UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA NO DERMATÓFITO *Trichophyton rubrum*
MIMETIZANDO A INFECÇÃO *IN VITRO*: pH E DIFERENTES FONTES DE
CARBONO REGULANDO GENES

FERNANDA CRISTINA DE ALBUQUERQUE MARANHÃO

Ribeirão Preto – SP

2008

FERNANDA CRISTINA DE ALBUQUERQUE MARANHÃO

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA NO DERMATÓFITO *Trichophyton rubrum*
MIMETIZANDO A INFECÇÃO *IN VITRO*: pH E DIFERENTES FONTES DE
CARBONO REGULANDO GENES**

Tese apresentada ao Departamento de Genética
da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da
Universidade de São Paulo, como requisito
parcial para a obtenção do Título de Doutor em
Ciências: Área de concentração Genética.

Orientação: Profa. Dra. Nilce Maria Martinez Rossi

Ribeirão Preto – SP

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Maranhão, Fernanda Cristina de Albuquerque

Análise da expressão gênica no dermatófito *Trichophyton rubrum* mimetizando a infecção *in vitro*: pH e diferentes fontes de carbono regulando genes. Ribeirão Preto, 2008.

117p. il. 30cm.

Tese apresentada ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo. Área de concentração Genética.

Orientação: Profa. Dra. Nilce Maria Martinez Rossi

1. *Trichophyton rubrum*, 2. Fontes de carbono e pH, 3. Virulência,
4. Hidridização subtrativa supressiva

Dedico

*Às pessoas mais importantes da minha vida,
meus pais Fátima e Fernando,
pelo Amor, atenção e esforço constante.
À vocês, dedico toda a minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço incansavelmente aos meus pais, Sra. Fátima Dias e Sr. Fernando Maranhão, e ao meu irmão Fábio Maranhão, pelo constante apoio nos meus estudos, carinho e incentivo nas horas de dificuldades, e pelas palavras sinceras que me empurraram para frente nas horas em que a queda parecia inevitável. Obrigada pela presença constante nos mais de 5 anos em que estive longe e mesmo com quase 2.400 km de distância.

À Profa. Dra. Nilce Maria Martinez-Rossi, pela oportunidade de trabalho em seu grupo de pesquisa, orientação e assistência.

Aos amigos Wesley C. Brandão, Cleyde H. Vega, Daniela Pedrosa, Edna do Sim e Ronai F. Ramos, pela amizade e auxílio em todas as horas, por estarem comigo nos momentos de felicidade e de tristeza, e pelas intervenções determinantes na minha saúde física. Amigos que nunca esquecerei, e que estarão comigo independente de onde a Vida me levar.

Aos companheiros de trabalho, Fernanda Gonzales Paião, Jeny Cursino-Santos, Roseli Aquino-Ferreira e Rodrigo A. Cazzaniga, pelas valiosas discussões e auxílios experimentais, pelas palavras de incentivo, companheirismo e convívio que renderam boas risadas. E claro, pelo indiscutível apoio emocional, crucial em determinadas etapas.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão da bolsa de Doutorado, a CAPES, CNPq e FAEPA que deram suporte financeiro em várias etapas desse trabalho e no projeto temático em que estive envolvida, propiciando a efetivação e divulgação dos resultados obtidos.

Aos funcionários do Departamento de Genética, em especial às queridas meninas da Secretária, Susie Adriana Penha Nalon, Maria Aparecida O. S. Elias e Silvia Sant'anna Consiglieri, pela cordialidade e presteza, sempre prontas a dar qualquer suporte.

A todos os colegas atuais e àqueles que já passaram pelo Laboratório de Biologia e Genética Molecular de Microrganismos e do Laboratório de Bioquímica de Fungos, coordenado pelo Prof. Dr. Antônio Rossi.

À Ana Lúcia Fachin e Roseli Aquino-Ferreira, pela parceria técnica nas análises da linhagem mutante $\Delta TruMDR2$. Aos técnicos, Mendelson Mazucato e Pablo Rodrigo Sanches, que dão conta de toda a demanda de sequenciamento e análises bioinformáticas do nosso laboratório, e foram imprescindíveis na elaboração do meu projeto, bem como a ajuda do técnico Marcos D. Martins.

E finalmente, gostaria de agradecer a todos que cruzaram meu caminho positivamente nessa fase, que acreditaram que tudo daria certo e sempre me incentivaram. Obrigada pela chance de aprendizado e amizade.

*“Meus amigos quando me dão a mão
Sempre deixam outra coisa
Presença
Olhar
Lembrança
Calor
Meus amigos quando me dão a mão
Deixam na minha a sua mão”*

(Paulo Lemínskí)

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE TABELAS E GRÁFICOS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
1. Introdução	1
1.1. Os fungos nas doenças infecciosas	1
1.2. O antropofílico <i>Trichophyton rubrum</i>	3
1.3. Aspectos epidemiológicos	4
1.4. Interação dermatófito-hospedeiro	6
1.5. Resposta de <i>T. rubrum</i> ao pH ambiente	10
1.6. Tratamento e resistência a drogas	15
2. Objetivos gerais e específicos	19
3. Materiais e Métodos	20
3.1. Linhagens	20
3.1.1. Linhagens fúngicas	20
3.1.2. Linhagens bacterianas	21
3.2. Meios de cultura	21
3.2.1. Meio Mínimo - MM (Cove, 1966)	21
3.2.2. Meio Sabouraud modificado (Atlas, 1993)	21
3.2.3. Meio LB (Luria e Bertani) (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	22
3.2.4. Meio com queratina (Promega – 0,25%)	22
3.3. Soluções e tampões	22
3.3.1. Solução de elementos-traço (Cove, 1966)	22
3.3.2. Solução de sais (Cove, 1966)	23
3.4. Soluções utilizadas em experimentos de Biologia molecular	23
3.4.1. Soluções para eletroforese	23
3.4.1.1. Água livre de RNase (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	23
3.4.1.2. Gel para corrida eletroforética de RNA (Sambrook, <i>et al.</i> , 1989)	23
3.4.1.3. <i>Loading Buffer</i> para RNA	24
3.4.1.4. Tampão de migração para RNA (MOPS 5X)	24

3.4.1.5. Gel para corrida eletroforética de DNA (Sambrook, <i>et al.</i> , 1989)	24
3.4.1.6. Tampão TAE (Tris-Acetato) (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	24
3.4.2. Soluções utilizadas na extração de DNA plasmidial	25
3.4.2.1. Solução de hibridação	25
3.4.2.2. Solução de lavagem I	25
3.4.2.3. Solução de lavagem II	25
3.4.3. Soluções utilizadas no tratamento das membranas para os experimentos de <i>reverse Northern Blot</i> e <i>southern blot</i>	25
3.4.3.1. Solução desnaturante	25
3.4.3.2. Solução neutralizante	26
3.4.3.3. Solução SSC 20X pH 7,0 para tratamento de gel de agarose e membranas ..	26
3.4.3.4. Solução de hibridação	26
3.4.3.5. Solução de lavagem I	26
3.4.3.6. Solução de lavagem II	26
3.4.3. Tampão TE	27
3.4.4. Soluções utilizadas no tratamento das membranas para os experimentos de <i>Northern Blot</i>	27
3.4.4.1. Tampão de hibridação (Church Buffer)	27
3.4.4.2. Solução de Lavagem I	27
3.4.4.3. Solução de lavagem II	27
3.4.5. Soluções utilizadas na síntese de cDNA e construção de Biblioteca Subtrativa Supressiva	28
3.4.6. Soluções para experimentos de transformação bacteriana	28
3.4.6.1. Solução de X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	28
3.4.6.2. Solução de IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	28
3.5. Suspensão de conídios	28
3.6. Metodologia para obtenção de bibliotecas de cDNAs diferencialmente expressos	29
3.6.1. Cultivo e exposição a diferentes fontes de carbono	29
3.6.1.1. Queratina e glicose (Biblioteca TRSSHQue)	29
3.6.1.2. Lipídeo e glicose (Biblioteca TRSSHlip)	29

3.6.2.	Extração e purificação de RNA total.....	30
3.6.3.	Obtenção de RNA poli (A).....	31
3.6.4.	Construção de Biblioteca Subtrativa seguida de PCR Supressivo (Subtractive suppression hybridization; SSH).....	32
3.6.4.1.	Síntese de cDNA fita simples.....	32
3.6.4.2.	Síntese de cDNA fita dupla.....	33
3.6.4.3.	Purificação dos cDNAs	35
3.6.4.4.	Digestão com <i>RsaI</i>	35
3.6.4.5.	Ligação dos adaptadores no cDNA teste.....	36
3.6.4.6.	Etapas da hibridização subtrativa.....	37
3.6.4.7.	PCRs primária e secundária	38
3.6.5.	Clonagem dos fragmentos de cDNA diferencialmente expressos obtidos por SSH.....	41
3.6.5.1.	Obtenção de células competentes.....	41
3.6.5.2.	Transformação bacteriana	42
3.7.	Micropreparação em larga escala.....	42
3.8.	Validação dos experimentos de expressão gênica diferencial.....	44
3.8.1.	Amplificação dos clones para preparo de membranas (PCR da cultura bacteriana)	44
3.8.2.	Fixação de amostras em membranas.....	45
3.8.3.	Preparo das sondas e marcação a frio.....	45
3.9.	Sequenciamento automático.....	46
3.10.	Análise da expressão de genes selecionados por <i>northern blot</i>	47
3.10.1.	Eletroforese de RNA em gel de agarose-formaldeído e preparo da membrana de náilon	47
3.10.2.	Preparo das sondas de cDNAs	47
3.10.3.	Pré-hibridização e Hibridização (<i>Northern Blot</i>)	49
3.11.	Análise das sequências isoladas através de Bioinformática.....	49
3.12.	Infecção <i>in vitro</i> com as linhagens H6 e $\Delta TruMDR2$ de <i>T. rubrum</i>	50
4.	Resultados	51
4.1.	Estabelecimento das condições de cultivo e verificação de alterações do pH durante o crescimento de <i>T. rubrum</i> em diferentes fontes de carbono (queratina, lipídeo e glicose)	51

4.2	Biblioteca Subtrativa Supressiva utilizando a linhagem H6 (TRSSHQue): Condição teste com queratina após 72 h de cultivo e <i>reverse northern blot</i>	53
4.2.1.	Sequenciamento e análise bioinformática	56
4.2.2.	Confirmação dos genes diferencialmente expressos através de <i>northern blot</i>	65
4.3.	Biblioteca Subtrativa Supressiva utilizando a linhagem CBS118892 (TRSSHLip): Condição teste com fonte lipídica após 72 h de cultivo e <i>reverse northern blot</i>	69
4.3.1.	Sequenciamento e análise bioinformática	71
4.3.2.	Validando genes através de <i>northern blot</i>	75
4.4.	Análise do padrão de expressão de proteases nas linhagens H6 e $\Delta pacC-1$ através de <i>northern blot</i>	76
4.5.	Crescimento em unhas humanas é diferenciado nas linhagens H6 e $\Delta TruMDR2$ de <i>T. rubrum</i>	78
5.	Discussão	79
5.1.	Uso de fontes de carbono e interferência do pH do meio	79
5.2.	Expressão gênica diferencial de <i>T. rubrum</i> após contato com queratina e lipídeos.....	82
5.2.1.	Proteases identificadas, capazes de degradar queratina	83
5.2.2.	Transportadores de membrana altamente expressos em queratina	85
5.2.3.	Queratina pode ativar transcritos envolvidos em várias funções, como no metabolismo geral de <i>T. rubrum</i>	88
5.2.4.	Fonte lipídica também ativa genes diferencialmente expressos em <i>T. rubrum</i>	92
5.3.	Expressão de proteases no mutante <i>pacC-1</i>	96
5.4.	Crescimento em unhas humanas é diferenciado nas linhagens H6 e $\Delta TruMDR2$ de <i>T. rubrum</i>	99
6.	Conclusões	101
7.	Referências Bibliográficas	102
Anexos		

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	(A) Aspecto macroscópico de <i>T. rubrum</i> cultivado em meio Sabouraud Agar durante 14 dias (28 °C) e (B) microscopia do perfil de conídios de <i>T. rubrum</i> , evidenciando a maior presença de microconídios em relação aos macroconídios.....	3
Figura 2:	Dermatofitoses causadas por <i>T. rubrum</i> : (A) <i>Tinea corporis</i> , (B) <i>Tinea pedium</i> e (C) <i>Tinea unguium</i>	6
Figura 3:	Modelo de infecção proposto para dermatófitos, baseado na regulação de enzimas proteolíticas secretadas em resposta ao pH ambiente. (Martinez-Rossi et al., 2004)	12
Figura 4:	Representação esquemática da síntese de cDNA fita dupla a partir do Kit SMART® da Clontech	34
Figura 5:	Esquema do procedimento de subtração de cDNA com o uso de PCR supressivo. Boxes marcados ou em aberto representam partes distintas dos adaptadores 1 e 2 (Gurskaya et al., 1996).....	40
Figura 6:	Etapas resumidas da construção da biblioteca TRSSHQue: (A) Gel de agarose-formaldeído desnaturante 1,5% com RNA total das condições controle-glicose (G) e teste-queratina (Q); (B) Gel agarose 1,2% com 1 kb DNA ladder (PM) e cDNA fita dupla das condições G e Q; (C) Gel de agarose 1,2% com λ HindIII (PM) e o produto de Nested PCR	53
Figura 7:	Reverse Northern Blot. Autoradiografias apresentando o rastreamento de clones. Seis membranas em duplicata contendo clones da Biblioteca Subtrativa de <i>T. rubrum</i> (TRSSHQue) (forward), hibridizadas com sonda de pool de cDNAs obtidos na Nested-PCR da condição controle (Taglicht & Michaelis) e teste (Que).....	55
Figura 8:	Northern Blot. Validação de transcritos diferencialmente expressos e similares a proteases (Subtilisina 5, Metaloprotease 4 e Subtilisina 3), após contato de <i>T. rubrum</i> com queratina durante 72 h. (C) controle, micélio cultivado em glicose; (Q) teste, micélio cultivado em queratina. Abaixo estão representados os respectivos géis desnaturantes contendo RNAs equalizados das condições citadas. Ao lado, gráficos representando as intensidades relativas da expressão gênica de cada transcrito, através da comparação entre controle (G) e teste (Q).....	66

Figura 9:	<i>Northern Blot. Validação de transcritos diferencialmente expressos e similares a proteína TINA, No Match (sem similaridade), Gag-poliproteína e Hsp30, após contato de T. rubrum com queratina durante 72 h. (C) controle, micélio cultivado em glicose; (Q) teste, micélio cultivado em queratina. Abaixo estão representados os respectivos géis desnaturantes contendo RNAs equalizados das condições citadas. Ao lado, gráficos representando as intensidades relativas da expressão gênica de cada transcrito, através da comparação entre controle (G) e teste (Q)</i>	<i>67</i>
Figura 10:	<i>Northern Blot. Validação de transcritos diferencialmente expressos e similares a transportadores transmembranas, após contato de T. rubrum com queratina durante 72 h. (C) controle, micélio cultivado em glicose; (Q) teste, micélio cultivado em queratina. Abaixo estão representados os respectivos géis desnaturantes contendo RNAs equalizados das condições citadas. Ao lado, gráficos representando as intensidades relativas da expressão gênica de cada transcrito, através da comparação entre controle (G) e teste (Q)</i>	<i>68</i>
Figura 11:	<i>Otimização dos ciclos de PCR para amplificação dos cDNAs controle e teste, evitando o “platô” para manter a variação quantitativa dos diferentes genes em cada condição. Fixou-se 20 ciclos para o controle e 27 para o teste. PM1: 1Kb DNA ladder; PM: padrão de peso molécula λHind.....</i>	<i>69</i>
Figura 12:	<i>Nested-PCR. (PM) 1Kb Plus DNA Ladder; (1) cDNAs da condição teste (azeite de oliva, 1%); (2) cDNAs da condição controle (glicose 55 Mm).....</i>	<i>70</i>
Figura 13:	<i>Reverse Northern Blot. Autoradiografias apresentando o rastreamento de clones. Sete membranas em duplicata contendo clones da Biblioteca Subtrativa de T. rubrum (TRSSHip) (forward), hibridizadas com sonda de pool de cDNAs obtidos na Nested-PCR da condição controle e teste (Lip)</i>	<i>72</i>

- Figura 14:** Northern Blot. Validação de transcritos diferencialmente expresso, sem (Gorani et al., 2002) a glicoproteína de 43 kDa, após contato de *T. rubrum* com lipídeos durante 72 h. (C) controle, micélio cultivado em glicose; (L) teste, micélio cultivado em azeite de oliva (1%). Abaixo está representado o respectivo gel desnaturante contendo RNAs equalizados das condições citadas. O gráfico representa a intensidade relativa da expressão gênica do transcrito, após a comparação entre controle (G) e teste (L)..... 75
- Figura 15:** Northern Blot. Comparação do padrão de expressão gênica de transcritos diferencialmente expressos e similares a proteases nas linhagens H6 (selvagem) e Δ PacC-1 (mutante) de *T. rubrum*, após cultivo durante 72 h: (1) H6 cultivado em glicose; (2) H6 cultivado em queratina; (3) Δ PacC-1 cultivado em glicose; (4) Δ PacC-1 cultivado em queratina. O respectivo gel desnaturante contendo RNAs equalizados das condições citadas está representado. Os gráficos representam as intensidades relativas da expressão gênica de cada transcrito após a comparação entre as linhagens (2) selvagem H6 e (4) mutante Δ pacC-1..... 77
- Figura 16:** Ensaio de infecção mostrando o crescimento de diferentes linhagens de *T. rubrum* cultivadas em fragmentos de unhas humanas durante 6 dias a 28 °C. O crescimento fúngico nas unhas foi avaliado por microscopia óptica e as imagens capturadas através do Axion vision System (Zeiss) com objetiva (plan neofluar) 20x/0.5. As partes pretas no lado esquerdo das figuras são os fragmentos de unhas. (A) Controle negativo (sem inóculo); (B) H6 (linhagem selvagem H6) e (C) linhagem mutante Δ TruMDR2. Esses resultados são representativos de dois experimentos distintos..... 78

ÍNDICE DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1:	<i>Sequência dos oligonucleotídeos para uso na RT-PCR.....</i>	<i>35</i>
Tabela 2:	<i>Alteração do pH quando várias linhagens de T. rubrum foram cultivadas em meio mínimo com glicose (controle) (55 mM), queratina (teste 1) (2,5g/L) e fonte lipídica (teste 2) (1 %)</i>	<i>52</i>
Tabela 3:	<i>Contigs e singlets identificados a partir de sequências expressas no dermatófito T. rubrum após tratamento com queratina durante 72 h</i>	<i>57</i>
Tabela 4:	<i>Análise bioinformática e anotação funcional de unigenes selecionados da Biblioteca Subtrativa Supressiva de T. rubrum cultivado em meio contendo fonte lipídica</i>	<i>73</i>
Gráfico 1:	<i>Classificação funcional dos unigenes gerados após a análise dos clones que compõem a Biblioteca Subtrativa Supressiva TRSSHQue, de acordo com banco de dados do MIPS (Munich Information Center for Protein Sequences)</i>	<i>64</i>
Gráfico 2:	<i>Classificação funcional dos unigenes gerados após a análise dos clones que compõem a Biblioteca Subtrativa Supressiva TRSSHLip, de acordo com banco de dados do MIPS (Munich Information Center for Protein Sequences)</i>	<i>74</i>

RESUMO

Dermatófitos são fungos filamentosos com a habilidade de invadir substratos queratinizados e causar dermatofitoses em humanos e animais, penetrando profundamente apenas em hospedeiros imunocomprometidos. *Trichophyton rubrum* é um fungo antropofílico e cosmopolita, o mais comum agente de micoses superficiais, que usa componentes celulares como proteínas e lipídeos após uma específica regulação de sua expressão gênica governada pelo pH ambiente e sensoriamento celular. A virulência de *T. rubrum* é relacionada com a secreção de enzimas proteolíticas, um importante fator determinante na invasão, utilização e subsequente disseminação através do estrato córneo. O objetivo desse estudo foi identificar através de Hibridização Subtrativa Supressiva (SSH) genes de *T. rubrum* preferencialmente expressos durante o crescimento na presença de queratina e lipídeos, quando *T. rubrum* degrada fontes de carbono tipicamente encontradas em células epidérmicas. Inicialmente, nós avaliamos as mudanças no pH extracelular durante seu crescimento em queratina e lipídeo (depois de 6, 12, 24, 48, 72 h e 7 dias) em pH inicial 5,0, onde foi observado um gradual aumento do pH basal sob ambas as condições de teste, comparado com a condição glicose (controle). Também identificamos 576 transcritos de *T. rubrum* diferencialmente expressos por SSH usando conídios cultivados por 72 h em queratina como teste e em glicose como controle. Os genes de *T. rubrum* ativados codificam proteínas putativas que foram validadas por cDNA *dot-blot* e *northern blot*, mostrando similaridade com proteínas fúngicas envolvidas no metabolismo básico, crescimento e virulência, p. ex., transportadores ABC-MDR, MFS e ATPase de cobre, permease, NIMA *interactive protein*, poliproteína Gag-Pol, fatores de virulência subtilisinas serino-proteases (Sub 3 e 5) e metaloproteases (Mep 3 e 4) e Hsp30. Adicionalmente, entre os 762 clones obtidos na biblioteca da condição lipídeo (72 h), 80 transcritos superexpressos foram confirmados por cDNA *dot-blot*, revelando 14 *unigenes* similares à proteínas de vários organismos patogênicos, como glicoproteína 43 kD, transportador MDR, proteína G, quitina sintase e serino/treonina fosfatase.

Transcritos do gene *TruMDR2*, codificador de um transportador ABC, foi isolado tanto na presença de queratina quanto em lipídeo, e a análise da linhagem mutante $\Delta TruMDR2$ de *T. rubrum* mostrou uma redução na atividade infectante, caracterizada pelo baixo crescimento em unhas humanas comparada com o tipo selvagem. A alta expressão de transportadores por *T. rubrum* em condições que mimetizam a infecção e a redução na

virulência de $\Delta TruMDR2$ durante o modelo *in vitro* sugerem que transportadores estão envolvidos na patogenicidade de *T. rubrum*. Outra linhagem mutante ($\Delta pacC-1$) com um nocaute no gene *pacC* que codifica um fator de transcrição regulado pelo pH local, mostrou a expressão de proteases (Sub 3 e 5 e Mep 4) diminuída após o crescimento em queratina em comparação com o tipo selvagem em análises de *northern blots*. Essas proteases tem uma atividade ótima em pH alcalino, e nossos resultados indicam uma regulação defectiva do gene *pacC* de *T. rubrum* na ativação de proteases.

Em conclusão, através do uso de SSH foi possível identificar genes de *T. rubrum* ativados após tratamentos específicos, o que sugere a importância dos mesmos na interação dermatófito-hospedeiro, instalação e manutenção da doença. Esses resultados disponibilizam novos dados sobre *T. rubrum* que levarão a um melhor entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos no crescimento, metabolismo geral e patogenicidade, e também auxiliar na identificação de novos e efetivos alvos de drogas para dermatófitos.

ABSTRACT

Dermatophytes are a group of fungi filamentous that have the ability to invade keratinized substrates, causing dermatophytosis in humans and animals and only penetrate deeper if the host is immunocompromised. *Trichophyton rubrum* is an anthropophilic and cosmopolitan fungi, the most common agent of superficial mycoses, which uses cell components such as proteins and lipids after a specific regulation of its gene expression governed by pH environment and sensing cell. The virulence *T. rubrum* is related to secretion of proteolytic enzymes, an important factor determinant in the invasion, utilization and subsequently dissemination through the stratum corneum. The aim of this study was to indentify by Suppression Subtractive Hybridization (SSH) *T. rubrum* genes preferentially expressed during growth in the presence of keratin and lipids, upregulated when this fungus degrades carbon source typically found at epidemic cells. Initially, this work evaluated the changes in the extracellular pH during its growth in keratin and lipid (after 6, 12, 24, 48, 72 h and 7 days) at initial pH 5.0, where we observed a gradual increase of basal pH under both tests when compared to glucose condition (control). Also, we identified 576 *T. rubrum* transcripts differentially expressed by SSH using conidia cultivated for 72 h in keratin as tester, and in glucose as driver. The *T. rubrum* genes upregulated encode putative proteins that were validated by cDNA dot-blot and northern blot, showing similarity to fungi proteins involved in basic metabolism, growth and virulence, i.e., transporters ABC-MDR, MFS and ATPase of copper, permease, NIMA interactive protein, Gag-Pol polyprotein, virulence factors serine-protease subtilisins (Sub 3 and 5) and metalloproteases (Mep 3 and 4) and Hsp30. Additionally, among the 762 clones obtained in a library of lipid condition (72 h), 80 over-expressed transcripts were confirmed by cDNA dot-blot, revealing 14 unigenes similar to proteins of several pathogenic organisms, like glicoprotein 43 kD, MDR transporters, G protein, chitin synthase and serine/threonine-protein phosphatase.

Transcripts of *TruMDR2* gene, encoding an ABC transporter in *T. rubrum*, were isolated in the presence of keratin and lipid, and the examination of $\Delta TruMDR2$ mutant *T. rubrum* showed a reduction in infecting activity, characterized by low growth in human nails compared to wild-strain. The high expression of transporter by *T. rubrum* in conditions that mimetize the infection and the virulence reduction of $\Delta TruMDR2$ in an *in vitro* model suggests that transporters are involved in *T. rubrum* pathogenicity. Another

mutant, *ΔpacC-1* with a knockout in PacC gene that encodes a transcription factor regulated by local pH, showed the expression of proteases (Sub 3, Sub 5 and Mep 4) decreased after growth in keratin (72 h) in comparison to wild-strain in northern blot analyzes. These proteases have an optimal activity in alkaline pH, and our results indicate a defective regulation of *T. rubrum* pacC gene in the activation of proteases.

In conclusion, by means of SSH to identify genes upregulated in *T. rubrum* after specific treatments, their importance in the dermatophyte-host interaction, installation and maintenance in the disease is suggested. These results provide new insights about *T. rubrum* that will contribute to a better understanding of molecular mechanisms about the growth, metabolism and pathogenicity, and may also aid in the identification of novel effective drug targets for dermatophytes.

APRENDIZADO

Do mesmo modo que te abriste à alegria
 abre-te agora ao sofrimento
 que é fruto dela
 e seu avesso ardente.

Do mesmo modo
 que da alegria foste
 ao fundo
 e te perdeste nela
 e te achaste
 nessa perda
deixa que a dor se exerça agora
sem mentiras
nem desculpas
 e em tua carne vaporize
 toda ilusão

que a vida só consome
o que a alimenta.

(FERREIRA GULLAR)

1. Introdução

1.1. Os fungos nas doenças infecciosas

Os fungos são organismos eucarióticos, uni ou pluricelulares, heterotróficos, quimiorganotróficos, aeróbios ou microaerófilos, sendo que alguns possuem parede celular constituída de quitina ou quitina e celulose. Essa diversidade morfológica e fisiológica permite que tais organismos sejam encontrados em variados ambientes, sendo delimitados em um reino próprio por possuírem características peculiares que os distinguem dos seres de outros reinos. Com relação à nutrição, os fungos fazem absorção do alimento, acumulam glicogênio como substâncias de reserva, com estilo de vida saprobiótico, comensal, simbiote ou parasitário (Tortora *et al.*, 2005). Estes organismos são importantes por trazerem benefícios em diversos aspectos, p.ex., na cadeia alimentar como decompositores, servindo de alimento ou na produção de pão e drogas, no controle biológico e com grande influência biotecnológica por inovar na produção de enzimas utilizadas industrialmente.

Ao longo da última década, a incidência de infecções causadas por fungos tem aumentado, seja em infecções hospitalares afetando principalmente indivíduos debilitados imunologicamente ou como fitopatógenos, infectando plantas economicamente importantes. Os fungos de interesse médico (agentes de micoses) podem ser leveduras, fungos filamentosos ou apresentar-se com as duas formas (fungo dimórfico) a depender das condições ambientais como pH e temperatura. As micoses são classificadas em cinco grupos de acordo com o grau de envolvimento no tecido e o modo de entrada no hospedeiro: sistêmica, subcutânea, cutânea, superficial ou oportunista. A criptococose causada por *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, principalmente o sorotipo A, é caracterizada como infecção oportunista iniciada pelas vias aéreas que pode se tornar sistêmica em hospedeiros com imunossupressão, enquanto membros do gênero *Aspergillus*

podem provocar doenças em homens e animais através de vários mecanismos com características variadas, sendo a maioria das espécies fúngicas considerada oportunista (Sidrim & Rocha, 2004).

As dermatofitoses estão entre as micoses superficiais mais comuns e determinam lesões limitadas ao extrato queratinizado da pele e seus anexos. São causadas por fungos filamentosos denominados dermatófitos, que através de um longo processo evolutivo tornaram-se altamente capazes de invadir e colonizar tecidos queratinizados. Estes compreendem cerca de 30 espécies classificadas de acordo com o habitat preferencial (antropofílicos, zoofílicos ou geofílicos), e em 3 gêneros anamórficos (assexuado ou imperfeito): *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton* (Weitzman & Summerbell, 1995; Graser *et al.*, 2000). Os dermatófitos antropofílicos têm específica afinidade por queratina de tecidos humanos como cabelo, pele e unha para utilizá-los como fonte de nutrientes. Eles afetam cerca de 25% da população mundial, como constatado pela Organização Mundial da Saúde (Marques *et al.*, 2000). Menos freqüentemente, os dermatófitos estão relacionados às infecções subcutâneas e profundas com quadros clínicos mais complexos como abscessos, granulomas e micetomas em indivíduos imunodeprimidos (Speth *et al.*, 2008). A infecção pode ser branda ou severa, e depende de vários fatores, p. ex., relacionados com a capacidade infectante do fungo para superar os mecanismos de defesa do hospedeiro, local da infecção, pH ambiente, concentração de nutrientes (Ogawa *et al.*, 1998) e outros aspectos, podendo gerar diferentes manifestações clínicas a depender da área anatômica infectada.

1.2. O antropofílico *Trichophyton rubrum*

Entre os representantes do gênero, *Trichophyton rubrum* (Castellani; Sabouraud, 1911) tem sido o agente etiológico isolado com maior frequência nos casos de dermatofitoses humanas. Quando cultivado em placa de Petri contendo meio adequado, apresenta crescimento lento e colônias brancas com textura algodonosa ou aveludada (Fig. 1A), com pregas radiais e pigmentação vermelha no lado reverso (Kwon-Chung & Bennett, 1992; Cervelatti *et al.*, 2004), mas variedades com aspecto granular e ausência de pigmentação podem ocorrer. Os microconídios são piriformes localizados geralmente ao longo de hifas hialinas não ramificadas, com macroconídios pouco abundantes, longos e com formas fina e claviformes (Ferreira & Ávila, 2001) (Fig. 1B). Os arthroconídios de *T. rubrum* são bem resistentes às adversidades dos fatores ambientais e capazes de sobreviver por longos períodos, sendo os principais elementos infecciosos (Coelho *et al.*, 2008).

A

B

Figura 1: (A) Aspecto macroscópico de *T. rubrum* cultivado em meio Sabouraud Agar durante 14 dias (28 °C) e (B) microscopia do perfil de conídios de *T. rubrum*, evidenciando a maior presença de microconídios em relação aos macroconídios.

Para o diagnóstico, geralmente é feita coleta e cultivo em meio Sabouraud, fazendo-se análise da formação de conídios e de caracteres morfológicos das colônias com ou sem uso de microscopia para distinguir as espécies (Gorani *et al.*, 2002). Várias técnicas moleculares vêm sendo utilizadas e dão resultados mais rápidos e confiáveis, como por exemplo, PCR utilizando *primers* de regiões repetitivas conservadas, análise de RAPD, DNA mitocondrial e do número de repetições da região espaçadora não transcrita (ITS) do RNA ribossômico (Kano *et al.*, 1997; Kano *et al.*, 2000; Nascimento & Martinez-Rossi, 2001). Recentemente foi proposto o seqüenciamento do genoma do *T. rubrum* por pesquisadores de várias universidades (Projeto *Fungal Genome Initiative* do Broad Institute; <http://www.broad.mit.edu/>) pela sua importância e prevalência, e sua efetivação auxiliará em diversos estudos sobre taxonomia, epidemiologia e processos metabólicos gerais, dando melhores condições para o surgimento de terapias mais eficientes. A cariotipagem molecular deste dermatófito, utilizando a técnica CHEF (Contour-clamped homogeneous electric field), foi definida por Cervellati *et al* (2004) que identificou cinco bandas cromossômicas de peso molecular entre 3,0 a 5,8 Mb.

1.3. Aspectos epidemiológicos

Quanto à distribuição geográfica, os dermatófitos são encontrados atualmente em diferentes regiões do mundo, havendo variações regionais em relação às frequências de determinadas espécies. Muitas espécies têm distribuição mundial (cosmopolita), como o *T. rubrum*, que infecta os humanos e pode eventualmente causar dermatofitoses em animais (Chermette *et al.*, 2008; Seebacher *et al.*, 2008), sendo a espécie mais prevalente deste gênero e o dermatófito mais comumente encontrado em lesões superficiais de pele e unha (Costa *et al.*, 2002; Zahra *et al.*, 2003). Mas apesar de ser considerado cosmopolita, o *T. rubrum* no passado apresentava uma distribuição mais restrita, sendo a mudança

possivelmente um resultado da extensa migração humana transportando tais dermatófitos (Weitzman & Summerbell, 1995). Condições geoclimáticas e sociais interferem na distribuição das espécies dermatofíticas isoladas. No Brasil, as regiões Sul e Sudeste têm apresentado alta incidência de *T. rubrum*, seguido de *M. canis* e *T. mentagrophytes* como as mais isoladas, enquanto na região Nordeste há maior prevalência de *T. tonsurans*, *T. rubrum* e *M. canis* (Sidrim & Rocha, 2004). O fluxo populacional e alterações positivas ou negativas das condições de saneamento podem interferir na frequência de cada espécie em determinadas regiões com o decorrer do tempo e modificar esses padrões.

Estima-se que aproximadamente 80-93% das dermatofitoses crônicas ou recorrentes são causadas por *T. rubrum*, que pode ainda ter um comportamento invasivo ao causar infecções oportunistas atípicas em pacientes com o sistema imune comprometido, como ocorre em portadores do vírus HIV, pacientes com órgãos transplantados e outros que são submetidos a tratamento quimioterápico contra o câncer (Georgopapadakou & Walsh, 1994; Grossman *et al.*, 1995; Weitzman & Summerbell, 1995; Gorani A *et al.*, 2002; Gong *et al.*, 2007). No Estado de São Paulo, 4.500 crianças de 0-15 anos foram avaliadas para determinar a incidência de *tinea capitis* entre 1996 e 2000. Em 132 crianças com suspeita de contaminação, 112 pacientes (85%) tiveram a confirmação através de microscopia direta e cultura, sendo apenas 0,9% relacionado à presença de *T. rubrum* (Moraes *et al.*, 2006). Já entre as onicomicoses, *T. rubrum* é o mais prevalente e afeta crianças e adultos em cerca de 70% dos casos, seguido de *T. mentagrophytes*.

Em relação aos hospedeiros em potencial, fatores de riscos estão associados à micoses como a onicomicoses, dentre eles a idade, *diabetes mellitus*, anomalias morfológicas na unha, fatores genéticos, imunodeficiência, tratamento e higiene inadequados, tanto para infecções primárias como em reincidências. Além disto, as taxas hormonais de cada indivíduo afetam a frequência de infecções em homens e mulheres

(Tosti *et al.*, 2005). Então, vários fatores climáticos, práticas sociais, migração populacional e características individuais afetam a epidemiologia das dermatofitoses.

1.4. Interação dermatófito-hospedeiro

A infecção por *T. rubrum* e conseqüente propagação podem ocorrer através do contato direto ou indireto entre indivíduos infectados e saudáveis, ou com objetos inanimados contaminados (fomites). As manifestações clínicas, conhecidas popularmente como impigem (tinha), são caracterizadas de acordo com o sítio anatômico atingido. Este dermatófito causa *tinea corporis*, *tinea pedis* e *tinea unguium*, e mais raramente *tinea capitis* (Graser *et al.*, 2000), sendo as lesões resultantes da reação do hospedeiro contra enzimas específicas produzidas e liberadas pelo fungo durante o processo de infecção, que viabilizam a digestão tecidual do hospedeiro em busca de nutrientes para o desenvolvimento e manutenção do fungo (Martinez-Rossi *et al.*, 2004).

Figura 2: Dermatofitoses causadas por *T. rubrum*: (A) *Tinea corporis*, (B) *Tinea pedis* e (C) *Tinea unguium*.

A complexidade dos eventos envolvidos no desenvolvimento de uma doença requer a combinação de características do patógeno e do hospedeiro, existindo vários fatores do hospedeiro que estão envolvidos no processo de colonização dos dermatófitos. Vários fungos e outros parasitas que se desenvolvem em tecidos queratinizados são incapazes de se manter na presença de fatores séricos e muitas vezes em temperaturas como a fisiológica humana (37 °C). Caracteres do extrato córneo favorecem essa adaptação, como a alta hidratação devido à presença de glândulas e o fato das células superficiais já se encontrarem mortas e inacessíveis a diversos mecanismos de defesa provenientes da circulação ativa, além da temperatura e do pH em torno de 5,0 a 6,7 (ácido) (Sidrim & Rocha, 2004). Ou seja, além da temperatura da pele ser menor que 37 °C, os fungos queratinolíticos não são diretamente afetados pelos componentes inflamatórios já que a extensa camada de queratina age como uma barreira que impede o contato do fungo com componentes séricos.

Entretanto, segundo Ogawa *et al* (1998), após o contato para a transmissão do dermatófito, a etapa inicial da patogênese envolve a capacidade infectante do fungo em superar os mecanismos de resistência do hospedeiro, p.ex., barreiras físicas como as camadas da pele em descamação e a adaptação às características físico-químicas do ambiente (incidência de luz U.V., temperatura, umidade, pH, etc). Para o estabelecimento das dermatofitoses, a aderência aos queratinócitos e a germinação conidial são cruciais (Samdani, 2005). Efetivada a aderência inicial, segue-se a competição com a flora microbiana normal e germinação dos artroconídios para subsequente colonização da superfície celular, culminando na penetração das hifas em camadas mais profundas do extrato córneo. Sendo assim, é essencial a regulação da expressão gênica para induzir ou inibir genes de acordo com a necessidade, como em todos os seres vivos. A capacidade de adesão nas superfícies celulares vem sendo atribuída à presença de glicoproteínas na

parede celular desses microorganismos (Ferreira-Nozawa *et al.*, 2003), como também é observado no fungo dimórfico patogênico *Candida albicans* (Ogawa *et al.*, 1998).

Uma vez ultrapassadas essas etapas, os fungos devem ser capazes de obter nutrientes essenciais para sua completa instalação, desenvolvimento e permanência no hospedeiro (Martinez-Rossi *et al.*, 2004). Mas a seletividade da membrana citoplasmática impede que macromoléculas como proteínas, amido, celulose e lipídeos sejam transportadas para o interior da célula. Para que essas moléculas sejam utilizadas, é necessário degradá-las em compostos menores aos quais as membranas são permeáveis. A quebra dessas moléculas é promovida por enzimas hidrolíticas secretadas (exoenzimas) que apresentam especificidade pelo substrato, atuando sobre proteínas, amidos ou lipídeos, e constituem um fator de virulência por hidrolisar componentes estruturais de tecidos e conferir ao microorganismo a capacidade invasora.

Um dos principais alvos desse ataque enzimático é a queratina, uma molécula protéica fibrosa de alto peso molecular (Vignardet *et al.*, 2001), com uma matriz rica em cisteína e composta por fortes ligações peptídicas e acetamídicas que garantem estabilidade para a função de revestimento e proteção (Fraser & Parry, 2005). Esta é produzida apenas por humanos e outros animais, sendo o principal constituinte de acessórios como a pele, unhas, cascos e cornos. Outro componente importante encontrado nas paredes celulares e alvos das enzimas fúngicas são os lipídeos, que em conjunto com diversas proteínas garantem a forma e maleabilidade da parede celular (Tenchov *et al.*, 2008). Então, frente a esses componentes, é necessário que os fungos patogênicos regulem sua expressão gênica para ativar genes durante a infecção, induzindo a síntese e liberação de várias proteases não específicas, queratinase, lipase, elastase, nuclease, fosfatase, fosfolipase e enzimas mucinolíticas, dentre outras, para degradar macromoléculas e fazer uso de elementos mais simples (carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre) como fonte de nutrientes.

Como os principais componentes da membrana celular são proteínas e fosfolípidos, hidrolisados na desestabilização da membrana para a devida instalação dos fungos invasores (Apodaca & McKerrow, 1989), a secreção de proteases e fosfolipases é um importante fator de virulência para os dermatófitos no processo de digestão tecidual no hospedeiro. Essa ação já foi demonstrada em fungos patogênicos, como *C. albicans*, *C. dubliniense*, *T. mentagrophytes* var. *erinacei* *Penicillium notatum*, *C. neoformans*, *A. fumigatus* (Okumura *et al.*, 1980; Ghannoum *et al.*, 1994; Tsushima *et al.*, 1994; Birch *et al.*, 1996; Muhsin *et al.*, 1997; Fotadar & Al-Hedaithy, 2005; Kadir *et al.*, 2007), sugerindo que de fato estas enzimas são importantes para a efetivação de determinadas doenças. Estudos de caracterização fenotípica em diferentes isolados de *T. rubrum* e *M. canis* mostraram a assimilação de diferentes fontes de carbono, sendo todas as cepas capazes de secretar queratinases, proteinases e fosfolipases (Viani *et al.*, 2001; da Silva *et al.*, 2002).

Atividade lipolítica também foi observada em dermatófitos (*E. floccosum*, *M. canis*, *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*) após a adição de diferentes fontes de lipídeos em meio ágar, sendo quantificada a ação de lipases e fosfolipases em espécies do gênero *Trichophyton* e *Microsporum* (Hellgren & Vincent, 1980; Muhsin & Aubaid, 2001). A produção de lipases e esterases foi demonstrada em testes de plaqueamento em meio sólido e líquido. Um dos melhores substratos naturais para lipases secretadas é o óleo de oliva. Tween 60 e 80 também podem ser hidrolizados por dermatófitos (Muhsin & Aubaid, 2001). De acordo com a literatura disponível, ocorrem grandes diferenças na atividade lipolítica entre as várias espécies e linhagens de dermatófitos, sendo importante salientar que algumas enzimas que apresentam atividade contra lipídeos podem agir também em substratos queratinizados e em Sabouraud glucose-peptona devido às atividades mais abrangentes observadas, como é o caso da fosfolipase A (Shiba *et al.*, 2001; Hong *et al.*, 2005).

Já os transportadores presentes nas membranas que auxiliam na manutenção da composição citoplasmática de uma célula tanto em relação ao meio extracelular ou às organelas membranosas, também têm atividades relacionadas à patogenicidade de diversos organismos e na adaptação às alterações ambientais. Bactérias, leveduras e diversos fungos, bem como células especializadas de plantas e animais expressam proteínas de membrana para captação de aminoácidos, dipeptídeos e tripeptídeos (Fan *et al.*, 2002; Parisot *et al.*, 2002), sendo essenciais para regular a captação de nutrientes no meio, exclusão de metabólitos secundários ou de substâncias tóxicas.

Com uma gama de mecanismos metabólicos complexos que se interligam para a ativação da patogenicidade fúngica, é nítida a importância de conhecer mais detalhes acerca da expressão gênica dos dermatófitos. Utilizando cultivo em meio com proteínas e lipídeos para avaliar a interferência de diferentes fontes de carbono na expressão de genes ativadores de virulência e patogenicidade de fungos de interesse biomédico, é possível aprofundar o conhecimento acerca da adaptação, fisiologia e aspectos moleculares em fungos patogênicos.

1.5. Resposta de *T. rubrum* ao pH ambiente

É bem documentado que o pH homeostático governa o crescimento, diferenciação, fisiologia e viabilidade de todos os seres vivos, e que as células mudam a resposta de acordo com os fatores abióticos presentes. Os microrganismos possuem a capacidade de adaptar-se ao pH local modulando sua expressão gênica para ajustes fisiológicos adequados a cada ambiente. A expressão gênica na célula ocorre de forma coordenada em resposta a um sinal interno ou externo e dados comprovam que certos mecanismos de patogenicidade e de resistência a inibidores dependem direta ou indiretamente dos genes responsáveis pelo monitoramento do pH extracelular (Ferreira-Nozawa *et al.*, 2003; Li, 2004; Ferreira-Nozawa *et al.*, 2006).

Os fungos filamentosos *A. nidulans* e *N. crassa* são capazes de crescer em várias condições, mesmo com variações extremas de pH (Rossi & Arst, 1990; Bignell *et al.*, 2005). Para isto é necessário uma regulação do pH homeostático, a partir do monitoramento do pH extracelular. Assim, é possível direcionar a síntese de permeases e enzimas secretadas, como por exemplo, a secreção de fosfatase ácida em meio ácido e fosfatase alcalina em meio alcalino (Nahas *et al.*, 1982; Ferreira-Nozawa *et al.*, 2003). De Bernardis *et al* (1998) demonstrou a relação no controle da expressão dos genes PHR1 e PHR2 de *C. albicans* com as mudanças no pH ambiente, sendo estes expressos respectivamente acima e abaixo do pH 5.5. Davis *et al* (1999), também identificou linhagens responsivas ao pH ambiente deste mesmo patógeno (De Bernardis *et al.*, 1998; Davis *et al.*, 2002).

A ativação de várias enzimas proteolíticas liberadas no meio com atividade ótima em pH ácido, provavelmente porque a pele humana tem um pH levemente ácido, propicia o início da infecção. As proteinases ativas em meio ácido agem em substratos queratinizados ou não, liberando peptídeos que são hidrolisados em aminoácidos. Estes podem reprimir a síntese de proteases inespecíficas e induzir a produção de queratinases (Apodaca & McKerrow, 1989; Cutler, 1991). De acordo com o modelo proposto por Martinez-Rossi *et al* (2004) para a regulação de enzimas proteolíticas em função do pH, o dermatófito monitora o pH da pele ao iniciar a infecção, desreprimindo proteases não específicas e queratinases com atividade ótima em pH ácido enquanto reprimem queratinases efetivas em pH alcalino, gerando polipeptídeos pela digestão tecidual. Provavelmente, peptidases putativas clivam os polipeptídeos e geram fontes de carbono, nitrogênio e enxofre para a nutrição do fungo. A captação e metabolismo desses aminoácidos geram a alcalinização do meio, podendo levar à repressão de enzimas proteolíticas com ação em pH ácido e ativar queratinases com atividade ótima em pH alcalino, permitindo que a infecção se instale.

Figura 3: Modelo de infecção proposto para dermatófitos, baseado na regulação de enzimas proteolíticas secretadas em resposta ao pH ambiente. (Martinez-Rossi et al., 2004).

Genes responsivos ao pH já foram isolados em fungos filamentosos (Delgado-Jarana *et al.*, 2002; Brakhage *et al.*, 2004), sendo a regulação pelo pH descrita primeiramente em *N.crassa* (Nahas *et al.*, 1982), quando foi observado que a secreção de fosfatases ácidas e alcalinas eram dependentes do pH do meio. Em *A. nidulans* é conhecida a existência de genes alcalino-específicos e ácido-específicos. Os primeiros genes envolvidos no sensoriameto do pH ambiente foram identificados em *A. nidulans* (Caddick *et al.*, 1986), onde a resposta ao pH é mediada por uma via metabólica constituída pelo menos por 7 genes. Um deles é o fator de transcrição PacC em fungos, homólogo ao Rim101 de leveduras (Li, 2004), que apresenta regiões *zinc-fingers* (Cys2His2) como domínio que interage com regiões do DNA e atua na ativação da transcrição de genes alcalino-específicos e conseqüente repressão de genes ácido-específicos (Caddick *et al.*, 1986). Este modelo determina que a versão íntegra de pacC (PacC⁷²) é ativada por processamento pós-traducional em pH alcalino através de dois passos proteolíticos, nos quais remove-se o domínio C-terminal. Inicialmente a clivagem forma uma proteína intermediária (PacC⁵³) que sofre uma proteólise gerando a forma ativa PacC²⁷. O pH ambiente é decisivo para o primeiro passo da síntese do PacC ativo, que é resultado de uma cascata de sinalização para a correta ativação em pH específico. A interação no domínio C (entre os resíduos 529 e 678) previne o processamento sob condições inapropriadas de pH (Flaherty *et al.*, 2003).

Tal sistema de sinalização é composto por seis genes que foram clonados e seqüenciados: *pal* A, B, C, F, H e I (Orejas *et al.*, 1995; Maccheroni Jr. *et al.*, 1997; Denison, 2000; Arst & Penalva, 2003). Arst e Peñalva (2003) propuseram algumas alterações no modelo de regulação do pH inicialmente proposto por Caddick *et al* (1986), sugerindo que os genes *palI* e *palH* codificam proteínas transmembranas que funcionariam como sensores do pH externo (Peñalva & Arst, 2002). Já o produto do gene *palB* geraria

uma calpaína (cisteína protease) responsável pelo reconhecimento do sinal que envia sinal intracelular que efetiva a clivagem do fator de transcrição *pacC* em sua forma ativa, removendo então a porção de 180 aminoácidos na região C-terminal (Diez *et al.*, 2002). A ativação da transcrição de genes alcalino-específicos ocorre pelo reconhecimento de elementos *cis* na região promotora desses genes, enquanto que a repressão de genes ácido-específicos ocorre por inibição competitiva quando o *pacC* se sobrepõe ao sítio promotor e previne a ligação do fator de ativação *intA* (Denison *et al.*, 1995; Tilburn *et al.*, 2005). Essa resposta em pH alcalino é crucial mas parece ocorrer apenas após a transcrição, uma vez que não há evidências de que os genes *pal* sejam regulados pelo pH (Maccheroni Jr. *et al.*, 1997; Diez *et al.*, 2002; Rollins, 2003).

A via de sinalização pelo *pacC* regula muitos eventos metabólicos envolvidos no sensoramento do pH extracelular em diferentes níveis. Além da regulação do gene *pacC*, os elementos desta via também atuam na glicosilação dependente de pH de fosfatases secretadas por determinadas linhagens fúngicas, alterando o nível de carboidratos ligados as fosfatases ácidas e alcalinas, dependendo do pH ambiente (Nozawa *et al.*, 2003). A ativação da transcrição de genes alcalinos pela proteína *pacC* foi demonstrada experimentalmente para a síntese e secreção da Penicilina em *A. nidulans*, que ocorre preferencialmente em pH alcalino envolvendo um conjunto interligado de genes. Foram descritas mutações nos genes *pal* (A, B, etc), com alterações como o aumento dos níveis de fosfatases ácidas e a diminuição das fosfatases alcalinas quando o pH extracelular se encontrava neutro. Entretanto, mutação com remoção do gene *pacC* foi caracterizada por fenótipo semelhante ao crescimento em pH ácido (Tilburn *et al.*, 1995).

T. rubrum codifica uma proteína homóloga ao regulador transcricional *pacC* (*A. nidulans*) / Rim101p (*C. albicans*) da conservada via de sinalização do pH, tipo zinc-finger cuja transcrição é auto-induzida em meio de cultivo com pH alcalino. O gene *pacC* de *T.*

rubrum foi clonado, seqüenciado e nocauteado, conforme descrito por Ferreira-Nozawa *et al* (2006). Experimentos realizados com a linhagem mutante *pacC-1* teve a sua capacidade infectante reduzida quando cultivada em fragmentos de unha humana, correlacionando com a diminuição acentuada da atividade queratinolítica no meio de cultivo líquido suplementado com queratina. As habilidades de crescimento e capacidade queratinolítica foram comparadas com os resultados na linhagem selvagem H6, sendo evidente a diferença. Estes resultados sugerem que o desenvolvimento em queratina e a conseqüente degradação desta proteína típica de regiões infectadas pelo dermatófito *T. rubrum* está de alguma forma sob regulação do gene *pacC*, interferindo na secreção de proteases com ótima atividade em pH alcalino, necessárias para a manutenção da infecção.

1.6. Tratamento e resistência a drogas

Os fungos patogênicos são responsáveis pela maioria das doenças infecciosas em animais e plantas. Devido ao grande número de espécies fúngicas patogênicas, é crescente o interesse em abordagens para estudo de fisiologia, morfologia e análise genética, visando o aprofundamento de conhecimentos gerais e específicos que podem auxiliar na formulação de novas estratégias terapêuticas, para um ataque mais efetivo ao dermatófito. Um dos problemas no tratamento de infecções fúngicas é a ocorrência de linhagens resistentes a agentes antifúngicos encontrados no mercado, dificultando tratamentos e elevando os custos dos mesmos.

Com a emergência da AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida; SIDA em inglês) e o advento da terapia com antibióticos de largo espectro, bem como o tratamento de pacientes com doenças metabólicas crônicas, neoplásicos e transplantados com agentes citotóxicos e imunossupressores, tornou-se pouco clara a diferença entre fungos contaminantes e patogênicos (classicamente os agentes de micoses superficiais,

subcutâneas e profundas) (Surjushe *et al.*, 2007; Seebacher *et al.*, 2008). Agentes como *Aspergillus*, *Candida* e *Cryptococcus*, considerados antigamente como contaminantes de laboratório e, portanto, de pouca importância clínica, são agora conhecidos como causadores de doenças disseminadas em pacientes imunodeprimidos, como endocardites e infecções pulmonares (Sidrim & Rocha, 2004). Nessa nova conjuntura, os dermatófitos também se tornaram mais agressivos.

O uso repetido de antifúngicos no tratamento ou prevenção de infecções causadas por fungos e na preservação de alimentos e sementes leva frequentemente à ineficiência dos antimicóticos, devido ao surgimento ou seleção de linhagens fúngicas resistentes, com graves consequências econômicas e sociais. Esse efeito ameaça a saúde pública e dificulta tratamentos ao elevar os custos dos mesmos. Ademais, existem poucas classes químicas de antifúngicos disponíveis comercialmente e com um número de alvos limitados: o ergosterol e as enzimas de sua síntese, a síntese de ácidos nucleicos e da parede celular (DiDomenico, 1999). O ergosterol é o principal esterol da membrana plasmática do fungo, contribui para a fluidez e integridade da membrana e para o funcionamento adequado de enzimas da própria membrana celular, incluindo a quitina sintetase, uma enzima envolvida no crescimento e divisão celular (Georgopapadakou & Walsh, 1994; Sarifakioglu *et al.*, 2007). A resistência à drogas já foi documentada para todos antifúngicos largamente empregados em terapias, havendo uma necessidade crescente por novos antifúngicos de largo espectro de ação (Sarifakioglu *et al.*, 2007). É importante salientar que o fato da baixa diversidade em relação às classes de antimicóticos pode ser também um indício da existência de diferenças ainda não exploradas, entre o patógeno e o hospedeiro, que podem ser utilizadas no desenvolvimento de novas substâncias para interferir em funções essenciais dos fungos (Pena-Muralla, 2002).

Hashimoto & Blumenthal (1978) relataram, já na década de 70, resistência a nistatina pela espécie *T. mentagropytes*. No caso do *T. rubrum*, nos últimos anos alguns estudos foram realizados a respeito dos mecanismos de resistência a drogas e de outros processos que ocorrem durante a infecção (Hashimoto & Blumenthal, 1978; Fachin *et al.*, 2006; Maranhão *et al.*, 2007; Paião *et al.*, 2007; Coelho *et al.*, 2008; Martinez-Rossi *et al.*, 2008; Segato *et al.*, 2008). Entretanto, a busca de dados que auxiliem no desenvolvimento de novas drogas e na identificação e caracterização de novos alvos terapêuticos a partir de um criterioso estudo de genômica funcional ainda é constante e necessária, sendo crucial um maior entendimento da biologia dos fungos patogênicos, seja quanto à fisiologia ou aos aspectos moleculares e sistemas de adaptação a diferentes condições de estresse ambiental, assim como aprofundar o conhecimento das interações patógeno-hospedeiro.

Após o advento da Genômica Estrutural, estudos de seqüenciamento de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) foram conduzidos em diversos organismos para identificar as populações de mRNA expressas em determinadas condições ou etapas do desenvolvimento (transcriptoma) (Bouzidi *et al.*, 2007; Schumacher *et al.*, 2008), e o desenvolvimento desses projetos propiciou o surgimento de melhores metodologias que tornaram as análises da expressão gênica mais apuradas, como por exemplo com novas técnicas de hibridização subtrativa, SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) e *microarrays* (Kasuga *et al.*, 2005; Kronstad, 2006; Poggeler *et al.*, 2006).

Esta abordagem utilizando ESTs mostrou-se versátil, considerada rápida e econômica para identificar genes, e vem sendo cada vez mais utilizada para anotação de seqüências completas genômicas de organismos eucariotos, pois podem dar evidências biológicas para a previsão de centenas de genes (baseada em seqüências heterólogas) ou podem indicar a presença de novos genes preferencialmente expressos em certos tecidos ou células de organismos multicelulares (Franco *et al.*, 1995). Hoje, mais de dez milhões de

ESTs estão disponíveis no banco de dados de ESTs (dbEST) do GenBank e auxiliam nessa busca por dados moleculares no estudo do metabolismo fúngico (Tugendreich *et al.*, 1993). A nossa proposta de estudo da biologia do *T. rubrum* com ênfase na funcionalidade de alguns genes, como os potencialmente envolvidos na sua patogenicidade, é de interesse geral da comunidade científica, e a divulgação dos resultados representará um grande avanço nesta área.

É PRECISO NÃO ESQUECER NADA

É preciso não esquecer nada:
nem a torneira aberta nem o fogo aceso,
nem o sorriso para os infelizes
nem a oração de cada instante.

É preciso não esquecer de ver a nova borboleta
nem o céu de sempre.

O que é preciso é esquecer o nosso rosto,
o nosso nome, o som da nossa voz, o ritmo do nosso pulso.

O que é preciso esquecer é o dia carregado de atos,
a idéia de recompensa e de glória.

O que é preciso é ser como se já não fôssemos,
vigiados pelos próprios olhos severos conosco,
pois o resto não nos pertence.

CECÍLIA MEIRELES

2. Objetivos gerais e específicos

Tendo em vista a importância clínica do dermatófito *T. rubrum* devido à necessidade de controle epidemiológico, desenvolvimento de novos antifúngicos e de um maior entendimento acerca do metabolismo do mesmo, o presente trabalho teve como objetivo geral identificar genes diferencialmente expressos em função de nutrientes específicos e do pH de cultivo, visando caracterizar genes possivelmente envolvidos na fixação e manutenção do processo infeccioso por este patógeno no hospedeiro. Sendo assim, foram delimitados os seguintes objetivos específicos:

- Cultivar o *T. rubrum* em meio contendo componentes celulares característicos de tecidos epidérmicos (queratina e lipídeos) para avaliar a capacidade de crescimento e possíveis alterações na expressão gênica.
- Isolar genes diferencialmente expressos das linhagens de *T. rubrum* tratadas nas condições descritas através de técnicas de expressão diferencial, principalmente Biblioteca Subtrativa Supressiva;
- Clonar as seqüências de cDNAs diferencialmente expressas e identificar genes cujos produtos estejam envolvidos no metabolismo, secreção enzimática e obtenção de nutrientes no tecido hospedeiro;
- Usar ferramentas bioinformáticas para análises comparativas entre os transcriptomas de *T. rubrum* (nas condições ensaiadas) e de outros fungos patogênicos;
- Selecionar genes diferencialmente expressos e que sejam relevantes para a virulência e/ou patogenicidade de *T. rubrum* e validar por *northern blot*.

3. Materiais e Métodos

3.1. Linhagens

3.1.1. Linhagens fúngicas

A linhagem H6 de *T. rubrum* (ATCC MYA – 3108), isolada de paciente do sexo feminino acometida de *tinea pedis* no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), foi a principal cepa utilizada neste estudo. A H6 foi identificada por métodos morfológicos e bioquímicos padrões (McGinnis, 1980), e cedida pela Dra. Cláudia M. Leite Maffei do Setor de Micologia do Departamento de Biologia Celular Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP. O estoque da linhagem H6 de *T. rubrum* foi mantido em placas de Petri contendo meio Ágar Dextrose Sabouraud, com repiques periódicos, e armazenados em estufa climatizada a 28°C. Morfologicamente em meio Sabouraud, a linhagem apresenta colônias brancas de aspectos cotonoso e denso, com o reverso sem pigmentação devido às sucessivas repicagens, além de conídios claviformes.

Outra linhagem utilizada no nosso trabalho foi a CBS118892, de *T. rubrum*, cedida pelo Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS Holanda) e alvo de futuro seqüenciamento através de consórcio internacional, tendo sido utilizada para a obtenção de cDNAs subtraídos após crescimento em fonte lipídica. As linhagens mutantes $\Delta pacC$ -1 e $\Delta TruMDR2$ de *T. rubrum*, obtidas após disrupção gênica do gene regulatório *pacC* e no transportador MDR, respectivamente (Fachin *et al.*, 2006; Ferreira-Nozawa *et al.*, 2006), também foram utilizadas para experimentos de *northern blots* e infecção *in vitro*.

3.1.2. Linhagens bacterianas

Para a propagação de plasmídeos recombinantes (pGEM[®]-T) durante as etapas de clonagem, foram utilizadas células competentes pMOS *Blue* de *Escherichia coli*, que apresentam a seguinte constituição genotípica: *endA1*, *hsdR17* (*r_{k12}-m_{k12}*) *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, *lac* [F', *pro A⁺B⁺*, *lac 1^q* ZΔM15, Tn10 (Tc^R)].

Para a manutenção, *E. coli* foi cultivada em meio LB líquido com tetraciclina (15 µg/mL) por 12 a 24 horas a 37 °C. Após preparar alíquotas de 1 mL e adição de glicerol estéril (70%), foram estocadas a -80 °C para descongelamento de alíquotas apenas no momento do uso.

3.2. Meios de cultura

3.2.1. Meio Mínimo - MM (Cove, 1966)

Solução de sais	20 mL
Água destilada (q.s.p)	1000 mL

O meio mínimo foi suplementado com glicose (55 mM) e nitrato de sódio (70 mM), com o pH ajustado em 6,8 não tamponado. O meio foi autoclavado a 1 atm de pressão e 120 °C por 20 minutos.

3.2.2. Meio Sabouraud modificado (Atlas, 1993)

Glicose	20 g
Peptona	10 g
Água destilada (q.s.p.)	1000 mL

O pH do meio foi ajustado para 5,7. O meio foi autoclavado a 1 atm de pressão a 120 °C por 20 minutos, tendo sido adicionado agar 1,5% para o preparo do meio sólido.

3.2.3. Meio LB (Luria e Bertani) (Sambrook *et al.*, 1989)

Triptona	10g
Extrato de levedura	5g
Cloreto de potássio	0,2g
Cloreto de sódio	0,6g
Água destilada (q.s.p.)	1000 mL

O pH do meio foi ajustado para 7,4. O meio foi autoclavado a 1 atm de pressão e 120 °C por 20 minutos. Para o preparo do meio sólido foi adicionado ágar para uma concentração final de 1,5% (m/v).

3.2.4. Meio com queratina (0,25%)

Queratina (Promega)	2,5g
Água destilada (q.s.p.)	1000 mL

O pH do meio foi ajustado para 5,0, não tamponado. O meio foi autoclavado a 1 atm de pressão e 120 °C por 20 minutos.

3.3. Soluções e tampões

3.3.1. Solução de elementos-traço (Cove, 1966)

Borato de sódio decahidratado	40 mg
Sulfato de cobre pentahidratado	400 mg
Sulfato de ferro heptahidratado	532 mg
Sulfato de manganês monohidratado	292 mg
Molibdato de sódio bihidratado	800 mg
Sulfato de zinco heptahidratado	2 g
Água destilada esterilizada (q.s.p.)	250 mL

Solução foi mantida sob clorofórmio a 4 °C.

3.3.2. Solução de sais (Cove, 1966)

Cloreto de potássio	26 g
Sulfato de magnésio heptahidratado	26 g
Fosfato de potássio monobásico	76 g
Solução de elementos-traço	50 mL
Água destilada esterilizada (q.s.p.)	1000 mL

Solução foi mantida sob clorofórmio a 4 °C.

3.4. Soluções utilizadas em experimentos de Biologia molecular

3.4.1. Soluções para Eletroforese

3.4.1.1. Água livre de RNase (Sambrook *et al.*, 1989)

A água destilada necessária para o preparo de todas as soluções utilizadas na extração de RNA e elaboração do gel desnaturante, bem como na lavagem de material de uso exclusivo para o RNA, evitando a contaminação com RNase, teve a adição de 0,1% (v/v) de DEPC (Dietilpirocarbonato). Esta solução foi incubada a 37 °C por 18-20 horas com leve agitação, sendo autoclavada em seguida por 30 minutos, a 1 atm de pressão e 120 °C.

3.4.1.2. Gel para corrida eletroforética de RNA (Sambrook *et al.*, 1989)

A agarose foi dissolvida em água tratada com DEPC (1,5 %) por aquecimento, e após leve resfriamento foram adicionadas as seguintes soluções: Formaldeído e tampão de corrida MOPS 5X. As quantidades são de acordo com o volume do aparato eletroforético e a concentração de agarose necessária.

Após a solidificação do gel, as amostras (5 µL) foram preparadas com 10 µL de “*Loading Buffer* para RNA”, as mesmas foram denaturadas através de incubação a 65 °C por 15 minutos e colocadas imediatamente no gelo para resfriamento. A seguir, as

amostras foram aplicadas no gel e submetidas à eletroforese por 4 V/cm em tampão de corrida MOPS 1x.

3.4.1.3. Loading Buffer para RNA

Água DEPC	930 µL
MOPS 10X	150 µL
Formamida	240 µL
Glicerol	100 µL
Azul de Bromofenol	80 µL
Brometo de etídio	5 µL

Solução preparada em tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e estocada a -20 °C.

Preparado com água livre de RNase (DEPC) e mantido em frasco escuro à temperatura ambiente.

3.4.1.4. Tampão de migração para RNA (MOPS 5X)

MOPS (3-(N-morpholino) propanesulphonic acid) pH 7,0	100 mM
Acetato de sódio	40 mM
EDTA pH 8,0	5 mM

Preparado com água livre de RNase (DEPC), o pH ajustado para 7.0 e mantido em frasco escuro à temperatura ambiente.

3.4.1.6. Tampão TAE (Tris-Acetato) (Sambrook *et al.*, 1989)

Tris-base	242 g
Ácido acético glacial	57,1 mL
EDTA 0,5M	100 mL
Água destilada (q.s.p)	1000 mL

O pH foi ajustado para 8,0 e a solução autoclavada a 1 atm de pressão e 120 °C por 20 minutos.

3.4.2. Soluções utilizadas na extração de DNA plasmidial

3.4.2.1. Solução I

Glicose	50 mM
Tris-HCl	25 mM
EDTA pH 8,0	10 mM

O pH foi ajustado para 8,0 e a solução foi autoclavada a 1 atm de pressão e 120 °C e estocada a 4 °C.

3.4.2.2. Solução II

SDS	1% (m/v)
Hidróxido de sódio	0,2 M

A solução de SDS foi autoclavada separadamente e o NaOH foi adicionado no momento do uso.

3.4.2.3. Solução III

Acetato de potássio	60 mL
Ácido acético glacial	11,5 mL
Água destilada (q.s.p.)	100 mL

O pH foi ajustado para 8,0 e a solução foi autoclavada a 1 atm de pressão e 120 °C e estocada a 4 °C.

3.4.3. Soluções utilizadas no tratamento das membranas para os experimentos de *reverse Northern Blot* e *southern blot*

3.4.3.1. Solução desnaturante

Hidróxido de sódio	0,5 M
Cloreto de sódio	1,5 M

Solução autoclavada a 1 atm de pressão e 120 °C por 20 minutos e mantida à temperatura ambiente.

3.4.3.2. Solução neutralizante

Tris-base pH 7,4	1,0 M
Cloreto de sódio	1,5 M

Solução autoclavada a 1 atm de pressão e 120 °C por 20 minutos e mantida à temperatura ambiente.

3.4.3.3. Solução SSC 20X pH 7,0 para tratamento de gel de agarose e membranas

Cloreto de sódio	175,3 g
Citrato de sódio	88,2 g
Água destilada (q.s.p.)	1000 mL

Solução autoclavada a 1 atm de pressão e 120 °C por 20 minutos e mantida à temperatura ambiente.

3.4.3.4. Solução de hibridação

Dextran Sulfato	5 g
SSC 20X	25 mL
SDS 10% (m/v)	1 mL
Líquido bloqueador	5 mL
Água deionizada (q.s.p.)	100 mL

3.4.3.5. Solução de lavagem I

EDTA pH 8,0	1 mM
SDS	5%
Tampão fosfato de sódio pH 7,5	40 mM

3.4.3.6. Solução de lavagem II

SDS	0,1%
Tampão fosfato de sódio pH 7,5	40 mM

3.4.3. Tampão TE

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

3.4.4. Soluções utilizadas no tratamento das membranas para os experimentos de *Northern Blot*

3.4.4.1. Tampão de hibridação (Church Buffer)

EDTA 0,5 M	1 mL
Na ₂ PO ₄	17,45 g
H ₃ PO ₄ 85%	1 mL
Caseína 1% hidrolisada	5 g
SDS	35 g
Água deionizada (q.s.p.)	500 mL

3.4.4.2. Solução de Lavagem I

SSC 20 x	100 mL
SDS 10%	20 mL
Água deionizada (q.s.p.)	1000 mL

3.4.4.3. Solução de lavagem II

SSC 20 x	2,5 mL
SDS 10%	5 mL
Água deionizada (q.s.p.)	1000 mL

3.4.5. Soluções utilizadas na síntese de cDNA e construção de Biblioteca Subtrativa

Supressiva

As soluções, oligonucleotídeos, adaptadores e tampões utilizados nestas metodologias estão descritas ou acompanham os kits SMARTTM *PCR cDNA Synthesis Kit* e *PCR Select cDNAs subtraction kit* (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA).

3.4.6. Soluções para experimentos de transformação bacteriana

3.4.6.1. Solução de X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside)

(Sambrook *et al.*, 1989)

A solução estoque de X-gal foi preparada em N, N-dimetilformamida na concentração de 20 mg/mL. Esta solução foi mantida a -20 °C em frasco escuro para evitar a fotodegradação.

3.4.6.2. Solução de IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) (Sambrook *et*

***al.*, 1989)**

A solução estoque de IPTG foi preparada dissolvendo-se IPTG na concentração de 1 M em água destilada esterilizada, sendo aliquoteada e mantida a -20 °C.

3.5. Suspensão de conídios

Após cultivo em meio Sabouraud Ágar (Eto *et al.*) por 15 dias a 28 °C, a linhagem H6 de *T. rubrum* teve o micélio coletado com espátula estéril e depositado em tubos contendo solução salina (0,9%) estéril, suplementada com 0,01% de Tween 80 (v/v) para facilitar a liberação dos conídios. O material foi agitado vigorosamente para desagregar a massa conidial, com posterior filtração em lã de vidro e centrifugação por 10 minutos. O precipitado formado foi ressuspensionado em solução salina estéril, obtendo assim um concentrado de conídios estimado em câmara de Neubauer e usado na etapa seguinte.

3.6. Metodologia para obtenção de bibliotecas de cDNAs diferencialmente expressos

3.6.1. Cultivo e exposição a diferentes fontes de carbono

3.6.1.1. Queratina e glicose (Biblioteca TRSSHQue)

A suspensão de conídios foi transferida para 100 mL de meio Sabouraud líquido (Eto *et al.*) e mantida sob agitação por 72 horas a 28 °C para estimular a germinação dos conídios e a formação de hifas. Após esse período, o micélio obtido foi filtrado em papel esterelizado Whatman (Whatman International, Maidstone, UK) e dividido igualmente em diferentes *erlenmeyers* contendo 100 mL de meio mínimo (Cove *et al.*, 1966) com pH inicial 5,0, parte deles contendo queratina (2,5 g/L) (Invitrogen), e outra parte glicose (55 mM) como únicas fontes de carbono, ambas suplementadas com fonte de nitrogênio (solução de nitrato a 70 mM). Os frascos foram mantidos a 28 °C sob agitação por diferentes períodos (6 h; 12 h; 24 h; 48 h; 72 h e 7 dias). Após determinado período de incubação nos meios contendo queratina, lipídeo ou glicose, o micélio resultante foi filtrado em papel Whatman num sistema à vácuo e estocado a -80 °C até a etapa de extração de RNA total. O cultivo em meio contendo glicose foi utilizado como controle da indução gênica em relação aos experimentos com as outras fontes de carbono (Teste 1 e teste 2). Para controles negativos, os meios de cultivo correspondentes foram incubados sem inóculos. Ao final de todos os experimentos, o pH final dos meios foi aferido para registrar possíveis alterações durante o cultivo.

3.6.1.2. Lipídeo e glicose (Biblioteca TRSHLip)

A suspensão de conídios foi processada como descrito acima, dividindo o material final retirado do meio SAB em diferentes *erlenmeyers* contendo 100 mL de meio mínimo (Cove *et al.*, 1966) com pH inicial 5,0, parte deles contendo azeite de oliva (1 %) como fonte lipídica, e outra parte glicose (55 mM), únicas fontes de carbono, ambas

suplementadas com fonte de nitrogênio (solução de nitrato a 70 mM). Os frascos foram mantidos a 28 °C sob agitação por 72 h. O micélio resultante foi filtrado em papel Whatman num sistema à vácuo e estocado a -80 °C até a etapa de extração de RNA total. Ao final de todos os experimentos, o pH final dos meios foi aferido para registrar possíveis alterações durante o cultivo.

3.6.2. Extração e purificação de RNA total

Inicialmente, todo o material necessário para a extração de RNA total foi tratado com solução de NaOH 0,5 N e enxaguado com água livre de RNase. Esta etapa foi realizada com o *RNA Isolation Kit* - Gentra System[®] ou Trizol[®] reagente (Invitrogen), este último adotado durante experimentos de *northern blot*. Para a extração com o Kit Gentra System[®], os micélios de *T. rubrum* tratados separadamente em diferentes condições foram pesados individualmente (100 mg) e macerados para homogeneização na solução de lise celular (3 mL), adicionando-se em seguida 1 mL da solução de precipitação de proteína-DNA. Após 5 minutos de incubação e 3 minutos de centrifugação, o material resultante foi precipitado com 3 mL de isopropanol e após centrifugação, lavado com 1 mL de etanol 70% para a última etapa de centrifugação e o descarte do sobrenadante. A secagem foi feita à temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, o material final contendo RNA foi ressuspensionado em 30 µL de água livre de RNase e estocado a -80 °C. Na extração com o Trizol[®], os micélios foram separadamente macerados com o reagente (100 mg de cada) em suporte adequado contendo nitrogênio líquido, sendo o RNA total de cada amostra isolado de acordo com as instruções do fabricante e estocado a -80 °C.

Todas as amostras de RNA total foram tratadas com a enzima DNase, adicionando-se os seguintes reagentes a 10 µL de cada amostra: 1 µL de tampão da DNase I (10x) ; 1 µL de DNase I Amp Grade (1U/µL); 15µL de água livre de RNase (q.s.p.). A concentração

de RNA da amostra foi determinada em GeneQuantTM calculator (Amersham Biosciences), pela absorbância das preparações a 260 nm, utilizando como valor padrão, $1A_{260} = 40 \mu\text{g/mL}$ de RNA, e o grau de pureza avaliado através das razões A_{260}/A_{280} , que deve ser próxima a 2,0. A qualidade dos RNAs também foi observada através de fracionamento em gel de agarose (1,5%) com formaldeído por 4 V/cm em tampão MOPS 1X, após desnaturação a 65 °C em tampão de corrida apropriado. O preparo do gel foi efetivado de acordo com Sambrook *et al.* (1989), sendo o resultado final documentado em sistema digital Kodak[®] e todas as amostras estocadas a -80 °C até o momento do uso.

3.6.3. Obtenção de RNA poli (A)

O RNA poli (A) foi obtido pela utilização do kit *PolyA Tract Isolation System* (Promega) a partir de 5 mg de RNA total, inicialmente incubado a 65 °C por 10 minutos, em seguida sendo adicionado 10 μL de sonda oligo (dT) biotinizada e 60 μL de SSC 20x. A mistura foi homogeneizada e conservada à temperatura ambiente até o resfriamento. Todo o conteúdo foi misturado a *streptavidin-paramagnetic particles* (AS-PMPs) previamente lavados com SSC 20x e incubados por 10 minutos à temperatura ambiente, misturando-se a cada 2 minutos. As AS-PMPs foram capturadas pela ação de uma estante magnética para que o sobrenadante fosse cuidadosamente removido, sendo as partículas lavadas 4 vezes com SSC 0,1x. O precipitado de AS-PMPs foi ressuspendido em 1 mL de água livre de RNase. Novamente foi utilizada a estante magnética para capturar as AS-PMPs e o RNA poli (A) eluído foi transferido para novos tubos estéreis. A concentração do RNA poli (A) isolado foi determinada por espectrofotômetro e a sua integridade verificada em gel de agarose desnaturante (1%) com formaldeído como descrito anteriormente.

3.6.4. Construção de Biblioteca Subtrativa seguida de PCR Supressivo (Subtractive suppression hybridization; SSH)

Esta metodologia visa a comparação entre duas populações de cDNAs oriundos de diferentes fontes, permitindo a identificação de um conjunto de genes que se expressam em uma condição específica de teste. A geração de cDNA dupla fita e a construção das bibliotecas foram efetivadas utilizando-se o SMARTTM PCR *cDNA Synthesis Kit* e o PCR – *Select cDNA Subtraction*[®] *kit* (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA), respectivamente, tendo como testes os cDNAs obtido a partir da linhagem H6 cultivada em meio na presença de queratina (1) (Forward) e lipídeo (2), e como controle a mesma linhagem cultivada em glicose. Foi realizada uma segunda hibridização supressiva invertendo as condições teste 1 e controle para que o produto final fosse utilizado nos experimentos de confirmação.

3.6.4.1. Síntese de cDNA fita simples

Os RNAs extraídos de *T. rubrum* obtidos a partir de micélio tratado nas diferentes condições descritas anteriormente (testes e controle) foram usados para síntese de cDNAs através do kit SMARTTM PCR *cDNA Synthesis Kit*, conforme instruções do fabricante, baseando-se na transcrição reversa a partir do RNA total e a amplificação dos cDNAs gerados. O kit faz uso da atividade transferase terminal da enzima transcriptase reversa (RT) para ancorar iniciadores na região 5' terminal de todos os cDNAs sintetizados, gerando sítios de ligação para o primer poli (T) específico usado na síntese da primeira fita. Ao chegar à porção 5' final do RNAm, a enzima catalisa a adição de uma pequena região de citosinas na fita de cDNA sintetizada, devido ao fato do kit apresentar um iniciador que contém uma região rica em guaninas, anela com o poli (C) adicionado e passa a servir

como molde para a RT. A reação para síntese da primeira fita de cDNA foi realizada da seguinte forma:

RNA total	1 µg (1-3 µL)
3'BD Smart CDS Primer IIA (12 µM)	1 µL
BD Smart IIA oligonucleotide (12 µM)	1 µL
Água deionizada estéril (q.s.p.)	5 µL

As amostras foram incubadas a 72 °C por 2 minutos, resfriadas em gelo e centrifugadas rapidamente. Em seguida, foram adicionados os reagentes a cada amostra:

5x First-strand Buffer	2 µL
DTT (20 mM)	1 µL
dNTP Mix (10 mM de cada dNTP)	1 µL
BD Power Script reverse transcriptase	1 µL

Após a incubação durante 1 hora a 42 °C, as amostras foram diluídas com 40 µL de TE e estocadas a -20 °C, ou utilizadas imediatamente para a geração da segunda fita do cDNA.

3.6.4.2. Síntese de cDNA fita dupla

A 2ª fita foi sintetizada através de reação de cadeia da polimerase à longa distância (*Long Distance PCR*; LD-PCR), uma etapa que necessita de otimização dos números de ciclos para cada amostra, evitando que teste e controle cheguem ao “platô” da reação para manter as diferenças quantitativas de cada cDNA diferencialmente expresso. Foi utilizada uma amostra diluída de cada tubo da primeira reação e adicionados os reagentes descritos abaixo:

10x BD advantage 2 PCR	10 µL
50x dNTP (10m mM de cada dNTP)	2 µL
5'PCR Primer IIA (12)	2 µL
50x advantage 2 Polymerase Mix	2 µL
Água deionizada estéril (q.s.p.)	74 µL

As amostras foram submetidas ao termociclador aquecido a 95 °C por 2 minutos, com a seguinte ciclagem: 95 °C (15''); 65 °C (30''); 68 °C (6'); 4 °C (∞), com o número de ciclos determinado para cada amostra na padronização. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio e corrido em tampão TAE 1x.

Figura 4: Representação esquemática da síntese de cDNA fita dupla a partir do Kit SMART® da Clontech.

Tabela 1: Sequência dos oligonucleotídeos para uso na RT-PCR

Tipo	Sequência
3' SMART™ CDS Primer II A	5' AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT(30) VN 3'
5' PCR Primer II A	5' AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT 3'
Smart II™ A oligonucleotídeo	5' AAGCAGTATGGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG 3'

3.6.4.3. Purificação dos cDNAs

O produto final da amplificação foi purificado em colunas CHROMA SPIN-1000, seguindo as instruções contidas no SMART PCR *cDNA Synthesis Kit User Manual*. Para isso, em cada amostra foi adicionado igual volume de Fenol: Clorofórmio: Álcool iso-amilico (25:24:1) para uma vigorosa agitação e centrifugados a 20.817 g por 10 minutos. A fase superior foi removida e transferida para um novo tubo estéril contendo 700 µL de N-butanol, seguidos de leve homogeneização e centrifugação por 1 minuto a 20.817 g. Posteriormente a fase orgânica (superior) foi retirada e o material concentrado (cerca de 40-70 µL) aplicado nas colunas de cromatografia CHROMA SPIN-1000 (teste e controle separadamente) para ressuspensão e subseqüentes aplicações de tampão TNE 1x. Após averiguar o material em gel de agarose 1,2 % corado com brometo de etídio, as amostras de cDNAs purificadas foram quantificadas em espectrofotômetro (260 nm) considerando-se o valor padrão $1A_{260} = 50 \mu\text{g/mL}$ de DNA.

3.6.4.4. Digestão com *RsaI*

Cada amostra purificada foi digerida com a enzima *RsaI* (Invitrogen), com objetivo de normalizar o tamanho dos fragmentos e gerar sítio de ligação para os adaptadores (1 e 2R) na etapa seguinte. A reação abaixo foi efetivada para a digestão:

Tampão de restrição da enzima (10x)	40 µL
<i>RsaI</i> (10U/µL)	1,5 µL
cDNA fita dupla	320 µL
Água Milli-Q® (q.s.p.)	400 µL

A digestão foi incubada a 37 °C por 3 horas. Separou-se 5 µL da reação para a análise da eficiência da digestão em gel de agarose 1,5% (m/v), sendo adicionados ao restante das reações separadamente 2,5 µL do *Mix* EDTA/Glicogênio 20X. Cada amostra digerida foi purificada utilizando-se o kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare).

3.6.4.5. Ligação dos adaptadores no cDNA teste

A amostra de cDNA teste purificada foi dividida em dois tubos diferentes para a ligação dos adaptadores 1 e 2R, ou seja, apenas nas moléculas de cDNA diferencialmente expressas na condição testada (queratina ou lipídeo). Cada um desses adaptadores apresenta uma sequência diferente que funciona como sítio para anelamento de um iniciador, e uma única extremidade fosforilada para permitir a ligação nos fragmentos de cDNA. Esta etapa é fundamental para o funcionamento adequado da etapa seguinte de subtração. Para isso a reação foi realizada adicionando-se os seguintes componentes:

Reagentes	Tubo 1 (adaptador 1)	Tubo 2 (adaptador 2R)
Água deionizada	3µL	3 µL
Tampão de ligação	2 µL	2 µL
T4 DNA ligase	1 µL	1 µL
cDNA tester diluído (1:5)	2 µL	2 µL
Adaptador 1	2 µL	—
Adaptador 2	—	2 µL
Volume final	6 µL	6 µL

As diferentes alíquotas foram incubadas a 16 °C por 18 horas e a reação interrompida acrescentando-se 1 µL do Mix EDTA/Glicogênio (20x), seguida de incubação a 72 °C por 5 minutos para inativação da T4 DNA ligase.

3.6.4.6. Etapas da hibridização subtrativa

Uma vez com os adaptadores 1 e 2R foram ligados aos cDNAs das amostras teste, seguiu-se para o início das hibridizações subtrativas. Na primeira hibridização os cDNAs de todas as amostras foram desnaturados a 98 °C, sendo adicionado cDNA controle em excesso a cada tubo de amostra teste com seus devidos adaptadores e subsequente diminuição da temperatura para 68 °C durante 8 horas, permitindo a renaturação de parte das amostras. As moléculas mais abundantes se anelam com mais facilidade e há formação de 5 tipos diferentes de moléculas: (1) cDNA teste não hibridizado; (2) cDNA teste hibridizado com moléculas iguais; (3) cDNA teste hibridizado com cDNA controle; (4) cDNA controle hibridizado com moléculas iguais ou (5) somente cDNA controle, livre de hibridização. Ou seja, as moléculas comuns de cada tubo teste se hibridizam, separando esses cDNAs que não são de interesse no estudo. Para a realização desta etapa, 1,5 µL de cada tubo (Teste com adaptador 1 e teste com adaptador 2R) foi separada para adição de:

cDNA controle digerido com <i>RsaI</i> (desnaturado – 98°C por 1'30'')	1,5 µL
Tampão de hibridização 4x	1 µL
Água deionizada (q.s.p.)	4 µL

Na segunda etapa, ocorre a junção dos materiais oriundos da primeira hibridização (amostras com diferentes adaptadores contidas nos tubo 1 e tubo 2) que foram hibridizadas antes separadamente, com a adição de amostras controle em excesso e desnaturadas e posterior incubação a 68 °C por 18 horas. Após esta incubação, foi

adicionado 100 μL de tampão de diluição e a amostra aquecida a 68 °C por 7 minutos, tendo sido estocada a -20 °C até o momento do uso. Essa etapa diminui o *background*, e apenas as moléculas de cDNA fita simples diferencialmente expressas podem se associar, formando novos híbridos. Esses novos híbridos são cDNAs fita-dupla com diferentes seqüências nas extremidades que correspondem aos diferentes adaptadores ligados. A reação foi feita como descrita abaixo:

cDNA teste 1 e 2R (1,5 μL de cada cDNA)	3 μL
cDNA controle digerido com <i>RsaI</i> (desnaturado a 98°C por 1'30'')	1,5 μL
Tampão de hibridação 4x	1 μL
Água deionizada (q.s.p.)	4 μL

3.6.4.7. PCRs primária e secundária

Após as duas hibridizações, o material foi submetido a uma primeira reação de PCR com um único tipo de iniciador para amplificar apenas os cDNAs diferencialmente expressos, excluindo por exemplo as seqüências sem adaptadores ou com adaptadores únicos. Neste caso, o iniciador é único para as seqüências das extremidades mais externas dos cDNAs que possuem diferentes adaptadores. Então, foi realizada uma amplificação exponencial com o cDNA da reação anterior diluído (1:100), de acordo com os seguintes parâmetros:

Tampão da Taq 10x	2,5 μL
MgCl ₂ 50mM	1,5 μL
dNTP (1,25mM)	4 μL
Oligonucleotídeo 1 (10 μM)	1 μL
cDNA diluído	3 μL
Taq polimerase (5U/ μL)	0,5 μL
Água deionizada (q.s.p.)	25 μL

Foi realizada uma incubação (5 minutos) antes do programa de ciclagem para que os adaptadores fossem estendidos, gerando um adequado sítio para o iniciador, sendo submetidos ao seguinte programa no termociclador: 94 °C (30''); 66 °C (30''); e 72 °C (1'30'') por 30 ciclos.

Após a diluição da reação anterior (3 µL de cDNA em 27 µL de água deionizada), foi preparada uma nova PCR tipo *Nested* com o objetivo de reduzir o *background* e enriquecer a amostra de genes diferencialmente expressos. Foram adotados os mesmos parâmetros indicados na PCR primária, substituindo-se o oligonucleotídeo 1 pelos oligonucleotídeos *Nested* 1 e 2 (10µM cada).

O programa de ciclagem utilizado foi: 94 °C (30''); 68 °C (30''); e 72 °C (1'30''), após 15 ciclos: 4 °C (∞). Nesta etapa, amplificações inespecíficas são eficientemente suprimidas e apenas as moléculas diferencialmente expressas amplificadas para culminar numa amostra final enriquecidas dos cDNAs de interesse. Após a *Nested* PCR (amostra com transcritos diferencialmente expressos da condição teste obtidos por SSH), as amostras foram aplicadas em gel de agarose 2% (m/v) e submetidas à corrida eletroforética. Após a eletroforese, os fragmentos com mais de 150 pb foram recortados do gel com auxílio de um bisturi e o material transferido para um tubo de microcentrifuga (cerca de 300 mg/tubo) esterelizado e identificado, separando-os de acordo com os pesos moleculares (200-400 pb; 400-500 pb; 500-700 pb; 700-1 kb; 1,5 kb). Em seguida, realizou-se a extração das bandas de DNA do gel utilizando o Kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE). O produto purificado de cada amostra foi concentrado em Speed-Vac (Eppendorf) e ligado em vetor, como descrito posteriormente.

Figura 5: Esquema do procedimento de subtração de cDNA com o uso de PCR supressivo. Boxes marcados ou em aberto representam partes distintas dos adaptadores 1 e 2 (Gurskaya et al., 1996).

3.6.5. Clonagem dos fragmentos de cDNA diferencialmente expressos obtidos por SSH

Os fragmentos obtidos após técnicas de análise da expressão diferencial (SSH) e purificados em colunas GFX foram ligados (cerca de 200 ng) em vetor pGEM[®]-T (50 ng), numa reação com 1 µL (5U) de T4 DNA ligase e 5 µL de tampão da enzima com 10 mM tris-acetato, 10 mM acetato de magnésio e 50 mM acetato de Potássio, incubada a 16 °C por 18 horas. O produto de cada reação foi utilizado em transformações bacterianas com células competentes, conforme descrito abaixo.

3.6.5.1. Obtenção de células competentes

A linhagem pMOS *Blue* de *E. coli* foi inoculada em 5mL de meio LB contendo tetraciclina (15 µg/mL), a partir de uma célula isolada obtida do estoque, sendo então cultivada por 12-24 horas a 37 °C. A seguir, 3mL desta cultura foram inoculados em 250 mL de meio de cultura LB e cultivados por aproximadamente 2 horas e 30 minutos ou até que uma absorvância de 0.4-0.5, a 550 nm, fosse atingida. A cultura foi colocada em banho de gelo por 15 minutos e centrifugada 5.000 g por 10 minutos a 4 °C. As células foram ressuspendidas em 125 mL de solução I (Tris-HCl pH 7,5 10mM; cloreto de cálcio 50mM), incubadas em gelo por 15 minutos e centrifugadas a 5.000 g por 10 minutos a 4 °C. O precipitado foi suspenso em 3,5 mL de solução II (Tris-HCl pH 7,5 10 mM; cloreto de cálcio 10 mM; glicerol 15 % (v/v)). As células foram aliquotadas, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80 °C.

3.6.5.2. Transformação bacteriana

Essa etapa objetivou a inserção das moléculas recombinantes (DNA + Vetor) em células bacterianas competentes (linhagem pMOS *Blue* de *E. coli.*) pelo método de transformação por choque térmico. Uma alíquota de 200 µL de células competentes foi descongelada em gelo, sendo adicionado cerca de 50 a 100 ng de DNA transformante. Esta mistura foi incubada em gelo por 30 minutos e posteriormente aquecida a 42 °C por 40 segundos. As células foram imediatamente incubadas em gelo por 2 minutos e 1 mL de meio LB foi adicionado, seguindo-se uma incubação por 1 hora a 37 °C. Reservadamente, foram preparadas placas de Petri contendo meio de cultura LB ágar acrescido de 50 µg/mL de ampicilina, 15 µg/mL de tetraciclina, IPTG e X-gal (Sambrook *et al.*, 1989), para cada amostra, tendo sido preparado controles negativos e positivos. As placas inoculadas foram incubadas por 18-20 horas a 37 °C para posterior repicagem de todas as colônias brancas, correspondentes àquelas bactérias que receberam os plasmídeos contendo insertos de cDNAs culminando na ativação do sistema de seleção IPTG/X-gal. Todo o material clonado foi então estocado a -80 °C para análises posteriores.

3.7. Micropreparação em larga escala

A extração de DNA plasmidial foi efetivada com a finalidade de eliminar todos os outros componentes celulares, inclusive o DNA genômico. Os clones foram repicados em placas 96 *deep well* contendo meio de cultura LB líquido acrescido de ampicilina (50 µg/mL) e tetraciclina (15 mg/mL) para cultivo a 37 °C por 18 horas, em agitador a 250 rpm. Decorrido este período, as placas foram centrifugadas por 6 minutos a 3.220 g, o sobrenadante descartado e a placa invertida para rápida secagem.

Foi adicionado a cada poço 240 µL de Solução I, selou-se a placa com adesivo e esta foi agitada (*vortex*) por 2 minutos, para ressuspender bem as células, seguindo-se com uma centrifugação de 6 minutos, 3.220 g e o sobrenadante dispensado. Posteriormente, foi preparado um mix contendo 17,6 mL de Solução I e 550 µL RNase (10 mg/mL) para duas placas, sendo adicionado 85 µL em cada poço para forte agitação (*vortex*) durante 2 minutos cada placa. Numa placa tipo Elisa (fundo U), foram transferidos 60 µL da suspensão de células de cada poço, sendo adicionado a cada 60 µL de NaOH/SDS 10%. As placas foram seladas e o conteúdo misturado por inversão (10x). Após breve centrifugação, foi adicionado a cada poço 60 µL de acetato de potássio (KOAc), sendo novamente misturadas por inversão, e submetidas à incubação de 10 minutos a temperatura ambiente. O adesivo foi removido de cada placa e estas dispostas na estufa a 90 °C para incubação por 30 minutos. Durante este período, foi fixada uma placa filtro Millipore no topo de uma microplaca tipo Elisa fundo V. Após um rápido resfriamento em gelo por 5 minutos, foi realizada uma centrifugação de 4 minutos a 3.220 g, sendo todo o volume transferido para a placa com filtro, evitando a transferência dos debris celulares. Foi efetivada uma centrifugação de 8 minutos, o filtro descartado e adicionado 110 µL de isopropanol. As placas foram seladas e centrifugadas por 45 minutos (3.220 g/20 °C), o sobrenadante descartado e as mesmas invertidas para uma breve centrifugação e adição de 200 µL de etanol 70 %. Após uma centrifugação de 10 minutos para a lavagem e descarte do sobrenadante, as placas foram secas a 65 °C e o material ressuspensionado em 25 µL de água deionizada e esterelizada, sendo estocado a -20 °C.

3.8. Validação dos experimentos de expressão gênica diferencial

O método de *reverse northern blot* (Dilks *et al.*, 2003) foi realizado para confirmar a expressão gênica diferencial, através da análise dos clones recombinantes gerados nas bibliotecas subtrativas após fixação em membrana de náilon. Estas foram expostas às sondas marcadas com fluoraceína ou radioativo, seguindo protocolo adotado neste laboratório e descrito a seguir.

3.8.1. Amplificação dos clones para preparo de membranas (PCR da cultura bacteriana)

Os clones bacterianos selecionados das bibliotecas foram cultivados em placas tipo *deep well* com meio de cultura LB contendo ampicilina (50 µg/mL) e tetraciclina (15 µg/mL) e mantidas a 37 °C por 24 horas sob agitação (250 rpm). Dois microlitros de cada cultura foram utilizados em uma reação de PCR descrita abaixo, com a seguinte ciclagem: 94 °C (2'); 35 ciclos com 94 °C (30''); 68 °C (45''); 72 °C (1'30''); e 72 °C (10').

1X tampão da <i>Taq</i> DNA polimerase	2 µL
<i>primers</i> Nested 1 e Nested 2 (10 µM cada)	1µL de cada
dNTPs (1,25 mM)	4 µL
Cloreto de magnésio (1,5 mM)	1,5µL
<i>Taq</i> DNA polimerase (5 U/µL)	0,3µL
Água deionizada (q.s.p.)	20 µL

O produto final foi resolvido em gel de agarose 1,2% nas devidas condições para avaliação, procedendo-se para o preparo das membranas.

3.8.2. Fixação de amostras em membranas

Cerca de 300 ng de cada produto de PCR obtido foram diluídos em tampão TE (pH 7,6) e fixados em membrana de náilon Hybond N⁺ (GE Healthcare) utilizando transferência à vácuo com aparelho específico para *dot blot* (96 amostras em cada membrana). Em seguida, as membranas foram tratadas em papéis-filtro umedecidos separadamente durante 5 minutos em cada solução: Solução desnaturante; solução neutralizante; e SSC 2X. Após o tratamento, as membranas secaram a temperatura ambiente por 20 minutos e as amostras foram fixadas por exposição à luz ultra violeta durante 2 minutos em cada lado.

3.8.3. Preparo das sondas e marcação a frio

Cinquenta ng do *pool* de cDNAs diferencialmente expressos oriundos da *Nested-PCR* (SSH) foram desnaturados e utilizados como sonda, sendo efetivada a estratégia de marcação a frio com os Kits *Genes Images Random Prime Labeling Module* (marcação da sonda) e *Gene Image CDP-Star Detection Module* (revelação) (GE Healthcare). Inicialmente, procedeu-se com a pré-hibridização das membranas em solução de hibridação (5x SSC; 0,1 % SDS; 5 % dextran sulfato; líquido bloqueador diluído 20 vezes) para marcação a frio por 1 hora a 60 °C. A seguir, a sonda marcada foi adicionada a esta solução e as membranas hibridizadas a 60 °C por 18 horas. Após este período, seguiram-se duas lavagens a 60 °C, a primeira com uma solução de SSC 1X e SDS 0,1 % (m/v) e a segunda com uma solução de SSC 0,5X e SDS 0,1 % (m/v). Em seguida, incubou-se a membrana em uma solução de líquido bloqueador e tampão A (1:10) durante 1 hora a temperatura ambiente. A detecção da marcação foi realizada com o kit descrito acima, que é composto por um anticorpo anti-fluoresceína conjugado com fosfatase alcalina (*anti-fluorescein alkaline phosphatase AP conjugate*) diluído em albumina bovina sérica 0,5 %

(m/v), preparada com tampão A (Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 300 mM). A incubação com o anticorpo deu-se por 1 hora à temperatura ambiente, com três lavagens em uma solução 0,3 % de Tween 20 (v/v) preparada com tampão A, para remover o excesso de conjugado. O reagente de detecção foi colocado sobre a membrana e esta foi exposta em filme fotográfico por cerca de 2-18 horas.

3.9. Sequenciamento automático

A reação de sequenciamento foi efetivada com o *Kit Big Dye Terminator Cycle Sequence Ready Reaction*, que contém nucleotídeos (adenina – dATP; guanina – dGTP; citosina – dCTP e timina – dTTP) adicionados pela DNA polimerase II Thermo sequenase na síntese nucleotídica. Também presente no kit estão os dideoxinucleotídeos (ddATP; ddGTP; ddCTP e ddTTP) marcados com corantes fluorescentes (fluoraceína e rodamina) e que foram utilizados como bloqueadores da reação e solução para aplicação no gel (70 % de formamida e 1mM EDTA). Utilizou-se 200 a 400 ng de DNA, 5 pmol do oligonucleotídeo universal M13 *forward* ou *reverse* e 2 µL de *Big Dye* e o programa de PCR utilizado para as reações de seqüenciamento foi: 96 °C (2’); 96 °C (2’’); 52 °C (30’’) e 60 °C (4’) por 39 ciclos. Após a ciclagem, as amostras foram precipitadas com 80 µL de isopropanol 75 % (v/v), incubadas por 15 minutos no escuro à temperatura ambiente e centrifugadas a 5.000 g por 45 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, seguindo-se duas lavagens com etanol 70 % (v/v) gelado, centrifugando a 5.000 g por 10 minutos a 4 °C. Após a secagem, as amostras foram ressuspensas em 2,5 µL de *Loading Color*, aplicando-se 0,7 µL em gel de poliacrilamida no sequenciador *ABI Prism 377* (Perkin Elmer).

Enquanto os fragmentos de DNA migravam através do gel para a separação eletroforética, um laser excitou a fluoraceína (idêntica para as 4 bases nitrogenadas) e esta em seguida excitou a rodamina (diferente para cada base). Os cromóforos emitiram sinais em forma de cromatograma, onde os picos produzidos representavam as bases nitrogenadas identificadas através de diferentes cores, as quais foram traduzidas em sequências lineares.

3.10. Análise da expressão dos genes selecionados por *northern blot*

3.10.1. Eletroforese de RNA em gel de agarose-formaldeído e preparo da membrana de náilon

Após corrida eletroforética em gel 1,5 % de agarose-formaldeído desnaturante com quantidades iguais de RNA para cada amostra e marcador de peso molecular específico, o gel de RNA foi tratado com solução de NaOH 0,05 N por 20 minutos, lavado com água livre de RNase e mantido em solução SSC 20x durante 45 minutos. Os RNAs foram transferidos para membranas de náilon Hybond N⁺ (GE Healthcare) por capilaridade. Para isso, foi montado um sistema de gradiente constituído de folhas de papel de filtro umedecidas em solução SSC 20x, uma membrana umedecida em solução SSC 10x e folhas de papel filtro em SSC 2x, seguidos de vários papéis absorventes. Após a transferência o/v (*over/night*), as amostras foram fixadas à membrana através da exposição da mesma por 2 minutos na luz UV de cada lado.

3.10.2. Preparo da sondas de cDNAs

Os clones selecionados dos experimentos de expressão diferencial para confirmação dos genes foram cultivados em meio de cultura LB líquido suplementado com ampicilina (50 µg/mL) e tetraciclina (15 µg/mL), mantidas a 37 °C por 24 horas sob

agitação (200 rpm). Em seguida, 2 µL da cultura foram utilizados em uma reação de PCR contendo:

1X tampão da <i>Taq</i> DNA polimerase	2 µL
oligonucleotídeo universal M13 (<i>forward</i> e <i>reverse</i> ; 10 pmol)	1 µL de cada
dNTPs (10 mM)	1 µL
Cloreto de magnésio (1,5 mM)	1,5 µL
<i>Taq</i> DNA polimerase (5 U/µL)	0,3 µL
Água deionizada (q.s.p.)	20 µL

O programa utilizado foi: 94 °C (2'); 30 ciclos com 94 °C (30''); 68 °C (45''); 72 °C (1'30'') durante 35 ciclos. Após a amplificação, todas as amostras foram purificadas separadamente com o Kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare) e corridas em gel de agarose 1,2 % para confirmar a qualidade. Após a desnaturação da sonda (50-100 ng) por 7 minutos a 95 °C, esta foi marcada radioativamente pela adição de Mix contendo os seguintes componentes:

Tampão	15µL
dATP	2 µL
dGTP	2 µL
dTTP	2 µL
<i>Klenow</i>	1µL
Água deionizada (q.s.p.)	50 µL

A reação de marcação foi realizada adicionando-se 5 µL de dCTP P³² seguindo com uma incubação a 37 °C em termociclador por 1 hora, para que a fita de nucleotídeos marcada fosse gerada, procedendo-se para uma breve purificação em coluna *Sephadex*

(Life Sciences) e nova desnaturação (5 minutos a 95 °C) para a mistura na solução de hibridização (procedimento descrito abaixo).

3.10.3. Pré-hibridização e Hibridização (*Northern Blot*)

As membranas foram pré-hibridizadas durante 2-6 horas a 65° C em tampão de hibridização (EDTA 1 mM; 17,45 g Na₂PO₄; 1 mL de H₃PO₄ 85 % (v/v); 5g de Caseína hidrolisada 1%, SDS 7%). A seguir, a sonda radioativamente marcada foi adicionada à solução de hibridização e incubada a mesma temperatura por 18 horas. As membranas foram lavadas com a solução I (SSC 2x, SDS 0,2 %) e II (SSC 0,05x; SDS 0,05 %) e a seguir expostas em *screenings* e reveladas no *Cyclone* (Perkin Elmer).

3.11. Análise das sequências isoladas através de Bioinformática

As sequências de cDNA obtidas foram analisadas através de ferramentas computacionais com programas bioinformáticos, auxiliando na análise da expressão gênica diferencial. Primeiramente, foi feita uma análise por comparação através do *site* do NCBI com o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool - www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) (Altschul *et al.*, 1997), para buscar similaridades com sequências depositadas no *GenBank* (NR). Os clones identificados como proteínas hipotéticas tiveram suas sequências submetidas à busca por similaridade de domínios e/ou *motifs* protéicos no programa InterProScan do EMBL (European Bioinformatics Institute), disponível no endereço eletrônico <http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>. Os pontos marcados nas membranas foram quantificados utilizando o programa *Image J*, disponível na rede pelo endereço eletrônico <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, sendo obtida uma razão entre os pontos teste e controle.

3.12. Infecção *in vitro* com as linhagens H6 e $\Delta TruMDR2$ de *T. rubrum*

Os ensaios de infecção *in vitro* com as linhagens H6 (selvagem) e $\Delta TruMDR2$ (mutante) (Fachin *et al.*, 2006) foram realizados conforme descrito anteriormente (Takasuka, 2000), com o objetivo de avaliar a interferência do nocaute no gene *TruMDR2* enquanto os fungos estão em contato com a queratina. Fragmentos de unha humana foram recortados com aproximadamente 1x1 mm, dispostos em uma placa de petri estéril com etanol durante 15 minutos. Após a secagem em temperatura ambiente, esses fragmentos foram arranjados em placa tipo Elisa de 96 poços para o inóculo com 5 μ L de suspensão conidial (3×10^6 conídios/mL) de cada linhagem testada. Após 1 h à temperatura ambiente, adicionou-se 200 μ L de água destilada esterelizada e o experimento seguiu-se por 6 dias a 28 °C. Após o período de incubação, o material foi analisado através de microscopia óptica de epifluorescência equipado com sistema de imagem digital (Axion vision system Zeiss). Os controles foram elaborados a partir de fragmentos de unha sem inóculo de conídios.

NÃO ENTENDO

Isso é tão vasto que ultrapassa qualquer entender.
Entender é sempre limitado.
Mas não entender pode não ter fronteiras.
Sinto que sou muito mais completa quando não entendo.
Não entender, do modo como falo, é um dom.
Não entender, mas não como um simples de espírito.
O bom é ser inteligente e não entender.
É uma benção estranha, como ter loucura sem ser doida.
É um desinteresse manso, é uma doçura de burrice.
Só que de vez em quando vem a inquietação:
quero entender um pouco.
Não demais: mas pelo menos entender que não entendo.

CLARICE LISPECTOR

4. Resultados

4.1. Estabelecimento das condições de cultivo e verificação de alterações do pH durante o crescimento de *T. rubrum* em diferentes fontes de carbono (queratina, lipídeo e glicose)

Para avaliar possíveis alterações no pH com a atividade metabólica de *T. rubrum* e identificar genes preferencialmente envolvidos na resposta do *T. rubrum* à queratina e lipídeo (Que; Lip), os micélios foram tratados com uma mistura heterogênea de queratina (teste 1) (raspados de cornos e cascos de animais) e 1% de azeite de oliva puro (teste 2), sendo a glicose (Taglicht & Michaelis) escolhida como suplemento na condição controle dos experimentos, uma vez que se trata de uma molécula simples e não-proteica, e assim o metabolismo basal não seria excessivamente alterado. Os conídios de *T. rubrum* foram cultivados por 6h, 12h, 24h, 48h, 72h e 7 dias em meio mínimo suplementado separadamente com Que, Lip ou Glic (pH inicial 5,0), além de fonte de nitrogênio em ambos. Após vários testes, as condições ideais de cultivo foram delimitadas e optou-se pelo inóculo da suspensão de conídios em meio Sabouraud líquido com cultivo por 72 horas a 28 °C, e imediata transferência da massa micelial gerada para os meios de testes e controle. A mesma metodologia foi aplicada no preparo do cultivo das linhagens H6, $\Delta pacC$ -1 (Que/Glic), CBS118892 e $\Delta TruMDR2$ (Lip/Glic) de *T. rubrum*.

O pH foi aferido durante todos os cultivos, sendo observado o aumento gradativo do pH basal do meio mínimo com queratina e lipídeo durante os períodos de tratamento pré-estabelecidos (Tabela 2). Na condição controle Glic não houve alteração significativa do pH em relação à condição Que. Resultados semelhantes foram observados durante o cultivo das linhagens H6, CBS118892 e $\Delta TruMDR2$ de *T. rubrum* em fonte lipídica (Lip), quando o pH do meio após 72 horas de cultivo de todas as linhagens alcalinizou, enquanto

o controle do experimento, onde o fungo cresceu em meio mínimo com glicose, não ultrapassou 5,7.

Tabela 2: Alteração do pH quando várias linhagens de *T. rubrum* foram cultivadas em meio mínimo com glicose (controle) (55 mM), queratina (teste 1) (2,5g/L) e fonte lipídica (teste 2) (1 %).

Tempo	pH final							
	Linhagem H6				Linhagem CBS118892		Linhagem Δ TruMDR2	
	Glic	Que	Glic	Lip	Glic	Lip	Glic	Lip
6 h	5,1	5,5	5,0	5,0	4,9	4,9	4,9	4,9
12 h	4,8	5,6	5,1	5,2	5,0	5,3	4,4	5,0
24 h	4,6	6	4,9	5,3	4,9	5,8	4,3	5,1
48 h	4,8	7,8	5,0	5,4	4,6	6,0	4,5	5,8
72 h	4,7	8,4	4,8	5,6	5,7	7,4	4,9	7,0
7 dias	5,2	8,3	4,3	7,0	4,3	7,2	4,4	7,1

pH inicial de todas as condições: 5,0.

Glic: Condição controle cultivado em glicose.

Que: Condição teste 1 cultivado em queratina.

Lip: Condição teste 2, cultivo em fonte lipídica.

4.2 Biblioteca Subtrativa Supressiva utilizando a linhagem H6 (TRSSHQue72):

Condição teste com queratina após 72 h de cultivo e *reverse northern blot*

Nesta etapa, o uso da hibridização subtrativa seguida de PCR supressivo teve como objetivo a seleção de genes preferencialmente expressos por *T. rubrum* cultivado em queratina (*forward*). Para obtenção de sonda utilizada nos experimentos de *reverse northern blot*, foram subtraídos cDNAs obtidos na presença de glicose como teste (*reverse*). O micélio de *T. rubrum* submetido às condições Que e Glic (72 horas) foi utilizado para extração de RNA total e obtenção do RNA poli (A), seguindo-se com a síntese de cDNAs (dupla fita), etapas de hibridizações e PCRs específicas. Ao final das reações de PCR, os híbridos de cDNAs representavam os genes diferencialmente expressos na condição teste de cada biblioteca. A extração de RNA total, síntese de cDNA dupla fita e *Nested PCR* da biblioteca TRSSHQue72 estão apresentadas na Figura 6.

Figura 6: Etapas resumidas da construção da biblioteca TRSSHQue: (A) Gel de agarose-formaldeído desnaturante 1,5% com RNA total das condições controle-glicose (G) e teste-queratina (Q); (B) Gel agarose 1,2% com 1 kb DNA ladder (PM) e cDNA fita dupla das condições G e Q; (C) Gel de agarose 1,2% com λ HindIII (PM) e o produto de *Nested PCR*.

Os fragmentos clonados variaram entre 0,15-2,0 kb (Fig. 6), e os clones brancos selecionados pelo sistema do gene *LacZ* (IPTG/X-gal) foram coletados para distribuição em placas de 96 poços (totalizando 6 placas) para cultivo em meio líquido LB, estoque e posterior amplificação por PCR, utilizando oligonucleotídeos com sequências idênticas aos utilizados na *Nested* PCR. Dessa forma, as sequências dos adaptadores nas extremidades de cada cDNA clonado foram praticamente excluídas do produto final da PCR. Os insertos amplificados dispostos em membranas de náilon foram rastreados através de *reverse northern blot* (Fig. 7) para a seleção dos clones preferencialmente expressos na condição teste Que, sendo utilizada também a sonda de cDNAs oriundos da *Nested* PCR da biblioteca *reverse* (condição Glic), como indicado, para excluir os falsos positivos marcados. Os clones com sinais intensos após a hibridização com sonda Que foram avaliados após seqüenciamento.

Biblioteca TRSSHQue

Figura 7: Reverse Northern Blot. Autoradiografias apresentando o rastreamento de clones. Seis membranas em duplicata contendo clones da Biblioteca Subtrativa de *T. rubrum* (TRSSHQue) (forward), hibridizadas com sonda de pool de cDNAs obtidos na Nested-PCR da condição controle (Taglicht & Michaelis) e teste (Que).

4.2.1. Sequenciamento e análise bioinformática

Foram gerados 576 clones contendo insertos diferencialmente expressos durante o contato com queratina. Todo o material foi sequenciado e os eletroferogramas analisados no programa *Phred* (Ewing & Green, 1998), que determina valores referentes à qualidade dos picos correspondentes a cada base, e o *Crossmatch* (<http://www.phrap.org>) aplicado para indicar a região vetorial em cada sequência. Os resultados foram organizados com o programa CAP3 para gerar os *contigs* e *singlets* e visualizados através do *Consed*. Duzentos e quarenta e uma (241) sequências se agruparam em 35 *contigs* e as restantes como *singlets*. Todas foram analisadas automaticamente por comparação no banco de dados de sequências não redundantes (NR) do NCBI, e após a seleção das sequências com alta qualidade foi gerada a Tabela 3. Através do algoritmo BLASTx, as sequências dos *contigs* e *singlets* foram avaliadas e os resultados obtidos tiveram como parâmetro de aceitação, um *e-value* igual ou menor que 10^{-3} , que confirma a obtenção de alinhamento com similaridade confiável por estar mais próximo de zero e diminui a probabilidade do alinhamento ter ocorrido casualmente.

Tabela 3: Contigs e singlets identificados a partir de sequências expressas no dermatófito *T. rubrum* após tratamento com queratina durante 72 h.

Nome	Acesso GenBank	pb	Anotação funcional; Organismo	Nº clones	E-value	Ident (%)
Contig Q-1	FE526298	435	Leucine Rich Repeat domain protein; <i>Aspergillus clavatus</i>	8	3e-10	40.86
Contig Q-2	FE526255	777	kynurenine aminotransferase, putative; <i>Neosartorya fischeri</i>	2	8e-55	75.74
Contig Q-3	FE526251	190	DNA polymerase gamma; <i>Aspergillus terreus</i>	3	4e-22	74.19
Contig Q-4	FE526258	735	NIMA interactive protein; <i>Emericella nidulans</i>	9	8e-06	33.09
Contig Q-5	FE526254	371	cytochrome P450nor; <i>Aspergillus oryzae</i>	4	6e-16	56.47
Contig Q-6	FE526268	176	copper-sulfate regulated protein; <i>Ajellomyces capsulatus</i>	2	7e-18	84.62
Contig Q-7	FE526252	520	multidrug resistance protein MDR; <i>Trichophyton rubrum</i>	9	9e-23	86.89
Contig Q-8	FE526257	284	ribosomal protein/carboxylic ester hydrolase (Ppe1), putative; <i>Neosartorya fischeri</i>	7	3e-25	63.64
Contig Q-9	FE526275	459	hypothetical protein Afu3g08320; <i>Aspergillus fumigatus</i>	3	3e-07	45.45
Contig Q-10	FE526297	143	nonribosomal peptide synthase; <i>Alternaria brassicae</i>	6	4e-07	72.22
Contig Q-11	FE526301	198	hypothetical protein CIMG_06490; <i>Coccidioides immitis</i>	7	2e-10	57.81
Contig Q-12	FE526306	275	glycerophosphodiester phosphodiesterase, cytosolic; <i>Herminiimonas arsenicoxydans</i>	4	1e-07	56.00
Contig Q-13	FE526370	720	glucosamine-6-phosphate deaminase, putative; <i>Aspergillus fumigatus</i>	11	2e-55	77.10
Contig Q-14	FE526478	682	oligopeptide transporter; <i>Neosartorya fischeri</i>	4	9e-43	55.73
Contig Q-15	FE526362	102	heat shock Hsp30-like protein, putative; <i>Aspergillus clavatus</i>	2	2e-07	75.00
Contig Q-16	FE526534	812	oligopeptide transporter; <i>Aspergillus clavatus</i>	13	1e-45	69.23
Contig Q-17	FE526367	300	Sem similaridade	2	-	-
Contig Q-18	FE526368	701	Sem similaridade	2	-	-
Contig Q-19	FE526388	268	oligopeptide transporter; <i>Neosartorya fischeri</i>	2	4e-21	65.33
Contig Q-20	FE526510	787	hypothetical protein CIMG_03466; <i>Coccidioides immitis</i>	9	7e-08	65.22
Contig Q-21	FE526330	375	Sem similaridade	2	-	-
Contig Q-22	FE526523	755	Sem similaridade	23	-	-
Contig Q-23	FE526545	727	Sem similaridade	6	-	-

<i>Contig Q-24</i>	FE526434	733	Sem similaridade	4	-	-
<i>Contig Q-25</i>	FE526480	691	glucosamine-6-phosphate deaminase; <i>Coccidioides immitis</i>	5	1e-16	55.79
<i>Contig Q-26</i>	FE526350	215	V-type ATPase, B subunit, putative; <i>Neosartorya fischeri</i>	15	1e-20	88.68
<i>Contig Q-27</i>	FE526467	760	subtilisin-like protease SUB5; <i>Trichophyton rubrum</i>	44	1e-40	78.18
<i>Contig Q-28</i>	FE526464	757	subtilisin-like protease SUB3; <i>Trichophyton rubrum</i>	4	5e-25	90.62
<i>Contig Q-29</i>	FE526458	853	MFS peptide transporter, putative; <i>Aspergillus clavatus</i>	3	2e-10	42.17
<i>Contig Q-30</i>	FE526512	711	ENSANGP00000027824; <i>Anopheles gambiae</i> str. PEST	2	6e-13	65.96
<i>Contig Q-31</i>	FE526327	746	oligopeptide transporter; <i>Aspergillus clavatus</i>	9	2e-13	73.08
<i>Contig Q-32</i>	FE526529	711	Sem similaridade	4	-	-
<i>Contig Q-33</i>	FE526537	823	Sem similaridade	7	-	-
<i>Contig Q-34</i>	FE526552	222	DUF895 domain membrane protein; <i>Aspergillus fumigatus</i>	2	4e-18	67.19
<i>Contig Q-35</i>	FE526522	340	hypothetical protein CIMG_00654; <i>Coccidioides immitis</i>	1	5e-04	80
<i>Singlet Q-1</i>	FE526280	449	pol protein; <i>Glomerella cingulata</i>	1	2e-43	66.94
<i>Singlet Q-2</i>	FE526317	285	Sem similaridade	1	-	-
<i>Singlet Q-3</i>	FE526320	250	MFS transporter, putative; <i>Aspergillus clavatus</i>	1	4e-11	47.89
<i>Singlet Q-4</i>	FE526322	277	Sem similaridade	1	-	-
<i>Singlet Q-5</i>	FE526329	180	hypothetical protein CIMG_04750; <i>Coccidioides immitis</i>	1	9e-07	63.41
<i>Singlet Q-6</i>	FE526335	444	ISCps6, transposase; <i>Colwellia psychrerythraea</i>	1	2e-11	58.93
<i>Singlet Q-7</i>	FE526336	247	Sem similaridade	1	-	-
<i>Singlet Q-8</i>	FE526340	382	Sem similaridade	1	-	-
<i>Singlet Q-9</i>	FE526342	175	cytochrome P450 phenylacetate hydroxylase, putative; <i>Aspergillus fumigatus</i>	1	2e-18	81.48
<i>Singlet Q-10</i>	FE526346	633	peptide transporter PTR2A; <i>Hebeloma cylindrosporum</i>	1	1e-11	44.44
<i>Singlet Q-11</i>	FE526352	738	glucosamine-6-phosphate deaminase, putative; <i>Aspergillus fumigatus</i>	1	6e-49	73.91
<i>Singlet Q-12</i>	FE526353	626	glucosamine-6-phosphate deaminase; <i>Coccidioides immitis</i>	1	8e-45	81.18
<i>Singlet Q-13</i>	FE526356	237	metalloprotease Mep3; <i>Trichophyton equinum</i>	1	8e-41	98.72
<i>Singlet Q-14</i>	FE526360	631	glucosamine-6-phosphate deaminase; <i>Coccidioides immitis</i>	1	9e-31	51.61
<i>Singlet Q-15</i>	FE526364	411	Sem similaridade	1	-	-
<i>Singlet Q-16</i>	FE526366	655	MFS transporter, putative; <i>Aspergillus fumigatus</i>	1	4e-35	48.67
<i>Singlet Q-17</i>	FE526369	432	benzoate 4-monooxygenase cytochrome P450, <i>Aspergillus clavatus</i>	1	3e-35	68.87

<i>Singlet Q-18</i>	FE526372	696	Sem similaridade	1	-	-
<i>Singlet Q-19</i>	FE526377	123	Sem similaridade	1	-	-
<i>Singlet Q-20</i>	FE526391	482	CHK1 checkpoint homolog ; <i>Saccharomyces pombe</i>	1	7e-08	77.78
<i>Singlet Q-21</i>	FE526396	644	subtilisin-like protease SUB5; <i>Trichophyton verrucosum</i>	1	3e-28	78.21
<i>Singlet Q-22</i>	FE526402	384	Sem similaridade	1	-	-
<i>Singlet Q-23</i>	FE526403	362	oxalate decarboxylase; <i>Bacillus licheniformis</i>	1	2e-09	35.09
<i>Singlet Q-24</i>	FE526406	399	Sem similaridade	1	-	-
<i>Singlet Q-25</i>	FE526410	66	Sem similaridade	1	-	-
<i>Singlet Q-26</i>	FE526415	283	phytanoyl-CoA dioxygenase family protein; <i>Neosartorya fischeri</i>	1	1e-18	63.01
<i>Singlet Q-27</i>	FE526416	684	hypothetical protein, unknown function; <i>Leishmania major</i>	1	7e-07	61.54
<i>Singlet Q-28</i>	FE526417	314	transposase domain protein; <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	1e-22	60.71
<i>Singlet Q-29</i>	FE526418	417	K+/H+ antiporter, putative; <i>Neosartorya fischeri</i>	1	4e-41	70.25
<i>Singlet Q-30</i>	FE526419	358	gamma interferon inducible lysosomal thiol reductase (GILT), putative; <i>Aspergillus clavatus</i>	1	3e-06	55.56
<i>Singlet Q-31</i>	FE526422	55	Sem similaridade	1	-	-
<i>Singlet Q-32</i>	FE526436	493	hypothetical protein CIMG_06605; <i>Coccidioides immitis</i>	1	8e-44	53.25
<i>Singlet Q-33</i>	FE526437	251	Ribosomal protein S7e; <i>Aspergillus fumigatus</i>	1	9e-31	84.21
<i>Singlet Q-34</i>	FE526439	501	Hypothetical protein CBG22239; <i>Caenorhabditis briggsae</i>	1	2e-12	50.59
<i>Singlet Q-35</i>	FE526446	496	glucosamine-6-phosphate deaminase; <i>Coccidioides immitis</i>	1	4e-22	61.76
<i>Singlet Q-36</i>	FE526452	685	oligopeptide transporter; <i>Aspergillus clavatus</i>	1	2e-21	57.89
<i>Singlet Q-37</i>	FE526453	135	Sem similaridade	1	-	-
<i>Singlet Q-38</i>	FE526454	232	urease accessory protein UreD; <i>Aspergillus clavatus</i>	1	2e-06	50.91
<i>Singlet Q-39</i>	FE526455	56	Sem similaridade	1	-	-
<i>Singlet Q-40</i>	FE526461	673	formin 2; <i>Homo sapiens</i>	1	9e-06	85.71
<i>Singlet Q-41</i>	FE526463	87	Sem similaridade	1	-	-
<i>Singlet Q-42</i>	FE526468	455	Sem similaridade	1	-	-
<i>Singlet Q-43</i>	FE526481	294	protein MGM1, mitochondrial precursor; <i>Aspergillus terreus</i>	1	3e-41	89.36
<i>Singlet Q-44</i>	FE526494	348	hypothetical protein CIMG_00073; <i>Coccidioides immitis</i>	1	1e-25	59.26
<i>Singlet Q-45</i>	FE526497	744	hCG1793893; <i>Homo sapiens</i>	1	2e-05	33.16
<i>Singlet Q-46</i>	FE526499	260	sterol 24-C-methyltransferase; <i>Aspergillus terreus</i>	1	7e-23	64.38

<i>Singlet Q-47</i>	FE526508	532	short chain dehydrogenase, putative; <i>Aspergillus clavatus</i>	1	1e-25	85.71
<i>Singlet Q-48</i>	FE526509	242	extracellular lipase, putative; <i>Neosartorya fischeri</i>	1	5e-19	63.01
<i>Singlet Q-49</i>	FE526513	920	unnamed protein product; <i>Aspergillus niger</i>	1	4e-12	64.10
<i>Singlet Q-50</i>	FE526514	713	cholinesterase; <i>Aspergillus terreus</i>	1	2e-08	44.64
<i>Singlet Q-51</i>	FE526515	726	arginine transporter, putative; <i>Aspergillus clavatus</i>	1	6e-17	57.50
<i>Singlet Q-52</i>	FE526519	131	hypothetical protein CIMG_04750; <i>Coccidioides immitis</i>	1	1e-07	63.16
<i>Singlet Q-53</i>	FE526521	353	flotillin domain protein; <i>Aspergillus fumigatus</i>	1	4e-16	56.41
<i>Singlet Q-54</i>	FE526535	89	Sem similaridade	1	-	-
<i>Singlet Q-55</i>	FE526541	705	small GTPase RanA; <i>Emericella nidulans</i>	1	2e-40	76.92
<i>Singlet Q-56</i>	FE526376	576	hypothetical protein CIMG_07037; <i>Coccidioides immitis</i>	1	1e-06	35

Analisando a anotação funcional disposta na Tabela 3, observa-se que diversos clones da biblioteca TRSSHQ apresentaram similaridades com sequências de fungos como os patogênicos *A. fumigatus* e *C. immitis* e com outros dermatófitos. Dois *contigs* (Q-27 e Q-28) apresentaram alta similaridade (identidade entre 78-91%) com *subtilisin-like* proteases de *T. rubrum*, respectivamente tipos 5 e 3, conhecidos como fatores de virulência de dermatófitos. Transcritos similares a metaloproteases (MEPs) também foram isolados, como o *contig* Q-3 que apresenta dois clones alinhados com uma Mep 4 de *T. tonsurans* (*e-value* $2e^{-41}$), enquanto o *singlet* Q-13 é similar a Mep 3 do *T. equinum*, ambas com 99 % de identidade.

Muitos transcritos de transportadores foram isolados após o cultivo de *T. rubrum* em queratina. O *contig* Q-29 e os *singlets* Q-3 e Q-16 são representados por clones confirmados através de *reverse northern blot* com alta similaridade com uma sequência de transportador tipo MFS (*e-values* $2e^{-10}$, $4e^{-11}$ e $4e^{-35}$) de *A. clavatus*. As sequências dos clones envolvidos neste *contig* foram analisadas no InterProScan, o que revelou um *motif* conservado para transportadores de peptídeos tipo PTR2-A. Outro transportador identificado nos alinhamentos com 9 clones sobrepostos num *contig* de 520 pb, foi do tipo MDR (*multidrug resistance*) de *T. rubrum*, da grande família de transportadores ABC, com *e-value* $9e^{-23}$ e 88% de identidade. Dois clones no *contig* Q-6 apresentaram homologia com um transportador ATPases de cobre de *A. fumigatus* e do fungo saprófita e termoresistente *Neosartorya fischeri*, que teve seu genoma recentemente sequenciado pela TIGR (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/nfa1/>). Vários outros transportadores de *N. fischeri* foram isolados (*contig* Q-14 e Q-19), como V-type ATPase (*contig* Q-26) que auxilia na manutenção do pH intracelular ideal para o metabolismo fúngico e uma bomba de nitrogênio/hidrogênio (K^+/H^+) (*singlet* Q-29), além de permeases transportadoras de

oligopeptídeos e aminoácidos similares a sequências de *A. clavatus* (*contigs* Q-16 e Q-31; *singlet* Q-16 e Q-51).

Uma proteína TINA interativa de NIMA quinase de *Emericella nidulans* (anamorfo de *A. nidulans*) foi identificada (*contig* Q-4; *e-value* $8e^{-06}$), enquanto outros quatro clones (*contigs* Q-5 e *singlet* Q-9) alinham com sequências referentes ao citocromo p450_{nor} do *A. fumigatus* que participa da oxidação do ácido nítrico. Um clone de 449 pb (*singlet* Q-1) e com alta similaridade (*e-value* $2e^{-43}$) com uma poliproteína de *Glomerella cingulata* foi isolado, sendo similar a retrotransposons encontrados em genomas de diversos organismos, inclusive os patogênicos. Interessantemente, também foram identificadas sequências similares a proteína transposase (*singlet* Q-6 e Q-28) de *P. aeruginosa* e da bactéria extremofílica *Colwellia psychrerythraea*, enzima relacionada à movimentação dos chamados elementos de transposição num genoma.

O *contig* Q-8 com 284 pb apresentou similaridade (*e-value* $3e^{-25}$) com uma putativa éster hidrolase carboxílica (Ppe1) de *A. fumigatus* e *N. fischeri*, identificada com domínio de hidrolase Ppe1 no InterProScan. Também foi confirmado pelo BLASTx como uma *kynurenine* aminotransferase putativa de *A. fumigatus* o *contig* Q-2. Os resultados do InterProScan classificam esta sequência com assinatura conservada de sítio ativo da grande família de redutases. Esta família inclui oxidoredutases relacionadas do tipo monoméricas e dependentes de NADPH, todas com funções e estruturas semelhantes. Outra sequência envolvida no metabolismo fúngico (*contig* Q-13; 77 % de identidade) gerada pela sobreposição de 8 clones apresentou similaridade com a proteína participante do catabolismo do N-acetilglicosamina (GlcNAc), a glucosamina-6-fosfato deaminase de *A. fumigatus*, codificada pelo gene NAG1. Ademais, o *contig* Q-3 demonstrou similaridade numa região da DNA polimerase *gamma* de *A. terreus*, tendo outro *hit* identificado como uma subunidade catalítica de DNA polimerase mitocondrial de *N. crassa* (Acesso

XP_322362), além de uma proteína que apresenta domínio rico em leucina de *A. fumigatus* (*contig* Q-1) e uma *heat shock protein30* de *A. clavatus* (*contig* Q-15).

Várias sequências foram identificadas como proteínas hipotéticas ou conservadas de fungos, como o *contig* Q-20 (787 pb), similar a proteína hipotética de *C. immitis* no primeiro *hit*, seguidos dos hits com *Botryotinia fuckeliana* ($1e^{-16}$) e *Sclerotinia sclerotiorum* ($2e^{-16}$). A busca por similaridade no NCBI utilizando BLASTx não trouxe resultados de alinhamentos confiáveis para 25 sequências, selecionadas como “sem similaridade”, variando entre 49 e 823 pb e que podem representar sequências de genes exclusivos de *T. rubrum*.

Dentre os *singlets*, há sequências com anotação funcional idêntica à de alguns *contigs*, como ocorre com sequências similares a transportadores tipo MFS, subtilisina, metaloprotease, citocromo p450nor, glucosamina-6-fosfato deaminase e algumas hipotéticas de *C. immitis*. Clones contendo *singlets* e confirmados pelo *reverse northern blot* apresentaram similaridade com uma GTPase RanA (*singlet* Q-55), proteína de membrana importante para a ativação de mecanismos de transdução de sinais que atuam em conjunto com moléculas ativadoras da expressão gênica. Muitos transcritos que podem ter participação em etapas básicas do metabolismo fúngico foram isolados, como proteínas *checkpoint* de ciclo celular, decarboxilase e esterol-24-C-metiltransferase.

De acordo com as análises comparativas (Tabela 3), utilizamos o banco de dados do MIPS para classificar funcionalmente os *unigenes* gerados, em percentagem dos grandes grupos funcionais (Gráfico 1). Pode-se observar que 2,10 % dos produtos expressos são relacionados a virulência, onde se enquadram as proteases, 32,9 % são transportadores e 28,30 % são proteínas não caracterizadas, compilando dados de proteínas hipotéticas, conservadas e sem similaridade.

Biblioteca TRSSHQue (%)

Gráfico 1: Classificação funcional dos unigenes gerados após a análise dos clones que compõem a Biblioteca Subtrativa Supressiva TRSSHQue, de acordo com banco de dados do MIPS (Munich Information Center for Protein Sequences).

4.2.2. Confirmação dos genes diferencialmente expressos através de *northern blot*

Sequências isoladas por SSH preferencialmente expressas sob contato com a queratina, similares a genes codificadores de proteases e outros possivelmente relacionados com processos patogênicos, foram priorizados nos estudos de validação por *northern blot* para inferirmos o seu possível envolvimento na utilização de queratina e na virulência deste dermatófito. Uma vez que muitas hipotéticas apresentaram similaridade com sequências gênicas de *A. fumigatus* e outros fungos filamentosos patogênicos, experimentos complementares também buscaram a confirmação desses transcritos. Sendo assim, os fragmentos obtidos na biblioteca TRSSHQue com sequências similares a subtilisina serino-protease, metaloprotease, proteína TINA, Hsp30, gag-poliproteína, trasportadores MFS, Cu^{++} ATPase, permease, MDR e uma sequência ainda não caracterizada (Fig. 8, 9 e 10) foram selecionadas e mostraram-se diferencialmente expressas na condição teste quando comparadas à marcação na condição controle avaliada.

Figura 8: Northern Blot. Validação de transcritos diferencialmente expressos e similares a proteases (Subtilisina 5, Metaloprotease 4 e Subtilisina 3), após contato de *T. rubrum* com queratina durante 72 h. (C) controle, micélio cultivado em glicose; (Q) teste, micélio cultivado em queratina. Abaixo estão representados os respectivos géis desnaturantes contendo RNAs equalizados das condições citadas. Ao lado, gráficos representando as intensidades relativas da expressão gênica de cada transcrito, através da comparação entre controle (G) e teste (Q).

Figura 9: Northern Blot. Validação de transcritos diferencialmente expressos e similares a proteína TINA, No Match (sem similaridade), Gag-poliproteína e Hsp30, após contato de *T. rubrum* com queratina durante 72 h. (C) controle, micélio cultivado em glicose; (Q) teste, micélio cultivado em queratina. Abaixo estão representados os respectivos géis desnaturantes contendo RNAs equalizados das condições citadas. Ao lado, gráficos representando as intensidades relativas da expressão gênica de cada transcrito, através da comparação entre controle (G) e teste (Q).

Figura 10: Northern Blot. Validação de transcritos diferencialmente expressos e similares a transportadores transmembranas, após contato de *T. rubrum* com queratina durante 72 h. (C) controle, micélio cultivado em glicose; (Q) teste, micélio cultivado em queratina. Abaixo estão representados os respectivos géis desnaturantes contendo RNAs equalizados das condições citadas. Ao lado, gráficos representando as intensidades relativas da expressão gênica de cada transcrito, através da comparação entre controle (G) e teste (Q).

4.3. Biblioteca Subtrativa Supressiva utilizando a linhagem CBS118892 (TRSSH_{Lip}): Condição teste com fonte lipídica após 72 h de cultivo e *reverse northern blot*

Com o objetivo geral de isolar genes envolvidos na resposta a lipídeos e complementares aos dados obtidos na biblioteca TRSSH_{Que}, possivelmente envolvidos na degradação de componentes celulares da pele durante infecção por *T. rubrum*, esta biblioteca de cDNAs subtraídos foi construída a partir de micélio da linhagem CBS118892 de *T. rubrum* submetidos separadamente a 1% de óleo de oliva (teste) e glicose (controle).

Os cDNAs dupla fitas foram gerados após devida padronização quanto ao número de ciclos da PCR, com a finalidade de não atingir o “platô” da reação evitando interferência na quantidade diferencial de cada tipo cDNA presente nas amostras, e assim garantir a análise diferencial (Fig. 11).

Figura 11: Otimização dos ciclos de PCR para amplificação dos cDNAs controle e teste, evitando o “platô” para manter a variação quantitativa dos diferentes genes em cada condição. Fixou-se 20 ciclos para o controle e 27 para o teste. PM1: 1Kb DNA ladder; PM: padrão de peso molécula λ Hind.

As amostras do *Nested* PCR contendo cDNA originados de transcritos diferencialmente expressos (Fig. 12) foram excisadas do gel, de acordo com o tamanho comparado ao padrão de peso molecular, sendo coletados material entre 200 pb e 1000 pb. O conteúdo foi purificado e concentrado para clonagem e estocagem da biblioteca.

Figura 12: *Nested-PCR*. (PM) 1Kb Plus DNA Ladder; (1) cDNAs da condição teste (azeite de oliva, 1%); (2) cDNAs da condição controle (glicose 55 mM).

4.3.1. Sequenciamento e análise bioinformática

Nesta nova etapa, obtivemos 672 clones de biblioteca TRSSLip, tendo sido realizado o *reverse northern blot* visando a exclusão de clones falsamente positivos. Os insertos clonados foram amplificados e transferidos para membranas em duplicata, sendo efetivada a hibridização separadamente com cDNAs teste e controle, obtidos a partir de RNA total controle (glicose) e RNA total teste (lipídeo) (Fig. 14). Oitenta clones positivos foram selecionados, sequenciados e analisados através de ferramenta bioinformáticas, sendo possível organizar 5 *contigs* e 9 *singlets* entre os *unigenes* (Tabela 4). Dentre os *unigenes*, 8 não apresentaram similaridade no banco de dados NR do NCBI e representam 58 clones, enquanto as demais sequências são similares a proteínas de fungos patogênicos como *H. capsulatum* e *A. niger* e o próprio *T. rubrum* (Contig L-1). Classificamos funcionalmente as sequências obtidas utilizando o MIPS e os resultados estão representados no Gráfico 2. Do total, 4,24 % são transcritos que interferem no metabolismo fúngico e 5,08 % relacionados à biogênese de compostos celulares, enquanto que 62,71 % são proteínas hipotéticas, sem similaridade ou não caracterizadas.

Biblioteca TRSSLip

Figura 13: Reverse Northern Blot. Autoradiografias apresentando o rastreamento de clones. Sete membranas em duplicata contendo clones da Biblioteca Subtrativa de *T. rubrum* (TRSSLip) (forward), hibridizadas com sonda de pool de cDNAs obtidos na Nested-PCR da condição controle e teste (Lip).

Tabela 4: Análise bioinformática e anotação funcional de unigenes selecionados da Biblioteca Subtrativa Supressiva de *T. rubrum* cultivado em meio contendo fonte lipídica.

Nome	Acesso GenBank	pb	Anotação funcional; Organismo	Nº clones	E-value	Ident(%)
<i>Contig L-1</i>	GE468525	579	Multidrug resistance protein MDR; <i>Trichophyton rubrum</i>	16	4e ⁻²⁵	96.72
<i>Contig L-2</i>	GE468526	503	43 kDa secreted glycoprotein precursor; <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	2	9e ⁻¹⁷	46.81
<i>Contig L-3</i>	GE468527	268	Sem similaridade	38	-	-
<i>Contig L-4</i>	GE468528	589	Sem similaridade	12		
<i>Contig L-5</i>	GE468529	249	Sem similaridade	3	-	-
<i>Singlet L-1</i>	GE468530	166	Sem similaridade	1	-	-
<i>Singlet L-2</i>	GE468531	89	Sem similaridade	1	-	-
<i>Singlet L-3</i>	GE468532	94	Sem similaridade	1	-	-
<i>Singlet L-4</i>	GE468533	155	chitin synthase B; <i>Ajellomyces capsulatus</i> (telemorfo <i>Histoplasma capsulatum</i>)	1	1e ⁻¹⁰	71.74
<i>Singlet L-5</i>	GE468534	416	Sem similaridade	1	-	-
<i>Singlet L-6</i>	GE468535	369	Sem similaridade	1	-	-
<i>Singlet L-7</i>	GE468536	485	Predicted protein; <i>Coccidioides immitis</i>	1	1e ⁻²⁹	92.31
<i>Singlet L-8</i>	GE468537	346	Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit; <i>Aspergillus niger</i>	1	5e ⁻⁵³	95.38
<i>Singlet L-9</i>	GE468538	217	copper-sulfate regulated protein 1; <i>Ajellomyces capsulatus</i>	1	6e ⁻⁰⁶	43.06

Biblioteca TRSSLip (%)

Gráfico 2: Classificação funcional dos unigenes gerados após a análise dos clones que compõem a Biblioteca Subtrativa Supressiva TRSSLip, de acordo com banco de dados do MIPS (Munich Information Center for Protein Sequences).

4.3.2. Validando genes através de *northern blot*

Após a análise dos clones isolados na Biblioteca THSSLip, alguns foram selecionados para validação por *northern blot*. Dessa forma foi possível confirmar que o transcrito similar a uma glicoproteína de 43 kDa do *P. brasiliensis* está com alta expressão diferenciada na condição teste Lip, em comparação com a condição controle (Fig. 14). O mesmo ficou constatado com um transcrito sem similaridade (*contig* L-3), que foi selecionado devido ao número de cópias isoladas na condição teste (38 clones) e também teve sua expressão diferencial confirmada.

Figura 14: Northern Blot. Validação de transcritos diferencialmente expresso, sem similaridade e similar a glicoproteína de 43 kDa, após contato de *T. rubrum* com lipídeos durante 72 h. (C) controle, micélio cultivado em glicose; (L) teste, micélio cultivado em azeite de oliva (1%). Abaixo está representado o respectivo gel desnaturante contendo RNAs equalizados das condições citadas. O gráfico representa a intensidade relativa da expressão gênica do transcrito, após a comparação entre controle (G) e teste (L)

4.4. Análise do padrão de expressão de proteases nas linhagens H6 e $\Delta pacC-1$ através de *northern blot*

Uma vez que foi gerada uma biblioteca subtrativa supressiva contendo cDNAs isolados de *T. rubrum* durante seu crescimento em queratina, ficou mais evidente a importância de proteases queratinolíticas com ótima atividade em pH alcalino para o processo infeccioso deste dermatófito. A adaptabilidade dos dermatófitos em ambiente com pH alcalino, como ocorre após a instalação da infecção na pele humana inicialmente com pH ácido, indica que devem existir mecanismos regulatórios que governam essas mudanças na expressão gênica através do sensoramento do pH externo.

Sendo assim, com o objetivo de relacionar funcionalmente a ação do fator de transcrição PacC e enzimas envolvidas no mecanismo de virulência do dermatófito *T. rubrum*, utilizamos 3 sondas obtidas a partir da recuperação de fragmentos de cDNAs da biblioteca TRSSHQue, duas delas homólogas a subtilisinas serino proteases (*contigs* Q- 27 e Q-28), e outra similar a uma metaloprotease 4 (*contig* Q-35). Todas as sondas foram marcadas radioativamente e utilizadas em experimentos de *northern blot* para comparar o nível de expressão entre a linhagem selvagem H6 e a mutante $\Delta pacC-1$, cultivados tanto na glicose (controle) como na queratina (teste). Obtivemos marcações positivas nas amostras de H6 e $\Delta pacC-1$ em contato com queratina, com variações no nível da expressão gênica, de acordo com as intensidades relativas quantificadas e observadas na Fig 15. Na linhagem selvagem H6, o gene da subtilisina 5 apresentou-se 1,5 vezes expresso em relação a amostra da linhagem mutante $\Delta pacC-1$, enquanto a subtilisina 3 está 1,7 vezes e a metaloprotease tem quase dobro de expressão (1,8 vezes) no selvagem, demonstrando que há uma interferência na geração de transcritos de proteases no mutante com o gene *pacC* nocauteado. Além disso, marcações na linhagem $\Delta pacC-1$ cultivada na condição controle (Taglicht & Michaelis) denotam uma provável ativação das proteases, podendo o PacC estar relacionado à inibição de Sub 3 e 5 e Mep 4 em pH ácido na linhagem H6.

Figura 15: Northern Blot. Comparação do padrão de expressão gênica de transcritos diferencialmente expressos e similares a proteases nas linhagens H6 (selvagem) e Δ PacC-1 (mutante) de *T. rubrum*, após cultivo durante 72 h: (1) H6 cultivado em glicose; (2) H6 cultivado em queratina; (3) Δ PacC-1 cultivado em glicose; (4) Δ PacC-1 cultivado em queratina. O respectivo gel desnaturante contendo RNAs equalizados das condições citadas está representado. Os gráficos representam as intensidades relativas da expressão gênica de cada transcrito após a comparação entre as linhagens H6 e Δ pacC-1, sendo considerado o controle (1).

4.5. Crescimento em unhas humanas é diferenciado nas linhagens H6 e $\Delta TruMDR2$ de *T. rubrum*

O efeito da disrupção do *TruMDR2* na patogenicidade de *T. rubrum* foi avaliada em modelos de infecção em unhas humanas *in vitro*, para testar a habilidade de infecção da linhagem mutante em comparação com o tipo selvagem H6. Preparações de conídios das linhagens testadas foram individualmente distribuídas em fragmentos de unhas esterelizados e o crescimento observado por microscopia óptica após 6 dias de inoculação a 28 °C. A deleção do *TruMDR2* foi correlacionada com o a diminuição da habilidade do mutante em crescer em unhas humanas (Fig. 16) como única fonte de nutriente, o principal sítio de infecção de *T. rubrum*, enquanto a linhagem H6 cresceu abundantemente.

Figura 16: Ensaio de infecção mostrando o crescimento de diferentes linhagens de *T. rubrum* cultivadas em fragmentos de unhas humanas durante 6 dias a 28 °C. O crescimento fúngico nas unhas foi avaliado por microscopia óptica e as imagens capturadas através do Axion vision System (Zeiss) com objetiva (plan neofluar) 20x/0.5. As partes pretas no lado esquerdo das figuras são os fragmentos de unhas. (A) Controle negativo (sem inóculo); (B) H6 (linhagem selvagem H6) e (C) linhagem mutante $\Delta TruMDR2$. Esses resultados são representativos de dois experimentos distintos.

ASSIM EU VEJO A VIDA

A vida tem duas faces:
Positiva e negativa
O passado foi duro
mas deixou o seu legado
Saber viver é a grande sabedoria
Que eu possa dignificar
Minha condição de mulher,
Aceitar suas limitações
E me fazer pedra de segurança
dos valores que vão desmoronando.
Nasci em tempos rudes
Aceitei contradições
lutas e pedras
como lições de vida
e delas me sirvo
Aprendi a viver.

CORA CORALINA

5. Discussão

Os resultados apresentados nesse trabalho mostram o uso da tecnologia de SSH para análise da expressão gênica durante a mimetização do processo infeccioso de um dermatófito de grande interesse clínico. A principal resposta aos estímulos ambientais é a modulação da expressão dos genes para o controle de todo o metabolismo celular frente às reações adversas e mudanças bruscas abióticas e/ou nutricionais, inclusive na adaptação em um novo nicho parasitado. Esse controle se apresenta com uma maior complexidade nos organismos eucarióticos e pode ocorrer em vários níveis do metabolismo celular (transcrição, processamento do RNAm, tradução, pós-tradução e funcionamento enzimático). A construção e análise de bibliotecas de subtração de cDNAs obtidos de células fúngicas de *T. rubrum* submetidas separadamente à queratina ou lipídeo como teste durante períodos pré-programados, foi o principal objetivo deste trabalho, que culminou no isolamento e identificação de genes posteriormente categorizados e associados ao metabolismo e virulência deste dermatófito.

5.1. Uso de fontes de carbono e interferência do pH do meio

A forma de tratamento dos conídios de *T. rubrum* foi definida após análises de trabalhos anteriores e diversos testes, sendo a massa micelial dividida em diferentes períodos de cultivo (6h; 12h; 24h; 48h; 72h e 7 dias) em meio mínimo suplementado separadamente com queratina (teste 1), lipídeo (teste 2) e glicose (controle) (pH inicial 5,0) com o objetivo de avaliar as alterações no pH durante o cultivo do fungo. Duek *et al* (2003) criaram um modelo que mimetiza *in vitro* a infecção de *T. mentagrophytes* em seções de pele humana, seguindo a ação do fungo com microscopia eletrônica. Foi observado que após 12 horas de infecção os microconídios se acomodavam no extrato

córneo iniciando o processo de adesão, com germinação evidente após 24 horas (crescimento do tubo germinativo) e nítida invasão do tecido pelo alongamento das hifas (72 horas), culminando na propagação das mesmas após 10 dias de experimento (Duek *et al.*, 2004).

Em fungos, a identificação de proteases envolvidas na degradação de queratina tem sido realizada com frequência em diversos experimentos utilizando queratina de fontes variadas, como proveniente de unha, cabelo, cascos de animais ou pele humana (Brouta *et al.*, 2001; Vignardet *et al.*, 2001; Esquenazi *et al.*, 2003; Ferreira-Nozawa *et al.*, 2006), com variações na concentração de 0,5-2,5% para a caracterização de queratinases extracelulares (Brasch & Zaldua, 1994; Brouta *et al.*, 2001). Quanto ao efeito da glicose, Meevootison & Nidespruem (1979) observaram que este açúcar simples pode reprimir a expressão de proteases extracelulares quando presente no cultivo de *T. rubrum* e outros dermatófitos em meio ágar na concentração de 2%, quantificando especificamente a diminuição na degradação de elastina (Meevootisom & Niederpruem, 1979). A glicose também reprime a produção de enzimas no *T. rubrum* que participam da hidrólise de substâncias presentes nos pêlos do porco da índia adicionado ao meio líquido (Apodaca & McKerrow, 1989).

Uma diferença significativa no pH final foi observado após o tratamento de 72 horas na condição de cultivo de *T. rubrum* em queratina, que variou de 5,0 para 8,4 (Tabela 2), dados que corroboram o modelo proposto por Martinez-Rossi *et al* (2004) para infecção por dermatófitos. Okafor & Alda (2000) também observaram um aumento no pH basal do meio tendo cabelo humano como substrato para testar a atividade queratinolítica de vários dermatófitos, incluindo *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e *M. gypseum* (Okafor & Ada, 2000). Alterações no pH local também foram aferidas quando *T. rubrum* cresceu em fonte

lipídica. Mudanças graduais e lentas ocorreram, assim como no teste 1 (cultivo em queratina), mas com a alcalinização do meio e pouca alteração da massa micelial.

Já que os elementos adicionados ao meio ativam a expressão de genes específicos em *T. rubrum*, espera-se que haja uma alteração do meio em que o fungo se encontra devido às enzimas secretadas atuantes na quebra de compostos de carbono para utilização nutricional, viabilizando a sobrevivência fúngica. Ferreira-Nozawa *et al* (2003) também observaram alteração no pH ambiente após cultivar *T. rubrum* em meio suplementado com 1 % de glicerol e 50 mM de glicina, obtendo níveis de pH que ultrapassaram 8,3. A glicina é uma fonte de carbono que quando metabolizada, libera resíduos de Acetil CoA citoplasmático, gerando a alcalinização local (Thedei Jr. *et al.*, 1994). Uma vez que este dermatófito alcaliniza o meio de cultivo, Ferreira-Nozawa *et al* (2003) também realizaram experimentos dispondo micélios de *T. rubrum* em meio com pH inicial alcalino (8,0 e 9,0), observando-se praticamente a ausência de crescimento fúngico com inalteração no pH local (Thedei Jr. *et al.*, 1994; Ferreira-Nozawa *et al.*, 2003). Portanto, *T. rubrum* mostra-se dependente do pH inicial ácido para viabilizar seu crescimento e fisiologia de modo que a alcalinização do pH local ocorra.

As células de fato alteram o seu meio homeostático e efetivam uma resposta metabólica em função do sensoramento do pH, efeito já demonstrado em fungos filamentosos como *N. crassa* e *A. nidulans*, que ajustam o pH do meio para ácido ou alcalino dependendo de fontes de carbono como glicose ou acetato, respectivamente (Nahas *et al.*, 1982; Caddick *et al.*, 1986). Recentes estudos têm demonstrado a interferência do pH ambiente na modulação metabólica em diferentes fungos patogênicos, como na transição dimórfica em *C. albicans* e *Paracoccidioides brasiliensis* com a ativação de suas formas virulentas (Davis *et al.*, 2000; Marques *et al.*, 2004). A identificação de genes que, uma vez ativos em específicas concentrações de pH podem

aumentar a virulência fúngica, foi crucial para o conhecimento de vias metabólicas atuantes no dano ao hospedeiro.

5.2. Expressão gênica diferencial de *T. rubrum* após contato com queratina e lipídeos

Atualmente, muitos estudos de genômica estrutural e funcional em fungos têm sido realizados com base nos resultados obtidos do sequenciamento genômico completo de fungos modelos como o *A.nidulans*, *N. crassa* e *S. cerevisiae* (Galagan *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2008), e esses dados vêm sendo amplamente utilizados para análises dos transcriptomas de vários microrganismos, inclusive patógenos de grande interesse clínico e agrônomico em busca de fatores de virulência.

Há muitos dados disponíveis sobre patógenos fúngicos que apresentam uma complexa regulação gênica modulando a morfogênese e a expressão de proteínas intracelulares para transdução de sinais, bem como referente às proteínas extracelulares para ação no substrato invadido e captação de nutrientes. Dentre estes, destacam-se as informações acerca da patogênese de *C. albicans*, *P. brasiliensis* e *C. neoformans*, tendo sido caracterizados muitos fatores de virulência nestes patógenos (Kozel, 1995; Lorenz, 2002; Naglik *et al.*, 2004). No processo de produção das ESTs em condições específicas de cultivo, é comum observar um grande número de sequências com tamanhos inferior a 500 pb e ainda a alta redundância de dados, visto que os clones de cDNA são aleatoriamente escolhidos de uma biblioteca. Na tentativa de superar estes problemas e ainda fornecer uma visão mais detalhada dos genes selecionados, a utilização de programas computacionais que avaliam a qualidade das sequências isoladas, providenciando o agrupamento das mesmas de acordo com as regiões de sobreposição (Oliveira & Johnston, 2001) aumenta a qualidade dos dados avaliados através do NCBI.

5.2.1. Proteases identificadas, capazes de degradar queratina

Dentre os transcritos expressos em maior abundância na condição de teste 1 (cultivo em queratina) estão as proteases, como as subtilisinas 3 (Sub 3) e 5 (Sub 5) e as metaloproteases 3 (Mep 3) e 4 (Mep 4), muitas utilizadas como sonda para confirmar a expressão através de experimentos de *northern blot*. Subtilisinas são serino proteases características como fator de virulência de dermatófitos, identificadas em *M. canis* (Brouta *et al.*, 2001) através de *screening* em biblioteca de DNA utilizando sonda heteróloga baseada na sequência de outras serino protease fúngicas. Jousson *et al* (2004) clonaram 7 genes de subtilisinas (SUBs) de *T. rubrum* (incluindo os genes das SUBs 3 e 5), avaliando a atividade queratinolítica dessas SUBs e destacando a ótima atividade em pH alcalino (entre 7,5-9,0). Saliento que após 72 h, o pH do meio de cultivo suplementado com queratina já se encontrava alcalino (8,4) devido a atividade metabólica de *T. rubrum* (Tabela 2).

Outra classe de proteases secretadas por dermatófitos é a de metaloproteases (MEPs), enzimas que possuem um íon acoplado em seu sítio catalítico. Muitas espécies de fungos que infectam humanos secretam proteases durante os processos infecciosos, sendo essas proteases secretadas do tipo MEP importantes fatores de virulência em dermatófitos, já bem caracterizadas em *M. canis* (Monod *et al.*, 2002). Jousson *et al* (2004) também caracterizaram genes MEPs em dermatófitos, observando similaridades entre MEPs de *M. canis*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *A. fumigatus* e *A. oryzae*. A detecção de MEPs na biblioteca de cDNAs de *T. rubrum* expressos na presença de queratina e através de *northern blot* atestam a provável funcionalidade na degradação de tecidos queratinizados durante uma dermatofitose.

Para investigar a função de metaloproteases nos principais fungos que causam patologias na córnea, incluindo *A. fumigatus* e *C. albicans*, foram realizados ensaios infecciosos. As atividades de MEP-2 e MEP-9 nas córneas infectadas alcançaram um alto nível após três dias de infecção (72 h), também sendo possível correlacionar o número de conídios aderidos com o nível da inflamação e dessas atividades protéicas (Dong *et al.*, 2005). A purificação de uma metalopeptidase de *C. albicans* e medições de sua atividade mostraram degradação contra colágenos tipo I e IV, laminina e fibronectina de células humanas e de ratos (el Moudni *et al.*, 1995). Os autores supõem que ainda não está bem definida a secreção de metalopeptidases pela levedura *C. albicans*, sendo importante a poderosa ação degradatória de proteínas MEPs na migração da célula fúngica através da camada endotelial e suas contribuições para a invasão do tecido hospedeiro. É conveniente ressaltar que as metalopeptidases demonstram não possuir atividade em pH ácido em linhagens selvagens, parecendo ter especificidade contra poucos tipos de substratos apenas em pH alcalino (el Moudni *et al.*, 1995).

Estudos com o patógeno *Yersinia enterocolitica* detectaram variações genéticas entre cepas com níveis de patogenicidade diferenciados e cepas não-patogênicas. Neste organismo, sequências codificantes de determinantes virulentos como hemolisinas e metaloproteases foram identificadas em cepas altamente patogênicas, quando comparadas às não patogênicas (Howard, 1999). Já em fungos filamentosos, estudos caracterizando MEPs de dermatófitos determinaram que estas são inicialmente geradas como pré-proteínas com processamento pós-traducional, com sítios de glicosilação identificados em MEPs maduras que possuem ação na quebra de nutrientes e na invasão do tecido hospedeiro (Apodaca & McKerrow, 1989; Brouta *et al.*, 2001).

Dessa forma, a expressão de proteases, como SUBs e MEPs que agem especificamente na quebra da queratina, reflete o alto nível de especialização que os

dermatófitos desenvolveram para a invasão e retirada de nutrientes da pele e seus anexos, necessários para a manutenção do seu metabolismo durante a infecção. Isto inclui eventos de duplicações em genes ancestrais que geraram famílias codificadoras de proteases secretadas, culminando neste aperfeiçoamento essencial para a instalação da dermatofitose (Jousson *et al.*, 2004).

5.2.2. Transportadores de membrana altamente expressos em queratina

Alguns cDNAs isolados na biblioteca TRSSHQue apresentaram alta similaridade com outra grande classe de proteínas tipo transportadores de membranas, que são responsáveis pela manutenção da composição citoplasmática de uma célula, seja em relação ao meio extracelular ou às organelas membranosas. Estes são essenciais para a manutenção da célula e para uma rápida adaptação de acordo com possíveis alterações ambientais, seja para regular captação de nutrientes no meio, exclusão de metabólitos secundários ou de substâncias tóxicas. O MFS (*Major Facilitator Superfamily*) é o maior grupo de transportadores que se ligam a íons e translocam seus substratos contra um gradiente eletroquímico (Vardy *et al.*, 2004). Existem mais de 70 famílias distribuídas nesta superfamília, com especificidades para diferentes substratos e transporte em uma única direção ou em ambas (Marger & Saier Jr, 1993), incluindo diferentes permeases. As sequências dos clones envolvidos neste *contig* (Q-29) foram analisadas no InterProScan, o que revelou um *motif* conservado para transportadores de peptídeos tipo PTR2-A. A hibridização via *northern blot* utilizando este transcrito como sonda foi presente em ambas condições, com nítido aumento da expressão no teste (cerca de 1,5 vezes em relação ao controle) (Fig. 10). Sendo assim, esse transportador de peptídeos deve estar envolvido no transporte de metabólitos gerados na degradação da queratina disponível no meio para o interior da célula fúngica.

Várias cópias de outras seqüências isoladas na biblioteca TRSSHQue foram submetidas ao InterProScan e identificadas com região característica de hidrolase transmembrana ATPase P-TYPE, com sítio de ligação para ATP, que participa também do transporte de cobre. Em *C. albicans* e *S. cerevisiae* (Weissman *et al.*, 2000) existem transportadores associados à resistência a altas concentrações de cobre, servindo como uma bomba de efluxo ao expulsar o excesso do cobre do citoplasma. A nossa seqüência identificada de *T. rubrum* (EB086878) apresentou homologia em alguns alinhamentos com transportadores deste tipo de *C. albicans* (acesso AAF04593; *e-value* $2e^{-05}$; Acesso AAF78958; *e-value* $2e^{-05}$), com alta expressão confirmada através de *northern blot* (Fig. 10).

Na citação acima, os autores confirmaram a expressão do gene codificador deste transportador ATPase em *C. albicans* (CaCRP1) quando esta foi cultivada em meio com alta concentração de cobre e em condições ácidas e aeróbicas. Nestas circunstâncias há uma associação quanto à capacidade de defesa contra a toxicidade do cobre através de bombas de efluxo com a adaptação desta levedura em colonizar e infectar o trato digestório, que possui uma concentração de cobre específica.

Várias ATPases estão implicadas no transporte de cobre intracelular entre organelas, sendo proteínas relacionadas com a doença de Menkes e de Wilson em humanos e também no metabolismo geral de *S. cerevisiae*, presentes na superfície do Complexo de Golgi. Dados de microscopia fluorescente demonstraram a localização desta proteína transmembrana na membrana plasmática de *C. albicans* (Weissman *et al.*, 2000). Recentemente foi isolada linhagem mutante de *Salmonella* sp resistente a prata que apresentava seqüência gênica similar a de um transportador ATPase de cobre. Pode ser que a resistência a determinados metais mediada por esta proteína represente um importante mecanismo associado à virulência de alguns patógenos (Riggle & Kumamoto, 2000).

Parisot *et al* (2002) geraram um mutante avirulento e com pouca pigmentação de *Colletrichum lindemuthianum*. Neste caso, análises moleculares identificaram a inserção do plasmídeo no gene *clapI*, responsável pela codificação do putativo transportador ATPase de cobre homólogo ao gene CaCCC2 de *S. cerevisiae*. A complementação do mutante de *C. lindemuthianum* com o alelo *clapI* selvagem restaurou a patogenicidade e a pigmentação (Parisot *et al.*, 2002). Todos os dados observados sugerem que o gene responsável pela codificação deste transportador ATPase de cobre deve estar relacionado com a patogenicidade de alguns organismos, inclusive de *T. rubrum*.

Na biblioteca TRSSHQue, as análises no Blast revelaram que sequências altamente reguladas nas populações de cDNAs teste apresentam homologia com um transportador ABC tipo-MDR de *T. rubrum* (100% de identidade), codificado pelo gene *TruMDR2*, clonado e identificado anteriormente (Fachin *et al.*, 2006). No InterProScan foi confirmada a classificação do clone como sequência relacionada à resistência de múltiplas drogas com sítio de ligação para o ATP. Transportadores ABC fúngicos têm ampla função como bombas de efluxo, dando a característica de resistência a diversas drogas para vários microrganismos (Urban *et al.*, 1999). Várias sequências relacionadas ao sistema efluxo de multidrogas foram identificadas na análise parcial de ESTs do *T. rubrum* (Wang *et al.*, 2006). Ademais, genes codificadores da classe ABC foram identificados como importantes fatores de virulência nos estágios iniciais da infecção efetivada por fungos filamentosos, como demonstrado em *M. grisea* (gene ABC1), *Botrytis cinerea* (BcatrB) e *Gibberella puricales* (Vermeulen *et al.*, 2001; Fleissner *et al.*, 2002). Este transcrito também foi validado em experimentos de *northern blot*, mostrando-se quase 8 vezes expresso na condição teste (cultivo em queratina) em comparação com controle (Fig. 10).

5.2.3. Queratina pode ativar transcritos envolvidos em várias funções, como no metabolismo geral de *T. rubrum*

Outro transcrito isolado a partir dos clones de *T. rubrum* na biblioteca TRSSHQue e que também foi testada nos experimentos de *northern blot*, apresentou similaridade com um gene que codifica a proteína TINA, envolvida no ciclo celular de *Emmericella nidulans* (anamorfo de *A. nidulans*) e com marcação positiva na condição teste, obtida após crescimento de *T. rubrum* em queratina.

O gene *tinA* codifica uma proteína de 553 aminoácidos (TINA) que interage a em uma região da NIMA quinase (*Never In Mitose A*) e juntas regulam processos específicos durante a mitose (Osmani *et al.*, 2003). As proteínas tipo NIMA são caracterizadas estrutural e funcionalmente como serino-treonina quinases, uma classe relacionada à morfogênese, ciclo celular e patogenicidade em fungos filamentosos (Dickman & Yarden, 1999). Várias proteínas relacionadas às quinases tipo-NIMA têm sido isoladas e caracterizadas em *N. crassa* e *Schizosaccharomyces pombe* (Grallert *et al.*, 2004), participando na ativação de diversas etapas da divisão celular como a condensação dos cromossomos e a fragmentação da lâmina nuclear, sendo a proteína TINA associada à estrutura que constituem os microtúbulos e a formação dos mesmos durante a mitose.

Alguns atores sugerem uma função especializada da NIMA quinase em fungos, que pode ocorrer devido às características exclusivas da mitose na germinação conidial, como durante a fase G2 do ciclo celular (O'Connel *et al.*, 2003). Considerando que a germinação dos conídios implica em alterações nos microtúbulos e na estrutura geral do citoesqueleto da célula durante a divisão celular, é possível que a expressão de uma proteína TINA identificada na biblioteca TRSSHQue e validada por *northern blot* (Fig. 9), que interage com NIMA quinase, esteja relacionada ao alongamento das hifas de *T. rubrum* nesta etapa.

Isto afetaria a capacidade de invasão deste dermatófito no tecido hospedeiro durante o processo infeccioso, momento de constante divisão celular.

Sequências de transcritos relacionadas a proteínas envolvidas no metabolismo geral fúngico foram identificadas em abundância nas duas bibliotecas geradas, fato constatado também com o isolamento na TRSSHQue de transcritos similares a glucosamina-6-fosfato deaminase de *A. fumigatus* codificada pelo gene *nag1*. Esta enzima é induzida durante a formação do tubo germinativo em *C. albicans* (Gopal *et al.*, 1982). A linhagem de *C. albicans* mutante homozigota para o gene *nag1* mostrou deficiência na captação de GlcNAc, ausência de formação de tubo germinativo e virulência altamente atenuada, como observado em diversos testes bioquímicos e de infecção em ratos (Wei *et al.*, 2001), possivelmente através de mecanismos relacionados à produção de adesinas e enzimas hidrolíticas (Niewerth *et al.*, 2003).

Com a metodologia de *northern blot* foi possível confirmar a indução da expressão diferencial do gene *gag-pol* em *T. rubrum* cultivado em queratina. O *singlet* Q-1 alinhou com alta similaridade (*e-value* $2e^{-43}$) em uma poliproteína de *Glomerella cingulata* (anamorfo: *Colletotrichum gloeosporioides*). No fitopatógeno *C. gloeosporioides*, o gene *Cgret* codifica duas putativas poliproteínas que tem homologia com genes *gag* e *pol* de outros transposons fúngicos e virais. Além disso, a nossa sequência analisada no InterPro apresentou domínio vWF (*von Willebrand factor*, type C), encontrado em quase todas as proteínas extracelulares. Outras proteínas intracelulares também apresentam domínio vWF e estão envolvidas em funções como transcrição, reparo de DNA, transporte transmembrana, transdução de sinais, adesão e migração celular. A região do gene *Cgret* homóloga ao gene *gag* de retrovírus tem 2.520 pb, e apresenta domínio *zinc-finger* para ligação em ácidos nucleicos (Zhu & Oudemans, 2000). Vários genomas virais são traduzidos em grande poliproteínas pela maquinaria hospedeira, sendo clivados através de

regulação pós-transcricional em enzimas, material capsular e outros componentes virais, p. ex., no caso do piconavírus com uma cisteína peptidase que é processada de uma poliproteína. Esse conhecimento acerca da atuação das poliproteínas tem sido utilizado para o desenvolvimento de drogas contra o HIV-1, preparando inibidores de poliproteínas com a finalidade de se evitar o processamento das estruturas virais (James, 2006).

Baseado em dados do Blastx, este transcrito (*singlet* Q-1) também se mostrou similar à retrotransposons encontrados em genomas de diversos organismos, como em *C. neoformans* (Loftus *et al.*, 2005), que possui um genoma rico em transposons. Elementos transponíveis podem exercer influência no desenvolvimento de novos genótipos patogênicos em vários microrganismos, já que são caracterizados como fonte de mutações espontâneas com impacto evolutivo em muitos organismos procariotos e eucariotos (Bingham & Judd, 1981; Shcherban *et al.*, 2000; Galagan *et al.*, 2003). Retrotransposons têm sido detectados em diversos fungos filamentosos como *Magnaporthe grisea*, *Cladosporium fulvum* e *Fusarium oxysporu* (Schmitt *et al.*, 2001), e devido à conhecida capacidade de movimentação dos transposons em genomas, essa característica pode direcionar a instabilidade cariotípica e variação genotípica. Há evidências que indicam funcionalidade em determinados transposons, tendo sido adotadas várias estratégias para estudos de retrotransposons em fungos filamentosos, visando os mecanismos de geração de diversidade genética e interferência na patogenicidade (Anaya & Roncero, 1996; Daviere *et al.*, 2001; James, 2006).

Adicionalmente, um dos *singlets* isolado e validado através de *northern blot* é similar a uma pequena chaperona do tipo Hsp30. Seymour e Piper (1999) demonstraram em *S. cerevisiae* que Hsp30 pode ser ativada sob diferentes condições de estresse além de choque térmico, como exposição a etanol e a ácidos orgânicos (Seymour & Piper, 1999). Baseando-se em vários dados, Plesofsky *et al* (1999) propuseram que Hsp30 se liga a uma

proteína translocase da membrana externa mitocondrial, agindo como chaperona em componentes que interagem com essa translocase em determinadas temperaturas (Borkovich *et al.*, 2004). Chaperonas tem importante papel na translocação de proteínas, proporcionando mudanças conformacionais que auxiliam no transporte e consequente ativação de proteínas nos seus locais de ação. A ação de Hsp30 em fungos patogênicos ainda não foi determinada, portanto é necessário aprofundar o conhecimento para entender quais as proteínas que dependem de associação com proteínas *heat shock*.

Muitas sequências dentre os *singlets* apresentaram-se praticamente idênticas a determinados *contigs*. Isso pode ocorrer, já que o programa CAP3 tem parâmetros definidos para aproveitar as sequências nas sobreposições, considerando um mínimo de 40 bases sobrepostas e pontuando de acordo com a qualidade de alinhamento entre cada base, existência de *gaps* e outras características (Saier *et al.*, 1999). Sendo assim, os *singlets* não incluídos nos devidos *contigs* podem ter ficado fora do arranjo por não se enquadrarem nos parâmetros considerados, como podemos observar entre os *singlets* com sequências similares a transportadores MFS, subtilisina, metaloprotease, citocromo p450nor, glucosamina-6-fosfato deaminase e hipotéticas de *A. nidulans* e *A. fumigatus*.

Apesar de vários clones da biblioteca TRSSHQue de *T. rubrum* terem apresentado resultados satisfatórios nos alinhamentos e classificações funcionais, alguns *contigs* e a maioria dos *singlets* não apresentaram similaridades no banco de dados NR do NCBI. Tais sequências podem ser sequências exclusivas do *T. rubrum* e representar genes únicos que merecem uma abordagem mais aprofundada, pois há chances de caracterizar novos genes não apenas relacionados ao metabolismo geral de fungos.

5.2.4. Fonte lipídica também ativa genes diferencialmente expressos em *T. rubrum*

A metodologia para geração de biblioteca subtrativa supressiva já foi utilizada para confirmar a alta expressão de enzimas com ação direta/indireta em lipídeos, como no patógeno *Histoplasma capsulatum* (Lisofosfolipase) (Shim *et al.*, 2004), *P. brasiliensis* (Marques *et al.*, 2004) e *M. grisea* (Lu *et al.*, 2005). Os produtos de genes relacionados à resposta aos lipídeos vêm emergindo como potenciais alvos farmacológicos, uma vez que os lipídeos e as vias metabólicas onde estes estão envolvidos têm sido associados a críticos eventos celulares (crescimento da célula fúngica, replicação, diferenciação, apoptose, transdução de sinal e transcrição) e nos processos infecciosos.

Na Tabela 4 observamos detalhes da anotação funcional através do Blast (NCBI), onde o *contig* L-1 com 16 clones tem seqüências similares ao transportador MDR de *T. rubrum* (97 % de identidade). É importante salientar que várias seqüências de transcritos com mesma anotação funcional (tipo MDR) também foram isolados na biblioteca TRSSHQue, com validação por *northern blot*. A ampla função de transportadores tipo MDR vem sendo estudada em patógenos humanos e de cultivares diversos (de Waard *et al.*, 2006). Apesar da multifuncionalidade, ainda não se conhece detalhes acerca do transporte de nutrientes por MDRs, e o isolamento de várias seqüências similares a transportadores tipo MDR após o cultivo de fungos em fontes como queratina e lipídeos deve ser mais explorada.

O *singlet* L-9 apresentou similaridade com a subunidade alfa (α) da proteína G de *C. immitis* (80 % de identidade; *e-value* $1e^{-35}$), uma proteína transmembrana e trimérica ($\alpha\beta\gamma$), mediadora de sinais de transdução em eucariotos, ativando e regulando atividades metabólicas na célula com um fino controle da expressão gênica (Seo *et al.*, 2005). São necessários estímulos ambientais para ativação e consequente dissociação das subunidades

(α e $\beta\gamma$), cada uma com função ativadora em uma ampla variedade de moléculas efetoras, como fosfolipases, canais de íons e adenilato ciclase (Kaufman *et al.*, 2007). Na análise dos genes diferencialmente expressos no patógeno *M. grisea*, pesquisadores confirmaram a alta expressão da proteína G após a indução/formação do apressório maduro em comparação com o controle (micélio vegetativo) (Jin *et al.*, 2007).

Existem vários estudos das proteínas G em organismos fúngicos modelos (*Saccharomyces*, *Neurospora* e *Aspergillus*) e patogênicos. Estudando o fungo *N. crassa*, Ivey e colaboradores (1996) obtiveram uma cepa mutante (Δ *gna-1*) da subunidade α que apresentou alteração em múltiplos fenótipos durante o crescimento vegetativo e sexual. O Δ *gna-1* exibiu vários defeitos na macroconidiação relacionados a diferenças na morfologia das hifas aéreas e baixa produção de conídios, além de conídios pouco aderentes em relação aos obtidos da cepa selvagem (Ivey *et al.*, 1996), entre outras alterações. Vias sinalizadoras no fitopatógeno *F. oxysporum* ativam cascatas enzimáticas através de proteínas G, regulando sua patogenicidade (Jain *et al.*, 2002), e a disrupção de genes codificadores das subunidades α e β destas proteínas gerou mutantes morfologicamente alterados e com conidiação reduzida, caracterizando retardo na infecção em plantas susceptíveis com redução marcante da virulência. Em *Cochliobolus heterostrophus*, mutações nas subunidades α e β da proteína G afetaram vários estágios do desenvolvimento celular e a formação do apressório, com redução da conidiação e virulência durante a infecção no arroz (Sherif, *et al.*, 2004). Vários estímulos ambientais podem acionar as proteínas G, muitos deles oriundos de fontes nutricionais, e assim interferindo em diversas redes metabólicas, sendo importante avaliar este gene em *T. rubrum*.

O *contig* L-2 apresentou similaridade com o gene que codifica um precursor da glicoproteína secretada (43 kDa) de *P. brasiliensis* (47 % de identidade) e teve sua

expressão confirmada por *northern blot* (Fig. 14), enquanto o *singlet* L-7 é similar a uma proteína hipotética de *C. immitis* (92 % de identidade; *e-value* $1e^{-29}$), todos fungos altamente patogênicos. Uma glicoproteína é uma proteína que sofreu processamento pós-traducional com glicosilação em algumas regiões específicas que interferem na estrutura e função de proteínas secretadas e/ou de membranas. A adição de diferentes resíduos de carboidratos (glicosilação) define parte da função protéica, e vem sendo largamente estudada em *S. cerevisiae* (Herscovics & Orlean, 1993). Na levedura *C. neoformans* a produção de fosfolipases secretadas é um fator de virulência (Chen *et al.*, 1997; Hossain & Ghannoum, 2000), sendo as principais conhecidas como PLB1 (fosfolipase B1), LPL1 (lisofosfolipase) e LPTA (lisofosfolipase/transacilase), enzimas que apresentam resíduo glicoprotéico de 90-120 kDa e que degradam substratos preferencialmente saturados de lipídeos. Em *C. Gatti* foi identificada nova fosfolipase com atuação marcante em pH 7,0, também encontrada em *C. neoformans* var. *grubii* (Wright *et al.*, 2004).

A capacidade de adesão de fungos nas superfícies celulares vem sendo atribuída à presença de glicoproteínas na parede celular desses microrganismos (Ferreira-Nozawa *et al.*, 2003), como também é observado em *C. albicans* (Ogawa *et al.*, 1998). Pouco é conhecido sobre os mecanismos moleculares da secreção de proteínas em fungos filamentosos. No *Trichoderma reesei* (Pakula *et al.*, 2000), utilizado na produção e secreção protéica para uso industrial, foi possível obter *in vitro* a glicosilação (com [35S] metionina ou [14C] manose) e secreção da celobiohidrolase 1 (CBH1), destacando-se como uma ferramenta biotecnológica útil. A superfície da glicoproteína 43 kDa de *P. brasiliensis* é considerada o principal componente antigênico em pacientes acometidos por paracoccidioomicose pulmonar (PCM) (Gonzalez *et al.*, 2008), que diminui a função de macrófagos como um mecanismo para fuga do sistema imune do hospedeiro. Experimentos em ratos tratados (teste) com células dendríticas estimuladas com *plugs* de

gp43 obtidos na presença de fonte lipídica mostraram um aumento das unidades formadoras de colônias nos pulmões, o que não foi observado no grupo de ratos não tratados (controle) (Ferreira & Almeida, 2006). Dessa forma, demonstraram que gp43 tem o poder de afetar várias funções na célula hospedeira, diminuindo a atividade de moléculas de classe II do MHC, CD54, CD40 e CD80, também com a redução da capacidade aderente de células dendríticas, principal defesa que inicia a resposta imune contra o *P. brasiliensis*. Mecanismos de resistência e susceptibilidade a PCM não são totalmente claros, mas evidências de ação inibitória do sistema imune pelo antígeno gp43 com aumento na patogenicidade de *P. brasiliensis* já foi relatado (Camargo *et al.*, 1989; Vicentini *et al.*, 1994).

Já a sequência do *singlet* L-8 codifica uma proteína similar a uma serino/treonina fosfatase (95 % de identidade) de *A. niger*, que remove os grupamentos fosfatos de proteínas para a regulação de cascatas enzimáticas presentes em uma grande variedade de processos celulares. Fosfatases ácidas e alcalinas são frequentemente produzidas e secretadas por fungos filamentosos em condições específicas (Guimarães *et al.*, 2003; Borkovich *et al.*, 2004), com associações diretas à patogenicidade da levedura *C. albicans* (Lee *et al.*, 2004) e de *Botrytis cinerea* (Schumacher *et al.*, 2008)

Os transcritos isolados podem estar relacionados à patogenicidade ou virulência em dermatófitos, sendo este o primeiro ensaio molecular para detectar genes expressos após contato de *T. rubrum* com lipídeos, o que mostra a necessidade de experimentos mais apurados de expressão gênica para atestar o envolvimento destes genes no estabelecimento das dermatofitoses.

5.3. Expressão de proteases no mutante *pacC-1*

Como já demonstrado, patógenos modulam o pH do sítio hospedeiro e regulam sua virulência em um mecanismo que permite a expressão de genes e secreção de seus produtos apenas em condições de pH ótimos para suas atividades (Nahas *et al.*, 1982), processo relacionado ao sucesso adaptativo durante a infecção. Em dermatófitos, a adaptação metabólica também ocorre após a identificação das características do local e consequente regulação gênica para estabelecer os passos iniciais da infecção. Dentre os genes com ativação regulada pelo pH ambiente após cascata de sinalização estão os codificadores de enzimas secretadas, permeases e reguladores da expressão de genes que codificam enzimas de atuação intracelular (Espeso & Penalva, 1996; Nozawa *et al.*, 2003; Maranhão *et al.*, 2007), além de outros compostos que podem ser exportados e causar uma gradativa alcalinização do ambiente infectado. O modelo proposto por Caddick *et al* (1986) para a regulação da expressão gênica através do pH em *A. nidulans* demonstrou que o fator de transcrição *pacC* ativa ou reprime genes específicos, dependendo do pH extracelular.

A importância de grandes famílias de proteases (subtilisinas e metaloproteases) relacionadas à virulência em vários fungos e com ótima atividade em pH alcalino foi abordada anteriormente, ressaltando no importante papel destas para a degradação de tecidos, e consequentemente na disseminação de patógenos para o desenvolvimento de doenças (Jousson *et al.*, 2004). Sendo assim, uma vez que na biblioteca TRSSHQue foram isoladas seqüências de transcritos similares a proteases queratinolíticas com atividade em pH alcalino, experimentos de *northern blot* com a linhagem $\Delta pacC-1$ de *T. rubrum* utilizando sondas desses transcritos foram efetivados para uma avaliação comparativa do padrão de expressão em relação a linhagem selvagem. Para este fim, as linhagens foram

cultivadas separadamente seguindo o mesmo protocolo adotado para a geração da biblioteca citada. Observou-se uma menor expressão de todas as proteases testadas (Sub 3 e 5 e Mep 4) na linhagem $\Delta pacC$ -1 cultivada em queratina em relação a selvagem H6 (Fig 15). Pode-se observar também que a expressão destas proteases estão ligeiramente aumentadas na linhagem $\Delta pacC$ -1 comparada com a linhagem selvagem, ambas cultivadas em glicose, onde o pH do meio de cultivo permanece ácido. Dessa forma é possível concluir que o fator de transcrição PacC da linhagem selvagem de *T. rubrum* participa da ativação destas proteases em queratina (pH alcalino) e parece também estar envolvido na inibição das mesmas em glicose (pH ácido).

Esses resultados são corroborados por análises da linhagem $\Delta pacC$ -1, quando a disrupção do gene *pacC* foi correlacionada com a diminuição na habilidade em crescer sob fragmentos de unhas como única fonte de nutrição, em relação à linhagem selvagem H6 (Ferreira-Nozawa *et al.*, 2006). O mesmo grupo também observou que a secreção de proteases queratinolíticas é diminuída no mutante $\Delta pacC$ -1 em relação a linhagem H6, em meio líquido suplementado com queratina, apesar das duas linhagens apresentarem o mesmo fenótipo quando crescidas em meio Sabouraud ágar. Essas observações também são consistentes com o fato de que *T. rubrum* falha ao crescer em meio contendo PMSF, um inibidor específico de proteases (Takasuka, 2000). Resultados similares foram obtidos com o fungo filamentoso *Fusarium verticillioides*, um fitopatógeno que teve o gene homólogo ao *pacC* de *A. nidulans* isolado e caracterizado (Flaherty *et al.*, 2003).

Patógenos humanos como o fungo *C. albicans* e bactérias como *Salmonella typhimurium* e *E. coli* apresentam virulência dependente do pH externo (Slonczewski & Blankenhorn, 1999; Davis *et al.*, 2000). Em *C. albicans* já foi confirmado que existem genes diretamente relacionados à patogenicidade e que são regulados pelo homólogo do gene *pacC* de *A. nidulans* (Ramon *et al.*, 1999; Li, 2004), envolvidos em mudanças

morfológicas determinantes para estabelecer o estado patogênico leveduriforme. Bignell *et al* (2005) estudaram mecanismos dependentes do pH em agentes causadores da aspergilose pulmonar. Ao gerar mutantes para o gene *pacC*, observaram atenuação severa da virulência nas novas cepas quando essas também se mostraram com limitações no crescimento *in vivo*, concluindo que o gene *pacC* é requerido para a virulência em espécies de *Aspergillus*.

É possível observar resultados semelhantes em fungos que atacam plantas. A expressão do gene que codifica a endo-1,4- β -gluconase foi aumentada em *Alternaria alternata* (Eshel *et al.*, 2002), bem como proteases que foram ativadas em *Metarhizium anisopliae* (St. Leger *et al.*, 1998), enquanto o pH ambiente encontrava-se alcalino. A secreção de proteases em isolados fitopatogênicos de *Colletotrichum*, além de lipases, celulases, pectinas (Maccheroni *et al.*, 2004) também foi alterada em resposta ao pH externo.

Uma cepa mutante do fitopatógeno *Sclerotia sclerotiorum* com perda de função após mutação no gene homólogo ao *pacC* (*pac1*), teve seu crescimento completamente inibido em pH alcalino com redução de 75% na produção de ácido oxálico, considerado essencial para a virulência deste organismo (Rollins, 2003). Outras características deste mutante foram avaliadas, como a diminuição na síntese de enzimas que degradam a parede celular da célula hospedeira, o que reduziu drasticamente a virulência de *S. sclerotiorum*. Já em *A. niger* ocorre conidiogênese alterada após mutação no *pacC* (MacCabe *et al.*, 1996), enquanto que a cepa de *U. maydis* mutada no *pacC* (altamente similar com a sequência do *pacC* de *A. niger*) mostrou alteração na morfogênese, aumento na sensibilidade às enzimas líticas e redução na produção de proteases (Arechiga-Carvajal & Ruiz-Herrera, 2005), similarmente aos nossos resultados, apesar da transição dimórfica de *U. maydis* induzida *in vitro* pelo pH não ter sido afetada após mutação no *pacC*.

A partir destes dados, sugere-se que o gene *pacC* de *T. rubrum* tenha um papel fundamental na regulação de genes necessários à uma infecção eficiente, sendo notável a sua relação com a virulência de fungos filamentosos como o *T. rubrum*. A busca de outros genes ativados pelo gene *pacC* e estudos mais aprofundados de cada um deles pode elucidar vias metabólicas e auxiliar no entendimento de mecanismos moleculares importantes para a manutenção de dermatofitoses crônicas.

5.4. Crescimento em unhas humanas é diferenciado nas linhagens H6 e $\Delta TruMDR2$ de *T. rubrum*

Uma vez que um grande número de sequências similares ao transportador ABC/MDR foram identificadas tanto na biblioteca com teste em queratina (TRSSHQue) como no teste em fonte lipídica (TRSSHLip), optou-se por utilizar o modelo de infecção *in vitro* com a linhagem H6 para entender melhor os efeitos de uma mutação no gene *TruMDR2*, que codifica um transportador tipo- ABC/MDR em *T. rubrum* e que se mostrou super expresso tanto em meio suplementado com queratina quanto com lipídeo. O gene *TruMDR2*, foi altamente transcrito após a exposição à acriflavina, cetoconazol, clorafenicol, griseofulvina, fluconazol e outros agentes citotóxicos, como demonstrou Fachin *et al.* (2006) através de *northern blots* utilizando a linhagem selvagem H6. Fachin *et al* (2006) também realizaram análises funcionais no mutante interrompido no gene *TruMDR2* (linhagem $\Delta TruMDR2$) e constataram a hipersensibilidade à 4-nitroquinoline-N-oxide (4NQO), terbinafina e brometo de etídio. Em nossos ensaios infecciosos, o nocaute foi estritamente correlacionado com a diminuição da habilidade do mutante $\Delta TruMDR2$ em crescer sob unhas humanas quando comparado com a linhagem selvagem H6 (Fig. 16). Logo, os genes tipo-MDR podem afetar outros aspectos do metabolismo além do efluxo de

drogas, podendo estar envolvido no transporte de nutrientes como fontes de carbono diferenciadas.

A capacidade do fungo infectante em regular sua expressão gênica e ultrapassar as resistências imunológicas do hospedeiro são cruciais para a sobrevivência dos dermatófitos durante o processo infeccioso, e a expressão de vários transportadores de membrana celular identificados nos nossos experimentos confirmam que há um sistema de transporte requerido para o ótimo crescimento de *T. rubrum* em substratos queratinizados. Além disso, com o uso de fragmentos de unha como única fonte nutricional para as linhagens testadas, foi confirmada a baixa conidiação do mutante $\Delta TruMDR2$ comparado com a linhagem H6, sugerindo que o gene *TruMDR2* pode estar envolvido em mecanismos de virulência de *T. rubrum*.

6. Conclusões

- *T. rubrum* foi capaz de alterar gradativamente o pH do meio de cultivo durante o crescimento em diferentes fontes de carbono (queratina e lipídeo), sendo esta alteração captada pela célula fúngica e relacionada com uma expressão regulada de genes.
- O uso da hibridização subtrativa seguida de PCR supressivo e de ferramentas bioinformáticas possibilitou o isolamento e análise de genes diferencialmente expressos de *T. rubrum*, após o tratamento pré-programado com fontes de carbono, estabelecendo um padrão de resposta diferenciada frente a compostos tipicamente encontrados em sítios infectados por dermatófitos.
- Queratina ou fonte lipídica no meio de cultivo ativa a expressão gênica em *T. rubrum*, regulando genes codificadores de proteínas queratinolíticas, relacionadas ao ciclo celular e ativas para a transdução de sinais, além de outros processos metabólicos relacionados à virulência fúngica.
- Em *T. rubrum*, o isolamento e validação de transcritos similares à transportadores transmembranas, após o cultivo tanto em queratina quanto em lipídeo, reflete um sistema de transporte com provável função regulatória. Observou-se ainda a redução da virulência na linhagem $\Delta TruMDR2$ durante o crescimento em fragmentos de unhas, sugerindo que o gene codificador de um transportador tipo-MDR está envolvido na virulência de *T. rubrum*.
- O gene *pacC* interfere na expressão de genes alcalino-específicos neste dermatófito, como os codificadores de importantes fatores de virulência ativos nas dermatofitoses (subtilisinas e metaloproteases), atestando sua função na regulação de genes necessários a infecção.
- O presente trabalho contribuiu para o depósito de sequências no banco dBEST do NCBI, agregando dados acerca de Genômica estrutural e funcional que podem auxiliar em estudos futuros.

7. Referências Bibliográficas

Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller & D. J. Lipman (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res** **25**(17): 3389-402.

Anaya, N. & M. I. Roncero (1996). Stress-induced rearrangement of *Fusarium* retrotransposon sequences. **Mol Gen Genet** **253**: 89-94.

Apodaca, G. & J. H. McKerrow (1989). Regulation of *Trichophyton rubrum* proteolytic activity. **Infect Immun** **57**(10): 3081-90.

Arechiga-Carvajal, E. T. & J. Ruiz-Herrera (2005). The RIM101/pacC homologue from the basidiomycete *Ustilago maydis* is functional in multiple pH-sensitive phenomena. **Eukaryot Cell** **4**: 999-1008.

Arst, H. N. & M. A. Penalva (2003). Recognizing gene regulation by ambient pH. **Fungal Genetics and Biology** **40**(1): 1-3.

Atlas, R. M. (1993). Handbook of microbiological media, CRC Press.

Bignell, E., S. Negrete-Urtasun, A. M. Calcagno, K. Haynes, H. N. Arst, Jr. & T. Rogers (2005). The *Aspergillus* pH-responsive transcription factor PacC regulates virulence. **Mol Microbiol** **55**(4): 1072-84.

Bingham, P. M. & B. H. Judd (1981). A copy of the copia transposable element is very tightly linked to the Wa allele at the white locus of *D. melanogaster*. **Cell** **25**: 705-11.

Birch, M., G. Robson, D. Law & D. W. Denning (1996). Evidence of multiple extracellular phospholipase activities of *Aspergillus fumigatus*. **Infect Immun** **64**(3): 751-5.

Borkovich, K. A., L. A. Alex, O. Yarden, M. Freitag, G. E. Turner, N. D. Read, S. Seiler, D. Bell-Pedersen, J. Paietta, N. Plesofsky, M. Plamann, M. Goodrich-Tanrikulu, U. Schulte, G. Mannhaupt, F. E. Nargang, A. Radford, C. Selitrennikoff, J. E. Galagan, J. C. Dunlap, J. J. Loros, D. Catcheside, H. Inoue, R. Aramayo, M. Polymenis, E. U. Selker, M. S. Sachs, G. A. Marzluf, I. Paulsen, R. Davis, D. J. Ebbole, A. Zelter, E. R. Kalkman, R. O'Rourke, F. Bowring, J. Yeadon, C. Ishii, K. Suzuki, W. Sakai & R. Pratt (2004). Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. **Microbiol Mol Biol Rev** **68**(1): 1-108.

Bouzhidi, M. F., F. Parlange, P. Nicolas & S. Mouzeyar (2007). Expressed Sequence Tags from the oomycete *Plasmopara halstedii*, an obligate parasite of the sunflower. **BMC Microbiol** 7: 110.

Brakhage, A. A., P. Sprote, Q. Al-Abdallah, A. Gehrke, H. Plattner & A. Tuncher (2004). Regulation of penicillin biosynthesis in filamentous fungi. **Adv Biochem Eng Biotechnol** 88: 45-90.

Brasch, J. & M. Zaldua (1994). Enzyme patterns of dermatophytes. **Mycoses** 37(1-2): 11-6.

Brouta, F., F. Descamps, T. Fett, B. Losson, C. Gerday & B. Mignon (2001). Purification and characterization of a 43 kDa keratinolytic metalloprotease from *Microsporum canis*. **Med Mycol** 39(3): 269-275.

Caddick, M. X., A. G. Brownlee & H. N. Arst (1986). Regulation of gene-expression by pH of the growth-medium in *Aspergillus nidulans*. **Mol Gen Genet** 203(2): 346-353.

Camargo, Z. P., C. Unterkircher & L. R. Travassos (1989). Identification of antigenic polypeptides of *Paracoccidioides brasiliensis* by immunoblotting. **J Med Vet Mycol** 26: 2147-51.

Cervelatti, E. P., M. S. Ferreira-Nozawa, R. Aquino-Ferreira, A. L. Fachin & N. M. Martinez-Rossi (2004). Electrophoretic molecular karyotype of the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Genetics and Molecular Biology** 27(1): 99-102.

Chen, S. C. A., M. Muller, J. Z. Zhou, L. C. Wright & T. C. Sorrell (1997). Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: a new virulence factor? **J. Infect. Dis** 175: 414-420.

Chermette, R., L. Ferreira & J. Guillot (2008). Dermatophytoses in Animals. **Mycopathologia**.

Coelho, L. M., R. Aquino-Ferreira, C. M. Maffei & N. M. Martinez-Rossi (2008). In vitro antifungal drug susceptibilities of dermatophytes microconidia and arthroconidia. **J Antimicrob Chemother** 62(4): 758-61.

Costa, M., X. S. Passos, L. K. Souza, A. T. Miranda, A. Lemos Jde, J. G. Oliveira, Jr. & R. Silva Mdo (2002). Epidemiology and etiology of dermatophytosis in Goiania, GO, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 35(1): 19-22.

Cove, D. J. (1966). The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. **Biochim Biophys Acta** 113(1): 51-6.

Cutler, J. E. (1991). Putative virulence factors of *Candida albicans*. **Annu Rev Microbiol** **45**: 187-218.

da Silva, A. C., J. A. Ferro, F. C. Reinach, C. S. Farah, L. R. Furlan, R. B. Quaggio, C. B. Monteiro-Vitorello, M. A. Van Sluys, N. F. Almeida, L. M. Alves, A. M. do Amaral, M. C. Bertolini, L. E. Camargo, G. Camarotte, F. Cannavan, J. Cardozo, F. Chambergo, L. P. Ciapina, R. M. Cicarelli, L. L. Coutinho, J. R. Cursino-Santos, H. El-Dorry, J. B. Faria, A. J. Ferreira, R. C. Ferreira, M. I. Ferro, E. F. Formighieri, M. C. Franco, C. C. Greggio, A. Gruber, A. M. Katsuyama, L. T. Kishi, R. P. Leite, E. G. Lemos, M. V. Lemos, E. C. Locali, M. A. Machado, A. M. Madeira, N. M. Martinez-Rossi, E. C. Martins, J. Meidanis, C. F. Menck, C. Y. Miyaki, D. H. Moon, L. M. Moreira, M. T. Novo, V. K. Okura, M. C. Oliveira, V. R. Oliveira, H. A. Pereira, A. Rossi, J. A. Sena, C. Silva, R. F. de Souza, L. A. Spinola, M. A. Takita, R. E. Tamura, E. C. Teixeira, R. I. Tezza, M. Trindade dos Santos, D. Truffi, S. M. Tsai, F. F. White, J. C. Setubal & J. P. Kitajima (2002). Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature** **417**(6887): 459-63.

Daviere, J. M., Langin T. & M. J. Daboussi (2001). Potential role of transposable elements in the rapid reorganization of the *Fusarium oxysporum* genome. **Fungal Genet Biol** **34**: 177-92.

Davis, D., R. B. Wilson & A. P. Mitchell (2000). RIM101-dependent and -independent pathways govern pH responses in *Candida albicans*. **Mol Cell Biol** **20**(3): 971-978.

Davis, D. A., V. M. Bruno, L. Loza, S. G. Filler & A. P. Mitchell (2002). *Candida albicans* Mds3p, a conserved regulator of pH responses and virulence identified through insertional mutagenesis. **Genetics** **162**(4): 1573-1581.

De Bernardis, F., F. A. Muhlschlegel, A. Cassone & W. A. Fonzi (1998). The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans*. **Infect Immun** **66**(7): 3317-25.

de Waard, M. A., A. C. Andrade, K. Hayashi, H. J. Schoonbeek, I. Stergiopoulos & L. H. Zwieters (2006). Impact of fungal drug transporters on fungicide sensitivity, multidrug resistance and virulence. **Pest Manag Sci** **62**(3): 195-207.

Delgado-Jarana, J., A. M. Rincon & T. Benitez (2002). Aspartyl protease from *Trichoderma harzianum* CECT 2413: cloning and characterization. **Microbiology** **148**: 1305-1315.

Denison, S. H. (2000). pH regulation of gene expression in fungi. **Fungal Genet Biol** **29**(2): 61-71.

Denison, S. H., M. Orejas & H. N. Arst (1995). Signaling of ambient pH in *Aspergillus* involves a cysteine protease. **J Biol Chem** **270**(48): 28519-28522.

Dickman, M. B. & O. Yarden (1999). Serine/threonine protein kinases and phosphatases in filamentous fungi. **Fungal Genet Biol** **26**: 99-117.

DiDomenico, B. (1999). Novel antifungal drugs. **Curr Opin Microbiol** **2**(5): 509-15.

Diez, E., J. Alvaro, E. A. Espeso, L. Rainbow, T. Suarez, J. Tilburn, H. N. Arst & M. A. Peñalva (2002). Activation of the *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor requires two proteolytic steps. **EMBO J.** **21**(6): 1350-1359.

Dilks, D. W., R. H. Ring, X. Z. Khawaja, T. J. Novak & C. Aston (2003). High-throughput confirmation of differential display PCR results using reverse Northern blotting. **J Neurosci Methods** **123**(1): 47-54.

Dong, X., W. Shi, Q. Zeng & L. Xie (2005). Roles of adherence and matrix metalloproteinases in growth patterns of fungal pathogens in cornea. **Curr Eye Res** **30**(8): 613-20.

Duek, L., G. Kaufman, Y. Ulman & I. Berdicevsky (2004). The pathogenesis of dermatophyte infections in human skin sections. **J Infect** **48**(2): 175-80.

el Moudni, B., M. H. Rodier, C. Barrault, M. Ghazali & J. L. Jacquemin (1995). Purification and characterisation of a metallopeptidase of *Candida albicans*. **J Med Microbiol** **43**(4): 282-8.

Eshel, D., I. Miyara, T. Ailing, A. Dinoor & D. Prusky (2002). pH regulates endoglucanase expression and virulence of *Alternaria alternata* in persimmon fruit. **Mol Plant Microbe Interact** **15**(8): 774-9.

Espeso, E. A. & M. A. Penalva (1996). Three binding sites for the *Aspergillus nidulans* PacC zinc-finger transcription factor are necessary and sufficient for regulation by ambient pH of the isopenicillin N synthase gene promoter. **Journal of Biological Chemistry** **271**(46): 28825-28830.

Esquenazi, D., W. de Souza, C. S. Alviano & S. Rozental (2003). The role of surface carbohydrates on the interaction of microconidia of *Trichophyton mentagrophytes* with epithelial cells. **FEMS Immunol Med Microbiol** **35**(2): 113-23.

Eto, Y., K. Ikeda, I. Chuma, T. Kataoka, S. Kuroda, N. Kikuchi, L. D. Don, M. Kusaba, H. Nakayashiki, Y. Tosa & S. Mayama (2001). Comparative analyses of the distribution of various transposable elements in *Pyricularia* and their activity during and after the sexual cycle. **Mol Gen Genet** **264**(5): 565-77.

Ewing, B. & P. Green (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Res** **8**(3): 186-194.

Fachin, A. L., M. S. Ferreira-Nozawa, W. Maccheroni, Jr. & N. M. Martinez-Rossi (2006). Role of the ABC transporter TruMDR2 in terbinafine, 4-nitroquinoline N-oxide and ethidium bromide susceptibility in *Trichophyton rubrum*. **J Med Microbiol** **55**(Pt 8): 1093-9.

Fan, J., V. Chaturvedi & S. H. Shen (2002). Identification and phylogenetic analysis of a glucose transporter gene family from the human pathogenic yeast *Candida albicans*. **J Mol Evol** **55**(3): 336-46.

Ferreira-Nozawa, M. S., S. R. Nozawa, N. M. Martinez-Rossi & A. Rossi (2003). The dermatophyte *Trichophyton rubrum* secretes an EDTA-sensitive alkaline phosphatase on high-phosphate medium. **Braz J Microbiol** **34**(2): 161-164.

Ferreira-Nozawa, M. S., H. C. Silveira, C. J. Ono, A. L. Fachin, A. Rossi & N. M. Martinez-Rossi (2006). The pH signaling transcription factor PacC mediates the growth of *Trichophyton rubrum* on human nail *in vitro*. **Med Mycol** **44**(7): 641-5.

Ferreira, K. S. & S. R. Almeida (2006). Immunization of susceptible mice with gp43-pulsed dendritic cells induce an increase of pulmonary Paracoccidioidomycosis. **Immunol Lett** **103**(2): 121-6.

Flaherty, J. E., A. M. Pirttila, B. H. Bluhm & C. P. Woloshuk (2003). PAC1, a pH-regulatory gene from *Fusarium verticillioides*. **Appl Environ Microbiol** **69**(9): 5222-7.

Fleissner, A., C. Sopalla & K. M. Weltring (2002). An ATP-binding cassette multidrug-resistance transporter is necessary for tolerance of *Gibberella pulicaris* to phytoalexins and virulence on potato tubers. **Mol Plant Microbe Interact** **15**(2): 102-8.

Fotedar, R. & S. S. Al-Hedaithy (2005). Comparison of phospholipase and proteinase activity in *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. **Mycoses** **48**(1): 62-7.

Franco, G. R., M. D. Adams, M. B. Soares, A. J. Simpson, J. C. Venter & S. D. Pena (1995). Identification of new *Schistosoma mansoni* genes by the EST strategy using a directional cDNA library. **Gene** **152**(2): 141-7.

Fraser, R. D. & D. A. Parry (2005). The three-dimensional structure of trichocyte (hard alpha-) keratin intermediate filaments: features of the molecular packing deduced from the sites of induced crosslinks. **J Struct Biol** **151**(2): 171-81.

Galagan, J. E., S. E. Calvo, K. A. Borkovich, E. U. Selker, N. D. Read, D. Jaffe, W. FitzHugh, L. J. Ma, S. Smirnov, S. Purcell, B. Rehman, T. Elkins, R. Engels, S. G. Wang, C. B. Nielsen, J. Butler, M. Endrizzi, D. Y. Qui, P. Ianakiev, D. B. Pedersen, M. A. Nelson, M. Werner-Washburne, C. P. Selitrennikoff, J. A. Kinsey, E. L. Braun, A. Zelter, U. Schulte, G. O. Kothe, G. Jedd, W. Mewes, C. Staben, E. Marcotte, D. Greenberg, A. Roy, K. Foley, J. Naylor, N. Stabge-Thomann, R. Barrett, S. Gnerre, M. Kamal, M. Kamvysselis, E. Mauceli, C. Bielke, S. Rudd, D. Frishman, S. Krystofova, C. Rasmussen, R. L. Metzenberg, D. D. Perkins, S. Kroken, C. Cogoni, G. Macino, D. Catcheside, W. X. Li, R. J. Pratt, S. A. Osmani, C. P. C. DeSouza, L. Glass, M. J. Orbach, J. A. Berglund, R. Voelker, O. Yarden, M. Plamann, S. Seller, J. Dunlap, A. Radford, R. Aramayo, D. O. Natvig, L. A. Alex, G. Mannhaupt, D. J. Ebbole, M. Freitag, I. Paulsen, M. S. Sachs, E. S. Lander, C. Nusbaum & B. Birren (2003). The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. **Nature** **422**(6934): 859-868.

Georgopapadakou, N. H. & T. J. Walsh (1994). Human mycoses: drugs and targets for emerging pathogens. **Science** **264**(5157): 371-3.

Ghannoum, M. A., B. J. Spellberg, A. S. Ibrahim, J. A. Ritchie, B. Currie, E. D. Spitzer, J. E. Edwards, Jr. & A. Casadevall (1994). Sterol composition of *Cryptococcus neoformans* in the presence and absence of fluconazole. **Antimicrob Agents Chemother** **38**(9): 2029-33.

Gong, J. Q., X. Q. Liu, H. B. Xu, X. S. Zeng, W. Chen & X. F. Li (2007). Deep dermatophytosis caused by *Trichophyton rubrum*: report of two cases. **Mycoses** **50**(2): 102-8.

Gonzalez, A., B. L. Gomez, C. Munoz, B. H. Aristizabal, A. Restrepo, A. J. Hamilton & L. E. Cano (2008). Involvement of extracellular matrix proteins in the course of experimental paracoccidioidomycosis. **FEMS Immunol Med Microbiol** **53**(1): 114-25.

Gopal, P., P. A. Sullivan & M. G. Shepherd (1982). Enzymes of N-acetylglucosamine metabolism during germ-tube formation in *Candida albicans*. **J Gen Microbiol** **128**(10): 2319-26.

Gorani, A., A. Schiera & A. Oriani (2002). Case Report. Widespread tinea corporis due to *Trichophyton rubrum*. **Mycoses** **45**(5-6): 195-7.

Grallert, A., A. Krapp, S. Bagley, V. Simanis & I. M. Hagan (2004). Recruitment of NIMA kinase shows that maturation of the *S. pombe* spindle-pole body occurs over consecutive

cell cycles and reveals a role for NIMA in modulating SIN activity. **Genes Dev** *18*(9): 1007-21.

Graser, Y., A. F. Kuijpers, W. Presber & G. S. de Hoog (2000). Molecular taxonomy of the *Trichophyton rubrum* complex. **J Clin Microbiol** *38*: 3329-3336.

Grossman, M. E., A. S. Pappert, M. C. Garzon & D. N. Silvers (1995). Invasive *Trichophyton rubrum* infection in the immunocompromised host: report of three cases. **J Am Acad Dermatol** *33*(2 Pt 1): 315-8.

Guimarães, L. H., H. F. Terenzi, J. A. Jorge, F. A. Leone & M. L. Polizeli (2003). Extracellular alkaline phosphatase from the filamentous fungus *Aspergillus caespitosus*: purification and biochemical characterization. **Folia Microbiol** *48*(5): 627-32.

Gurskaya, N. G., L. Diatchenko, A. Chenchik, P. D. Siebert, G. L. Khaspekov, K. A. Lukyanov, L. L. Vagner, O. D. Ermolaeva, S. A. Lukyanov & E. D. Sverdlov (1996). Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. **Anal Biochem** *240*(1): 90-7.

Hashimoto, T. & H. J. Blumenthal (1978). Survival and resistance of *Trichophyton mentagrophytes* arthrospores. **Appl Environ Microbiol** *35*(2): 274-7.

Hellgren, L. & J. Vincent (1980). Lipolytic activity of some dermatophytes. **J Med Microbiol** *13*(1): 155-7.

Herscovics, A. & P. Orlean (1993). Glycoprotein biosynthesis in yeast. **Faseb J** *7*(6): 540-50.

Hong, S., H. Horiuchi & A. Ohta (2005). Identification and molecular cloning of a gene encoding Phospholipase A2 (plaA) from *Aspergillus nidulans*. **Biochim Biophys Acta** *1735*(3): 222-9.

Hossain, M. A. & M. A. Ghannoum (2000). New investigational antifungal agents for treating invasive fungal infections. **Expert Opin Investig Drugs** *9*(8): 1797-813.

Howard, D. H. (1999). Acquisition, transport, and storage of iron by pathogenic fungi. **Clin Microbiol Rev** *12*(3): 394-404.

Ivey, F. D., P. N. Hodge, G. E. Turner & K. A. Borkovich (1996). The G alpha i homologue gna-1 controls multiple differentiation pathways in *Neurospora crassa*. **Mol Biol Cell** 7(8): 1283-97.

Jain, S., K. Akiyama, K. Mae, T. Ohguchi & R. Takata (2002). Targeted disruption of a G protein alpha subunit gene results in reduced pathogenicity in *Fusarium oxysporum*. **Curr Genet** 41(6): 407-13.

James, J. S. (2006). Vaccine improves survival in monkey tests. **AIDS Treat News** 418(4).

Jin, Q. C., H. T. Dong, Y. L. Peng, B. S. Chen, J. Shao, Y. Deng, C. E. Dai, Y. Q. Fang, Y. C. Lou, Y. Z. Li & D. B. Li (2007). Application of cDNA array for studying the gene expression profile of mature appressoria of *Magnaporthe grisea*. **J Zhejiang Univ Sci B** 8(2): 88-97.

Jousson, O., B. Lechenne, O. Bontems, B. Mignon, U. Reichard, J. Barblan, M. Quadroni & M. Monod (2004). Secreted subtilisin gene family in *Trichophyton rubrum*. **Gene** 339: 79-88.

Kadir, T., B. Gumru & B. Uygun-Can (2007). Phospholipase activity of *Candida albicans* isolates from patients with denture stomatitis: the influence of chlorhexidine gluconate on phospholipase production. **Arch Oral Biol** 52(7): 691-6.

Kano, R., H. Matshushiro, T. Watari, H. Tsujimoto & A. Hasegawa (1997). Differentiation of *Arthroderma* spp. by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and Southern hybridization. **Mycoses** 40(9-10): 335-41.

Kano, R., K. Okabayashi, Y. Nakamura, S. Ooka, M. Kashima, M. Mizoguchi, S. Watanabe & A. Hasegawa (2000). Differences among chitin synthase I gene sequences in *Trichophyton rubrum* and *T. violaceum*. **Medical Mycology** 38(1): 47-50.

Kasuga, T., J. P. Townsend, C. Tian, L. B. Gilbert, G. Mannhaupt, J. W. Taylor & N. L. Glass (2005). Long-oligomer microarray profiling in *Neurospora crassa* reveals the transcriptional program underlying biochemical and physiological events of conidial germination. **Nucleic Acids Res** 33(20): 6469-85.

Kaufman, G., B. A. Horwitz, L. Duek, Y. Ullman & I. Berdicevsky (2007). Infection stages of the dermatophyte pathogen *Trichophyton*: microscopic characterization and proteolytic enzymes. **Med Mycol** 45(2): 149-55.

Kozel, T. R. (1995). Virulence factors of *Cryptococcus neoformans*. **Trends Microbiol** 3(8): 295-9.

Kronstad, J. W. (2006). Serial analysis of gene expression in eukaryotic pathogens. **Infect Disord Drug Targets** 6(3): 281-97.

Kwon-Chung, K. J. & J. E. Bennett (1992). Medical mycology. Philadelphia, Lea and Febiger.

Lee, C. M., A. Nantel, L. Jiang, M. Whiteway & S. H. Shen (2004). The serine/threonine protein phosphatase SIT4 modulates yeast-to-hypha morphogenesis and virulence in *Candida albicans*. **Mol Microbiol** 51(3): 691-709.

Li, M. C., Martin, S.J., Bruno, V.M., Mitchell, A.P., Davis, D.A. (2004). *Candida albicans* Rim13p, a protease required for Rim101p processing at acidic and alkaline pHs. **Eukaryotic Cell** 3: 741-751.

Li, Q. R., A. R. Carvunis, H. Yu, J. D. Han, Q. Zhong, N. Simonis, S. Tam, T. Hao, N. J. Klitgord, D. Dupuy, D. Mou, I. Wapinski, A. Regev, D. E. Hill, M. E. Cusick & M. Vidal (2008). Revisiting the *Saccharomyces cerevisiae* predicted ORFeome. **Genome Res** 18(8): 1294-303.

Loftus, B. J., E. Fung, P. Roncaglia, D. Rowley, P. Amedeo, D. Bruno, J. Vamathevan, M. Miranda, I. J. Anderson, J. A. Fraser, J. E. Allen, I. E. Bosdet, M. R. Brent, R. Chiu, T. L. Doering, M. J. Donlin, C. A. D'Souza, D. S. Fox, V. Grinberg, J. Fu, M. Fukushima, B. J. Haas, J. C. Huang, G. Janbon, S. J. Jones, H. L. Koo, M. I. Krzywinski, J. K. Kwon-Chung, K. B. Lengeler, R. Maiti, M. A. Marra, R. E. Marra, C. A. Mathewson, T. G. Mitchell, M. Pertea, F. R. Riggs, S. L. Salzberg, J. E. Schein, A. Shvartsbeyn, H. Shin, M. Shumway, C. A. Specht, B. B. Suh, A. Tenney, T. R. Utterback, B. L. Wickes, J. R. Wortman, N. H. Wye, J. W. Kronstad, J. K. Lodge, J. Heitman, R. W. Davis, C. M. Fraser & R. W. Hyman (2005). The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Science** 307: 1321-4.

Lorenz, M. (2002). Genomic approaches to fungal pathogenicity. **Curr Opin Microbiol** 5: 372-378.

Lu, J. P., T. B. Liu & F. C. Lin (2005). Identification of mature appressorium-enriched transcripts in *Magnaporthe grisea*, the rice blast fungus, using suppression subtractive hybridization. **Fems Microbiology Letters** 245(1): 131-137.

MacCabe, A. P., J. P. Van den Hombergh, J. Tilburn, H. N. Arst, Jr. & J. Visser (1996). Identification, cloning and analysis of the *Aspergillus niger* gene *pacC*, a wide domain regulatory gene responsive to ambient pH. **Mol Gen Genet** 250(3): 367-74.

Maccheroni Jr., W., May, GS, N. M. Martinez-Rossi & A. Rossi (1997). The sequence of *palF*, an environmental pH response gene in *Aspergillus nidulans*. **Gene** 194(2): 163-7.

Maccheroni, W., W. L. Araujo & J. L. Azevedo (2004). Ambient pH-regulated enzyme secretion in endophytic and pathogenic isolates of the fungal genus *Colletotrichum*. **Scientia Agricola** **61**(3): 298-302.

Maranhão, F. C. A., F. G. Paião & N. M. Martinez-Rossi (2007). Isolation of transcripts over-expressed in human pathogen *Trichophyton rubrum* during growth in keratin. **Microb Pathog** **43**: 166-72.

Marger, M. D. & M. H. Saier Jr (1993). A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. **Trends Biochem Sci** **18**(1): 13-20.

Marques, E. R., M. E. Ferreira, R. D. Drummond, J. M. Felix, M. Menossi, M. Savoldi, L. R. Travassos, R. Puccia, W. L. Batista, K. C. Carvalho, M. H. Goldman & G. H. Goldman (2004). Identification of genes preferentially expressed in the pathogenic yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis*, using suppression subtraction hybridization and differential macroarray analysis. **Mol Genet Genomics** **271**(6): 667-77.

Marques, S. A., A. M. Robles, A. M. Tortorano, M. A. Tuculet, R. Negroni & R. P. Mendes (2000). Mycoses associated with AIDS in the Third World. **Med Mycol** **38 Suppl 1**: 269-79.

Martinez-Rossi, N. M., M. S. Ferreira-Nozawa, M. A. S. Graminha, S. R. Nozawa, A. L. Fachin, E. P. Cervelatti, R. A. Prade & A. Rossi (2004). Molecular aspects of dermatophyte-host interactions. Fungi in human and animal health. K. R.K.S. Jodhpur, India, Scientific Publishers. **9**: 143-165.

Martinez-Rossi, N. M., N. T. A. Peres & A. Rossi (2008). Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. **Mycopathologia (in press)**.

McGinnis, M. R. (1980). Laboratory handbook of Medical Mycology, Academic Press.

Meevootisom, V. & D. J. Niederpruem (1979). Control of exocellular proteases in dermatophytes and especially *Trichophyton rubrum*. **Sabouraudia** **17**(2): 91-106.

Monod, M., S. Jaccoud, C. Zaugg, B. Lechenne, F. Baudraz & R. Panizzon (2002). Survey of dermatophyte infections in the Lausanne area Switzerland. **Dermatology** **205**(2): 201-3.

Moraes, M. S., P. Godoy-Martinez, M. M. Alchorne, H. F. Boatto & O. Fischman (2006). Incidence of *Tinea capitis* in Sao Paulo, Brazil. **Mycopathologia** **162**(2): 91-5.

Muhsin, T. M. & A. H. Aubaid (2001). Partial purification and some biochemical characteristics of exocellular keratinase from *Trichophyton mentagrophytes* var. *erinacei*. **Mycopathologia** **150**(3): 121-5.

Muhsin, T. M., A. H. Aubaid & A. H. al-Duboon (1997). Extracellular enzyme activities of dermatophytes and yeast isolates on solid media. **Mycoses** **40**(11-12): 465-9.

Naglik, J., A. Albrecht, O. Bader & B. Hube (2004). *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. **Cell Microbiol** **6**(10): 915-26.

Nahas, E., H. F. Terenzi & A. Rossi (1982). Effect of carbon source and pH on the production and secretion of acid-phosphatase (EC3.1.3.2) and alkaline-phosphatase (EC3.1.3.1) in *Neurospora crassa*. **J Gen Microbiol** **128**(SEP): 2017-2021.

Nascimento, A. M. & N. M. Martinez-Rossi (2001). 18S-rDNA sequencing, enzyme patterns and morphological characterization of *Trichophyton* isolates. **Brazilian Journal of Microbiology** **32**(3): 179-186.

Niewerth, M., D. Kunze, M. Seibold, M. Schaller, H. C. Korting & B. Hube (2003). Ciclopirox olamine treatment affects the expression pattern of *Candida albicans* genes encoding virulence factors, iron metabolism proteins, and drug resistance factors. **Antimicrob Agents Chemother** **47**(6): 1805-17.

Nozawa, S. R., M. S. Ferreira-Nozawa, N. M. Martinez-Rossi & A. Rossi (2003). The pH-induced glycosylation of secreted phosphatases is mediated in *Aspergillus nidulans* by the regulatory gene *pacC*-dependent pathway. **Fungal Genet Biol** **39**(3): 286-295.

Ogawa, H., R. C. Summerbell, K. V. Clemons, T. Koga, Y. P. Ran, A. Rashid, P. G. Sohnle, D. A. Stevens & R. Tsuboi (1998). Dermatophytes and host defense in cutaneous mycoses. **Med Mycol** **36**: 166-73.

Okafor, J. I. & N. Ada (2000). Keratinolytic activity of five human isolates of the dermatophytes. **J Commun Dis** **32**: 300-305.

Okumura, T., S. Kimura & K. Saito (1980). A novel purification procedure for *Penicillium notatum* phospholipase B and evidence for a modification of phospholipase B activity by the action of an endogenous protease. **Biochim Biophys Acta** **617**(2): 264-73.

Orejas, M., E. A. Espeso, J. Tilburn, S. Sarkar, H. N. Arst & M. A. Peñalva (1995). Activation of the *Aspergillus* PacC transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxy-terminal moiety. **Genes Dev** **9**(13): 1622-1632.

Osmani, A. H., J. Davies, C. E. Oakley, B. R. Oakley & S. A. Osmani (2003). TINA interacts with the NIMA kinase in *Aspergillus nidulans* and negatively regulates astral microtubules during metaphase arrest. **Mol Biol Cell** **14**(8): 3169-79.

Paião, F. G., F. Segato, J. R. Cursino-Santos, N. T. Peres & N. M. Martinez-Rossi (2007). Analysis of *Trichophyton rubrum* gene expression in response to cytotoxic drugs. **FEMS Microbiol Lett** **271**(2): 180-6.

Pakula, T. M., J. Uusitalo, M. Saloheimo, K. Salonen, R. J. Aarts & M. Penttila (2000). Monitoring the kinetics of glycoprotein synthesis and secretion in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*: cellobiohydrolase I (CBHI) as a model protein. **Microbiology** **146** (Pt 1): 223-32.

Parisot, D., M. Dufresne, C. Veneault, R. Lauge & T. Langin (2002). clap1, a gene encoding a copper-transporting ATPase involved in the process of infection by the phytopathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. **Mol Genet Genomics** **268**(2): 139-51.

Pena-Muralla, R., Ayoubi, P., Graminha, M., Martinez-Rossi, N.M., Rossi, A., Prade, R.A. (2002). Antifungal target selection in *Aspergillus nidulans*. Using Bioinformatics to make the difference. Pathogen Genomics. Impact on Human Health. K. J. Shaw. Totowa, The Humana Press Inc. **14**: 215-230.

Peñalva, M. A. & H. N. Arst (2002). Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** **66**(3): 426.

Poggeler, S., M. Nowrousian, C. Ringelberg, J. J. Loros, J. C. Dunlap & U. Kuck (2006). Microarray and real-time PCR analyses reveal mating type-dependent gene expression in a homothallic fungus. **Mol Genet Genomics** **275**(5): 492-503.

Ramon, A. M., A. Porta & W. A. Fonzi (1999). Effect of environmental pH on morphological development of *Candida albicans* is mediated via the PacC-related transcription factor encoded by PRR2. **Journal of Bacteriology** **181**(24): 7524-7530.

Riggle, P. J. & C. A. Kumamoto (2000). Role of a *Candida albicans* P1-type ATPase in resistance to copper and silver ion toxicity. **J Bacteriol** **182**(17): 4899-905.

Rollins, J. A. (2003). The *Sclerotinia sclerotiorum* pac1 gene is required for sclerotial development and virulence. **Molecular Plant-Microbe Interactions** **16**(9): 785-795.

Rossi, A. & H. N. Arst, Jr. (1990). Mutants of *Aspergillus nidulans* able to grow at extremely acidic pH acidify the medium less than wild-type when grown at more moderate pH. **FEMS Microbiol Lett** **66**(1-3): 51-53.

Saier, M. H. J., J. T. Beatty, A. Goffeau, K. T. Harley, W. H. Heijne, S. C. Huang, D. L. Jack, P. S. Jahn, K. Lew, J. Liu, S. S. Pao, I. T. Paulsen, T. T. Tseng & P. S. Virk (1999). The major facilitator superfamily. **J Mol Microbiol Biotechnol** **1**: 257-279.

Sambrook, J., E. F. Fritsch & T. Maniatis (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Samdani, A. J. (2005). Dermatophyte growth and degradation of human stratum corneum in vitro (pathogenesis of dermatophytosis). **J Ayub Med Coll Abbottabad** **17**(4): 19-21.

Sarifakioglu, E., D. Seckin, M. Demirbilek & F. Can (2007). In vitro antifungal susceptibility patterns of dermatophyte strains causing *tinea unguium*. **Clin Exp Dermatol** **32**(6): 675-9.

Schmitt, E. K., R. Kempken & U. Kuck (2001). Functional analysis of promoter sequences of cephalosporin C biosynthesis genes from *Acremonium chrysogenum*: specific DNA-protein interactions and characterization of the transcription factor PACC. **Molecular Genetics and Genomics** **265**(3): 508-518.

Schumacher, J., M. Viaud, A. Simon & B. Tudzynski (2008). The Galpha subunit BCG1, the phospholipase C (BcPLC1) and the calcineurin phosphatase co-ordinately regulate gene expression in the grey mould fungus *Botrytis cinerea*. **Mol Microbiol** **67**(5): 1027-50.

Seebacher, C., J. P. Bouchara & B. Mignon (2008). Updates on the Epidemiology of Dermatophyte Infections. **Mycopathologia**.

Segato, F., S. R. Nozawa, A. Rossi & N. M. Martinez-Rossi (2008). Over-expression of genes coding for proline oxidase, riboflavin kinase, cytochrome c oxidase and an MFS transporter induced by acriflavin in *Trichophyton rubrum*. **Med Mycol** **46**(2): 135-9.

Seo, J. A., K. H. Han & J. H. Yu (2005). Multiple roles of a heterotrimeric G-protein gamma-subunit in governing growth and development of *Aspergillus nidulans*. **Genetics** **171**(1): 81-9.

Seymour, I. J. & P. W. Piper (1999). Stress induction of HSP30, the plasma membrane heat shock protein gene of *Saccharomyces cerevisiae*, appears not to use known stress-regulated transcription factors. **Microbiology** **145** (Pt 1): 231-9.

Shcherban, A. B., D. A. Vaughan, N. Tomooka & A. Kaga (2000). Diversity in the integrase coding domain of a gypsy-like retrotransposon among wild relatives of rice in the *Oryza officinalis* complex. **Genetica** **110**(1): 43-53.

Shiba, Y., C. Ono, F. Fukui, I. Watanabe, N. Serizawa, K. Gomi & H. Yoshikawa (2001). High-level secretory production of phospholipase A1 by *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae*. **Biosci Biotechnol Biochem** **65**(1): 94-101.

Shim, K. S., S. K. Cho, J. U. Jeung, K. W. Jung, M. K. You, S. H. Ok, Y. S. Chung, K. H. Kang, H. G. Hwang, H. C. Choi, H. P. Moon & J. S. Shin (2004). Identification of fungal (*Magnaporthe grisea*) stress-induced genes in wild rice (*Oryza minuta*). **Plant Cell Reports** **22**(8): 599-607.

Sidrim, J. J. C. & M. F. G. Rocha (2004). Micologia Médica à Luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan.

Slonczewski, J. L. & D. Blankenhorn (1999). Acid and base regulation in the proteome of *Escherichia coli*. **Novartis Found Symp** **221**: 75-83.

Speth, C., G. Rambach, R. Wurzner & C. Lass-Florl (2008). Complement and fungal pathogens: an update. **Mycoses**.

St. Leger, R. J., L. Joshi & D. Roberts (1998). Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. **Appl Environ Microbiol** **64**: 709-13.

Surjushe, A., R. Kamath, C. Oberai, D. Saple, M. Thakre, S. Dharmshale & A. Gohil (2007). A clinical and mycological study of onychomycosis in HIV infection. **Indian J Dermatol Venereol Leprol** **73**(6): 397-401.

Taglicht, D. & S. Michaelis (1998). *Saccharomyces cerevisiae* ABC proteins and their relevance to human health and disease. **Methods Enzymol** **292**: 130-162.

Takasuka, T. (2000). Amino acid- or protein-dependent growth of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. **FEMS Immunol Med Microbiol** **29**(4): 241-5.

Tenchov, B. G., L. Wang, R. Koynova & R. C. Macdonald (2008). Modulation of a membrane lipid lamellar-nonlamellar phase transition by cationic lipids: A measure for transfection efficiency. **Biochim Biophys Acta**.

Thedei Jr., G., T. H. Doubowetz & A. Rossi (1994). Effect of carbon source and extracellular pH on the acidification of the culture medium and phosphatase excretion in *Neurospora crassa*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 27(5): 1129-34.

Tilburn, J., J. C. Sanchez-Ferrero, E. Reoyo, H. N. Arst, Jr. & M. A. Peñalva (2005). Mutational analysis of the pH signal transduction component PalC of *Aspergillus nidulans* supports distant similarity to BRO1 domain family members. **Genetics** 171(1): 393-401.

Tilburn, J., S. Sarkar, D. A. Widdick, E. A. Espeso, M. Orejas, J. Mungroo, M. A. Peñalva & H. N. Arst, Jr. (1995). The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. **EMBO J** 14(4): 779-90.

Tortora, G. J., B. R. Funke & C. L. Case (2005). Microbiologia. Porto Alegre, Artmed.

Tosti, A., R. Hay & R. Arenas-Guzman (2005). Patients at risk of onychomycosis--risk factor identification and active prevention. **J Eur Acad Dermatol Venereol** 19 Suppl 1: 13-6.

Tsushima, H., H. Mine, Y. Kawakami, F. Hyodoh & A. Ueki (1994). *Candida albicans* aspartic proteinase cleaves and inactivates human epidermal cysteine proteinase inhibitor, cystatin A. **Microbiology** 140 (Pt 1): 167-71.

Tugendreich, S., M. S. Boguski, M. S. Seldin & P. Hieter (1993). Linking Yeast Genetics to Mammalian Genomes - Identification and Mapping of the Human Homolog of Cdc27 Via the Expressed Sequence Tag (Est) Data-Base. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 90(21): 10031-10035.

Urban, M., T. Bhargava & J. E. Hamer (1999). An ATP-driven efflux pump is a novel pathogenicity factor in rice blast disease. **EMBO J**. 18(3): 512-21.

Vardy, E., I. T. Arkin, K. E. Gottschalk, H. R. Kaback & S. Schuldiner (2004). Structural conservation in the major facilitator superfamily as revealed by comparative modeling. **Protein Sci** 13: 1832-1840.

Vermeulen, T., H. Schoonbeek & M. A. De Waard (2001). The ABC transporter BcatrB from *Botrytis cinerea* is a determinant of the activity of the phenylpyrrole fungicide fludioxonil. **Pest Manag Sci** 57(5): 393-402.

Viani, F. C., J. I. Dos Santos, C. R. Paula, C. E. Larson & W. Gambale (2001). Production of extracellular enzymes by *Microsporium canis* and their role in its virulence. **Med Mycol** **39**(5): 463-8.

Vicentini, A. P., J. L. Gesztesi, M. F. Franco, W. de Souza, J. Z. de Moraes, L. R. Travassos & J. D. Lopes (1994). Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. **Infect Immun** **62**(4): 1465-9.

Vignardet, C., Y. C. Guillaume, L. Michel, J. Friedrich & J. Millet (2001). Comparison of two hard keratinous substrates submitted to the action of a keratinase using an experimental design. **Int J Pharm** **224**(1-2): 115-22.

Wang, L., L. Ma, W. Leng, T. Liu, L. Yu, J. Yang, L. Yang, W. Zhang, Q. Zhang, J. Dong, Y. Xue, Y. Zhu, X. Xu, Z. Wan, G. Ding, F. Yu, K. Tu, Y. Li, R. Li, Y. Shen & Q. Jin (2006). Analysis of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* expressed sequence tags. **BMC Genomics** **7**: 255.

Wei, H. J., M. Scherer, A. Singh, R. Liese & R. Fischer (2001). *Aspergillus nidulans* alpha-1,3 glucanase (mutanase), mutA, is expressed during sexual development and mobilizes mutan. **Fungal Genetics and Biology** **34**(3): 217-227.

Weissman, Z., I. Berdicevsky, B. Z. Cavari & D. Kornitzer (2000). The high copper tolerance of *Candida albicans* is mediated by a P-type ATPase. **Proc Natl Acad Sci U S A** **97**(7): 3520-5.

Weitzman, I. & R. C. Summerbell (1995). The Dermatophytes. **Clin Microbiol Rev** **8**(2): 240-259.

Wright, L. C., J. Payne, R. T. Santangelo, M. F. Simpanya, S. C. Chen, F. Widmer & T. C. Sorrell (2004). Cryptococcal phospholipases: a novel lysophospholipase discovered in the pathogenic fungus *Cryptococcus gattii*. **Biochem J** **384**(Pt 2): 377-84.

Zahra, L. V., P. Gatt, M. J. Boffa, E. Borg, E. Mifsud, L. Scerri, D. V. Briffa & J. L. Pace (2003). Characteristics of superficial mycoses in Malta. **International Journal of Dermatology** **42**(4): 265-271.

Zhu, P. & P. V. Oudemans (2000). A long terminal repeat retrotransposon Cgret from the phytopathogenic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* on cranberry. **Curr Genet** **38**(5): 241-7.

ANEXOS

This article was published in an Elsevier journal. The attached copy is furnished to the author for non-commercial research and education use, including for instruction at the author's institution, sharing with colleagues and providing to institution administration.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>

Isolation of transcripts over-expressed in human pathogen *Trichophyton rubrum* during growth in keratin

Fernanda C.A. Maranhão, Fernanda G. Paião, Nilce M. Martinez-Rossi*

Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes 3900, 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil

Received 2 March 2007; accepted 14 May 2007

Available online 21 May 2007

Abstract

Trichophyton rubrum is a cosmopolitan and anthropophilic fungus able to invade keratinized tissue, causing infection in human skin and nails. This work evaluated the changes in the extracellular pH during its growth in keratin (after 6, 12, 24, 48, 72 h and 7 days) at initial pH 5.0. We observed a gradual increase of basal pH under keratin exposure when compared to glucose condition. Also, we identified 576 *T. rubrum* transcripts differentially expressed by subtractive suppression hybridization (SSH) using conidia cultivated for 72 h in keratin as tester, and cultivated in glucose as driver. The over-expression of 238 transcripts obtained under keratin condition was confirmed by macro-array dot-blot, revealing 28 unigenes. Putative proteins encoded by these genes showed similarity to fungi proteins involved in basic metabolism, growth and virulence, i.e., transporters ABC-MDR, MFS and ATPase of copper, NIMA interactive protein, Gag-Pol polyprotein, virulence factors serine-protease subtilisin and metalloprotease, cytochrome P450, GlcN-6-phosphate deaminase and Hsp30. The upregulation of *T. rubrum* genes encoding subtilisin, metalloprotease and Gag-Pol polyprotein was also validated by northern blot. The results of this study provide the first insight into genes differentially expressed during *T. rubrum* grown in keratin that may be involved in fungal pathogenesis.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Dermatophyte; Keratin; SSH; *Trichophyton rubrum*; Virulence

1. Introduction

Dermatophytosis are superficial mycoses caused by a group of filamentous fungi called dermatophytes, which are able to invade keratinized substrates such as hair, nails and stratum corneum, causing diseases in humans and animals [1]. *Trichophyton rubrum*, an anthropophilic and cosmopolitan fungus, is the most common agent of superficial mycoses [2,3], causing rarely deep dermatophytosis in immunocompromised hosts [4,5].

During infection, *T. rubrum* regulates the expression of several genes involved in environment adaptation and keratin degradation. This fibrous protein, which is the structural component of vertebrates skin and nails [6], contains a cystine-rich matrix with disulfide bonds to maintain high stability [7]. The secretion of proteolytic

enzymes by dermatophytes is a key factor in the invasion, utilization and subsequent dissemination through the stratum corneum of the host [8]. Enzymes such as phospholipases and proteases, which are specific virulence factors associated with *T. rubrum* pathogenicity, have been identified [9].

The homeostatic pH governs the growth, differentiation, physiology, and viability of all living organisms and the fungi *Neurospora crassa* and *Aspergillus nidulans* adjust the ambient pH as function of the nutrient utilized [10]. The pH influence in protein activity has been well documented, interfering in metabolism and virulence of pathogenic microorganisms. A model for the pH regulation of proteolytic enzymes in dermatophytes [11] describes the activation of general proteases acid-specific after contact with skin (acid pH), while it represses keratinases and other proteins with optimal activity in pH alkaline. During infection, the metabolic machinery enables the fungus to use macromolecules as source of nitrogen, sulfur and

*Corresponding author. Tel.: +55 16 3602 3078; fax: +55 16 3633 0069.
E-mail address: nmmrossi@usp.br (N.M. Martinez-Rossi).

carbon, creating signals that lead to an alkaline environment. In an adaptive response for environment pH, the fungus represses proteases with optimal activity at acid pH and activates alkaline-specific genes for infection installation. Thus, it is important to understand this machinery, since the pathogenicity of many microorganisms has been demonstrated to depend on the sensing of pH ambient in the host.

Subtractive suppression hybridization (SSH) has been very useful for identifying genes upregulated during host–pathogen interaction [12]. In an attempt to identify genes involved in virulence and adaptation to the host, a SSH cDNA library was constructed and transcripts upregulated after *T. rubrum* exposure to keratin were isolated. Our results show that growth on keratin induces several genes that are probably virulence factors. Also, these results will provide a greater understanding of the infection strategy of this dermatophyte.

2. Results

2.1. pH change

The ability to regulate the gene expression in response to changes in environment pH is relevant in the pathogenicity

Table 1
Evaluation of pH changing during *T. rubrum* cultivating in glucose or keratin as carbon source

Time	Final pH	
	Glucose	Keratin
6 h	5.1	5.5
12 h	4.8	5.6
24 h	4.6	6.0
48 h	4.8	7.8
72 h	4.7	8.4
7 days	5.2	8.3

Initial pH was 5.0.

of many filamentous and dimorphic fungi. Then, we evaluated changes in pH of the media during *T. rubrum* growth in glucose and keratin sources at 6, 12, 24, 48, 72 h and 7 days post-inoculation. These times were chosen since there was an infection model of dermatophytes that proposes a gradual alkalization during the adaptation in infection process. *T. rubrum* promoted an increase of medium initial pH from 5.0 to 8.4 in keratin. However, this effect was not observed when the fungus was cultivated in glucose as carbon source, where the pH was maintained at approximately 5.0 (Table 1).

2.2. SSH and macro-array dot-blot

We cultivated MYA-3108 *T. rubrum* strain in keratin as tester and in glucose as driver, both as carbon source for 72 h, to characterize fungal gene expression during interaction with a substrate typically found in the skin and nails. Total RNAs were obtained and SSH cDNA library was constructed, resulting in 576 clones. The mean size for the ESTs from this library was about 0.5 kb. All clones were sequenced.

The amplified inserts were blotted in membranes and hybridized with tester and driver probes, individually, for a preliminary screening of differentially expressed clones. Different and intensive hybridization signals were observed in membranes labeled with forward subtracted probe, when compared with membrane hybridized with reverse subtracted probe. These analyses revealed clones that were considered as candidates for differential expression based on differential hybridization signals with upregulation in keratin (Fig. 1).

2.3. Sequence analysis and northern blot

Clusters were recovered with CAP3 sequence assembly program, yielding 40 contigs and 215 singlets. Twenty-eight non-redundant unigenes, confirmed by macro-array dot-blot, were compared to NCBI GenBank databases by

Fig. 1. Macro-array dot-blot profile. Autoradiography of membranes blotted with PCR amplified cDNA sequences from subtracted library enriched for *T. rubrum* gene expressed on the keratin, hybridized with (A) reverse and (B) forward probes cDNA. The clones A-10, G-9 and H-9 were considered false positive.

Table 2

Summary of BLAST search and MIPS classification of ESTs differentially expressed in *T. rubrum* cultivated in keratin (72 h) and identified by SSH analysis

EST	GenBank accession number	Size ^a (bp)	Putative ID (GenBank)	E-value	Number of clones	FunCat MIPS ^b
TR0046	EB086881	1130	<i>Trichophyton rubrum</i> , subtilisin-like protease SUB5, AAR02424	2e–125	49 (20.6%) ^c	32
TR0042	EB086877	634	<i>Aspergillus fumigatus</i> , MFS peptide transporter, putative, EAL84913	1e–69	38 (16.0%)	20
			<i>T. rubrum</i> cDNA, DW406372 ^d	3e–155		
TR0040	EB086875	564	<i>Coccidioides immitis</i> RS, glucosamine-6-phosphate deaminase, EAS33387	1e–73	37 (15.5%)	02
			<i>T. rubrum</i> cDNA, DW710894 ^d	0		
TR0062	EE681873	500	<i>C. immitis</i> , hypothetical protein, EAS32987	1e–24	26 (10.9%)	99
			<i>T. rubrum</i> cDNA, similar to Leucine Rich Repeat domain, DW005365 ^d	2e–153		
TR0097	EH038250	224	<i>A. fumigatus</i> , V-type ATPase, subunit B, EAL93618	8e–20	16 (6.7%)	20
			d <i>T. rubrum</i> cDNA, DW703261 ^d	1e–68		
TR0057	EC275253	416	<i>Emericella nidulans</i> , NIMA interactive protein, AAP23304	4e–06	9 (3.8%)	10
			<i>T. rubrum</i> cDNA, similar to NIMA interactive protein, DW005360 ^d	1e–120		
TR0044	EB086879	420	<i>T. rubrum</i> , multidrug resistance protein MDR, AAG01549	2e–20	9 (3.8%)	20
TR0098	EH038251	647	<i>A. terreus</i> , conserved hypothetical protein, EAL31587	6e–31	7 (2.9%)	99
			<i>T. rubrum</i> cDNA, DW692303 ^d	1e–121		
TR0045	EB086880	308	<i>A. fumigatus</i> , carboxylic ester hydrolase (Ppe1), putative, EAL88020	3e–23	7 (2.9%)	01
			<i>T. rubrum</i> cDNA, DW005383 ^d	1e–119		
TR0041	EB086876	297	<i>A. oryzae</i> , cytochrome P450nor, BAC01275	5e–16	6 (2.6%)	32
			<i>T. rubrum</i> cDNA, DW685960 ^d	5e–80		
TR0063	EE681874	349	<i>T. rubrum</i> , subtilisin-like protease SUB3, AAR11462	5e–25	5 (2.1%)	32
TR0056	EC275252	190	<i>A. fumigatus</i> , DNA polymerase gamma, EAL91351	9e–22	3 (1.3%)	10
			<i>T. rubrum</i> cDNA, similar to DNA polymerase gamma, DW005364 ^d	6e–87		
TR0051	EB086886	713	<i>Botryotinia fuckeliana</i> , extracellular lipase, putative, AAU87359	1e–06	3 (1.3%)	01
TR0061	EC275257	920	<i>C. immitis</i> , conserved hypothetical protein, EAS31011	7e–08	3 (1.3%)	99
			<i>T. rubrum</i> cDNA, DW005379 ^d	1e–83		
TR0047	EB086882	259	<i>Arthroderma benhamiae</i> , metalloprotease MEP4, AAQ21101	5e–27	3 (1.3%)	32
TR0043	EB086878	176	<i>A. fumigatus</i> , copper resistance-associated P-type ATPase, EAL92309	2e–15	2 (0.8%)	20
			<i>T. rubrum</i> cDNA, DW005353 ^d	8e–73		
TR0048	EB086883	102	<i>A. oryzae</i> , heat shock protein, class I (30kD), BAD02411	3e–06	2 (0.8%)	32
			<i>T. rubrum</i> cDNA, AJ883235 ^d	5e–34		
TR0096	EH038249	273	<i>A. fumigatus</i> , short chain dehydrogenase, EAL89916	6e–13	2 (0.8%)	02
			<i>T. rubrum</i> cDNA, DW703055 ^d	1e–43		
TR0059	EC275255	409	<i>A. fumigatus</i> , kynurenine aminotransferase, putative, EAL89672	7e–58	1 (0.4%)	01
TR0060	EC275256	490	<i>C. immitis</i> , hypothetical protein, EAS32442	1e–30	1 (0.4%)	99
			<i>T. rubrum</i> cDNA, AJ882980 ^d	1e–76		
TR0058	EC275254	300	<i>C. immitis</i> , hypothetical protein, EAS28871	2e–06	1 (0.4%)	99
			<i>T. rubrum</i> cDNA, DW005367 ^d	2e–142		
TR0055	EB086890	231	<i>A. fumigatus</i> , urease accessory protein UreD, EAL93904	7e–05	1 (0.4%)	01
TR0052	EB086887	723	<i>A. fumigatus</i> , amino acid permease, putative acid permease, AAC98709	8e–12	1 (0.4%)	20
			<i>Glomerella cingulata</i> , Gag-Pol protein, AAG24792	1e–43	1 (0.4%)	38
TR0064	EE681875	446	<i>T. rubrum</i> cDNA, DW005349 ^d	0		
TR0053	EB086888	703	<i>E. nidulans</i> , small GTPase RanA, AAR08135	1e–38	1 (0.4%)	30
			<i>T. rubrum</i> cDNA, AJ883484 ^d	8e–109		
TR0054	EB086889	237	<i>T. rubrum</i> , metalloprotease MEP3, AAQ21094	3e–39	1 (0.4%)	32
TR0065	EE681876	815	<i>A. niger</i> , hypothetical protein, CAK39928	2e–41	1 (0.4%)	99
TR0050	EB086885	328	<i>C. immitis</i> hypothetical protein CIMG_00654, EAS35300	3e–04	1 (0.4%)	99
			<i>T. rubrum</i> cDNA, DW680201 ^d	5e–54		
TR0049	EB086884	484	No match		1 (0.4%)	99

^aContigs or singlets ESTs.

^bMIPS: 01, metabolism; 02, energy; 10, cell cycle and DNA processing; 20, transport; 30, cellular communication/signal transduction mechanism; 32, cell rescue, defense and virulence; 38, transposable elements; 99, unclassified/hypothetical proteins.

^cPercentage in parentheses was calculated based on 238 cDNA clones analyzed.

^dGenBank EST database.

BLAST algorithms (Table 2). All the 28 genes that had significant hits in the non-redundant database were homologous to sequences from fungi. The functional classification of these genes into 8 major groups was performed according to Munich Information Center for Protein Sequences (MIPS) categorization (Table 2). Table 2 also shows that about 55% of the transcripts analyzed belong to two categories: the defense/virulence and the cellular transporters. Five transcripts revealed by the keratin subtracted library totalized 72% of all transcripts obtained, which encode proteins similar to a subtilisin-like protease, a MFS transporter, a glucosamine-6-phosphate deaminase, an ATPase and a hypothetical protein (Table 2).

Eighteen of the 28 transcripts had significant homologies with *T. rubrum* transcripts in the NCBI EST database (Table 2).

The upregulation of the *T. rubrum* genes coding for subtilisin protease (TR0046), metalloprotease (TR0047) and Gag-Pol polyprotein (TR0064) in keratin condition was confirmed by northern blot analyses (Fig. 2). Furthermore, the upregulation of copper-transporter gene (TR0043) was confirmed by virtual northern blot (data not shown).

3. Discussion

The purpose of this study was to identify genes that are preferentially expressed when the pathogenic fungus *T.*

rubrum is growing in medium supplemented with keratin as carbon source at alkaline pH. We showed that the pH of the medium remained almost constant during mycelial growth on glucose as the only carbon source, while during growth on keratin the pH increased, reaching values higher than 8.0. Similar result (final pH ranging from 8.3 to 8.9) was obtained when *T. rubrum* was grown on a mixture of glycine and glycerol, regardless of the initial growth pH [13].

The influence of glucose in the media pH was observed in experiments with other fungi [14,15]. The glucose represses the expression of extracellular protease activity, when *T. rubrum* and other dermatophytes grow in agar medium with 2% glucose [16]. Also, it was described that glucose can repress the production of enzymes from *T. rubrum* which hydrolyze guinea pig hair in liquid medium [8]. However, several proteases have been shown to be present in high levels in mycelium of dermatophytes and other fungi treated with keratin [17,18]. At 72 h post-inoculation in these experiments, the proteolytic activity of mycelia and conidia germinated was probably increased. Thus, this time point was chosen to extract total RNA for use in SSH, because this period was considered an appropriate starting point to isolate genes preferentially expressed in alkaline pH, probably involved in infection maintenance.

T. rubrum genes upregulated under keratin treatment belong to wide categories of genes. However, the SSH revealed a high redundancy for some transcripts, such as those encoding proteolytic enzymes—for instance, subtilisins (TR0046 and TR0063) and metalloproteases (TR0047 and TR0054). The differential expression of genes that encode the subtilisin SUB5 (TR0046) and the metalloprotease MEP4 (TR0047) was also confirmed by northern blot when *T. rubrum* was grown into keratin. Since *T. rubrum* grows preferentially in stratum corneum, nails or hair, it is evident that secreted proteases are important for its virulence [19,20]. A SSH cDNA library constructed for *Trichophyton mentagrophytes* in similar conditions but with longer incubation time revealed that the majority of the transcripts corresponded to the fungal thioredoxin and cellobiohydrolase genes [21]. Also, the differential expression of *T. mentagrophytes* proteases genes was detected by RT-PCR amplifications [21]. *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* and *Microsporum canis* possess a five-member gene family encoding secreted metalloproteases. A phylogenetic analysis of genomic and protein sequences indicates that the multiplication of MEP genes in dermatophytes occurred prior to species divergence, suggesting that these genes have a conserved and essential function in dermatophytes [22].

One gene (TR0040) upregulated upon keratin, which represented about 16% of SSH clones analyzed, showed high similarity to *Aspergillus fumigatus* gene encoding a glucosamine-6-phosphate deaminase, which participates in *N*-acetylglucosamine metabolism. This pathway is well characterized in *Candida albicans* and is closely associated with its virulence and morphogenesis [23]. The role of *nag1* gene in *C. albicans* was investigated with disrupted mutants

Fig. 2. Northern blot analysis showing differential expression of *T. rubrum* genes encoding for a Gal-Pol polyprotein (TR0064), a subtilisin (TR0046) and a metalloprotease (TR0047). Lanes 1 and 2 represent the H6 strain grown in glucose and in keratin, respectively. An aliquot (15 µg) of *T. rubrum* total RNA was loaded in agarose-formaldehyde gel and probed with 50 ng of selected cDNA. Ethidium bromide-stained rRNA bands are shown for comparison on the quantities of loaded RNA.

that exhibited highly attenuated virulence in murine model [24]. In addition, this gene presented different patterns of induction under several carbon sources and had influence in germ-tube formation [25].

The identification of EST (TR0064) similar to gap-pol gene of Cgret retrotransposon element from *Glomerella cingulata* (anamorph: *Colletotrichum gloeosporioides*) suggests that a transposable element participates in *T. rubrum* keratin adaptation. The transposition of these elements in response to stress conditions has been described in plants, yeasts and *Drosophila* [26,27]. Also, several viral RNA genomes are translated into a large polyprotein by the host-cell machinery that is cleaved into mature capsid proteins, non-structural proteins and proteases, such as the picornaviruses, which have a cysteine peptidase processed by a polyprotein [28]. The upregulation of this gene (TR0064) when *T. rubrum* was cultivated in keratin was confirmed by northern blot, suggesting its participation in the infectious process.

The involvement of transporters in pathogenesis was already described for phytopathogenic fungi [29]. Our results show that about 27% of the isolated transcripts by SSH were related to cellular transporters, and upregulated upon keratin. One of these transcripts (TR0044) that had been previously described [30] encodes for a putative multidrug resistance transporter (MDR) and is upregulated also in the presence of different drugs [30,31]. Disruption of this gene rendered the mutant more sensitive to some drugs [30] and interestingly presented growth deficiency when cultivated in fragments of nails, in comparison with wild-type strain (Fachin AL, personal communication), confirming the role of this gene in *T. rubrum* virulence. Another EST (TR0043) upregulated upon keratin encodes for a transporter similar to a copper resistance-associated P-type ATPase protein that is involved in intracellular transporter in eukaryotes for stability of cell, since copper is an essential cofactor of many enzymes [32]. Transmembranes proteins involved in metallic ions transport appear to have roles in microbial pathogenicity [33], as it was described in Cu-ATPases mutants that showed reduced virulence in *Listeria monocytogenes* [34] and *Cryptococcus neoformans* [35]. In the latter case, the Δ vph1 avirulent mutant had absence of laccase enzyme activity, essential for the virulence of this pathogen. These data suggest that this gene may have important implications for infection mechanism of *T. rubrum*. Also, the sequence TR0042 showed high similarity with a putative transporter peptide of superfamily MFS of *A. fumigatus*, containing a conserved domain of PTR2 [36].

In conclusion, we have successfully used SSH to identify 28 genes that are upregulated in *T. rubrum* submitted to keratin. Most of these genes encode for proteins probably relevant to the dermatophyte–host interaction and for installation and maintenance of infection on the host. SSH method represented an efficient strategy for the identification of these genes and it can aid in the identification of potential drug targets in dermatophytes.

4. Materials and methods

4.1. Strains

The *T. rubrum* clinical isolate H6 (ATCC MYA-3108) used throughout this study was obtained from a female patient with *tinea pedis* [37]. *Escherichia coli* (Mos Blue) was used for transformation and plasmid pGEM-T[®] (Promega) amplification.

4.2. Growth and treatment conditions

The isolate H6 was cultivated in Petri dishes with Sabouraud glucose agar for 15 days at 28 °C. Mycelia from dishes were collected with a sterile spatula, vortexed into saline solution (0.9 NaCl/Tween 0.1%), following filtration in fiber glass to remove debris of mycelium. Conidia were recovered by centrifugation, and the resuspended pellet was transferred to liquid Sabouraud at 28 °C for 72 h in shaker. The mycelia resulting were harvested by fast filtration over Whatman paper (Whatman International, Maidstone, UK), washed and transferred to minimum medium [38] at pH 5.0, being one part supplemented with glucose (55 mM) and the other with keratin (Sigma) (2.5 g/L), both with nitrate as nitrogen source (70 mM) and incubated separately for 6, 12, 24, 48, 72 h and 7 days at 28 °C in shaker. The medium pH was measured after the final time of each condition.

4.3. RNA isolation and library preparations

Mycelia obtained after 72 h post-inoculation were harvested by filtration and total mycelial RNA from each treatment was extracted with the Gentra Kit and poly (A⁺) RNA was isolated by means of PolyAtract[®] mRNA Isolation Systems (Promega), according to manufacturer's protocols. The SSH approach, based on the Clontech PCR-Select cDNA Subtraction Kit, was used for the construction of the cDNA library. The SSH subtraction was performed by using driver (conidia germinated in glucose) and tester (conidia germinated in keratin) cDNAs. Reverse library was performed with conidia germinated in glucose as tester to prepare subtracted cDNA for differential screening. In all library constructions, two sequential hybridization steps followed by two PCR reactions were carried out. The PCR primers included in the Clontech Kit were adopted, with nested primers (1 and 2R) in the second PCR.

The final template enriched with differentially expressed sequences from the tester population was electrophoresed in 1.2% agarose gel, purified in GFX column and cloned using pGEM-T[®]. After the transformation using IPTG/X-gal for selection, white colonies were randomly picked and grown in LB medium containing tetracycline (15 µg/mL) and ampicilin (50 µg/mL). Clones were picked and arrayed in 96-well plates, duplicated and kept at –80 °C for storage.

4.4. Northern analysis

Macro-array dot-blots (differential screening) were applied to identify upregulated genes. The colonies of *E. coli* containing individual inserts of the differentially expressed sequences in the tester population were picked up, grown in ampicillin–LB medium, and amplified using nested primers 1 and 2R from the SSH kit and *E. coli* culture as a template. Amplified clones have cDNA inserts carrying adaptor 1 and adaptor 2R on both ends, which suggests that contaminating background due to non-specific amplification of the tester is low.

After denaturation at 94 °C for 5 min, the amplification reactions were performed for 30 cycles as follows: 30 s denaturation at 94 °C, 30 s annealing at 55 °C, and 1 min extension at 72 °C. PCR fragments were spotted onto nylon membranes (Hybond-N⁺) via vacuum blotter (Bio Rad Bio-dot) for the reverse northern blot analysis. Both cDNA forward and reverse subtracted PCR product probes labeled following manufacturer's protocol (*Genes Images Random Prime Labeling Module*) were used to screen the membranes. The signals were evaluated between forward and reverse blots by using *Gene Image CDP-Star Detection Module* and these signals were also converted to relative intensity values and quantified by using ImageJ software (data not shown).

To perform the traditional northern blot, 15 µg total RNA was electrophoresed on a 1.5% agarose gel containing formaldehyde, transferred to a Hybond-N⁺ membrane and hybridized with probes radioactively labeled with [α -³²P] dCTP. Individual cDNA clones selected from subtraction procedure amplified by nested PCR were used as probes. Probe concentrations of all blots were 50 ng.

4.5. DNA sequencing and bioinformatic analysis

Automatic DNA sequencing of subtracted clones was performed using Big Dye Terminator cycle sequencing chemistry with universal primers M13. The sequences were processed using PhredPhrap-Consed package, and subjected to similarity searches against the non-redundant GenBank database using BLASTX and the GenBank EST database using BLASTN at National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) [39]. A match was considered significant if the expected (*E*) value was less than 10^{−3}. Sequences were functionally classified into MIPS according to putative BLASTX results [40,41], and were submitted to the GenBank database under the accession numbers given in Table 2.

Acknowledgments

We thank R.A.P. Ferreira, A.C.C. Souza, M. Mazucato and P.R. Sanches for technical support, and A. Borghi for reviewing the English paper. This research was supported by grants from the Brazilian agencies FAPESP, CNPq, CAPES and FAEPa.

References

- [1] Weitzman I, Summerbell RC. The dermatophytes. Clin Microbiol Rev 1995;8:240–59.
- [2] Emmons CW. Epidemiology of the mycoses. J Med Liban 1956;9:332–42.
- [3] Faergemann J, Correia O, Nowicki R, Ro BI. Genetic predisposition—understanding underlying mechanisms of onychomycosis. J Eur Acad Dermatol Venereol 2005;19(Suppl 1):17–9.
- [4] Gorani A, Schiera A, Oriani A. Case report. Widespread tinea corporis due to *Trichophyton rubrum*. Mycoses 2002;45:195–7.
- [5] Sentamilselvi G, Janaki C, Kamalam A, Thambiah AS. Deep dermatophytosis caused by *Trichophyton rubrum*—a case report. Mycopathologia 1998;142:9–11.
- [6] Singh CJ. Optimization of an extracellular protease of *Chrysosporium keratinophilum* and its potential in bioremediation of keratin wastes. Mycopathologia 2002;156:151–6.
- [7] Fraser RD, Parry DA. The three-dimensional structure of trichocyte (hard alpha-) keratin intermediate filaments: features of the molecular packing deduced from the sites of induced crosslinks. J Struct Biol 2005;151:171–81.
- [8] Apodaca G, McKerrow JH. Regulation of *Trichophyton rubrum* proteolytic activity. Infect Immun 1989;57:3081–90.
- [9] Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. Clin Microbiol Rev 2000;13:122–43.
- [10] Thedei Jr G, Doubowetz TH, Rossi A. Effect of carbon source and extracellular pH on the acidification of the culture medium and phosphatase excretion in *Neurospora crassa*. Braz J Med Biol Res 1994;27:1129–34.
- [11] Martinez-Rossi NM, Ferreira-Nozawa MS, Graminha MAS, Nozawa SR, Fachin AL, Cervelatti EP, et al. Molecular aspects of dermatophyte–host interactions. In: Fungi in human and animal health. Jodhpur, India: Ed Scientific Publishers; 2004.
- [12] Alonso-Monge R, Navarro-Garcia F, Roman E, Eisman B, Nombela C, Pla J. Strategies for the identification of virulence determinants in human pathogenic fungi. Curr Genet 2003;42:301–12.
- [13] Ferreira-Nozawa MS, Nozawa SR, Martinez-Rossi NM, Rossi A. The dermatophyte *Trichophyton rubrum* secretes an EDTA-sensitive alkaline phosphatase on high-phosphate medium. Braz J Microbiol 2003;34:161–4.
- [14] Baek YU, Martin SJ, Davis DA. Evidence for novel pH-dependent regulation of *Candida albicans* Rim101, a direct transcriptional repressor of the cell wall beta-glycosidase Phr2. Eukaryot Cell 2006;5:1550–9.
- [15] Johannesson H, Kasuga T, Schaller RA, Good B, Gardner MJ, Townsend JP, et al. Phase-specific gene expression underlying morphological adaptations of the dimorphic human pathogenic fungus, *Coccidioides posadasii*. Fungal Genet Biol 2006;43:545–59.
- [16] Meevooitson V, Niederpruem DJ. Control of exocellular proteases in dermatophytes and especially *Trichophyton rubrum*. Sabouraudia 1979;17:91–106.
- [17] Brouta F, Descamps F, Fett T, Losson B, Gerday C, Mignon B. Purification and characterization of a 43.5 kDa keratinolytic metalloprotease from *Microsporum canis*. Med Mycol 2001;39:269–75.
- [18] Lambkin I, Hamilton AJ, Hay RJ. Purification and characterisation of a novel 34,000-Mr cell-associated proteinase from the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. FEMS Immunol Med Microbiol 1996;13:131–40.
- [19] Monod M, Capoccia S, Lechenne B, Zaugg C, Holdom M, Jousson O. Secreted proteases from pathogenic fungi. Int J Med Microbiol 2002;292:405–19.
- [20] Jousson O, Lechenne B, Bontems O, Mignon B, Reichard U, Barblan J, et al. Secreted subtilisin gene family in *Trichophyton rubrum*. Gene 2004;339:79–88.
- [21] Kaufman G, Berdicevsky I, Woodfolk JA, Horwitz BA. Markers for host-induced gene expression in *Trichophyton* dermatophytosis. Infect Immun 2005;73:6584–90.

- [22] Jousson O, Lechenne B, Bontems O, Capoccia S, Mignon B, Barblan J, et al. Multiplication of an ancestral gene encoding secreted fungalsin preceded species differentiation in the dermatophytes *Trichophyton* and *Microsporum*. *Microbiology* 2004;150: 301–10.
- [23] Yamada-Okabe T, Sakamori Y, Mio T, Yamada-Okabe H. Identification and characterization of the genes for N-acetylglucosamine kinase and N-acetylglucosamine-phosphate deacetylase in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Eur J Biochem* 2001;268: 2498–505.
- [24] Singh P, Ghosh S, Datta A. Attenuation of virulence and changes in morphology in *Candida albicans* by disruption of the N-acetylglucosamine catabolic pathway. *Infect Immun* 2001;69: 7898–903.
- [25] Gopal P, Sullivan PA, Shepherd MG. Enzymes of N-acetylglucosamine metabolism during germ-tube formation in *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* 1982;128:2319–26.
- [26] Daboussi MJ, Capi P. Transposable elements in filamentous fungi. *Annu Rev Microbiol* 2003;57:275–99.
- [27] Gabriel A, Dapprich J, Kunkel M, Gresham D, Pratt SC, Dunham MJ. Global mapping of transposon location. *PLoS Genet* 2006;2(12):e212.
- [28] Lin YC, Brik A, de Parseval A, Tam K, Torbett BE, Wong CH, et al. Altered gag polyprotein cleavage specificity of feline immunodeficiency virus/human immunodeficiency virus mutant proteases as demonstrated in a cell-based expression system. *J Virol* 2006;80: 7832–43.
- [29] Urban M, Bhargava T, Hamer JE. An ATP-driven efflux pump is a novel pathogenicity factor in rice blast disease. *EMBO J* 1999;18:512–21.
- [30] Fachin AL, Ferreira-Nozawa MS, Maccheroni Jr W, Martinez-Rossi NM. Role of the ABC transporter TruMDR2 in terbinafine, 4-nitroquinoline N-oxide and ethidium bromide susceptibility in *Trichophyton rubrum*. *J Med Microbiol* 2006;55:1093–9.
- [31] Paião FG, Segato F, Cursino-Santos JR, Peres NTA, Martinez-Rossi NM. Analysis of *Trichophyton rubrum* gene expression in response to cytotoxic drugs. *FEMS Microbiol Lett* 2007;271:180–6.
- [32] Weissman Z, Berdicevsky I, Cavari BZ, Kornitzer D. The high copper tolerance of *Candida albicans* is mediated by a P-type ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:3520–5.
- [33] Parisot D, Dufresne M, Veneault C, Lauge R, Langin T. *clap1*, a gene encoding a copper-transporting ATPase involved in the process of infection by the phytopathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. *Mol Genet Genomics* 2002;268:139–51.
- [34] Francis MS, Thomas CJ. Mutants in the CtpA copper transporting P-type ATPase reduce virulence of *Listeria monocytogenes*. *Microb Pathog* 1997;22:67–78.
- [35] Zhu X, Gibbons J, Zhang S, Williamson PR. Copper-mediated reversal of defective laccase in a *Deltavph1* avirulent mutant of *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* 2003;47:1007–14.
- [36] Marger MD, Saier Jr MH. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends Biochem Sci* 1993;18:13–20.
- [37] Fachin AL, Maffei CM, Martinez-Rossi NM. In vitro susceptibility of *Trichophyton rubrum* isolates to griseofulvin and tioconazole. Induction and isolation of a resistant mutant to both antimycotic drugs. *Mycopathologia* 1996;135:141–3.
- [38] Cove DJ. The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim Biophys Acta* 1966;113:51–6.
- [39] Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997;25:3389–402.
- [40] Mewes HW, Albermann K, Heumann K, Liebl S, Pfeiffer F. MIPS: a database for protein sequences, homology data and yeast genome information. *Nucleic Acids Res* 1997;25:28–30.
- [41] Mewes HW, Frishman D, Guldener U, Mannhaupt G, Mayer K, Mokrejs M, et al. MIPS: a database for genomes and protein sequences. *Nucleic Acids Res* 2002;30:31–4.

Manuscripts with Decisions

View past decisions on your manuscripts. Click on the links below the manuscript details to perform actions.

REVISION

JMM/2008/002907

Membrane transporter proteins are involved in *Trichophyton rubrum* pathogenesis

Fernanda C. A. Maranhão, Fernanda G. Paião, Ana L. Fachin, and Nilce M Martinez-Rossi

Decision: Accept; **Decision Date:** 7 Oct 2008

Date Received: 28 Aug 2008

Editor: Yvonne Graeser

Contents Category: Pathogenicity and virulence

Corresponding Author: Nilce M Martinez-Rossi

Keywords: Dermatophytes; Gene expression; Multidrug; Pathogenesis; Pathogenic fungi

Supplementary Files: 0

[\[Contact Editorial Staff\]](#) [\[Contact Handling Editor\]](#) [\[Upload Change of Authorship Form\]](#)
[\[Reviews\]](#) [\[Decision Letter\]](#) [\[First Submission reviews\]](#) [\[First Submission Decision\]](#)

NILCE M MARTINEZ-ROSSI, Universidade de São Paulo, Av Bandeirantes 3900, Monte Alegre
Ribeirão Preto, SP 14049-900 Brazil
Tel: (Brazil-16) 36023150, Fax: (55-16) 36330069, Email: nmmrossi@usp.br

Journal of Medical Microbiology

JMM Editorial Office, Society for General Microbiology, Spencers Wood, Reading RG7 1AG, UK
Tel: +44(0) 118 988 1800; Fax: +44(0) 118 988 1834; Email: jmm@sgm.ac.uk
Copyright © 2008 by the Society for General Microbiology

1 **Membrane transporter proteins are involved in *Trichophyton***
2 ***rubrum* pathogenesis**

3
4
5
6 Fernanda C. A. Maranhão, Fernanda G. Paião, Ana Lúcia Fachin,¹ and Nilce M.
7 Martinez-Rossi

8
9
10
11 Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de
12 São Paulo, 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil

13
14
15
16 ¹**Present address:** Departamento de Biotecnologia, Universidade de Ribeirão Preto, SP,
17 Brazil

18
19
20 **Key words:** dermatophyte, keratin, pathogenesis, membrane transporter, *Trichophyton*
21 *rubrum*

22
23 **Running title:** Transporter proteins in *T. rubrum* pathogenesis

24
25
26 **Corresponding author**

27 Tel: + 55-16-3602-3150; fax: + 55-16-3633-0069

28 E-mail address: nmmrossi@usp.br (Nilce M. Martinez-Rossi)

33 SUMMARY

34 *Trichophyton rubrum* is a dermatophyte responsible for the great majority of human
 35 superficial mycoses. The functional expression of important proteins for the initial step
 36 and maintenance of infection process were previously identified in *T. rubrum* by
 37 Subtraction Suppression Hybridization (SSH) after growth in the presence of keratin.
 38 Here, we isolated sequences similar to genes encoding for ATP binding cassette (ABC)
 39 transporter (multidrug resistance, MDR), copper ATPase, major facilitator (MFS) and
 40 permease, and used northern hybridizations to monitor the expression of these genes up
 41 regulated in the presence of keratin. A sequence identical to *TruMDR2* gene, encoding
 42 an ABC transporter in *T. rubrum*, was isolated in our experiments, and the examination
 43 of Δ *TruMDR2* mutant *T. rubrum* showed a reduction in infecting activity, characterized
 44 by low growth in human nails compared to wild-strain. The high expression of
 45 transporter genes by *T. rubrum* in mimetic infection and the virulence reduction of
 46 Δ *TruMDR2* mutant in a disease model *in vitro* suggest that transporters are involved in
 47 *T. rubrum* pathogenicity.

48

49 INTRODUCTION

50 Fungal infections have caused morbidity in immunosuppressed individuals, particularly
 51 those undergoing transplants, chemotherapy and HIV positive patients, showing the
 52 importance of an early diagnosis and appropriate antifungal therapy (Erbagci, 2002;
 53 Nir-Paz *et al.*, 2003). The dermatophytes, fungi specialized in keratin degradation, are
 54 frequently involved in chronic infections that affect humans on global scale. The most
 55 prevalent dermatophyte is the *Trichophyton rubrum*, isolated in *tinea corporis*, *tinea*
 56 *unguium* and *tinea pedis* (Summerbell, 1997; Weitzman & Summerbell, 1995).

Several studies have provided evidence that pH environment-mediated effect regulates the fungi gene expression and the secretory activity (Casadevall & Pirofski, 2001; Ferreira-Nozawa *et al.*, 2006), which play a role in the pathogenicity. During keratin degradation, dermatophytes have been shown to secrete specific enzymes, depending on the sensing of host ambient pH (Maranhão *et al.*, 2007; Martinez-Rossi *et al.*, 2004). A sensing regulatory system in the response of *T. rubrum* towards carbon source availability and the ability to adapt in the host is essential to fungal survival (Ferreira-Nozawa *et al.*, 2006; Kunert, 1972, 1976), inducing the expression of enzymes and membrane transporters that facilitate the uptake of amino acids (Grobler *et al.*, 1995; Lechenne *et al.*, 2007). Furthermore, specific genes are necessarily expressed to permit these mechanisms, which are involved in the activation of signal transduction for the maintenance of the infection process under keratin contact. The occurrence of therapeutic failures due to resistance development is often associated with efflux pumps in the membrane cell (Martinez-Rossi *et al.*, 2008; Prasad *et al.*, 2006). Recent observations have indicated that membrane transporters are commonly involved in bacterial and fungal pathogenesis, with important roles as virulent factors to ensure successful colonization in a host environment (Mishra *et al.*, 2007). The *T. rubrum* *TruMDR1* gene, which encodes an ATP-binding cassette (ABC) transporter, is differentially expressed in the presence of antifungals such as griseofulvin and itraconazole (Cervellati *et al.*, 2006). Early genetic knock-out analysis of $\Delta TruMDR2$ strain has shown that *TruMDR2* transporter-mediated toxicant efflux mechanism plays a role in modulating susceptibility to terbinafine, 4NQO and ethidium bromide in *T. rubrum* (Fachin *et al.*, 2006). The aim of this study was to investigate the differential expression of genes encoding proteins similar to transporters in the dermatophyte *T. rubrum* grown in keratin, and to compare growth characteristics between wild type and

82 $\Delta TruMDR2$ strain during nail infection. These findings suggest that membrane
 83 transporter proteins are important to the dermatophyte infection process, adding new
 84 knowledge about the *T. rubrum* gene expression profile.

85

86 **METHODS**

87 **Fungal strain and culture conditions for expression analyses.** The *T. rubrum* strains
 88 ATCC MYA-3108, H6 (wild-type) and $\Delta TruMDR2$ (Fachin *et al.*, 2006) were used
 89 throughout this study and cultured as previously described (Fachin *et al.*, 1996). On the
 90 expression assays, *T. rubrum* wild-type conidial were grown in liquid minimal medium
 91 with nitrate as nitrogen source (70mM) (Cove, 1966), supplemented with keratin in the
 92 test sample (2.5 g ml⁻¹) to promote specific gene expression, and the control samples
 93 were cultivated with glucose (55 mM), both during 72 h at 28 °C at pH initial 5.0.

94

95 **Isolation of RNA and cDNA synthesis by construction of suppression subtractive**
 96 **hybridization.** Total RNA of *T. rubrum* wild-strain was extracted from about 100 mg
 97 frozen mycelium using Trizol[®] reagent (Invitrogen). The quality and concentration of
 98 total RNA were checked by formaldehyde-agarose gel electrophoresis and
 99 spectrophotometer. One µg was used for double-strand cDNAs synthesis with BD
 100 SMART[™] PCR cDNA Synthesis Kit (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA),
 101 according to the manufacturer's guide. A Subtraction Suppression Hybridization (SSH)
 102 library was constructed as previously described (Diatchenko *et al.*, 1996; Maranhão *et*
 103 *al.*, 2007), using PCR Select cDNAs subtraction kit (BD Biosciences Clontech, Palo
 104 Alto, CA). We used *T. rubrum* mycelia treated in the presence of keratin as tester and in
 105 glucose as driver. The final PCR sample obtained corresponds to genes differently
 106 expressed when this dermatophyte is in keratin contact. All PCR products were cloned

107 into pGEM-T Easy Vector System (Promega) and transformed into *Escherichia coli*
108 (*Mos Blue*). After the selection by X-gal/IPTG system, white colonies were picked up,
109 grown in LB medium with selection by ampicilin and tetracilin resistance during 20 h
110 at 37 °C and stored until the next steps.

111

112 **DNA sequencing and Northern blot analysis.** The cDNA clones were sequenced on
113 an ABI Prism 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA), using M13
114 forward and reverse primers. The sequences were processed using the PhredPhrap-
115 Consed package, and submitted to similarity searches against the nonredundant
116 GenBank database using BLASTX software at the National Center for Biotechnology
117 Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Altschul *et al.*, 1997). The clones
118 with inserts corresponding to transporter genes were selected to be used as probes in
119 northern analysis.

120 For validation of differential gene expression by Northern blot, *T. rubrum* were
121 cultivated in test and control conditions (keratin and glucose). Fifteen micrograms of
122 total RNA from each condition were separated through electrophoresis on 1.5%
123 agarose-formaldehyde gel and subsequently transferred onto nylon membranes
124 (Hybond-N⁺, Amersham) using the vacuum blotter (Bio Rad Bio-dot). Probes were
125 purified from plasmids containing inserts of the specific transporter genes by PCR
126 amplification. All probes (50 ng) were labeled by random priming (Random Primers
127 DNA labeling System; Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA) and [α -32P]-dCTP. The
128 hybridizations were performed overnight at 65 °C under agitation and the membranes
129 were washed using standard protocols (Sambrook *et al.*, 1989), following the exposition
130 to storage phosphor screens (Applied Biosystem). Each transcript had the intensity

131 levels quantified based on digital light units (DLUs) generated by OptiQuant (Perkin
132 Elmer), subtracting the background. The Northern blot illustrations are representative of
133 two independent experiments.

134

135 **Infection assays.** Infection *in vitro* was performed as previously described (Takasuka,
136 2000). Human nail fragments of approximately 1 x 1 mm in size were treated with
137 ethanol for 15 min and dried at room temperature. Five μ L of a conidia suspension ($3 \times$
138 10^6 ml⁻¹) of each *T. rubrum* strains (wild-type and mutant) were soaked on individual
139 nail fragments during 1 hour, followed by the addition of 200 μ l of distilled water. The
140 eppendorf tubes were incubated at 28 °C for 6 days, and the fungal growth was
141 observed through light microscopy (Axion vision system, Zeiss). As a control, we used
142 nail fragments soaked in 200 μ l of distilled water.

143

144 **RESULTS AND DISCUSSION**

145 **Identification of transporter genes by SSH and bioinformatic analyses**

146 In this report, we investigated the expression of several genes that may affect the *T.*
147 *rubrum* pathogenesis. After the isolation of genes differentially expressed by SSH,
148 which had *T. rubrum* mycelium cultivated in keratin as test condition, a BLASTX
149 analysis was performed and 66 clones similar to genes encoding putative transporters of
150 different families were focused. They represented 27.7% of the cDNA clones isolated
151 after *T. rubrum* had grown in the presence of keratin (Maranhão *et al.*, 2007). From the
152 66 subtractive cDNA clones screened, five nonredundant unique ESTs were generated.
153 These ESTs named TR0042, TR0043, TR0044, TR0052 and TR0097 were predicted to
154 encode proteins corresponding to MFS peptide transporter, copper resistance-associated
155 P-type ATPase, MDR transporter, amino acid permease and V-type ATPase,

156 respectively (Table 1). Most of these proteins have similarity to well-known
 157 homologues in *Aspergillus fumigatus*. MFS proteins, members of a large transporter
 158 family, had a high incidence (57.6 %) among the transporter proteins expressed in *T.*
 159 *rubrum* grown in the presence of keratin (Table 1).
 160 It is known that the human skin has pH of approximately 5.0 (Marro *et al.*, 2001) and
 161 contains keratinized elements, which are important characters for dermatophyte
 162 infection. Then, our experiments were performed with initial pH 5.0 with keratin or
 163 glucose as carbon source. The results were obtained after 72 h of *T. rubrum* cultivation
 164 (when the keratin medium reached pH 8.4), an experimental condition appropriate to
 165 isolate genes probably involved in infection maintenance, being preferentially expressed
 166 in alkaline pH (Maranhão *et al.*, 2007).

167 .

168 **Expression of transporter genes in *T. rubrum***

169 Northern blot analysis was carried out with total RNA isolated from mycelia of *T.*
 170 *rubrum* (H6) strain cultivated individually with keratin and glucose. The mRNA steady
 171 state levels of genes encoding for specific efflux pumps, metal transporter, MFS and a
 172 permease were detected through northern blot analysis in test condition, during
 173 germination in keratin media, revealing that the expression of specific transporters in
 174 test media was higher than that in glucose media (Fig. 1). ABC and MFS transporters
 175 are two major classes of proteins involved in drug resistance. The substrate range of
 176 both membrane transporters is very broad and may include ions, amino acids, peptides,
 177 sugars, secondary metabolites and drugs. Several studies have investigated the role of
 178 MDR transporter in response to metabolic poisons and antifungal drugs (Prasad *et al.*,
 179 2006). The BLASTX analysis revealed homology of a sequence highly up-regulated in
 180 the tester cDNA population (TR0044) with a *T. rubrum* ABC transporter MDR-like, a

181 multidrug pump efflux (Fachin *et al.*, 2006). Fungal ABC transporters play a function as
182 efflux pumps, providing resistance to several antifungal types (Mishra *et al.*, 2007;
183 Urban *et al.*, 1999). In addition, ABC-encoding genes were identified as an important
184 pathogenicity determinant in early stages of filamentous fungi pathogenesis, as
185 demonstrated for the ABC1 from *Magnaporthe grisea*, BcatrB from *Botrytis cinerea*,
186 and GpABC1 from *Gibberella pulicaris*. (Fleissner *et al.*, 2002; Gupta & Chattoo,
187 2008; Vermeulen *et al.*, 2001).

188 Additionally, the northern blot analyses with probe similar to MFS transporter-encoding
189 gene showed a strong signal in test keratin condition (Fig. 1). Although a high number
190 of clones similar to MFS were isolated through SSH when *T. rubrum* was grown in
191 keratin media, we also detected a weak hybridization signal in control condition in
192 comparison to test sample. This result was expected because MFS transporters are a
193 ubiquitous group of proteins involved in the transport of a wide range of compounds,
194 including external elements and toxins (Saier *et al.*, 1999; Vardy *et al.*, 2004). In
195 *Aspergillus oryzae* genome, 63.9 % of transporters are MFS-type, involved in secondary
196 metabolism (Akao *et al.*, 2007). The analysis of a MFS transporter-like gene (*CTB4*) in
197 *Cercospora nicotianae* provided genetic evidence to support its role in virulence by
198 cercosporin accumulation (Choquer *et al.*, 2007). In this study, experiments with a *C.*
199 *nicotianae* mutant displayed a drastic reduction of cercosporin production and
200 accumulation, causing fewer lesions on tobacco leaves (Choquer *et al.*, 2007).

201 Expression of copper ATPase was barely detectable as an approximately 3 kb transcript
202 in a wild-type strain grown in minimal medium containing keratin. A subtractive library
203 enriched by *T. rubrum* genes expressed in the presence of cytotoxic components showed
204 the up-regulation of a gene encoding for copper resistance-associated P-type ATPase
205 after fluconazole contact (Paião *et al.*, 2007). Copper is an essential metabolic element,

like a cofactor of many cellular enzymes, and copper-transporting P-type ATPases are found in eukaryotes organisms and require an iron transporter for the adaptation in different environments and hosts (Riggle & Kumamoto, 2000). The absence of copper-transporter normal activity in *Cryptococcus neoformans* after VPH1 gene deletion was observed in an avirulent mutant interfering in laccase activity (Zhu & Williamson, 2003), a strong virulent factor in this opportunistic pathogen. Also, a disruption in *C. albicans* CaCCC2 gene led to an unusual phenotype of silver and copper resistance (Weissman *et al.*, 2002), and a *clap1* mutation in *Colletotrichum lindemuthianum* caused to a non-pathogenic phenotype (Parisot *et al.*, 2002), both genes encoding for a putative copper-transporting ATPase.

The virulence capacity was also affected in *Listeria monocytogenes* mutants, carrying mutation in *cptA*, a gene involved in copper homeostasis (Francis & Thomas, 1997). Furthermore, our northern experiments also demonstrated that a permease, a general transporter, is highly expressed in *T. rubrum* cultures growing in the test media.

Assay infection of $\Delta TruMDR2$

The effect of disrupting the *TruMDR2* gene (TR0044 cDNA) on pathogenicity of *T. rubrum* was assessed in the nails model *in vitro*, to test the infection ability of the $\Delta TruMDR2$ strain mutant in comparison to wild-type H6. Conidia preparations of wild-type and mutant were individually distributed in sterile nails and the growth was observed by microscopy 6 days after inoculation at 28°C. The deletion of *TruMDR2* was correlated with a decreased ability of $\Delta TruMDR2$ mutant to grow on human nail (Fig. 2), a *T. rubrum* major infection site.

The *TruMDR2* gene, encoding an ABC/MDR transporter in *T. rubrum*, is also highly expressed after exposure to acriflavine, ketoconazole, chloramphenicol, griseofulvin,

231 fluconazole, and other cytotoxic agents revealed by northern blot analyses in wild strain.
 232 Also, the mutant $\Delta TruMDR2$ is more sensitive to terbinafine, 4NQO and ethidium
 233 bromide than the control strain, confirming the involvement of this gene in drug
 234 transporter (Fachin *et al.*, 2006). The MDR genes might affect other aspects of
 235 metabolism and nutrient availability, and in our infection *T. rubrum* assays in nails, the
 236 mutant phenotype of $\Delta TruMDR2$ strain was strictly correlated with the decreased
 237 growth on human nails.
 238 In conclusion, the capacity of infecting fungi to regulate their gene expression and
 239 overcome the host resistances is crucial in the dermatophyte virulence. The expression
 240 of several transporters reported in our studies confirmed that a membrane transporter
 241 system is required for optimal growth on keratin sources that may reflect a regulatory
 242 role for establishment of dermatophytoses in the host site. Furthermore, by using nail
 243 fragments as the only source of nutrients, we noted that the $\Delta TruMDR2$ mutant grows
 244 poorly compared to the control strain suggesting that the *TruMDR2* gene could be
 245 involved in the virulence of *T. rubrum*.

246

247 **ACKNOWLEDGEMENTS**

248 This work was supported by grants from the Brazilian agencies FAPESP, CNPq,
 249 CAPES and FAEPA. We thank R.A.P. Ferreira, A.C.C. Souza, M. Mazucato for
 250 technical support, Sanches P. R. for bioinformatic assistance, and Borghi A. for English
 251 review.

252

253 **REFERENCES**

254

255 Akao, T., Sano, M., Yamada, O., Akeno, T., Fujii, K., Goto, K., Ohashi-Kunihiro,
 256 S., Takase, K., Yasukawa-Watanabe, M. & other authors (2007). Analysis of

- expressed sequence tags from the fungus *Aspergillus oryzae* cultured under different conditions. *DNA Res* **14**, 47-57.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.
- Casadevall, A. & Pirofski, L. (2001).** Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *J Infect Dis* **184**, 337-344.
- Cervelatti, E. P., Fachin, A. L., Ferreira-Nozawa, M. S. & Martinez-Rossi, N. M. (2006).** Molecular cloning and characterization of a novel ABC transporter gene in the human pathogen *Trichophyton rubrum*. *Med Mycol* **44**, 141-147.
- Choquer, M., Lee, M. H., Bau, H. J. & Chung, K. R. (2007).** Deletion of a MFS transporter-like gene in *Cercospora nicotianae* reduces cercosporin toxin accumulation and fungal virulence. *FEBS Lett* **581**, 489-494.
- Cove, D. J. (1966).** The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim Biophys Acta* **113**, 51-56.
- Diatchenko, L., Lau, Y. F., Campbell, A. P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N. & other authors (1996).** Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6025-6030.
- Erbagci, Z. (2002).** Deep dermatophytoses in association with atopy and diabetes mellitus: Majocchi's granuloma trichophyticum or dermatophytic pseudomycetoma? *Mycopathologia* **154**, 163-169.
- Fachin, A. L., Maffei, C. M. & Martinez-Rossi, N. M. (1996).** *In vitro* susceptibility of *Trichophyton rubrum* isolates to griseofulvin and tioconazole. Induction and isolation of a resistant mutant to both antimycotic drugs. *Mycopathologia* **135**, 141-143.
- Fachin, A. L., Ferreira-Nozawa, M. S., Maccheroni, W., Jr. & Martinez-Rossi, N. M. (2006).** Role of the ABC transporter TruMDR2 in terbinafine, 4-nitroquinoline N-oxide and ethidium bromide susceptibility in *Trichophyton rubrum*. *J Med Microbiol* **55**, 1093-1099.
- Ferreira-Nozawa, M. S., Silveira, H. C., Ono, C. J., Fachin, A. L., Rossi, A. & Martinez-Rossi, N. M. (2006).** The pH signaling transcription factor PacC mediates the growth of *Trichophyton rubrum* on human nail *in vitro*. *Med Mycol* **44**, 641-645.
- Fleissner, A., Sopalla, C. & Weltring, K. M. (2002).** An ATP-binding cassette multidrug-resistance transporter is necessary for tolerance of *Gibberella pulicaris* to phytoalexins and virulence on potato tubers. *Mol Plant Microbe Interact* **15**, 102-108.
- Francis, M. S. & Thomas, C. J. (1997).** Mutants in the CtpA copper transporting P-type ATPase reduce virulence of *Listeria monocytogenes*. *Microb Pathog* **22**, 67-78.

- 307 **Grobler, J., Bauer, F., Subden, R. E. & Van Vuuren, H. J. (1995).** The mae1 gene of
308 *Schizosaccharomyces pombe* encodes a permease for malate and other C4 dicarboxylic
309 acids. *Yeast* **11**, 1485-1491.
- 310
- 311 **Gupta, A. & Chattoo, B. B. (2008).** Functional analysis of a novel ABC transporter
312 ABC4 from *Magnaporthe grisea*. *FEMS Microbiol Lett* **278**, 22-28.
- 313
- 314 **Kunert, J. (1972).** Keratin decomposition by dermatophytes: evidence of the
315 sulphitolysis of the protein. *Experientia* **28**, 1025-1026.
- 316
- 317 **Kunert, J. (1976).** Keratin decomposition by dermatophytes. II. Presence of s-
318 sulfocysteine and cysteic acid in soluble decomposition products. *Z Allg Mikrobiol* **16**,
319 97-105.
- 320
- 321 **Lechenne, B., Reichard, U., Zaugg, C., Fratti, M., Kunert, J., Boulat, O. & Monod,**
322 **M. (2007).** Sulphite efflux pumps in *Aspergillus fumigatus* and dermatophytes.
323 *Microbiology* **153**, 905-913.
- 324
- 325 **Maranhão, F. C., Paião, F. G. & Martinez-Rossi, N. M. (2007).** Isolation of
326 transcripts over-expressed in human pathogen *Trichophyton rubrum* during growth in
327 keratin. *Microb Pathog* **43**, 166-172.
- 328
- 329 **Marro, D., Guy, R. H. & Delgado-Charro, M. B. (2001).** Characterization of the
330 iontophoretic permselectivity properties of human and pig skin. *J Control Release* **70**,
331 213-217.
- 332
- 333 **Martinez-Rossi, N. M., Ferreira-Nozawa, M. S., Graminha, M. A. S., Nozawa, S.**
334 **R., Fachin, A. L., Cervelatti, E. P., Prade, R. A. & Rossi, A. (2004).** Molecular
335 aspects of dermatophyte-host interactions. In *Fungi in human and animal health*, pp.
336 143-165. Edited by K. R.K.S. Jodhpur, India: Scientific Publishers.
- 337
- 338 **Martinez-Rossi, N. M., Peres, N. T. A. & Rossi, A. (2008).** Antifungal resistance
339 mechanisms in dermatophytes. *Mycopathologia* DOI 10.1007/s11046-008-9110-7.
- 340
- 341 **Mishra, N. N., Prasad, T., Sharma, N., Payasi, A., Prasad, R., Gupta, D. K. &**
342 **Singh, R. (2007).** Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other
343 yeast species. A review. *Acta Microbiol Immunol Hung* **54**, 201-235.
- 344
- 345 **Nir-Paz, R., Elinav, H., Pierard, G. E., Walker, D., Maly, A., Shapiro, M., Barton,**
346 **R. C. & Polacheck, I. (2003).** Deep infection by *Trichophyton rubrum* in an
347 immunocompromised patient. *J Clin Microbiol* **41**, 5298-5301.
- 348
- 349 **Paião, F. G., Segato, F., Cursino-Santos, J. R., Peres, N. T. & Martinez-Rossi, N.**
350 **M. (2007).** Analysis of *Trichophyton rubrum* gene expression in response to cytotoxic
351 drugs. *FEMS Microbiol Lett* **271**, 180-186.
- 352
- 353 **Parisot, D., Dufresne, M., Veneault, C., Lauge, R. & Langin, T. (2002).** clap1, a
354 gene encoding a copper-transporting ATPase involved in the process of infection by the
355 phytopathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. *Mol Genet Genomics* **268**,
356 139-151.

- 357
358 **Prasad, R., Gaur, N. A., Gaur, M. & Komath, S. S. (2006).** Efflux pumps in drug
359 resistance of *Candida*. *Infect Disord Drug Targets* **6**, 69-83.
360
- 361 **Riggle, P. J. & Kumamoto, C. A. (2000).** Role of a *Candida albicans* P1-type ATPase
362 in resistance to copper and silver ion toxicity. *J Bacteriol* **182**, 4899-4905.
363
- 364 **Saier, M. H., Jr., Beatty, J. T., Goffeau, A., Harley, K. T., Heijne, W. H., Huang, S.
365 C., Jack, D. L., Jahn, P. S., Lew, K. & other authors (1999).** The major facilitator
366 superfamily. *J Mol Microbiol Biotechnol* **1**, 257-279.
367
- 368 **Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** *Molecular cloning: a laboratory*
369 *manual*, 2nd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
370
- 371 **Summerbell, R. C. (1997).** Epidemiology and ecology of onychomycosis.
372 *Dermatology* **194 Suppl 1**, 32-36.
373
- 374 **Takasuka, T. (2000).** Amino acid- or protein-dependent growth of *Trichophyton*
375 *mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **29**, 241-
376 245.
377
- 378 **Urban, M., Bhargava, T. & Hamer, J. E. (1999).** An ATP-driven efflux pump is a
379 novel pathogenicity factor in rice blast disease. *EMBO J* **18**, 512-521.
380
- 381 **Vardy, E., Arkin, I. T., Gottschalk, K. E., Kaback, H. R. & Schuldiner, S. (2004).**
382 Structural conservation in the major facilitator superfamily as revealed by comparative
383 modeling. *Protein Sci* **13**, 1832-1840.
384
- 385 **Vermeulen, T., Schoonbeek, H. & De Waard, M. A. (2001).** The ABC transporter
386 BcatrB from *Botrytis cinerea* is a determinant of the activity of the phenylpyrrole
387 fungicide fludioxonil. *Pest Manag Sci* **57**, 393-402.
388
- 389 **Weissman, Z., Shemer, R. & Kornitzer, D. (2002).** Deletion of the copper transporter
390 CaCCC2 reveals two distinct pathways for iron acquisition in *Candida albicans*. *Mol*
391 *Microbiol* **44**, 1551-1560.
392
- 393 **Weitzman, I. & Summerbell, R. C. (1995).** The Dermatophytes. *Clin Microbiol Rev* **8**,
394 240-259.
395
- 396 **Zhu, X. & Williamson, P. R. (2003).** A CLC-type chloride channel gene is required for
397 laccase activity and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* **50**, 1271-
398 1281.
399
400
401

402
403
404
405

406
407
408

Table 1. *Trichophyton rubrum* transporter genes over-expressed during growth in the presence of keratin

EST	GenBank acession number	Size (bp)	Putative ID (GenBank)	<i>E-value</i>	Identity	Number of clones
TR0042	EB086877	634	<i>Aspergillus fumigatus</i> , MFS peptide transporter, putative, XP_746951	1 E ⁻⁶⁹	66 %	38
TR0097	EH038250	224	<i>A. fumigatus</i> , V-type ATPase, subunit B, XP_755656	6 E ⁻²⁰	92 %	16
TR0044	EB086879	420	<i>T. rubrum</i> , multidrug resistance protein MDR, AAG01549 - <i>TruMDR2</i> gene	2 E ⁻²⁰	100 %	9
TR0043	EB086878	176	<i>A. fumigatus</i> , copper resistance-associated P-type ATPase, XP_754347	2 E ⁻¹⁵	75 %	2
TR0052	EB086887	723	<i>A. fumigatus</i> , amino acid permease, putative acid permease, AC98709	8 E ⁻¹²	57 %	1

409
410

411 **Legends for Figures**

412

413 **Fig. 1.** Northern blot analyses showing differential expression of *Trichophyton rubrum*
414 genes encoding for a MFS transporter (TR0042), a Cu⁺⁺ ATPase (TR0043), an MDR
415 ABC transporter (TR0044) and a permease (TR0052), using total RNA from strain H6.
416 This strain was cultivated in glucose, as a control (C) and in keratin (K). Ethidium
417 bromide-stained rRNA shows the relative loading of the samples. Numbers associated
418 with the bars indicate fold differences relative to the intensity of the Northern blots
419 shown by each clone expressed in the H6 strain cultivated in control condition (C;
420 glucose) and in keratin (K) as test, as established by densitometry analysis using
421 Phosphoimager Scanner.

422

423

424

425 **Fig. 2.** Infection assays showed the growth of different *Trichophyton rubrum* strains
426 cultivated in human nail during 6 days at 28 °C. The fungal growth on human nails was
427 observed through light microscopy and the images were captured by using the Axio
428 vision system (Zeiss) with a plan neofluar 20x/0.5 objective. The black parts on the left
429 side are nail fragments: (A) Control negative (no inoculum), (B) H6 (wild-type) and (C)
430 $\Delta TruMDR2$ strain. The representative results of two experiments are shown.

A **B** **C**