mL de RPMI-FBS contendo 1×10^5 conídios (1:5 macrófago/conídios) de cada cepa, em duplicata, foram adicionados e então incubados a 37°C com 5% de CO₂ por 80 minutos, depois disso o sobrenadante foi removido e 500 µL de PBS-formaldeído 3,7% foi adicionado. Depois de 15 minutos as amostras foram lavadas com 1 mL de água ultra pura e novamente incubadas com 495 µL de água e 5 µL de CFW (10 mg/ml) por 20 minutos. As amostras foram lavadas e montadas em lâminas com 50% glicerol. O microscópio de fluorescência Zeiss Observer.Z1 foi utilizado para checar a porcentagem de esporos fagocitados. A membrana dos macrófagos não é permeável, portanto apenas esporos fagocitados permanecem não corados pelo CFW. Pelo menos 100 conídios foram contados por amostra e o índice de fagocitose foi calculado. Esse experimento foi feito em triplicata.

3.4.21 - Destruição de conídios por macrófagos alveolares

Para avaliar a destruição de conídios por macrófagos alveolares, as células fagocíticas foram obtidas como descrito acima. Em uma placa de 96 poços, 1×10^4 macrófagos foram adicionados com 200 µL de RPMI-FBS por poço e incubados a 37°C com 5% de CO₂ por 1 hora. Em seguida, 5×10^4 conídios (1:5 macrófagos/conídios) foram adicionados e incubados a 37°C com 5% de CO₂ por 4 horas. Como controle positivo, poços sem a adição de macrófagos

foram utilizados. Para cada cepa utilizada esse ensaio foi realizado em duplicata. Após a incubação, 100 µL de Triton X-100 3% foi adicionado. Em seguida, 10 minutos a temperatura ambiente, as amostras foram removidas da placa e diluídas sericamente em solução salina estéril. As diluições foram plaqueadas em meio completo YAG (Mech et al, 2011) e incubados a 37°C por 2 dias. A destruição de conídios foi calculada comparando o número de UFCs das amostras incubadas com macrófagos contra o número de UFCs das incubadas sem macrófagos. Este experimento foi feito em triplicata.

3.4.22 - Determinação dos níveis de TNF- α

Para a determinação de citocinas, macrófagos derivados da medula óssea (MDMO) de camundongos C57BL/6 foram preparados como descrito anteriormente (Marim et al, 2010). Previamente, macrófagos da medula óssea de fêmur dos camundongos foram cultivados por seis dias em meio RPMI 1640, contendo 20% FBS e 30% LCCM. Os macrófagos (5×10^5) foram adicionados em placas de 24 poços por 16 horas a 37°C com 5% CO₂ em meio RPMI 1640 contendo 10% SFB e 5% LCCM. Para a infecção fúngica, cultivamos previamente 2×10^4 esporos por poço por 18 horas a 37°C até o estágio de hifa, irradiados com UV e então usados para estimular os macrófagos. As células foram centrifugadas para sincronizar a infecção e cultivados por 18 horas. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e os níveis de citocina foram medidos por ELISA (measured by enzyme-linked immunosorbent) com um kit de TNF- α de rato (R&D Quantikine ELISA) de acordo com as instruções do fabricante.

3.4.23 – Inibição de PkcA

A inibição farmacológica de PkcA de *A. fumigatus* foi analisada pelo uso de chelerytrin, calphostin C e cercosporamide. Conídios (1×10^6) da cepas selvagem, $\Delta sitA$, e complementado foram inoculados em 1 mL de meio YG líquido em placas de poliestireno de 24 poços contendo 10% de alamarBlue (Life Technologies) como indicador de viabilidade, de acordo com o método de

Yamaguchi et al (2002). As células foram cultivadas durante 48 horas a 37°C e o crescimento foi avaliado em intervalos de 24 horas.

3.4.24 - Western Blotting

A detecção da fosforilação de mpkA por *Western blotting* foi realizada como descrito por *Hagiwara* et al (2013), com pequenas modificações. Previamente, conídios de *A. fumigatus* do tipo selvagem e o mutante $\Delta sitA$ foram cultivados em meio YPD líquido por 18 horas a 37°C antes da adição de CR (concentração final de 200µg/mL) durante 60 minutos. Para a extração das proteínas, micélios foram então macerados em nitrogênio líquido, em tampão de extração de proteínas contendo inibidores de proteases. A suspensão foi centrifugada e o sobrenadante recolhido, as proteínas foram quantificadas por Bradford e ajustadas para uma concentração de 60 µg de proteína em tampão amostra e fervidas em banho maria a 95°C por 5 minutos. As proteínas foram separadas no sistema NuPAGE (Invitrogen) e transferidas utilizando o sistema de transferência de gel iBlot® 2 NC Regular Stacks (Novex, Life Technologies™). Para detectar as proteínas, os anticorpos anti-fosfo-p44/42 e anti-p44/42 foram utilizados contra a forma fosforilada (MpkA-P) e não fosforilada da MpkA. Para detectar esses sinais na membrana, utilizamos o sistema de detecção para *Western blotting* ECL Prime (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) e LAS1000 (FUJIFILM, Tokyo, Japan).

4.1 - Identificação da proteína fosfatase SitA homóloga em *Aspergillus fumigatus*

Uma busca com BLASTp no genoma de *A. fumigatus* revelou uma única proteína putativa ortóloga à proteína Sit4 de *S. cerevisiae* (ScSit4p), Afu6g11470 (nomeado como SitA). A organização de introns e exons do gene *sitA* foi confirmada por RNA-seq (disponível em www.aspgd.org) e três íntrons preditos estão localizados de 155 a 211, 603 a 656, e 989 a 1036 pares de bases. A proteína predita codificada por *sitA* provavelmente tem 388 aminoácidos e possui massa de 43,5kDa. A identidade entre as proteínas de *A. nidulans* SitA e ScSit4 é alta (1e-99; 72,9 % de identidade; 84,7 %). Uma comparação entre a estrutura e a organização da ScSit4 e SitA foi feita através da interface SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). A organização dos domínios catalíticos das proteínas fosfatases 2A são conservadas em ambas as proteínas (dados não mostrados). Análises filogenéticas identificaram inúmeros homólogos de SitA com fungos filamentosos (identidade das proteínas maior que 70%), incluindo várias espécies da família Aspergilli, patógenos de plantas e fungos saprofíticos (Figura 01). Entretanto, as análises filogenéticas claramente demonstraram dois grandes grupos diferentes entre fungos e leveduras (Figura 01).

Figura 01 – Árvore filogenética de homólogos de *sitA* em fungos. A árvore foi inferida utilizando o método de neighbor-joining. O valor calculado de bootstrap para as 500 replicatas estão indicadas nas ramificações da árvore. As sequências foram alinhadas por ClustalW e a árvore construída utilizando o software MEGA6. *F. verticillioides*, *Fusarium verticillioides*; *F. oxysporum*, *Fusarium oxysporum*; *A. flavus*, *Aspergillus flavus*; *A. nidulans*, *Aspergillus nidulans*; *N. crassa*, *Neurospora crassa*; *S. pombe*, *Schizosaccharomyces pombe*.

4.2 - O mutante $\Delta sitA$ tem problemas na integridade da parede celular

Para obtermos um melhor entendimento de SitA em *A. fumigatus*, nós deletamos o gene *sitA* (Figura 02.) e os fenótipos do mutante foram comparados com o tipo selvagem. O gene deletado foi posteriormente complementado com o gene correspondente do tipo selvagem para checar a possibilidade de mutações secundárias durante a construção da cepa deletada. Os fenótipos relacionados ao mutante de *S. cerevisiae* $\Delta sit4$ (Sutton *et al.*, 1991; Stark, 1996; Angeles de la Torre-Ruiz *et al.*, 2002; Zabrocki *et al.*, 2002) que pudessem afetar a ausência de *sitA*, como sensibilidade à rapamicina, estresse por alta osmolaridade, danos na parede celular, sensibilidade a metais e diferença no crescimento em meios de cultura pobres em nutrientes foram investigados.

O mutante $\Delta sitA$ demonstrou crescimento radial comparável ao tipo selvagem em meio mínimo e crescimento radial reduzido no tempo de 24 horas em meio completo (Figura 03), sugerindo que $\Delta sitA$ não é importante para o crescimento radial em condições de escassez de nutriente. O mutante $\Delta sitA$ mostrou-se mais sensível a uma série de metais, tais como $MnCl_2$, $CaCl_2$ e $LiCl$ (figura 04); porém, o mutante é mais resistente a $ZnSO_4$ na presença de 1 mM EDTA (usado visando quelar todos os metais pré-existent no meio; Figura 04-C). O mutante $\Delta sitA$ é igualmente sensível a rapamicina quando comparado com as cepas selvagem e complementadas (figura 05). O mutante $\Delta sitA$ é mais sensível a agentes que causam dano na parede celular, como Congo Red (CR), Calcofluor White (CFW) e Sodium Dodecil Sulfate (SDS), que afeta a membrana plasmática (Figura 06-A, B e C).

Para determinar se $\Delta sitA$ está envolvido na via da Mpk1 em *A. fumigatus*, a quantidade e o estado de fosforilação do homólogo de Mpk1p, MpkA, foram medidos na presença ou na ausência de CR. Os níveis de fosforilação da proteína MpkA foram determinados utilizando o anticorpo anti-fosfop44/42 que reconhece a MpkA fosforilada (figura 06-D). Na cepa selvagem, os níveis de indução da fosforilação de MpkA foram de 5,68; 20,8 e 19.2 vezes após a adição de 300 $\mu g/ml$ de CR durante 15, 30 e 120 minutos respectivamente. O mutante $\Delta sitA$ apresentou níveis de fosforilação 3 vezes maiores que o tipo selvagem na

ausência de CR (figura 06-D). Entretanto, o mutante $\Delta sitA$ demonstrou níveis de indução da MpkA de 0,88; 5,45 e 4,13 vezes após a adição de 300 $\mu\text{g/ml}$ de CR durante 15, 30 e 120 minutos (figura 06-D). Os níveis de fosforilação da MpkA do mutante $\Delta sitA$ foram de 4 a 5 vezes menores quando comparados ao tipo selvagem.

Esse aumento na sensibilidade à agentes que causam dano a parede celular podem estar relacionados à composição da parede celular. Dessa forma, analisamos a quantidade de quitina na parede celular do mutante $\Delta sitA$ através da coloração com Calcofluor White (CFW). A intensidade de fluorescência por área fúngica foi 20% mais alta no mutante $\Delta sitA$ quando comparado com o tipo selvagem ou a cepa complementada (Figura 07 A). Para identificar diferenças na composição ou exposição de β -(1,3)-glicanos na superfície da parede celular, utilizamos a coloração com Dectina-1. O mutante $\Delta sitA$ apresentou níveis mais elevados de β -glicanos em comparação com o tipo selvagem e a cepa complementada $\Delta sitA::sitA+$. A intensidade da fluorescência por área fúngica no mutante $\Delta sitA$ foi 40% maior em relação ao tipo selvagem e a cepa complementada (Figura 07-B, C). Dessa forma, esses resultados sugerem que o mutante $\Delta sitA$ possui mais β -(1,3)-glicanos e quitina em relação ao tipo selvagem. Diferenças na susceptibilidade à caspofungina (mais resistente) e à anidulafungina (mais sensível) foram observadas no $\Delta sitA$ (Figura 08). Evidências adicionais para o papel de SitA na correta organização da parede celular foram confirmadas por análises de TEM (*Transmission Electron Microscopy*, figura 09-A). Tubos germinativos não tratados de $\Delta sitA$ foram cultivados em MM e apresentaram parede celular aproximadamente 3 vezes mais grossa que as cepas selvagem e o mutante complementado (figura, 09 B). A exposição da parede celular dos tubos germinativos de $\Delta sitA$ à CR e CFW não alteraram a espessura da parede (figura 09-A, B). Entretanto, a exposição das cepas tipo selvagem e complementada à CFW e CR apresentaram um aumento de 2,5 a 3 vezes a espessura da parede celular (figura 09-A,B). Esses resultados sugerem que SitA é importante na via de integridade da parede celular em *A. fumigatus*.

Figura 02 – (A) Análise de Southern Blot para o mutante nulo *Afu6g11470* (*sitA*). (B) Análise por PCR mostrando a complementação da cepa.

Figura 03 – Crescimento radial em Meio Completo (A) e Meio Mínimo (B), sugerindo que *sitA* não é necessário para o crescimento normal em *A. fumigatus* (*= $P < 0,05$ por Teste-T).

Figura 04 – O mutante $\Delta sitA$ de *A. fumigatus* é mais sensível à estresse iônico. As cepas selvagem, $\Delta sitA$ e a cepa complementada de *A. fumigatus* foram incubadas durante 48 horas a 37°C em MM contendo diferentes concentrações de MnCl₂ (A), CaCl₂ (B), ZnSO₄ + 1mM EDTA (C) e LiCl (D).

Figura 05 – Experimento de crescimento de conídios em meio contendo diferentes concentrações de rapamicina. Diluições seriadas dos conídios (de 10^5 a 10^2) das cepas selvagem, $\Delta sitA$ e a cepa complementada foram cultivadas em Meio Completo líquido contendo diferentes concentrações de rapamicina. Nenhuma diferença entre as cepas foi observada.

Figura 06 – O mutante $\Delta sitA$ de *A. fumigatus* possui parede celular comprometida. (A e B) O mutante $\Delta sitA$ é mais sensível a agentes que causam danos à parede celular como CR e CFW. Diluições seriadas dos conídios (de 10⁵ a 10²) das cepas selvagem, $\Delta sitA$ e a cepa complementada foram plaqueadas em meio Mínimo (A) e completo (B). (C) O mutante $\Delta sitA$ de *A. fumigatus* é mais sensível à SDS. (D) Análises de *Immunoblot* para fosforilação de MpkA em resposta à estresse causado por CR. As cepas selvagem e o mutante $\Delta sitA$ foram cultivados por 18 horas a 37°C, então CR (300 g/ml) foi adicionado por 15, 30 e 120 minutos ou não (controle). O anticorpo anti-fosfo-p44/42 MAPK contra a forma fosforilada de MpkA foi utilizado para detectar a fosforilação de MpkA (MpkA-P). O anticorpo Anti-γ-tubulina foi utilizado para controle da quantidade de proteínas aplicadas no gel. Como controle adicional, a coloração do gel por Coomassie brilliant blue (CBB) foi utilizada. A intensidade dos sinais foi quantificada pelo software Image J e a razão da intensidade de MpkA-P pela intensidade do sinal de γ-tubulina foi calculada.

Figura 07 – Detecção da composição de β -(1,3)-glicanos e quitina na superfície celular. Conídios foram cultivados em meio líquido até o estágio de hifas, irradiados com UV e corados com dectina-1 solúvel ou calcoflúor (A) para detectar a quantidade de quitina (B) ou β -glicanos (C), respectivamente. A intensidade da coloração foi quantificada pela média da área total corada de cada célula fúngica utilizando o software Image J. Os experimentos foram feitos em triplicatas e os resultados são demonstrados em números arbitrários (valores médios com erro padrão; * = $P < 0,05$ por Teste-T). Barras, 5 μ m. DIC (*Differential Interference Contrast*)

Figura 08 – O mutante $\Delta sitA$ de *A. fumigatus* é mais resistente à caspofungina em relação ao tipo selvagem e a cepa complementada. (A) E-tests para o tipo selvagem e $\Delta sitA$ de *A. fumigatus*. 10⁶ conídios foram inoculados em 50 mL de MM e cultivados por 24 horas a 37°C na presença de e-tests de caspofungina, aniduladungina, posaconazol, itraconazol e voriconazol. (B) Drop-outs com caspofungina.

Figura 09 – Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) para a cepa selvagem, o mutante $\Delta sitA$ e a cepa complementada. Conídios foram cultivados na presença ou não de CFW ou Congo Red. (A) Análises por TEM (barras, 100 nm). (B) A espessura da parede celular de 50 secções de diferentes conídios. Os resultados foram expressos como médias com desvios padrões.

4.3 - A capacidade de adesão de $\Delta sitA$ de *A. fumigatus* é reduzido

A alteração na composição da parede celular pode afetar também a adesão de conídios e micélios a superfícies ou outras células fúngicas. Os conídios de $\Delta sitA$ possuem uma alteração drástica na sua hidrofobicidade e redução na quantidade da hidrofobina RodA (Figura 10-A, B). Assim, analisamos a capacidade do fungo em formar biofilmes em superfícies sólidas. A formação de biofilme foi analisada por: (i) Cristal Violeta (CV), o qual o mutante apresentou uma redução de 40% e 60% em meio Mínimo contendo 0,1% e 1% de glicose respectivamente (Figura 10-C) e; (ii) medimos também o acúmulo da biomassa através do peso seco das cepas cultivadas em meio RPMI durante 96 horas, neste experimento $\Delta sitA$ teve uma redução de 20% em sua biomassa com relação ao tipo selvagem e a cepa complementada (Figura 10-D). A microscopia eletrônica de varredura (SEM, Scanning Electron Microscopy) do micélio revelou que $\Delta sitA$ tem influência na superfície celular e na matriz extra-celular durante a formação de biofilme (Figura 11). A superfície do $\Delta sitA$ é lisa, em contraste com o tipo selvagem (Figura 11). Dessa forma, esses resultados demonstram a influência do $\Delta sitA$ na composição da superfície celular do conídios e das hifas, alterando a hidrofobicidade, adesão e a formação de biofilme.

Nós também investigamos a quantidade total de proteínas na superfície celular do $\Delta sitA$ comparada com o tipo selvagem, extraíndo as proteínas da superfície celular com NaCl 0,5M (Beauvais *et al.*, 2013). As proteínas extraídas da superfície celular de ambas as cepas foram analisadas por LC-MS/MS (Tabela 02). No total, 213 proteínas na superfície dos conídios foram identificadas (Tabela 02), porém apenas 52 dessas proteínas são diferentemente expressas entre as cepas analisadas (Tabela 02). Vinte e duas dessas proteínas diferentemente expressas são ou ausentes no mutante $\Delta sitA$ (11 proteínas) e presentes no tipo selvagem ou presentes no $\Delta sitA$ (11 proteínas) e ausentes no tipo selvagem (Tabela 02). Cinquenta por cento dessas proteínas são enzimas e a maioria delas estão envolvidas na remodelagem da parede celular, como a NagA (N-acetilhexosaminosidase) e Gel1 (1,3-beta glicosiltransferase) (Tabela 02). Quarenta por cento são

proteínas hipotéticas e 10% são proteínas do tipo adesinas. Essas proteínas são compostas por 7 enzimas, 2 pertencendo a maquinaria de translocação e 2 alérgenos (Aspf13 e Aspf34; Tabela 02). Dezesesseis proteínas são mais expressas no tipo selvagem: elas são 8 enzimas, 1 relacionada a maquinaria de translocação, 1 toxina, 5 proteínas hipotéticas, e 1 alérgeno, Aspf1 (Tabela 02). Esses resultados implicam a importância de $\Delta sitA$ para a correta distribuição de proteínas de superfície celular.

Figura 10 – A cepa mutante de *A. fumigatus* $\Delta sitA$ possui capacidade de adesão reduzida. A capacidade de adesão, formação de biofilme e hidrofobicidade é influenciada por *sitA*. (A) Conídios do tipo selvagem, $\Delta sitA$ e a cepa complementada em interface água-óleo (tributirina) 1:1. (B) Gel de poliácridamida mostrando a concentração de hidrofobinas de conídios da cepa selvagem, $\Delta sitA$ e $\Delta sitA::sitA^+$. RodAp corresponde à RodA nativa e RodAp* que pode ser a RodA parcialmente degradada ou processada. (C) A adesão, medida pelo ensaio de Cristal Violeta, é reduzida no mutante $\Delta sitA$ tanto em glicose 0,1% quanto 1% (*, $P = 0,01$ comparado com a cepa selvagem). (D) A Formação de Biofilme também é reduzido no mutante $\Delta sitA$. As barras de erro indicam o desvio padrão.

Figura 11 – Microscopia eletrônica de varredura (SEM) para o tipo selvagem e o mutante $\Delta sitA$. Aumentos x 1.000. As setas indicam a matriz extracelular.

<i>A.fumigatus</i> Protein	Function	Mass (kDa)	Length	Ratio ^a $\Delta sitA$ /WT ^b	% coverage mutant	% coverage Wild type
Conidia surface proteins absent in the $\Delta sitA$ mutant strain						
Afu1g17410	Beta-glucosidase	84	782	Only in WT	NI	2
Afu3g14030	Alkaline phosphatase, phoB-regulated	72	653	Only in WT	NI	17
Afu2g00690	Glican 1,4-alpha-glucosidase activity, role in polysaccharide metabolic process and Golgi apparatus, endoplasmic reticulum, prospore membrane localization	67	631	Only in WT	NI	6
Afu2g17530	Laccase involved in conidial pigment biosynthesis	65	587	Only in WT	NI	15
Afu7g05140	Putative class III family 18 chitinase	46	448	Only in WT	NI	16
Afu3g00270	Cell wall glicanase; predicted glycoposphatidylinositol (GPI)-anchor; secreted protein	44	450	Only in WT	NI	5
Afu2g05240	Ortholog(s) have extracellular region localization	42	400	Only in WT	NI	11
Afu2g00680	ORF, uncharacterized; Has domain(s) with predicted catalytic activity	40	375	Only in WT	NI	8
Afu7g05650	ORF, uncharacterized; Ortholog of <i>A.fumigatus</i> A1163 : AFUB_091230	23	225	Only in WT	NI	8
Afu5g01420	ORF, uncharacterized; Ortholog(s) have extracellular region localization	22	205	Only in WT	NI	30
Afu2g13600	Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) kinase activity, role in carbon utilization, peptidyl-serine phosphorylation and mitochondrion localization	20	187	Only in WT	NI	8
Conidia surface proteins absent in the wild-type strain						
Afu8g05020	NagA, secreted N-acetylhexosaminidase; highly expressed in biofilm	67	600	Only in $\square sitA$	8	NI
Afu2g02100	dihydrolipoamide dehydrogenase; reacts with rabbit immunosera exposed to <i>A. fumigatus</i> conidia	54	513	Only in $\square sitA$	27	NI
Afu2g01170	Gel1, 1,3-beta-glicanosyltransferase with a role in elongation of 1,3-beta-glican chains; glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored protein; constitutively expressed during hyphal growth; hypoxia induced protein	48	452	Only in $\square sitA$	6	NI
Afu7g05740	NAD-dependent malate dehydrogenase; protein abundant in conidia; immunoreactive; reacts with rabbit immunosera exposed to <i>A. fumigatus</i> conidia; induced by L-tyrosine; transcript downregulated in response to hypoxia	35	340	Only in $\square sitA$	17	NI
Afu6g10930	ORF, uncharacterized; Protein of unknown function	30	290	Only in $\square sitA$	8	NI
Afu6g14370	AraC-like ligand binding domain protein	23	213	Only in $\square sitA$	9	NI
Afu3g00880	Putative adhesin protein; MedA regulated transcript; transcript repressed by exposure to human airway epithelial cells	21	219	Only in $\square sitA$	13	NI
Afu3g09390	Laminin-binding protein with extracellular thaumatin domain; predicted adhesin-like protein; expression induced in biofilm; repressed by exposure to artemisinin	18	177	Only in $\square sitA$	14	NI
Afu1g01980	ORF, uncharacterized; Ortholog(s) have role in hyphal growth, response to cold, response to heat, response to oxidative stress, response to salt stress, sporocarp development involved in sexual reproduction	18	179	Only in $\square sitA$	6	NI

Afu5g01990	ORF, uncharacterized; BYS1 domain protein	16	156	Only in $\Delta sitA$	12	NI
Afu4g09320	DppIV, extracellular dipeptidyl-peptidase; predicted signal sequence for secretion; induced by growth on BSA as a sole nitrogen source; expression dependent on PrtT	85	765	30.5	18	NI
Conidia surface proteins more expressed in the $\Delta sitA$ mutant strain						
Afu5g10490	Amidase; secreted protein; fibrinogen-binding	65	611	18.8	5	3
Afu5g03540	Ortholog(s) have flavin-linked sulfhydryl oxidase activity, role in oxidation-reduction process and extracellular region localization	42	386	11.7	12	14
Afu4g13750	Mep20, penicillolysin/deuterolysin metalloprotease; predicted signal sequence for secretion	39	370	9.6	5	5
Afu1g06390	Tef1, translation elongation factor EF-1 alpha subunit; protein abundant in conidia; protein induced by heat shock	53	494	4.9	14	3
Afu3g08290	Aspartyl aminopeptidase; immunoreactive; secreted protein; induced by growth on BSA as a sole nitrogen source	54	504	3.9	6	5
Afu8g00710	ORF, uncharacterized; Has domain(s) with predicted role in defense response, negative regulation of growth	10	101	3.2	34	48
Afu2g09030	DppV, secreted dipeptidyl-peptidase; induced by growth on BSA as a sole nitrogen source; immunoreactive protein	79	721	2.9	24	12
Afu7g07010	Adh1, alcohol dehydrogenase; predicted gene pair with AFUA_5G06240 (alcC); induced by L-tyrosine; transcript up-regulated in conidia exposed to neutrophils	37	353	2.0	5	4
Afu5g09240	Sod1, Cu/Zn superoxide dismutase; recognized by sera from aspergillosis patients; highly expressed in conidia; transcript induced by copper starvation, menadione, gliotoxin and growth at high temperature; protein induced by hydrogen peroxide	15	154	2.0	28	30
Afu3g02270	Cat1, mycelial catalase; induced in hyphae exposed to neutrophils; protein induced in amphotericin B and H ₂ O ₂ ; stuA-dependent up-regulation in developmentally competent hyphae; hypoxia repressed; SrbA-regulated; repressed by gliotoxin exposure	79	728	2.0	22	21
Afu5g01120	ORF, uncharacterized; Ortholog of A. nidulans FGSC A4 : AN8927, A. oryzae RIB40 : AO090003001298, Aspergillus flavus NRRL 3357 : AFL2T_01773 and Neosartorya fischeri NRRL 181 : NFIA_041050	36	354	1.8	4	9
Afu2g12630	Aspf13, allergen Asp f 13; putative alkaline serine protease; higher expression in biofilm vs planktonic cells; transcript induced by growth on hydrogen peroxide	15	152	1.8	43	44
Afu3g03060	Aspf34, allergen Asp f 34; putative phiA family cell wall protein; induced calcium; repressed by exposure to artemisinin	19	185	1.8	9	9
Afu1g12070	ORF, uncharacterized; Ortholog(s) have glycine dehydrogenase (decarboxylating) activity, role in glycine catabolic process, one-carbon metabolic process, protein lipoylation and mitochondrion localization	18	175	1.6	9	9

Afu3g15090	Adenosine deaminase family protein; secreted protein; predicted secretory signal sequence; ortholog of <i>A. nidulans</i> AN2494	66	587	1.3	16	15
Conidia surface proteins more expressed in the wild-type strain						
Afu1g15730	40S ribosomal protein S22	14	130	0.9	11	11
Afu1g14450	ExgO, exo-beta-1,3-glicanase; secreted protein; predicted secretory signal sequence; ortholog of <i>A. nidulans</i> AN0779	10	947	0.8	10	13
Afu3g07030	Gta1, glutaminase A; secreted protein; predicted secretory signal sequence	76	691	0.8	16	20
Afu3g00590	AspHS, Asp-hemolysin; hemolytic toxin; highly secreted; enriched in conidia; expression increases in vivo; binds lysophosphatidylcholine	15	139	0.7	20	25
Afu1g05770	Exg12, secreted beta-glucosidase; predicted secretory signal sequence; fibrinogen-binding	94	873	0.6	10	20
Afu1g10970	Aalpha-1,2-mannosidase family protein	92	839	0.6	2	19
Afu6g14470	Ortholog of <i>A. nidulans</i> FGSC A4 : AN5353, <i>A. niger</i> CBS 513.88 : An02g05680, <i>A. oryzae</i> RIB40 : AO090103000108, <i>Aspergillus wentii</i> : Aspwe1_0131073 and <i>Aspergillus sydowii</i> : Aspsy1_0050268	26	234	0.5	10	18
Afu2g00967	Ortholog of <i>A. nidulans</i> FGSC A4 : AN7635/binA, AN11904, <i>A. fumigatus</i> Af293 : Afu3g02216, Afu7g00610 and <i>A. niger</i> CBS 513.88 : An10g00560	21	196	0.5	7	8
Afu6g03210	ConJ, protein of unknown function; conidia-enriched protein; ortholog of <i>Neurospora crassa</i>	87	83	0.4	35	26
Afu8g00630	uncharacterized; Ortholog(s) have extracellular region localization	37	347	0.3	27	41
Afu4g09280	ORF, uncharacterized; Ortholog of <i>A. niger</i> CBS 513.88 : An02g00330, <i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181 : NFIA_106720, <i>Aspergillus niger</i> ATCC 1015 : 36613-mRNA and <i>Aspergillus carbonarius</i> ITEM 5010 : Acar5010_203109	18	167	0.2	28	54
Afu4g11800	Alp1, secreted alkaline serine protease; cleaves human complement components C3, C4, and C5; predicted signal sequence for secretion; fibrinogen-binding	42	403	0.2	12	22
Afu6g12070	FmqD, Flavoprotein amide oxidase (FAD); has FAD activity; member of the fumiquinazoline biosynthetic cluster; may contain an N-terminal signal sequence and multiple N-glycosylation sites; transcript downregulated in response to voriconazole	54	497	0.2	5	14
Afu1g14560	MsdS, 1,2-alpha-mannosidase; secreted protein; fibrinogen-binding	53	493	0.2	2	7
Afu7g06140	Exg13, secreted 1,4-beta-D-glican glicanhydrolase	78	739	0.1	2	7
Afu5g02330	Aspf1, Allergen Asp f 1; ribonuclease mitogillin family of cytotoxins; similar to restrictocin; inhibits protein synthesis in mammalian cells; 18kD IgE-binding protein; expression increases in vivo; biofilm-induced vs planktonic cells	19	176	0.05	7	17

Tabela 02 – Proteínas de superfície identificadas no tipo selvagem e no mutante Δ sitA. Os valores estão relacionados a contagens espectrais de três replicatas para cada cepa.

4.4 - O mutante $\Delta sitA$ é mais sensível a inibidores de proteína quinase C

A proteína fosfatase Sit4p de *S. cerevisiae* é necessária para a correta regulação da atividade de PKC1 tanto basal quanto induzida (de la Torre-Ruiz *et al.*, 2002). Calfofostina C, queleritrina e cercosporamida têm sido utilizados em mamíferos e fungos como inibidores de proteína quinase C (Herbert *et al.*, 1990; Arpaia *et al.*, 1999; Jarvis e Grant, 1999; da Rocha *et al.*, 2002; Sussman *et al.*, 2004; Juvvadi *et al.*, 2007). Nós hipotetizamos que se $\Delta sitA$ está modulando a atividade da proteína quinase C, a susceptibilidade à esses inibidores deve ser alterada. Como esperado, o crescimento do mutante $\Delta sitA$ foi drasticamente inibido por queleritrina, calfofostina e cercosporamida (figura 12-A, B e C). Este resultado foi confirmado posteriormente pela redução na fosforilação de MpkA no mutante $\Delta sitA$ em relação ao tipo selvagem, quando as cepas foram expostas à calfofostina C (figura 12-D). Esses resultados fortemente sugerem que a cepa $\Delta sitA$ possui uma redução na atividade da proteína quinase C e que provavelmente modula a expressão da proteína quinase C.

Figura 12 – A cepa $\Delta sitA$ possui atividade reduzida da proteína quinase C. (A a C) A viabilidade dos conídios do tipo selvagem, $\Delta sitA$ e a cepa complementada na presença ou não de calfoestina C, cercosporamida e queleritrina são mostrados através do indicador de viabilidade alamarBlue. Os conídios são menos viáveis quando o indicador apresenta intensa coloração azul, indicando uma redução na atividade mitocondrial. Rosa e vermelho indicam viabilidade. (D) *Western blot* para a fosforilação de MpkA. O tipo selvagem e o mutante $\Delta sitA$ foram cultivados por 16 horas a 37°C, o micélio foi então transferido para um meio fresco contendo calfoestina C durante 30, 60 e 120 minutos. Para a detecção da fosforilação de MpkA, o anticorpo anti-fosfo-p44/42 que reconhece a MpkA fosforilada foi utilizado. Para controle de carregamento das amostras, o anticorpo anti- γ -tubulina foi utilizado. Como controle adicional da quantidade de proteína utilizada, o gel corado com CBB também foi utilizado. A intensidade dos sinais foi quantificada utilizando o software Image J e a razão da intensidade de MpkA-P pela intensidade do sinal de γ -tubulina foi calculada.

4.5 - SitA é importante para a virulência de *A. fumigatus* em camundongos

A importância de SitA para a patogenicidade do fungo *A. fumigatus* foi analisada no modelo de aspergilose pulmonar invasiva em camundongos neutropênicos (Figura 13-A). A infecção com a cepa selvagem resultou em 100 % de mortalidade 12 dias após a infecção, enquanto a infecção com o mutante $\Delta sitA$ resultou numa significativa redução na taxa de mortalidade, aproximadamente 15 % em 15 dias após a infecção (Figura 13-A, $p < 0,0003$ e $p < 0,0007$ comparação entre o tipo selvagem e o mutante, nos testes Log-rank, Mantel-Cox e Gehan-Breslow-Wilcoxon respectivamente). A virulência foi restaurada em uma cepa independente resultante de uma simples reintegração ectópica do locus *sitA* da cepa selvagem e não há diferença estatística entre o tipo selvagem e a cepa complementada (Figura 13-C $p > 0,3$ e $p > 0,4$ entre o tipo selvagem e a cepa complementada, nos testes Log-rank, Mantel-Cox e Gehan-Breslow-Wilcoxon respectivamente), relacionando diretamente a atenuação do $\Delta sitA$ à função de SitA.

Exames histopatológicos revelaram que 72 horas após a infecção os pulmões dos camundongos infectados com a cepa selvagem apresentaram vários focos de infecção de hifas invasivas penetrando o epitélio pulmonar, além de várias ramificações de hifas emergindo dos alvéolos (Figura 13-B). Em contraste com a cepa selvagem, a infecção com $\Delta sitA$ revelou inflamações nos bronquíolos, com poucos conídios germinados ou não germinados (Figura 13-B). A carga fúngica nos pulmões foi medida por qPCR, comprovando que o $\Delta sitA$ não cresceu tão bem quanto as cepas selvagem e complementada (Figura 13-B). Dessa forma, esses resultados sugerem que SitA tem um papel importante na virulência de *A. fumigatus*.

O problema na integridade da parede celular de $\Delta sitA$ com a drástica redução na virulência podem contribuir para a alteração na resposta imunológica. Macrófagos alveolares tem um papel essencial na remoção de conídios de *A. fumigatus* dos pulmões (Philippe *et al.*, 2003).

Aproximadamente 15% dos conídios das cepas selvagem e de *A. fumigatus* foram fagocitados após 80 minutos de incubação com macrófagos alveolares (Figura 14), porém 40% dos conídios de $\Delta sitA$ foram fagocitados após o mesmo tempo (Figura 14). Após 4 horas de incubação, não houve diferença na fagocitose de conídios *in vitro* entre as cepas selvagem, $\Delta sitA$ e a cepa complementada (dados não mostrados). Esses resultados sugerem que $\Delta sitA$ está mais suscetível à fagocitose, porém não existe nenhuma diferença na ação fagocítica dos macrófagos. Subsequentemente, os níveis do fator de necrose de Tumor alfa (TNF- α , Tumour necrosis factor alpha) liberados por macrófagos derivados da medula óssea (MDMO) depois de co-incubação com *A. fumigatus* foi investigada. TNF é um importante mediador da inflamação liberado por macrófagos quando expostos à *A. fumigatus* (Taramelli *et al.*, 1996; Mehrad *et al.*, 1999). MDMOs co-cultivados com $\Delta sitA$ mostraram níveis mais altos de produção de TNF quando comparados com a cepa selvagem e a complementada (aproximadamente 2,4 vezes, Figura 14). Esses resultados sugerem que os efeitos causados pelo SitA na integridade da parede celular são importantes para o reconhecimento feito pelo macrófago e a subsequente indução da resposta inflamatória.

Figura 13 – *A. fumigatus sitA* contribui para a virulência em camundongos neutropênicos. (A) Análise comparativa do tipo selvagem com as cepas mutantes em modelo de aspergilose pulmonar em camundongos neutropênicos. Grupos de 10 camundongos por cepa foram infectados via intranasal com 20 μ l de suspensão de 10^5 conídios. (B) Análises histológicas do pulmão dos camundongos foram realizadas 72 horas após a infecção. (C) Análise da carga fúngica nos pulmões determinados por qPCR 72 horas após a infecção. Os resultados foram expressos baseados no gene do RNA ribossomal 18S de *A. fumigatus* dividido pelo resultado da região intrônica do gene GAPDH de camundongo.

Figura 14 – Reconhecimento de macrófagos e secreção de TNF- α por MDMOs. (A) Porcentagem de conídios fagocitados por MAs. Houve um acréscimo no índice de fagocitose dos conídios de $\Delta sitA$ por MAs. Os resultados são mostrados como médias com desvios padrões. *, $P < 0,01$ em comparação com o tipo selvagem e o mutante complementado. (B) As hifas de $\Delta sitA$ ativam significativamente a liberação de TNF- α por MDMOs em comparação com o tipo selvagem e a cepa complementada. MDMOs de camundongos C57BL/6 foram infectados com hifas de *A. fumigatus* durante 18 horas e o sobrenadante das células coletados para determinar os níveis de TNF- α por ELISA. Os dados são mostrados como médias com desvios padrões. *, $P \leq 0,005$ em comparação com o tipo selvagem e a cepa complementada. NI, Não Infectado.

A. fumigatus é um fungo cosmopolita capaz de viver e se adaptar em diversos ambientes. Porém essa habilidade requer uma grande versatilidade metabólica e a capacidade de se adaptar à esses diversos nichos ecológicos, através da regulação precisa da rede de cascatas de sinalização e seus efeitos “downstream”. *A. fumigatus* pode eficientemente utilizar o corpo humano como nicho, causando diversas formas de doenças severas, dependendo das condições do sistema imune do hospedeiro. Como *A. fumigatus* é capaz de escapar do sistema imune do hospedeiro e estabelecer a infecção depende das coordenadas da via de transdução de sinais. Um melhor entendimento desses mecanismos de adaptação pode ajudar em novas estratégias para controlar a doença. Recentemente, para compreendermos um pouco mais sobre essas vias de sinalização, nós metodicamente investigamos todos os 32 genes que codificam proteínas fosfatases de *A. fumigatus* e construímos uma coleção de 24 mutantes nulos para estes genes (Winkelströter et al, 2015). Neste trabalho, nós focamos em uma única proteína fosfatase, SitA, e caracterizamos detalhadamente o seu papel na sinalização celular e virulência.

O gene *sitA* de *A. fumigatus* codifica uma proteína fosfatase do tipo Ser/Thr, membro da família fosfatase PPP, e relacionada a família PP2A (Winkelströter et al, 2015). Apesar do alto nível de identidade de SitA de *A. fumigatus* com a Sit4p de *S. cerevisiae*, nós não fomos capazes de complementar o mutante Δ SIT4 de *S. cerevisiae*. Isso pode ter acontecido provavelmente pelo fato de a subunidade regulatória de Sit4p de *S. cerevisiae*, Tap42 (Jiang Broach, 1999) não ter sido capaz de interagir e modular a atividade de SitA. De fato, a homologia da suposta Tap42 de *A. fumigatus*, Afu5g11780, é baixa com a Tap42p (31,1% de identidade, 54,5% de similaridade, evaluate 3e-37).

O defeito de crescimento do Δ SIT4 em *S. cerevisiae* foi apenas parcialmente restaurado com a expressão de FgSIT4 de *Fusarium graminearum* (Yu et al, 2014). Em *S. cerevisiae*, Sit4p desempenha um papel crítico no crescimento celular e na proliferação (Di Como and Jiang, 2006) e está envolvido em inúmeros processos biológicos, como a via de resposta à nutrientes mediada por TOR (Di Como and Arndt, 1996; Beck and Hall, 1999; Jiang and Broach,

1999), a regulação de íons monovalentes, homeostase e pH intracelular (Masuda et al, 2000), e a via de regulação do ciclo celular (Angeles de la Torre-Ruiz et al, 2002).

Nós observamos que o mutante de *A. fumigatus* Δ sitA não possui problemas de crescimento e desenvolvimento. A Sit4p de *S. cerevisiae* é fosforilada por TOR, negativamente regulando Sit4p através da associação de Sit4p com Tap42p. Os principais sinais para a ativação de Sit4p são o tratamento com rapamicina ou privação de nitrogênio (Jacinto, 2007). Quando a Sit4p é ativada os efetores “downstream” de TOR são defosforilados de forma Sit4p dependente (Jacinto 2007). A cepa Δ sitA de *A. fumigatus* não é mais sensível à rapamicina que a cepa selvagem e não observamos problema nutricional nessa cepa. Homólogos de Sit4 têm sido caracterizados em dois outros fungos, *Candida albicans* e *F. graminearum* (Lee et al, 2004; Yu et al, 2014). Em *C. albicans*, a inativação do homólogo de SIT4 resultou em redução na taxa de crescimento e na virulência em modelo de infecção em camundongos (Lee et al, 2004). Esses autores observaram que a Sit4p de *C. albicans* está envolvida no crescimento das hifas via regulação da biogênese da parede celular, osmossensibilidade e translocação de proteína. Recentemente, Sit4p foi identificada como potencial reguladora de resposta à hipóxia em *C. albicans* (Sellam et al, 2014).

Antes desse trabalho, apenas uma única proteína homóloga a Sit4 foi descrita em fungo filamentoso, FgSIT4 em *Fusarium graminearum* (Yu et al, 2014). No patógeno de planta *F. graminearum*, FgSit4 tem papel importante em vários processos celulares, incluindo crescimento micelial, virulência e desenvolvimento sexual (Yu et al, 2014). FgSit4 afeta a via de integridade da parede celular regulando positivamente a fosforilação de FgMgv1, a MAP quinase na via de integridade da parede celular.

A parede celular de *A. fumigatus* é composta principalmente por polissacarídeos, tais como β -(1,3)-glicanos e quitina, β -(1,3)-(1,4)-glicanos e galactomananas, que são covalentemente ligadas e α -(1,3)-glicanos, que possui propriedade adesiva e estabiliza a parede celular (Beauvais et al, 2013). A parede celular dos conídios é coberta por uma camada externa contendo

“rodlets” e melanina, que possuem propriedades hidrofóbicas e são inertes imunologicamente (Aimanianda et al, 2009; Aimanianda and Latgé, 2010; Carrion Sde J et al, 2013). A camada externa da parede celular dos conídios possui galactosaminogalactana, enquanto o micélio cresce embebido em uma matriz extracelular rica em polissacarídios, hidrofobinas e melanina (Beauvais et al, 2013). Nós observamos que o Δ sitA de *A. fumigatus* apresenta redução na quantidade de hidrofobinas, é mais sensível à agentes que causam danos na parede celular e possui um aumento na fosforilação de MpkA. Além disso, os tubos germinativos de Δ sitA de *A. fumigatus* apresentam aumento na quantidade de β -(1,3)-glicanos e quitina e a hifa apresenta redução na adesão, formação de biofilme e produção de matriz extracelular. A composição de proteínas da superfície do conídio de Δ sitA é distinta do tipo selvagem. Entretanto, análises quantitativas dos componentes da parede celular de Δ sitA ficarão para uma futura investigação. Todos esses dados sugerem fortemente defeitos na via de integridade da parede celular (CWI). A via PKC1-MAPK (protein kinase C-mediated mitogen-activated protein kinase) é essencial para a ativação da CWI (Levin, 2005; Rispail et al, 2009). A Δ SIT4 de *S. cerevisiae* apresenta atraso na transição de G1 para S no ciclo celular, que é mediada pela regulação positiva da ativade de Pkc1 (Angeles de la Torre-Ruiz et al, 2002). Em *S. cerevisiae*, Sit4 opera negativamente nos sensores da membrana plasmática Mid2, Wsc1 e Wsc2 e positivamente com a Pkc1, afetando as funções de Pkc1, tais como a atividade de Mpk1 e CWI, organização do citoesqueleto de actina e transcrição de genes ribossomais (Angeles de la Torre-Ruiz et al, 2002). Ainda falta ser investigado se a SitA de *A. fumigatus* está modulando diretamente ou indiretamente PkcA ou outros alvos que estejam envolvidos na via de CWI.

Nós mostramos que Δ sitA possui virulência atenuada e aumento no reconhecimento por macrófagos. No modelo de aspergilose pulmonar invasiva em camundongos imussuprimidos, Δ sitA é avirulento quando comparado com o tipo selvagem e a cepa complementada. Os níveis de TNF, um dos mediadores para a inflamação secretados pelos macrófagos em resposta à hifas, foi aumentada no Δ sitA em relação ao tipo selvagem e a cepa complementada. O

TNF tem um papel importante na indução da resposta imune inata à *A. fumigatus* (Taramelli et al, 1996).

O aumento na quantidade de β -(1,3)-glicanos, quitina e outras modificações na parede celular de Δ sitA pode ter contribuído para o reconhecimento do fungo pelo receptor dectina, favorecendo o aumento na fagocitose pelo macrófagos alveolares e consequentemente aumentando a produção de TNF, já que β -glicanos são potentes estimuladores na produção de TNF em resposta ao fungo (Hohl et al, 2005; Steele et al, 2005; Huang et al, 2009; Faro-Trindade et al, 2012).

Em resumo, nós identificamos SitA como uma fosfatase importante para construção da parede celular e essencial para virulência e reconhecimento por macrófagos. Ainda falta ser investigado como SitA está afetando a organização da parede celular. Entretanto, baseado nos estudos em *S. cerevisiae*, é provável que SitA esteja modulando a atividade de PkcA. Esse melhor entendimento na função de SitA em *A. fumigatus* pode fornecer a oportunidade de entendermos melhor como *A. fumigatus* regula a integridade da parede celular e sua composição durante a virulência.

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que:

- (I) O mutante $\Delta sitA$ apresenta aumento na fosforilação de MpkA;
- (II) é mais sensível a agentes que causam dano à parede celular;
- (III) tem um aumento na produção de β -1,3 glicana e quitina;
- (IV) apresenta problemas na adesão e formação de biofilme e;
- (V) O mutante $\Delta sitA$ também é avirulento em modelo de aspergilose

pulmonar invasiva em camundongos.

Esses resultados mostram a importância da proteína fosfatase SitA de *A. fumigatus* como um possível modulador da atividade de CWI e virulência.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE M, NISHIDA I, MINEMURA M, QADOTA H, SEYAMA Y, WATANABE T, OHYA Y. Yeast β 1,3-glucan synthase activity is inhibited by phytosphingosine localized to the endoplasmic reticulum. **J Biol Chem** v. 276, p. 26923–26930, 2001.

ADAMS, DJ. Fungal cell wall chitinases and glucanases. **Microbiol**, v. 150, p. 2029–2035, 2004.

AIMANIANDA V, BAYRY J, BOZZA S, KNIEMEYER O, PERRUCCIO K, ELLURU SR, CLAVAUD C, PARIS S, BRAKHAGE AA, KAVERI SV, ROMANI L, LATGÉ JP. Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. **Nature**, v. 460, p. 1117–1121, 2009.

AIMANIANDA V, LATGÉ JP. Fungal hydrophobins form a sheath preventing immune recognition of airborne conidia. **Virulence**, v. 1, p. 185–187, 2010.

AMBRA R, MACINO G. Cloning and characterization of PKC-homologous genes in the truffle species *Tuber borchii* and *Tuber magnatum*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 189, p. 45–53, 2000.

AQUINO-PINERO E, RODRIGUEZ-DEL VALLE N. Characterization of a protein kinase C gene in *Sporothrix schenckii* and its expression during the yeast-to-mycelium transition. **Med Mycol**, v. 40, p. 185–199, 2002.

ARELLANO M, VALDIVIESO MH, CALONGE TM, COLL PM, DURAN A, PEREZ P. *Schizosaccharomyces pombe* protein kinase C homologues, pck1p and pck2p, are targets of rho1p and rho2p and differentially regulate cell integrity. **J Cell Sci**, v. 112, p. 3569–3578, 1999.

ARPAIA G, CERRI F, BAIMA S, MACINO G. Involvement of protein kinase C in the response of *Neurospora crassa* to blue light. **Mol Gen Genet**, v. 262, p. 314–322, 1999.

ARPAIA G, CERRI F, BAIMA S, MACINO G. Involvement of protein kinase C in the response of *Neurospora crassa* to blue light. **Mol Gen Genet**, v. 262, p. 314–322, 1999.

BAKER LG, SPECHT CA, DONLIN MJ, LODGE JK: Chitosan, the deacetylated form of chitin, is necessary for cell wall integrity in *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell**, v. 6, p. 855-867, 2007.

BARDWELL L. A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway. **Peptides**, v. 26, p. 339–350, 2005.

BARTNICKI-GARCIA S. Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. **Annu Rev Microbiol**, v. 22, p. 87- 108, 1968.

BEALS, C. R., N. A. CLIPSTONE, S. N. HO, AND G. R. CRABTREE. Nuclear localization of NF-ATc by a calcineurin-dependent, cyclosporin-sensitive **Intramol interact Genes Dev**, v. 11, p. 824–834, 1997.

BEAUVAIS A, BOZZA S, KNIEMEYER O, FORMOSA C, BALLOY V, HENRY C, ROBERSON RW, DAGUE E, CHIGNARD M, BRAKHAGE AA, ROMANI L, LATGÉ JP. Deletion of the alpha-(1,3)-glucan synthase genes induces a restructuring of the conidial cell wall responsible for the avirulence of *Aspergillus fumigatus*. **PLoS Pathog.**, v. 9, p. 1316-1371, 2013.

BEAUVAIS A, DRAKE R, NG K, DIAQUIN M, LATGÉ JP. Characterization of the β 1,3-glucan synthase of *Aspergillus fumigatus*. **J Gen Microbiol**, v. 139, p. 3071–3078, 1993.

BEAUVAIS A, LATGÉ JP. Membrane and cell wall targets in *Aspergillus fumigatus*. **Drug Resist**, v. 4, p. 38–49, 2001.

BECK T, HALL MN. The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. **Nature**, v. 402, p. 689–692, 1999.

BERTOUT S, BADO C, MALLIE M, GIAIMIS J, BASTIDE J-M. Spore dijasate isolated from some strains of *Aspergillus fumigatus* inhibits phagocytosis by murine alveolar macrophages **FEMS Immunoln and Med Microbiol**, v. 33, p. 101-106, 2002.

BODEY GP, VARTIVARIAN S. Aspergillosis. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 8, p. 413-437, 1989.

BRAKHAGE AA, JAHN B, SCHMIDTEDS A. **Karg Med and Sci Pub**, p. 5-20, 1999.

BRAKHAGE AA, LANGFELDER K. **Annu Rev Microbiol**, v. 56, p. 433-455, 2002.

BRAKHAGE AA, Systemic Fungal Infections Caused by *Aspergillus* Species: Epidemiology, Infection Process and Virulence Determinants. **Current Drug Targets**, v. 6, p. 875-886, 2005.

BREWSTER JL, DE VALOIR T, DWYER ND, WINTER E, GUSTIN MC. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. **Science**, v. 259, p. 1760–1763, 1993.

BROWN GD, GORDON S. Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. **Nature**, v. 413, p. 36–37, 2001.

BRUNEAU JM, MAGNIN T, TAGAT E, LEGRAND R, BERNARD M, DIAQUIN M, FUDALI C, LATGÉ, JP. Proteome analysis of *Aspergillus fumigatus* identifies glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins associated to the cell wall biosynthesis. **Electrophoresis**. v. 22, p. 2812–2823, 2001.

BULAWA CE, MILLER DW, HENRY LK, BECKER JM. Attenuated virulence of chitin-deficient mutants of *Candida albicans*. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 92, p. 10570-10574, 1995.

BUSSINK HJ, OSMANI SA. A mitogen-activated protein kinase (MPKA) is involved in polarized growth in the filamentous fungus, *Aspergillus nidulans*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 173, p. 117–125, 1999.

CALONGE TM, NAKANO K, ARELLANO M, ARAI R, KATAYAMA S, TODA T, MABUCHI I, PEREZ P. Schizosaccharomyces pombe rho2p GTPase regulates cell wall alpha-glucan biosynthesis through the protein kinase pck2p. **Mol Biol Cell** v. 11, p. 4393–4401, 2000.

CARRION SDJ, LEAL SM, JR, GHANNOUM MA, AIMANIANDA V, LATGÉ JP, PEARLMAN E. 2013. The RodA hydrophobin on *Aspergillus fumigatus* spores masks dectin-1- and dectin-2-dependent responses and enhances fungal survival in vivo. **J Immunol**, v. 191, p. 2581–2588.

CHAZALET V, DEBEAUPUIS JP, SARFATI J, LORTHOLARY J, RIBAUD P, SHAH P, CORNET M, VU THIEN H, GLUCKMAN E, BRUCKER G, LATGÉ JP. Molecular Typing of Environmental and Patient Isolates of *Aspergillus fumigatus* from Various Hospital Settings. **J Clin Microbiol**, v. 36, p. 1494-1500, 1998.

CLOTET J, GARÍ E, ALDEA M, ARIÑO. The yeast ser/thr phosphatases sit4 and ppz1 play opposite roles in regulation of the cell cycle. **J Mol Cell Biol**, v. 19, p. 2408–2415, 1999.

COLOT HV., PARK, G., TURNER, G.E., RINGELBERG, C., CREW, C.M., LITVINKOVA, L., WEISS, R.L., BORKOVICH, K.A., DUNLAP, J.C. A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. **PNAS**, v. 103, p. 10352-10357, 2006.

D'ENFERT C, WEIDNER G, MOL PC, BRAKHAGE AA. in *Aspergillus fumigatus*: Biology, clinical aspects and molecular approaches to pathogenicity. **Contrib to Microbiol**, v. 2, p. 149-166, 1999.

DA ROCHA AB, MANS DR, REGNER A, SCHWARTSMANN G. Targeting protein kinase C: new therapeutic opportunities against high-grade malignant gliomas? **Oncologist.**, v. 7, p. 17–33, 2002.

DA SILVA FERREIRA ME, KRESS MRV, SAVOLDI M, GOLDMAN MH, HARTL A, HEINEKAMP T, BRAKHAGE AA, GOLDMAN GH. The *akuBKU80* Mutant Deficient for Nonhomologous End Joining Is a Powerful Tool for Analyzing Pathogenicity in *Aspergillus fumigatus*. **Eukariot. Cell**, v. 5, p. 207-211, 2006.

DAMVELD RA, VANKUYK PA, ARENTSHORST M, KLIS FM, VAN DEN HONDEL CA, RAM AF. Expression of *agsA*, one of Wve 1,3-D-glucan synthase-encoding genes in *Aspergillus niger*, is induced in response to cell wall stress. **Fungal Genet Biol**, v. 42, p. 165–177, 2005.

DE HOOG GS, GUARRO J. **Atlas of Clinical Fungi**, 2^aed, p. 136-139, 1995.

DE LA TORRE-RUIZ MA, TORRES J, ARINO J, HERRERO E. *Sit4* is required for proper modulation of the biological functions mediated by Pkc1 and the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**, v. 277, p. 33468–33476, 2002.

DE NOBEL H, RUIZ C, MARTIN H, MORRIS W, BRUL S, MOLINA M, KLIS FM. Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slt2/Mpk1 MAP kinase and in an Slt2-mediated increase in FKS2-lacZ expression, glucanase resistance and thermotolerance. **Microbiology.**, v. 146, p. 2121-2132, 2000.

DEBEAUPUIS JP, SARFATI J, CHAZALET V, LATGÉ JP. Genetic diversity among clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. **Infect Immun**, v. 65, p. 3080-3085, 1997.

DELLEY PA, HALL MN. Cell wall stress depolarizes cell growth via hyperactivation of *RHO1*. **J Cell Biol**, v. 147, p. 163–174, 1999.

DENIS V, CYERT MS. Molecular analysis reveals localization of *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C to sites of polarized growth and Pkc1p targeting to the nucleus and mitotic spindle. **Eukaryot Cell**, v. 4, p. 36–45, 2005.

DENNING, D.W. Invasive aspergillosis **Clin Infect Dis**, v. 26, p. 781-805, 1998.

DI COMO CJ, ARNDT KT. Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases. **Genes Dev**, v. 10, p. 1904–1916, 1996.

DI COMO CJ, BOSE R, ARNDT KT. Overexpression of SIS2, which contains an extremely acidic region, increases the expression of SWI4, CLN1 and CLN2 in *sit4* mutants. **Genetics**, v. 139, p. 95–107, 1995.

DI COMO CJ, CHANG H, ARNDT KT. Activation of CLN1 and CLN2 G1 cyclin gene expression by BCK2. **Mol Cell Biol**, v. 15, p. 1835–1846, 1995.

DIDIERLAURENT AJ, SIRARD JP, KRAEHENBUHL, NEUTRA MR. How the gut senses its content. **Cell Microbiol**, v. 4, p. 61–72, 2002.

DINAMARCO TM, ALMEIDA RS, DE CASTRO PA, BROWN NA, DOS REIS TF, RAMALHO LN, SAVOLDI M, GOLDMAN MH, GOLDMAN GH. Molecular characterization of the putative transcription factor SebA involved in virulence in *Aspergillus fumigatus*. **Eukaryot Cell**, v. 11, p. 518–531, 2012.

DOHLMAN, H.G. Pheromone signaling mechanisms in yeast: a prototypical sex machine. **Science**, v. 306, p. 1508–1509, 2004.

DOONAN JH, MORRIS, NR. The bimG gene of *Aspergillus nidulans*, required for completion of anaphase, encodes a homolog of mammalian phosphoprotein phosphatases. **Cell** v. 57, p. 987–996, 1989.

DOUGLAS CM. Fungal (1,3)-D-glucan synthesis. **Med Mycol**, v. 39, p. 55–66, 2001.

DOUGLAS CM. Fungal $\beta(1,3)$ -D-glucan synthesis, **Med Mycol**, v. 39, Supplement 1, p. 55-66, 2001

DRGONOVA J, DRGON T, TANAKA K., KOLLAR R, CHEN GC, FORD RA, CHAN C, TAKAI Y, CABIB E. Rho1p, a yeast protein at the interface between cell polarization and morphogenesis. **Science**, v. 272, p. 277–279, 1996.

DUCHINI A, REDFIELD DC, MCHUTCHISON JG, BRUNSON ME, POCKORS PJ. Aspergillosis in liver transplant recipients: successful treatment and improved survival using a multistep approach. **South Med J**, v. 95, p. 897-899, 2002.

DURÁN A, NOMBELA C. Fungal cell wall biogenesis: building a dynamic interface with the environment. **Microbiology**, v. 150, p. 3099–3103, 2004.

DYER PS, INGRAM DS, JOHNSTONE K. The control of sexual morphogenesis in the Ascomycotina. **Biol Rev Camb Phil Soc**, v. 67, p. 421–458, 1992.

ELLIS M. in *Aspergillus fumigatus: Biology, clinical aspects and molecular approaches to pathogenicity*. **Contrib to Microbiol**, v. 2, p. 105-129, 1999.

ELORZA MV, RICO H, SENTANDREU R. Calcofluor white alters the assembly of chitin fibrils in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* cells. **J Gen Microbiol** ., v. 129, p. 1577–1582, 1983.

ERLANDSEN SL, KRISTICH CJ, DUNNY GM, WELLS CL. High-resolution visualization of the microbial glycocalyx with low-voltage scanning electron microscopy: dependence on cationic dyes. **J Histochem Cytochem**, v. 52, p. 1427–1435, 2004.

FARO-TRINDADE I, WILLMENT JA, KERRIGAN AM, REDELINGHUYS P, HADEBE S, REID DM, SRINIVASAN N, WAINWRIGHT H, LANG DM, STEELE C, BROWN GD. Characterisation of innate fungal recognition in the lung. **PLoS One**, v. 7, p. 35- 67, 2012.

FERNANDES L, ARAÚJO MAM, AMARAL A, REIS VCB, MARTINS NF, FELIPE MS. Cell signaling pathways in *Paracoccidioides brasiliensis* – inferred from comparisons with other fungi. **Genet Mol Res** v. 4, p. 216–231, 2005.

FERNANDEZ-SARABIA MJ, SUTTON A, ZHONG T, ARNDT KT. SIT4 protein phosphatase is required for the normal accumulation of SWI4, CLN1, CLN2, and HCS26 RNAs during late G1. **Genes Dev**, v. 6, p. 2417–2428, 1992.

FISCHER G, MULLER T, OSTROWSKI R, DOTT W. Mycotoxins of *Aspergillus fumigatus* in pure culture and in native bioaerosols from compost facilities. **Chemosphere**., v. 38, p. 1745-1755, 1999.

FRANCHI L, FULCI V, MACINO G. Protein kinase C modulates light responses in *Neurospora* by regulating the blue light photoreceptor WC-1. **Mol Microbiol** v. 56, p. 334–345, 2005.

FUCHS BB, MYLONAKIS E. Our Paths Might Cross: the Role of the Fungal Cell Wall Integrity Pathway in Stress Response and Cross Talk with Other Stress Response Pathways. **Eukaryot Cell**, v. 8, p. 166-1625, 2009.

GALAGAN JE. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. **Nature**, v. 438, p. 1105–1115, 2005.

GALLEGOS LL, KUNKEL MT, NEWTON AC. Targeting protein kinase C activity reporter to discrete intracellular regions reveals spatiotemporal differences in agonist-dependent signaling. **J Biol Chem**, v. 281, p. 30947–30956, 2006.

GANEM C, DEVAUX F, TORCHET C, JACQ, S, QUEVILLON-CHERUEL G, LABESSE C, FACCA C, FAYE G. Ssu72 is a phosphatase essential for transcription termination of snoRNAs and specific mRNAs in yeast. **EMBO J**, v. 22, p. 1588–1598, 2003.

GARCIA R, BERMEJO C, GRAU C, PEREZ R, RODRIGUEZ-PENA JM, FRANCOIS J, NOMBELA C, ARROYO J: The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. **J Biol Chem**, v. 279, p. 15183–15195, 2004.

GAUTIER J, SOLOMON MJ, BOOHER RN, BAZAN JF, KIRSCHNER MW. cdc25 is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34cdc2. **Cell** v. 67, p. 197–211, 1991.

GINGRAS AC, CABALLERO M, ZARSKE M, SANCHEZ A, HAZBUN TR, FIELDS S, SONENBERG N, HAFEN E, RAUGHT B, AEBERSOLD R. A novel, evolutionarily conserved protein phosphatase complex involved in cisplatin sensitivity. **Mol Cell Proteomics** v. 4, p. 1725–1740, 2005.

GIRARDIN H, PARIS S, RAULT J, BELLON-FONTAINE MN, LATGE JP. The role of the rodlet structure on the physicochemical properties of *Aspergillus* conidia. **Lett Appl Microbiol.** v. 29, p. 364–369, 1999.

GOBERDHAN DC, PARICIO N, GOODMAN EC, MLODZIK M, WILSON C. *Drosophila* tumor suppressor PTEN controls cell size and number by antagonizing the Chico/PI3-kinase signaling pathway. **Genes Dev**, v. 13, p. 3244–3258, 1999.

GRAY JV, OGAS JP, KAMADA Y, STONE M, LEVIN DE, HERSKOWITZ I: A role for the Pkc1 MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* in bud emergence and identification of a putative upstream regulator. **EMBO J**, v. 16, p. 4924–4937, 1997,

GREENBERGER PA. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. **J Allergy Clin Immunol.**, v. 110, p.685–692, 2002.

GUEST GM, LIN X, MOMANY M. *Aspergillus nidulans* RhoA is involved in polar growth, branching, and cell wall synthesis. **Fungal Genet Biol** v. 41, p. 13–22, 2004.

GUO S, SHEN X, YAN G, MA D, BAI X, LI S, JIANG Y: A MAP kinase dependent feedback mechanism controls Rho1 GTPase and actin distribution in

HAGIWARA D, SUZUKI S, KAMEI K, GONOI T, KAWAMOTO S. The role of AtfA and HOG MAPK pathway in stress tolerance in conidia of *Aspergillus fumigatus*. **Fungal Genet and Biology.**, v. 73, p. 138–149, 2014.

HAGIWARA D, TAKAHASHI-NAKAGUCHI A, TOYOTOME T, YOSHIMI A, ABE K, KAMEI K, GONOI T, KAWAMOTO S. Nika/TcsC histidine kinase is involved in conidiation, hyphal morphology, and responses to osmotic stress and antifungal chemicals in *Aspergillus fumigatus*. **PLoS One**, v. 8, p. 80-88, 2013.

HALL MN: The TOR signalling pathway and growth control in yeast. **Biochem Soc Trans**, 24 p. 234–239, 1996.

HEINISCH JJ, LORBERG A, SCHMITZ HP, JACOBY JJ: The protein kinase C mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Microbiol**, v. 32, p. 671–680, 1999.

HELLIWELL SB, HOWALD I, BARBET N, HALL MN: TOR2 is part of two related signaling pathways coordinating cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 148, p. 99–112, 1998.

HERBERT JM, AUGEREAU JM, GLEYE J, MAFFRAND JP. 1990. Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 172, p. 993–999, 1990.

HEUNG LJ, LUBERTO C, PLOWDEN A, HANNUN YA., DEL POETA M. The sphingolipid pathway regulates Pkc1 through the formation of diacylglycerol in *Cryptococcus neoformans*. **J Biol Chem**, v. 279, p. 21144–21153, 2004.

HOGAN LH, KLEIN BS, LEVITZ SM. Virulence factors of medically important fungi. **Clin Microbiol Rev**, v. 9, p. 469-488, 1996.

HOHL TM, VAN EPPS HL, RIVERA A, MORGAN LA, CHEN PL, FELDMESSER M, PAMER EGEG. *Aspergillus fumigatus* triggers inflammatory responses by stage specific beta-glucan display. **PLoS Pathog**, v. 1, p. 30, 2005.

HOSPENTHAL DR, KWON-CHUNG KJ, BENNETT JE. Concentrations of airborne *Aspergillus* compared to the incidence of invasive aspergillosis: lack of correlation. **Med Mycol**, v. 36, p. 165-168, 1998.

HRMOVA M, TAFT C, SELITRENNIKOFF CP. β 1,3-D-glucan synthase of *Neurospora crassa*: Partial purification and characterization of solubilized enzyme activity. **Exper Mycol**, v. 13, p. 129–139, 1989.

HUANG H, OSTROFF GR, LEE CK, WANG JP, SPECHT CA, LEVITZ SM. Distinct patterns of dendritic cell cytokine release stimulated by fungal beta-glucans and Toll-like receptor agonists. **Infect Immun**, v. 77, p. 1774–1781, 2009.

HUH WK, FALVO JV, GERKE LC, CARROLL AS, HOWSON RW, WEISSMAN JS, O'SHEA EK. Global analysis of protein localization in budding yeast. **Nature**, v. 425, p. 686–691, 2003.

INOUE SB, QADOTA H, ARISAWA M, WATANABE T, OHYA Y. Prenylation of Rho1p is required for activation of yeast β 1-3-glucan synthase. **J Biol Chem**, v. 274, p. 38119–38124, 1999.

ITO JI, LYONS JM. Vaccination of corticosteroid immunosuppressed mice against invasive pulmonary aspergillosis. **J Infect Dis**, v. 186, p. 869-871, 2002.

JACINTO E, GUO B, ARNDT KT, SCHMELZLE T, HALL MN. TIP41 interacts with TAP42 and negatively regulates the TOR signaling pathway. **Mol Cell**, v. 8, p. 1017–1026, 2001.

JACINTO E. Phosphatase targets in TOR signaling. **Methods Mol Biol**, v. 365, p. 323-333, 2007.

JAHN B, LANGFELDER K, SCHNEIDER U, SCHINDEL C, BRAKHAGE AA. PKSP-dependent reduction of phagolysosome fusion and intracellular kill of *Aspergillus fumigatus* conidia by human monocyte-derived macrophages. **Cell Microbiol** v. 4, p. 793–803, 2002.

JAHN B, STUEBEN A, BHAKDI S. Colorimetric susceptibility testing for *Aspergillus fumigatus*: comparison of menadione-augmented 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide and Alamar blue tests. **J Clin Microbiol**, v. 34, p. 2039-2041, 1996.

JARVIS WD, GRANT S. Protein kinase C targeting in antineoplastic treatment strategies. **Invest New Drugs**, v. 17, p. 227–240, 1999.

JIANG Y, BROACH JR. Tor proteins and protein phosphatase 2A reciprocally regulate Tap42 in controlling cell growth in yeast. **EMBO J**, v. 18, p. 2782–2792, 1999.

JUNG US, LEVIN DE. Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signaling pathway. **Mol Microbiol**, v. 34, p. 1049–1057, 1994.

JUVVADI PR, MARUYAMA J, KITAMOTO K. Phosphorylation of the *Aspergillus oryzae* Woronin body protein, AoHex1, by protein kinase C: evidence for its role in the multimerization and proper localization of the Woronin body protein. **Biochem J**, v. 4005, p.533–540, 2007.

KAEBERLEIN M, KAPAH P. Aging is RSKy business. **Science**, v. 326, p. 55-56, 2009.

KAEBERLEIN M, POWERS RW 3RD, STEFFEN KK, WESTMAN EA, HU D, DANG N, KERR EO, KIRKLAND KT, FIELDS S, KENNEDY BK. Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients. **Science**, v. 310, p. 1193–1196, 2005.

KAMADA Y, JUNG US, PIOTROWSKI J, LEVIN DE. The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response. **Genes Dev**, v. 9, p. 1559-1571, 1995.

KAMADA Y, QADOTA H, PYTHON CP, ANRAKU Y, OHYA Y, LEVIN DE, Activation of yeast protein kinase C by Rho1 GTPase. **J Biol Chem**, v. 271, p. 9193–9196, 1996.

KATAYAMA, S., HIRATA, D., ARELLANO, M., PEREZ, P., AND TODA, T., Fission yeast alpha-glucan synthase Mok1 requires the actin cytoskeleton to localize the sites of growth and plays an essential role in cell morphogenesis downstream of protein kinase C function. **J Cell Biol** v. 144, p. 1173–1186, 1999.

KLIS FM, BOORSMA A, DE GROOT PW. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 23, p. 185-202, 2006.

KOBOR MS, ARCHAMBAULT J, LESTER W, HOLSTEGE FC, GILEADI O, JANSMA DB, JENNINGS EG, KOUYOUMDJIAN F, DAVIDSON AR, YOUNG RA, GREENBLATT J. An unusual eukaryotic protein phosphatase required for transcription by RNA polymerase II and CTD dephosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell**, v. 4, p. 55–62. 1999.

KURTZ MB, HEATH IB, MARRINAN J, DREIKORN S, ONISHI J, DOUGLAS CM. Morphological effects of lipopeptides against *Aspergillus fumigatus* correlate with activities against β 1,3-Dglucan synthase. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 38, p. 1480-1489, 1994.

KWON-CHUNG KJ, SUGUI JA. *Aspergillus fumigatus*—what makes the species a ubiquitous human fungal pathogen? **PLoS Pathog**, v.9, p.37-43, 2013.

LAGORCE A, HAUSER NC, LABOURDETTE D, RODRIGUEZ C, MARTIN-YKEN H, ARROYO J, HOHEISEL JD, FRANCOIS J: Genome-wide analysis of the response to cell wall mutations in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**, v. 278, p. 20345–20357, 2003.

LATGÉ JP, CALDERONE R. Host-microbe interactions: fungi invasive human opportunistic infections. **Curr Opin Microbiol**, v. 5, p. 355-358, 2002.

LATGÉ JP. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. **Clin Microbiol Rev**, v. 12, p. 310-350, 1999.

LATGE JP. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. **Mol Microbiol**, v. 66, p. 279-290, 2007.

LATGÉ, JP, MOUYN A I, TEKAIA F, BEAUVAIS A, DEBEAUPUIS JP, NIERMAN W. Specific molecular features in the organization and biosynthesis of the cell wall of *Aspergillus fumigatus*. **Med Mycol**, v. 43, p. 15–22, 2005.

LAVOIE H, WHITEWAY M. Increased respiration in the sch9Delta mutant is required for increasing chronological life span but not replicative life span. **Eukaryot Cell**, v. 7, p. 1127–1135, 2008.

LEE CM, NANTEL A, JIANG L, WHITEWAY M, SHEN SH. The serine/ threonine protein phosphatase SIT4 modulates yeast-to-hypha morphogenesis and virulence in *Candida albicans*. **Mol Microbiol**, v. 51, p. 691-709, 2004.

LEE KS, IRIE K, GOTOH Y, WATANABE Y, ARAKI H, NISHIDA E, MATSUMOTO K, LEVIN DE. A yeast mitogen-activated protein kinase homolog (Mpk1p) mediates signalling by protein kinase C. **Mol Cell Biol**, v. 13, p. 3067–3075, 1993.

LENARDON MD, MUNRO CA, NEIL AR. Chitin synthesis and fungal pathogenesis Gow. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, p. 416-423, 2010.

LESAGE G, BUSSEY H. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol. Mol Biol**, v. 70, p. 317–343, 2006.

LEVIN DE. Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 69, p. 262–291, 2005.

LOEWITH R, JACINTO E, WULLSCHLEGER S, LORBERG A, CRESPO JL, BONENFANT D, OPPLIGER W, JENCE P, HALL MN: Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. **Mol Cell**, v. 10, p. 457–468, 2002.

LOUDON KW, COKE AP, BURNIE JP, LUCAS GS, LIU YIN JA. Invasive aspergillosis: clusters and sources? **J Med Vet Mycol**, v. 32, p. 217-224, 1994.

LUTHER K, TOROSANTUCCI A, BRAKHAGE AA, HEESEMANN J, EBEL F. Phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* conidia by murine macrophages. **Cell Microbiol**, v. 9, p. 368-381, 2007.

LUTHER K, TOROSANTUCCI, BRAKHAGE AA, HEESEMANN J, EBEL F. MANN DJ, DOMBRÁDI V, COHEN PT. *Drosophila* protein phosphatase V functionally complements a SIT4 mutant in *Saccharomyces cerevisiae* and its amino-terminal region can confer this complementation to a heterologous phosphatase catalytic domain. **EMBO J**, v. 12, p.4833–4842, 1993.

MARR KA, CARTER RA, CRIPPA F, WALD A, COREY L. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. **Clin Infect Dis**, v. 34, p. 909-917, 2002.

MARTÍN H, FLÁNDEZ M, NOMBELA C, MOLINA M. Protein phosphatases in MAPK signalling: we keep learning from yeast. **Mol Microbiol**, v. 58, p. 6–16, 2005.

MASUDA CA, RAMÍREZ J, PEÑA A, MONTERO-LOMELÍ M. Regulation of monovalent ion homeostasis and pH by the Ser-Thr protein phosphatase SIT4 in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**, v. 275, p. 30957–30961, 2000.

MAY GS, Goldman GH, Osmani SA. Mitogen-activated protein kinase pathways in aspergilli, The aspergilli. **Genomics, medical aspects, biotechnology, and research methods**, p. 121–127, 2005.

MAY GS, XUE T, KONTOYIANNIS DP, GUSTIN MC, Mitogen activated protein kinases of *Aspergillus fumigatus*. **Med Mycol**, v. 43, p. 83–86, 2005.

MAYER FL, WILSON D, HUBE B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4:2, p. 119–128, 2013.

MAZUR P, BAGINSKY W. *In vitro* activity of β 1,3-D-Glucan synthase requires the GTP-binding protein Rho1. **J Biol Chem**, v. 271, p. 14604–14609, 1996.

MAZUR P, MORIN N, BAGINSKY W, EL-SHERBEINI M, CLEMAS JA, NIELSEN JB, FOOR F. Differential expression and function of two homologous subunits of yeast β 1,3-D-glucan synthase. **Mol Cell Biol**, v. 15, p. 5671–5681, 1995.

MECH F, THYWISSEN FA, GUTHKE R, BRAKHAGE AA, FIGGE MT. Automated image analysis of the host-pathogen interaction between phagocytes and *Aspergillus fumigatus*. **PLoS One.**, v. 6, p. 19-59, 2011.

MEHRAD B, STRIETER RM, STANDIFORD TJ. Role of TNF- α in pulmonary host defense in murine invasive aspergillosis. **J Immunol**, v. 162, p. 1633–1640, 1999.

MEINHART A, KAMENSKI T, HOEPPNER S, BAUMLI S, CRAMER P. A structural perspective of CTD function. **Genes Dev**, v. 19, p. 1401–1415, 2005.

MESHULAM T, LEVITZ SM, CHRISTIN L, DIAMOND RD. A simplified new assay for assessment of fungal cell damage with the tetrazolium dye, (2,3)-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanil ide (XTT). **J Infect Dis**, v. 172, p. 1153-1156, 1995.

MITCHELL CG, SLIGHT J, DONALDSON K. Diffusible component from the spore surface of the fungus *Aspergillus fumigatus* which inhibits the macrophage oxidative burst is distinct from gliotoxin and other hyphal toxins. **Thorax**, v. 52, p. 796–801, 1997.

MOLLER SG, KIM YS, KUNKEL T, CHUA NH. PP7 is a positive regulator of blue light signaling in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v.15, p. 1111–1119, 2003.

MONGE RA, ROMÁN E, NOMBELA C, PLA J. The MAP kinase signal transduction network in *Candida albicans*. **Microbiol**, v. 152, p. 905-912, 2008.

MONTOYA JG, CHAPARRO SV, CELIS D, CORTES JA, LEUNG AN, ROBBINS RC, STEVENS DA. Invasive aspergillosis in the setting of cardiac transplantation. **Clin Infect Dis**, v.37, p. 281-292, 2003.

MOORHEAD GB, TRINKLE-MULCAHY L, ULKE-LEMEE A. Emerging roles of nuclear protein phosphatases. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, p. 234–244, 2007.

MORAWETZ R, LENDENFELD T, MISCHAK H, MUHLBAUER M, GRUBER F, GOODNIGHT J, DE GRAAFF LH, VISSER J, MUSHINSKI JF, KUBICEK CP. Cloning and characterisation of genes (pkc1 and pkcA) encoding protein kinase C homologues from *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger*. **Mol Gen Genet**, v. 250, p. 17–28, 1996.

MOWAT E, BUTCHER J, LANG S, WILLIAMS C, RAMAGE G. Development of a simple model for studying the effects of antifungal agents on multicellular communities of *Aspergillus fumigatus*. **J Med Microbiol**, v. 56, p.1205–1212, 2007.

MÜLLBACHER A, EICHNER RD. Immunosuppression in vitro by a metabolite of a human pathogenic fungus. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 81, p. 3835-3837, 1984.

MULLINS J, HARVEY R, SEATON A. Sources and incidence of airborne *Aspergillus fumigatus* (Fres). **Clin Allergy**, v. 6, p. 209-217, 1976.

MUNRO CA, GOW NAR. Chitin synthesis in human pathogenic fungi. **Med Mycol**, v. 39, p. 41-53, 2001.

MUNRO CA, WINTER K, BUCHAN A, HENRY K, BECKER JM, BROWN AJ, BULAWA CE, GOW NAR. Chs1 of *Candida albicans* is an essential chitin synthase required for synthesis of the septum and for cell integrity. **Mol Microbiol**, v. 39, p. 1414-1426, 2001.

MUTHUVIJAYAN V, MARTEN MR. *In silico* reconstruction of nutrientsensing *neoformans*. **Mol Microbiol**, v. 58, p. 393–408, 2005.

NEWTON AC. Protein Kinase C: poised to signal. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 298, p. 395–402, 2010.

NEWTON AC. Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. **Chem Rev**, v. 101, p. 2353–2364, 2001.

NEWTON AC. Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: Protein kinase C as a paradigm. **Biochem J**, v. 370, p. 361–371, 2003.

NINOMIYA Y, SUZKI K, ISHII C, INOUE H. Highly efficient gene replacements in *Neurospora crassa* strains deficient for nonhomologous end-joining. **Proc Natl Acad USA**, v.101, p. 12248-12253, 2004.

NONAKA H, TANAKA K, HIRANO H, FUJIWARA T, KOHNO H, UMIKAWA M, MINO A, TAKAI Y. A downstream target of RHO1 small GTP-binding protein is PKC1, a homolog of protein kinase C, which leads to activation of the MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO J**, v. 14, p. 5931–5938, 1995.

O'GORMAN CM, FULLER HT, DYER PS. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. **Nature**, v. 2, p. 457-562, 2009.

OESER B. PKC1, encoding a protein kinase C, and FAT1, encoding a fatty acid transporter protein, are neighbors in *Cochliobolus heterostrophus*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 165, p. 273–280, 1998.

ORLEAN PA. β 1,3-D-Glucan synthase from budding and filamentous cultures of the dimorphic fungus *Candida albicans*. **Eur J Biochem**, v. 127, p. 397–403, 1982.

PARAVICINI G, MENDOZA A, ANTONSSON B, COOPER M, LOSBERGER C, PAYTON MA. The *Candida albicans* PKC1 gene encodes a protein kinase C homolog necessary for cellular integrity but not dimorphism. **Yeast**, v. 12, p. 741–756, 1996.

PARIS S, BOISVIEUX-ULRICH E, CRESTANI B, HOUCINE O, TARAMELLI D, LOMBARDI L, LATGE JP. **Infect Immun**, v. 65, p.1510-1514, 1997.

PARIS S, DEBEAUPUIS JP, CRAMERI R, CAREY R, CHARLES F, PREVOST MC, SCHMITT C, PHILIPPE B, LATGE JP. Conidial hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*. **Appl Environ Microbiol**, v. 63, p. 1581-1588, 2003

PEARLMAN E. The RodA hydrophobin on *Aspergillus fumigatus* spores masks dectin-1- and dectin-2-dependent responses and enhances fungal survival in vivo. **J Immunol**, v. 191, p. 2581–2588, 2013.

PEGUES DA, LASKER BA, MCNEIL MM, HAMM PM, LUNDAL JL, KUBAK BM. Cluster of cases of invasive aspergillosis in a transplant intensive care unit: evidence of person-to-person airborne transmission. **Clin Infect Dis**, v. 34, p. 412-416, 2002.

PEREZ P, CALONGE TM. Yeast protein kinase C. **J Biochem**, v. 132, p. 513–517, 2002.

PETER E, BAKRI F, BALL DM, CHENEY RT, SEGAL BH. Invasive pulmonary filamentous fungal infection in a patient receiving inhaled corticosteroid therapy. **Clin Infect Dis**, v. 35, pe54-e56, 2002.

PFALLER MA, DIEKEMA DJ. Rare and Emerging Opportunistic Fungal Pathogens: Concern for Resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **J Clin Microbiol**, v. 42, p. 4419-4431, 2004.

PHILIPPE BI-O, PRÉVOST MC, GOUGEROT-POCIDALO MA, SANCHEZ PM, MEEREN VDA, LATGÉ JP. Killing of *Aspergillus fumigatus* by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. **Infect Immun**, v. 71, p. 3034–3042, 2003.

PITT, J.I. The current roles of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health. **J Med Vet Mycol**, v. 32, p. 17-32, 1994.

QADOTA H, PYTHON CP, INOUE SB, ARISAWA M, ANRAKU Y, ZHENG Y, WATANABE, LEVIN DE, OHYA Y. Identification of yeast Rho1pGTPase as a regulatory subunit of β 1,3-glucan synthase. **Science**, v. 272, p. 279–281, 1996.

RAM AFJ, ARENTSHORST M, DAMVELD RA, VANKUYK PA, KLIS FM, VAN DEN HONDEL CAMJJ. The cell wall stress response in *Aspergillus niger* involves increased expression of the glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase-encoding gene (*gfaA*) and increased deposition of chitin in the cell wall.

REYES G, ROMANS A, NGUYEN CK, MAY GS. Novel mitogen-activated protein kinase MpkC of *Aspergillus fumigatus* is required for utilization of polyalcohol sugars. **Eukaryot Cell** 5, 1934–1940.

RIBAS JC, DIAZ M, DURAN A, PEREZ P. Isolation and characterization of *Schizosaccharomyces pombe* mutants defective in cell wall β 1,3-D-glucan. **J Bacteriol** v. 173, p. 3456– 3462, 1991.

RISPAIL N, SOANES DM, ANT C, CZAJKOWSKI R, GRÜNLER A, HUGUET R, PEREZ-NADALES E, POLI A, SARTOREL E, VALIANTE V, YANG M, BEFFA R, BRAKHAGE AA, GOW NA, KAHMANN R, LEBRUN MH, LENASI H, PEREZ-MARTIN J, TALBOT NJ, WENDLAND J, DI PIETRO A. Comparative genomics of MAP kinase and calcium-calcineurin signalling components in plant and human pathogenic fungi. **Fungal Genet Biol**, v. 46, p. 287–298, 2009.

RIVERA A, HOHL T, PAMER EG. Immune Response to *Aspergillus fumigatus* Infections. **Biol of Blood and Marrow Transpl**, V. 12, p. 47-49, 2006.

RÜCHEL R, REICHARD U. in *Aspergillus fumigatus*: Biology, clinical aspects and molecular approaches to pathogenicity. **Contributions to Microbiology**, v. 2, p. 21-43, 1999.

SAMBROOK J, RUSSEL DW. Molecular Cloning: a laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, **Cold Spring Harbor, NY**, 2001.

SAMSON RA. In *Aspergillus fumigatus*: Biology, clinical aspects and molecular approaches to pathogenicity. **Contributions to Microbiology**, v. 2, p. 5-20, 1999.

SCHMIDT A, BECK T, KOLLER A, KUNZ J, HALL MN: The TOR nutrient signaling pathway phosphorylates NPR1 and inhibits turnover of the tryptophan permease. **EMBO J**, v. 17, 1998.

SCHMITZ HP, JOCKEL J, BLOCK C, HEINISCH JJ., Domain shuffling as a tool for investigation of protein function: substitution of the cysteine-rich region of Raf kinase and PKC ϵ for that of yeast Pkc1p. **J Mol Biol**, v. 311, p. 1–7, 2001.

SCHMITZ HP, LORBERG A, HEINISCH JJ. Regulation of yeast protein kinase C activity by interaction with the small GTPase Rho1p through its amino-terminal HR1 domain. **Mol Microbiol**, v. 44, p. 829–840, 2002.

SCHMITZ HP, LORBERG A, HEINISCH JJ. Regulation of yeast protein kinase C activity by interaction with the small GTPase Rho1p through its

SCHMITZ, H. P., AND HEINISCH, J. J., Evolution, biochemistry and genetics of protein kinase C in fungi. **Curr Genet**, v. 43, p. 245–254, 2003.

SELLAM A, MVAN HET HOOG TEBBJI F, BEAUREPAIRE C, WHITEWAY M, NANTEL A. Modeling the transcriptional regulatory network that controls the early hypoxic response in *Candida albicans*. **Eukaryot Cell**, v. 13, p. 675–690, 2014.

SELMAN C, TULLET JMA, WIESER D, IRVINE E, LINGARD SJ, CHOUDHURY AI, CLARET M, AL-QASSAB H, CARMIGNAC D, RAMADANI F, WOODS A, ROBINSON ICA, SCHUSTER E, BATTERHAM RL, KOZMA SC, THOMAS G, CARLING D, OKKENHAUG K, THORNTON JM, PARTRIDGE L, GEMS D, WITHERS DJ: Ribosomal protein S6 kinase 1 signaling regulates mammalian life span. **Science**, v. 326, p. 140–144, 2009.

SHEMATEK EM, BRAATZ JA, CABIB E. Biosynthesis of the yeast cell wall. I. Preparation and properties of $\beta(1,3)$ -glucan synthetase. **J Biol Chem**, v. 255, p. 888–894, 1980.

SHEPARDSON KM, NGO LY, AIMANIANDA V, LATGE JP, BARKER BM, BLOSSER SJ, IWAKURA Y, HOHL TM, CRAMER RA. Hypoxia enhances innate immune activation to *Aspergillus fumigatus* through cell wall modulation. **Microbes Infect**, v. 15, p. 259–269, 2013.

SHIBUYA K, ANDO T, HASEGAWA C, WAKAYAMA M, HAMATANI S, HATORI T, NAGAYAMA T, NONAKA I. Patophysiology of pulmonary aspergillosis. **J Infect Chemother**, v. 10, p. 138-145, 2004.

SMITS GJ, VAN DEN ENDE H, KLIS FM. Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. **Microbiology**, v. 147, p. 781–794, 2006.

SOUTHERN, CM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J Mol Biol**, v. 98, p. 503-517, 1975.

STARK MJ. Yeast protein serine/threonine phosphatases: multiple roles and diverse regulation. **Yeast**, v. 12, p. 1647–1675, 1996.

STEELE C, RAPAKA RR, METZ A, POP SM, WILLIAMS DL, GORDON S, KOLLS JK, BROWN GD. The beta-glucan receptor dectin-1 recognizes specific morphologies of *Aspergillus fumigatus*. **PLoS Pathog**, v. 1, p. 42, 2005.

STEVENS DA. Vaccinate against aspergillosis! A call to arms of the immune system. **Clin Infect Dis**, v. 38, p. 1131-1136, 2004.

STURGILL TW, COHEN A, DIEFENBACHER M, TRAUTWEIN M, MARTIN DE, HALL MN. TOR1 and TOR2 have distinct locations in live cells. **Eukaryot Cell**, v. 7, p. 1819–1830, 2008.

SUNGHUN SON.; STEPHEN A. OSMAN. Analysis of All Protein Phosphatase Genes in *Aspergillus nidulans* Identifies a New Mitotic Regulator, **Eukaryot Cell**, p. 573–585, 2009.

SUSSMAN A, HUS K, CHIO LC, HEIDLER S, SHAW M, MA D, ZHU Z, CAMPBELL RM, PARK TS, KULANTHAIVEL P, SCOTT JE, CARPENTER JW, STREGE MA, BELVO MD, SWARTLING JR, FISCHL A, YEH WK, SHIH C, YE XS. Discovery of cercosporamide, a known antifungal natural product, as a selective Pkc1 kinase inhibitor through high-throughput screening. **Eukaryot Cell**, v. 3, p. 932–943, 2004.

SUTTON A, FREIMAN, R. The Cak1p protein kinase is required at G1/S and G2/M in the budding yeast cell cycle. **Genetics**, v. 147, p. 57–71, 1997.

SUTTON A, IMMANUEL D, ARNDT KT. The SIT4 protein phosphatase functions in late G1 for progression into S phase. *Mol Cell Biol*, v. 11, p. 2133–2148, 1991.

SVOBODA A. Cell wall-cytoplasm signalling. **J Appl Biomed**, v. 2, p. 81– 85, 2004.

TARAMELLI D, MALABARBA MG, SALA G, BASILICO N, COCUZZA G. Production of cytokines by alveolar and peritoneal macrophages stimulated by *Aspergillus fumigatus* conidia or hyphae. **J Med Vet Mycol.**, v. 34, p. 49–56, 1996.

TEEPE AG, LOPRETE DM, TIMOTHY ZHC, HOGGARD A, HILL TW. The protein kinase C orthologue PkcA plays a role in cell wall integrity and polarized growth in *Aspergillus nidulans*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 44, p. 554-562, 2007.

THAU N, MONOD M, CRESTANI B, ROLLAND C, TRONCHIN G, LATGE JP, PARIS S. Rodletless mutants of *Aspergillus fumigatus*. **Infect Immun**, v. 62, p. 4380-4388, 1994.

THOMPSON JR, DOUGLAS CM, LI W, JUE CK, PRAMANIK B, YUAN X, RUDE TH, TOFFALETTI DL, PERFECT JR, KURTZ M. A glucan synthase *FKS1* homolog in *Cryptococcus neoformans* is single copy and encodes an essential function. **J Bacteriol**, v. 181, p. 444–453, 1999.

TILBURN J, SCAZZOCCHIO C, TAYLOR GG, ZABICKY-ZISSMAN JH, LOCKINGTON RA, DAVIE RW. Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. **Gene**, v. 26, p. 205-221, 1983.

VALDIVIA RH, SCHEKMAN R. The yeasts Rho1p and Pkc1p regulate the transport of chitin synthase III (Chs3p) from internal stores to the plasma membrane. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 100, p. 10287–10292, 2003.

VALIANTE V, HEINEKAMP T, JAIN R, HÄRTL A, BRAKHAGE AA. The mitogen-activated protein kinase MpkA of *Aspergillus fumigatus* regulates cell wall signaling and oxidative stress response. **Fungal Genet Biol**, v45, p. 618–627, 2008.

VALIANTE V, JAIN R, BRAKHAGE AA. The MpkA MAP kinase module regulates cell wall integrity signaling and pyomelanin formation in *Aspergillus fumigatus*. **Fungal Genet Biol**, v. 46, p. 909-918, 2009.

VISINTIN R, CRAIG K, HWANG ES, PRINZ S, TYERS M, AMON A. The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. **Mol Cell**, v. 2, p. 709–718, 1998.

WANKE B, LAZERA MDOS S, NUCCI M. Fungal infections in the immunocompromised host. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 153-158, 2000.

WATANABE D, ABE M, OHYA Y. Yeast Lrg1p acts as a specialized RhoGAP regulating β 1-3-glucan synthesis. **Yeast**, v. 18, p. 943–951, 2001.

WATANABE M, CHEN CY, LEVIN DE. *Saccharomyces cerevisiae* PKC1 encodes a protein kinase C (PKC) homolog with a substrate specificity similar to that of mammalian PKC. **J Biol Chem**, 269, 16829–16836, 1994.

WATANABE Y, TAKAESU G, HAGIWARA M, IRIE K, MATSUMOTO K: Characterization of a serum response factor-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*, Rlm1, which has transcriptional activity regulated by the Mpk1 (Slt2) mitogen-activated protein kinase pathway. **Mol Cell Biol**, v.17, p. 2615–2623, 1997.

WEDAMAN KP, REINKE A, ANDERSON S, YATES J 3RD, MCCAFFERY JM, POWERS T. Tor kinases are in distinct membrane-associated protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Biol Cell**, v. 14, p. 1204–1220, 2003.

WINKELSTRÖTER LK, BOM VLP, DE CASTRO PA, RAMALHO LNZ, GOLDMAN MHS, BROWN NA, RAJENDRAN R, RAMAGE G, BOVIER E, DOS REIS TF, SAVOLDI M, HAGIWARA D, GOLDMAN GH. High osmolarity glycerol response (HOG) *PtcB* phosphatase is important for *Aspergillus fumigatus* virulence. **Mol Microbiol**, v. 96, p. 42–54, 2015.

XUE T, NGUYEN CK, ROMANS A, MAY GS. A mitogen-activated protein kinase that senses nitrogen regulates conidial germination and growth in *Aspergillus fumigatus*. **Eukaryot Cell**. v. 3, p. 557–560, 2004.

YAMAGUCHI H, UCHIDA K, NAGINO K, MATSUNAGA T. 2002. Usefulness of a colorimetric method for testing antifungal drug susceptibilities of *Aspergillus* species to voriconazole. **J Infect Chemother**, v. 8, p. 374–377, 2002.

YU F, GU Q, YUN Y, YIN Y, XU JR, SHIM WB, MA Z. The TOR signaling pathway regulates vegetative development and virulence in *Fusarium graminearum*. **New Phytol**, v. 203, p. 219–232, 2014.

YUILL E. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. **Trans Brit Mycol Soc**, v. 33, p. 324-33, 1950.

ZABROCKI P, VAN HOOFF C, GORIS J, THEVELEIN JM, WINDERICKX J, WERA S. Protein phosphatase 2A on track for nutrient-induced signalling in yeast. **Mol Microbiol**, v. 43, p. 835–842, 2002.

ZHANG Z, PRIDDEY G, GURR SJ. The barley powdery mildew protein kinase C gene, *pkc1* and *pkc*-like gene, are differentially expressed during morphogenesis. **Mol Plant Pathol**, v. 2, p. 327–337, 2001.

ZHAO C, JUNG US, GARRETT-ENGELE P, ROE T, CYERT MS, LEVIN DE. Temperature-induced expression of yeast *FKS2* is under the dual control of protein kinase C and calcineurin. **Mol Cell Biol**, v. 18, p. 1013–1022, 1998.

BOM VLP, DE CASTRO PA, WINKELSTRÖTRER LK, MARINÉ M, HORI JI, RAMALHO LNZ, DOS REIAS TF, GOLDMAN MHSG, BROWN NA, RAJENDRAN R, RAMAGE G, WALKER LA, MUNRO CA, ROCHA MC, MALAVAZI I, HAGIWARA D, GOLDMAN GH. The *Aspergillus fumigatus* *sitA* Phosphatase Homologue Is Important for Adhesion, Cell Wall Integrity, Biofilm Formation, and Virulence. **Eukaryo Cell**, v. 14, p. 728-744, 2015.