**Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Programa de Pós-Graduação em Genética**

Rodrigo da Silva Santos

**Regulação da expressão gênica no patógeno
humano *Trichophyton rubrum* em resposta ao pH
ambiente, a variações nutricionais e na interação
dermatófito-hospedeiro**

**Ribeirão Preto
2013**

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Programa de Pós-Graduação em Genética

Rodrigo da Silva Santos

Regulação da expressão gênica no patógeno humano *Trichophyton rubrum* em resposta ao pH ambiente, a variações nutricionais e na interação dermatófito-hospedeiro

Ribeirão Preto – São Paulo

2013

RODRIGO DA SILVA SANTOS

Regulação da expressão gênica no patógeno humano *Trichophyton rubrum* em resposta ao pH ambiente, a variações nutricionais e na interação dermatófito-hospedeiro

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Antonio Rossi Filho

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Nilce Maria Martinez Rossi

Ribeirão Preto – São Paulo

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Rodrigo da Silva

Regulação da expressão gênica no patógeno humano *Trichophyton rubrum* em resposta ao pH ambiente, a variações nutricionais e na interação dermatófito-hospedeiro. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

p.168 : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP – Área de concentração: Genética.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Rossi Filho

Co-Orientadora: Profa. Dra. Nilce Maria Martinez Rossi

1. *Trichophyton rubrum*; 2. Expressão gênica; 3. Fator de transcrição; 4. Autofagia; 5. Adesão celular.

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este projeto foi realizado com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP
(Proc.: nº 2008/58634-7).

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq
(Proc: nº 142311/2010-3).

Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência – FAEPA (FMRP/USP).

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

CAPES PROEX - Departamento de Genética FMRP-USP – (Mobilidade Internacional – Estágio de Doutorado na *Humboldt University* (Berlim, Alemanha).

CAPES PROEX - Departamento de Genética FMRP-USP – (Mobilidade Internacional - Doutorado Sanduíche na Universidade de Sevilla (Espanha).

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Este documento foi elaborado de acordo com:

Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT): NBR 6023, NBR 6024, NBR 6027 e NBR 6028.

Universidade de São Paulo. Sistema Integrado de Bibliotecas. Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: documento eletrônico ou impresso (ABNT), São Paulo, 2009.

"A vida inteligente em um planeta torna-se amadurecida quando, pela primeira vez, compreende a razão da sua própria existência".

Richard Dawkins (O gene egoísta)

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida...

Ao meu Deus, pelo grandioso Dom da Vida, fonte inesgotável de força e sabedoria.

Aos meus honrados pais, Gersonília Bispo da S. Santos e Jurivê Pereira dos Santos. Obrigado pelo apoio, pela força, dedicação e confiança em mim depositados, colocando sempre todos os meus planos acima dos seus. Meu exemplo de vida, determinação, fé e dos verdadeiros valores que engradem o homem. Mãe, o amor de mãe é o combustível que permite a um ser humano fazer o impossível. Te amo!

Ao meu grande irmão Paulo Henrique S. Santos, pelo apoio, amizade e parceria durante todos esses anos.

A minha avó Joana Pereira (saudades!). Hoje eu vi a senhora... Sabe onde? Nas melhores lembranças da minha vida!....Ensinou-me grandes valores e a enfrentar a vida, buscando através dos estudos, minhas verdadeiras conquistas. Dedico esse trabalho à sua pessoa, pelo exemplo de educadora que foi.

A todos as pessoas da minha família, que apoiaram e torceram a favor de mais essa conquista.

A vocês eu dedico todas as conquistas da minha vida..!

AGRADECIMENTOS

Um agradecimento especial e sincero aos meus orientadores: Prof. Dr. Antonio Rossi e Profa. Dra. Nilce Maria Martinez Rossi.

Ao meu orientador Prof. Dr. Antonio Rossi, agradeço pela sua orientação, atenção, confiança, discussões científicas e incentivo durante a realização deste projeto, e pela oportunidade de me integrar em seu grupo de pesquisa e prosseguir meus estudos. Agradeço pelo grande exemplo de luta, coragem e dedicação na área de pesquisa, pois a sua história de vida e de conquistas, foi um dos meus maiores estímulos, para continuar buscando meu aperfeiçoamento em grupos de pesquisa no exterior, quando recebi o primeiro não. Muito obrigado pela sua orientação e dedicação a minha formação científica e profissional.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Nilce Maria Martinez Rossi, agradeço por disponibilizar o seu laboratório, pela confiança, incentivo, discussões científicas, oportunidades e pelo seu exemplo de profissionalismo. A sua orientação foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a vocês dois também, pela oportunidade de trabalhar em um grupo de pesquisa preocupado em obter recursos financeiros para o desenvolvimento profissional dos seus alunos e comprometido com o bem público, onde se procura justificar, em forma de publicações, o suporte financeiro recebido. Sou grato e terei sempre, ao longo da minha carreira profissional, o cuidado e a responsabilidade de ter a minha formação vinculada ao nome de vocês.

À minha parceira, hermana e amiga Aline Helena da Silva Cruz, a família Silva Cruz e ao amigo João Paulo Langsdorff, pela amizade, pela lealdade, orações e atenção durante esses quatro anos de doutorado. Saiba que faltam palavras para agradecer e expressar a minha gratidão. Nossa parceria e união foram fundamentais durante esse processo. Obrigado por dividir o pão e as conquistas. Você é um ser humano incrível. Tenho muito orgulho de ser seu amigo!

À minha supervisora Profa. Dra Edda Klipp e todos os estudantes e pesquisadores do *Computational Systems Biology Group, Humboldt-Universität zu Berlin* e do *Institute for Molecular Genetics International, Max Planck Research School*, pelo apoio e recepção durante o estágio em Bioquímica e Biologia de Sistemas em Berlim (Alemanha).

Ao meu supervisor Prof. Dr. Sebastián Chávez de Diego, e todos os estudantes do Laboratório de Expressão Gênica em Eucariotos do Departamento de Genética da *Universidad de Sevilla* (Espanha), pelo apoio, atenção e conhecimento científico transmitido durante o meu estágio de doutorado sanduíche. Um agradecimento especial para: Lidia Delgado Ramos (obrigado pela parceria durante todos os meses), Gonzalo Millán Zambrano, Dra. Xenia Peñate Salas, Profa. Dra. María de la Cruz Muñoz Centeno e ao Prof. Dr. Jesús de La Cruz Diaz e seu estudante de doutorado Juan José Garcia Gómez “Juango” por toda a ajuda em encaminhar a minha documentação, resolver toda a burocracia e realizar a minha matrícula na universidade. Ficam registrados também, meus agradecimentos a Sra. Carmen Chávez de Diego por preparar todos os documentos necessários para a minha permanência no país e por cuidar da minha hospedagem. Aos Professores Jesús Cruz e Luis Corrochano Labs, pelos momentos de diversão e “câmbio” cultural. Sevilla foi uma experiência incrível!

Ao Prof. Dr. Juan Carlos Rodríguez Aguilera do grupo de Fisiopatologia Celular e Bioenergética do *European Centre for Biomedical Research Network of Rare Diseases - Andalusian Centre for Developmental Biology, Pablo de Olavide University (Seville, Spain)*, pela oportunidade em realizar o meu treinamento em Biologia Celular (Citometria de Fluxo), em um centro de pesquisa conceituado. Agradeço ao Prof. Dr. Sebastián Chávez de Diego, pela indicação e oportunidade.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos e do Laboratório de Genética e Biologia Molecular de Fungos (Grupo GBM USP - Genética e Biologia Molecular): Aline Cruz, Glauce Trevisan, Nieve Mendes, Patrícia Martins, Elza Lang, Gabriela Persinoti, Hemelin Ludmila, Larissa Gomes, Maíra Pompeu, Pablo Sanches, Rodrigo Cazzaniga, Tiago Jacob, pelo apoio, convívio e colaborações científicas durante esses anos. Um agradecimento especial para a Dra. Nalu Peres, pela amizade, por toda a colaboração durante a escrita da tese e discussões científicas. Muito Obrigado pessoal!

Aos técnicos dos Laboratórios de Bioquímica e Genética: Sílvia Helena Castrechini (Silvinha, obrigado por tudo), Mendelson Mazucato “Mendel”, Marcos Martins e Vandercei Massaro de Oliveira “Cuca”, por todo o auxílio técnico, no preparo de materiais, nos experimentos, sequenciamentos, preparo de vidrarias e soluções, extrações de DNA, e acima de tudo pela amizade.

Aos docentes, funcionários e estudantes dos Departamentos de Genética e Bioquímica e Imunologia, que não mediram esforços para ajudar e contribuir com a minha formação. Um agradecimento especial para o Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pela estrutura oferecida para minha formação na pós-graduação, e para a secretária Susie Nalon, pela atenção e dedicação, mesmo quando eu ainda estava em Goiânia. Ao Prof. Dr. Ademilson Espencer Egea Soares pela amizade, por todo apoio e ajuda durante a busca por auxílios financeiros para as viagens internacionais.

Aos docentes do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da FMRP, em especial ao Prof. Dr. Roy Edward Larson, pela oportunidade, pelos conhecimentos compartilhados e por todo o profissionalismo demonstrando durante o meu estágio docência e de aperfeiçoamento (PAE-USP) em Biologia Celular, Molecular, Tecidual e do Desenvolvimento.

Ao Prof. Dr. Roberto do Nascimento Silva, pela amizade, pelas discussões bioquímicas e moleculares, e incentivo durante as atividades desenvolvidas durante o meu doutorado. Agradeço também aos estudantes do seu Laboratório de Biotecnologia Molecular pela convivência e amizade. Um agradecimento especial a minha amiga Lilian Castro e ao amigo Sidon Cardoso (Rio Verde – GO).

Aos amigos e membros da república masculina FMRP-USP: Danilo Almeida (Guda), Tiago Ferreira, Marco Túlio Menezes, Rodrigo Vida e Ulysses Frias. Obrigado pela amizade e pela convivência diária durante esses anos de doutorado.

Agradeço ao CNPq pela bolsa de doutorado, a CAPES-PROEX pela verba disponibilizada para a realização do meu doutorado sanduíche, a FAEPA pelos auxílios fornecidos para participação em congressos e a FAPESP pelo apoio financeiro dado ao projeto temático “Genômica funcional e comparativa em fungos”.

Agradeço a disposição dos membros da banca examinadora para avaliar e discutir o presente trabalho.

É impossível, entretanto, nominar todas as pessoas que me ajudaram nessa jornada, mas eu tentei. Minhas desculpas aos que não foram citados, mas minha eterna gratidão a todos que possibilitaram a execução desse trabalho.

Obrigado!!!

RESUMO

SANTOS, R. S. **Regulação da expressão gênica no patógeno humano *Trichophyton rubrum* em resposta ao pH ambiente, a variações nutricionais e na interação dermatófito-hospedeiro.** 2013. 168 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, 2013.

O patógeno *Trichophyton rubrum* é um fungo queratinofílico e o principal agente de micoses cutâneas humanas. O processo de degradação de substratos queratinizados por dermatófitos está relacionado com a alcalinização do ambiente, o que modula a expressão e a secreção de enzimas responsáveis pela captação e utilização dos nutrientes presentes no microambiente hospedeiro. Essa modulação do pH parece determinante para o sucesso do processo infeccioso, quando o fungo se depara com o pH ácido da pele humana. A hipótese deste trabalho foi verificar se há influência do pH e da fonte nutricional na modulação da expressão de genes de *T. rubrum* que codificam proteínas envolvidas nos processos de autofagia (*atg8* e *atg15*), adesão celular (*sowgp*) e de alguns fatores de transcrição (*pacC*, *bZIP/cys-3* e *nuc-1*), e se estes processos estão relacionados à patogenicidade deste dermatófito. De modo a avaliar a modulação da expressão destes genes na patogenicidade e sobrevivência fúngica, *T. rubrum* foi cultivado em meios de cultura tamponados (pH 5,0 e pH 8,0) e não tamponados, contendo glicose, glicina, glicose com glicina, ou queratina como fonte nutricional. Os genes envolvidos no processo de autofagia também foram avaliados na presença do inibidor de autofagia 3-metiladenina (3-MA). Além disso, o perfil transcricional destes genes de *T. rubrum* foi avaliado durante a interação *ex vivo* com unha e pele humana. As análises demonstraram a influência concomitante da fonte nutricional e do pH ambiente na modulação da expressão dos transcritos gênicos estudados nas diferentes linhagens de *T. rubrum* utilizadas neste trabalho (CBS, H6 e *pacC-1*). Nossos resultados revelaram que o crescimento destas linhagens é maior na fonte nutricional queratina, quando comparado com as outras fontes nutricionais (glicose e glicina), havendo uma diferença na taxa de crescimento entre as linhagens neste substrato preferencial. Os genes *bZIP/cys-3* e *nuc-1* apresentaram perfil de expressão semelhante, mais elevada durante cultivos longos, respondendo a condições de estresse nutricional e pH alcalino, sugerindo a participação dos mesmos nos processos de crescimento e sobrevivência do fungo. Além disso, mecanismos regulatórios diferentes destes genes devem ocorrer nas três linhagens de *T. rubrum* em relação ao crescimento na fonte nutricional queratina. A variação transcricional do gene *pacC* em resposta às diferentes fontes nutricionais sugere que sua expressão depende das condições nutricionais encontradas por esse fungo, sendo o pH uma resposta secundária. Nossos resultados sugerem ainda que a via de autofagia seja importante para o desenvolvimento e sobrevivência de *T. rubrum* nestes substratos, e que o FT PacC atue regulando um dos pontos deste processo, visto que o gene *atg15* apresenta um perfil semelhante de expressão ao gene *pacC*, e o gene *atg8* tem perfil antagônico de expressão nas linhagens H6 e *pacC-1*, nas condições avaliadas neste trabalho. 3-MA inibiu a transcrição dos genes *atg8* e *atg15* em *T. rubrum* de modo específico, e por consequência a via de macroautofagia. Os dados de expressão de *sowgp* sugerem que essa molécula atue durante a privação nutricional e situações de estresse pelo dermatófito, provavelmente desempenhando seu papel na progressão e manutenção do processo infeccioso, permitindo a permanência do fungo em tecidos queratinizados, e auxiliando na fixação do fungo ao epitélio humano. Desta maneira, nossos resultados fornecem informações sobre os eventos moleculares envolvidos na regulação da expressão genica durante a adaptação de *T. rubrum* ao pH, à variação nutricional, e interação com células e moléculas do microambiente

hospedeiro. Os resultados revelam o envolvimento do processo de autofagia e de moléculas de adesão no sensoriamento e resposta a variações ambientais, e a modulação dos fatores de transcrição bZIP/Cys-3, Nuc-1 e PacC durante a adaptação de *T. rubrum* ao pH e à fonte nutricional podem ser importantes na regulação de moléculas necessárias para sua patogenicidade.

Palavras-chave: *Trichophyton rubrum*, expressão gênica, fator de transcrição, autofagia, adesão celular.

ABSTRACT

SANTOS, R. S. **Regulation of gene expression in human pathogen *Trichophyton rubrum* in response to ambient pH, the variations in nutritional and dermatophyte-host interaction.** 2013. 168 f. Thesis (PhD) - Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto-SP, 2013.

The pathogen *Trichophyton rubrum* is a keratinophilic fungi and the major agent of cutaneous mycosis in humans. The process of degradation of keratinized substrates by dermatophytes is related with environment alkalization, which modulates the expression and secretion of the enzymes responsible for the acquisition and utilization of nutrients from the host microenvironment. This pH modulation seems to be determinant for the success of the infectious process when the fungus encounters the acidic pH of the human skin. The hypothesis of this study was to determine whether there is influence of ambient pH and nutritional source in the modulation of gene expression of *T. rubrum* genes coding for proteins involved in the processes of autophagy (*atg8* and *atg15*), cellular adhesion (*sowgp*) and some transcription factors (*pacC*, *bZIP/cys-3* and *nuc-1*), and if they are related with the pathogenicity of this dermatophyte. To evaluate the modulation of the expression of these genes in fungal pathogenicity and survival, *T. rubrum* was cultivated in buffered (pH 5.0 and pH8.0) or non-buffered media, containing glucose, glycine, glucose and glycine, or keratin as nutrient source. The autophagy-related genes were also analyzed in the presence of 3-methyladenine (3-MA) autophagy inhibitor. Moreover, the transcriptional profile of these genes was evaluated during *T. rubrum* *ex vivo* interaction with human nail and skin. The analyses demonstrate the simultaneous influence of the nutritional source and environment pH in the modulation of gene transcription in the different *T. rubrum* strains evaluated here (CBS, H6 and *pacC-1*). Our results revealed that growth of these strains is higher in keratin source, compared with other nutrient sources (glucose or glycine), and that they present different growth rates in this preferential substrate. The genes *bZIP/cys-3* and *nuc-1* presented a similar expression profile, which is higher during longer periods of growth, responding to nutritional stress and alkaline pH, suggesting their involvement in fungal growth and survival. Also, different regulatory mechanisms of these genes in these three *T. rubrum* strains might be implicated during keratin degradation. The transcriptional variation in the *pacC* gene in response to different nutritional sources, suggests that its expression is dependent on the nutritional conditions, being the ambient pH a secondary response. Furthermore, our results indicate that the autophagy pathway is important for *T. rubrum* survival and development during nutrient and pH adaptation, and that PacC might regulates some points of this process, since *atg15* and *pacC* genes presented a similar expression profile, and *atg8* has antagonistic expression profiles in the H6 and *pacC-1* strains, in the conditions evaluated here. 3-MA inhibited the transcription of *atg8* and *atg15* *T. rubrum* genes in a specific manner, and thus inhibited the macroautophagy process. The expression profile of the *sowgp* gene suggests that this molecule is important during nutrient starvation and stress situation, probably having a role in the progression and maintenance of the infectious process, allowing fungal maintenance in the host keratinized tissues, contributing to fungal adherence to human epithelia. Taken together, our results provide insights into the molecular events involved in the regulation of gene expression during *T. rubrum* adaptation to pH, nutritional variation and interaction with the host cells and molecules. Our data reveals the involvement of the autophagy process and adhesion molecules in sensing and response of environmental changes, and the modulation of the bZIP/Cys-3, Nuc-1 and PacC transcription factors during *T. rubrum*

adaptation to pH and nutrient source might be important in the regulation of molecules required for its pathogenicity.

Keywords: *Trichophyton rubrum*, gene expression, transcription factors, autophagy, cellular adhesion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Principais manifestações clínicas de dermatofitoses (<i>Tinea unguium</i> e <i>Tinea corporis</i>) causadas pelo patógeno <i>Trichophyton rubrum</i> (Fonte: Degreef, 2008 e http://www.dermatlas.net).	27
Figura 02: Desenho experimental e representativo das propostas e objetivos realizados neste trabalho.	48
Figura 03: Estrutura química do composto 3-metiladenina (3MA) ($C_6H_7N_5$), que inibe a autofagia bloqueando a formação do autofagossomo (Fonte: Sigma-Aldrich Chemical, http://www.sigmaaldrich.com).	53
Figura 04: Pele humana utilizada para o experimento de infecção ex vivo, obtida de paciente submetido à cirurgia abdominal. O tecido adiposo foi retirado por raspagens consecutivas com bisturi em ambiente esterilizado e o fragmento de pele foi processado em pedaços de 1cm^2 e estocado em solução SGF a 4°C . Durante os ensaios de interação, os fragmentos de pele foram infectados com 1×10^4 conídios de <i>T. rubrum</i> , e foram incubados a 28°C por 96h. (Foto: Peres, NTA; 2009).	61
Figura 05: Esquema da metodologia de PCR de fusão para obtenção dos cassetes de inativação gênica. Os números 1 a 8 representam os oligonucleotídeos utilizados para amplificar cada fragmento. Fonte: Figura adaptada de Yu et al., 2004.	64
Figura 06: Estratégia de transformação com marcador dividido <i>split marker</i> . Nesta metodologia, três eventos de recombinação devem ocorrer, uma para que a sequência do gene que codifica o marcador de seleção fique intacta e a linhagem adquira resistência, e outras duas para recombinações envolvendo as âncoras homólogas ao gene que se pretende inativar (Fonte: Adaptado de Kuck e Hoff, 2010).	66
Figura 07: Esquema ilustrando oligonucleotídeos utilizados para amplificação de fragmentos 5' e 3' do cassette de inativação utilizados na metodologia de <i>split-marker</i>	66
Figura 08: Crescimento das linhagens de <i>T. rubrum</i> em meios Sabouraud e MEA, durante 22 dias, a 28°C	70
Figura 09: Crescimento das linhagens de <i>T. rubrum</i> em meio mínimo suplementado com diferentes fontes nutricionais (glicose, glicina, glicose com glicina ou queratina), durante 22 dias, a 28°C	72
Figura 10: Valores de pH aferidos para os meios de cultivo Sabouraud e meios mínimos não tamponados contendo diferentes fontes nutricionais em pH inicial 5,0, após o cultivo das linhagens de <i>T. rubrum</i>	73
Figura 11: Valores de massa celular obtidos após o cultivo das linhagens de <i>T. rubrum</i> em meio Sabouraud e meio mínimo não tamponado contendo diferentes fontes nutricionais em pH inicial 5,0. De forma asséptica, o micélio foi filtrado e seco em papel de filtro, e por fim pesado. O micélio cultivado em queratina foi lavado com água esterilizada durante a filtração para retirada do excesso deste substrato.	74
Figura 12: Valores de massa celular obtidos após o cultivo das linhagens de <i>T. rubrum</i> em meio Sabouraud e meio mínimo tamponado (pH 5,0 e pH 8,0) contendo diferentes fontes nutricionais. De forma asséptica, o micélio foi filtrado e seco em papel de filtro, e por fim pesado. O micélio cultivado em queratina foi lavado com água esterilizada durante a filtração para retirada do excesso deste substrato.	75
Figura 13: Alinhamento das sequências genômicas parciais do gene <i>bZIP/cys-3</i> das linhagens CBS e H6 de <i>T. rubrum</i> . A sequência de nucleotídeos está na direção 5' – 3'.	76
Figura 14: Alinhamento das sequências genômicas parciais do gene <i>nuc-1</i> das linhagens CBS e H6 de <i>T. rubrum</i> . A sequência de nucleotídeos está na direção 5' – 3'.	77
Figura 15: Alinhamento das sequências genômicas parciais do gene <i>pacC</i> das linhagens CBS e H6 de <i>T. rubrum</i> . A sequência de nucleotídeos está na direção 5' – 3'.	77
Figura 16: Alinhamento das sequências genômicas parciais do gene <i>atg8</i> das linhagens CBS e H6 de <i>T. rubrum</i> . A sequência de nucleotídeos está na direção 5' – 3'.	78
Figura 17: Alinhamento das sequências genômicas parciais do gene <i>atg15</i> das linhagens CBS e H6 de <i>T. rubrum</i> . A sequência de nucleotídeos está na direção 5' – 3'.	78
Figura 18: Alinhamento das sequências genômicas parciais do gene <i>sowgp</i> das linhagens CBS e H6 de <i>T. rubrum</i> . A sequência de nucleotídeos está na direção 5' – 3'.	79
Figura 19: Alinhamento das sequências genômicas parciais do gene <i>gapdh</i> das linhagens CBS e H6 de <i>T. rubrum</i> . A sequência de nucleotídeos está na direção 5' – 3'.	79

Figura 20: Alinhamento das sequências genômicas parciais do gene <i>β-tubulina</i> das linhagens CBS e H6 de <i>T. rubrum</i> . A sequência de nucleotídeos está na direção 5' – 3'.....	79
Figura 21: Diagrama de Venn representando o número de genes possivelmente regulados pelos fatores de transcrição bZIP/Cys-3, PacC e Nuc-1 no genoma do dermatófito <i>T. rubrum</i> (CBS118892).	81
Figura 22: Expressão relativa dos genes <i>bZIP/cys-3</i> , <i>pacC</i> e <i>nuc-1</i> na linhagem CBS de <i>T. rubrum</i> , cultivada na presença de diferentes fontes nutricionais (glicose ou glicina). As condições referem-se aos meios de cultivo não tamponados com pH inicial 5,0. Análises estatísticas para avaliar as diferenças na expressão dos genes foram realizadas em relação ao tempo de 24h de cada fonte nutricional, e são representadas por (*), correspondendo a um valor de $p \leq 0,05$	83
Figura 23: Expressão relativa dos genes <i>bZIP/cys-3</i> , <i>pacC</i> e <i>nuc-1</i> na linhagem CBS de <i>T. rubrum</i> , cultivada na presença de diferentes fontes nutricionais (glicose com glicina ou queratina). As condições referem-se aos meios de cultivo não tamponados com pH inicial 5,0. Análises estatísticas para avaliar as diferenças na expressão dos genes foram realizadas em relação ao tempo de 24h de cada fonte nutricional, e são representadas por (*), correspondendo a um valor de $p \leq 0,05$	83
Figura 24: Expressão relativa dos genes <i>bZIP/cys-3</i> , <i>pacC</i> e <i>nuc-1</i> nas linhagens H6 e <i>pacC-1</i> de <i>T. rubrum</i> , cultivadas na presença de queratina. As condições referem-se aos meios de cultivo não tamponados com pH inicial 5,0. Análises estatísticas para avaliar as diferenças na expressão dos genes foram realizadas em relação ao tempo de 24h de cada fonte nutricional, e são representadas por (*), correspondendo a um valor de $p \leq 0,05$	85
Figura 25: Expressão relativa dos genes <i>bZIP/cys-3</i> , <i>pacC</i> e <i>nuc-1</i> na linhagem CBS de <i>T. rubrum</i> , cultivada na presença de diferentes fontes nutricionais (glicose ou glicina). As condições referem-se aos meios de cultivo tamponados em pH 5,0 e pH 8,0. Análises estatísticas para avaliar as diferenças na expressão dos genes em pH alcalino foram realizadas em comparação com o meio ácido e são representadas por (*), correspondendo a um valor de $p \leq 0,05$	85
Figura 26: Expressão relativa dos genes <i>bZIP/cys-3</i> , <i>pacC</i> e <i>nuc-1</i> na linhagem CBS de <i>T. rubrum</i> , cultivada na presença de diferentes fontes nutricionais (glicose com glicina ou queratina). As condições referem-se aos meios de cultivo tamponados em pH 5,0 e pH 8,0. Análises estatísticas para avaliar as diferenças na expressão dos genes em pH alcalino foram realizadas em comparação com o meio ácido e são representadas por (*), correspondendo a um valor de $p \leq 0,05$	86
Figura 27: Expressão relativa dos genes <i>bZIP/cys-3</i> , <i>pacC</i> e <i>nuc-1</i> nas linhagens H6 e <i>pacC-1</i> de <i>T. rubrum</i> , cultivadas na presença de queratina. As condições referem-se aos meios de cultivo tamponados em pH 5,0 e pH 8,0. Análises estatísticas para avaliar as diferenças na expressão dos genes em pH alcalino foram realizadas em comparação com o meio ácido e são representadas por (*), correspondendo a um valor de $p \leq 0,05$	86
Figura 28: Heat map de expressão gênica, apresentando simultaneamente agrupamentos de amostras e genes. A matriz apresenta os valores em Log ₂ obtidos a partir da expressão dos genes <i>bZIP/cys-3</i> , <i>pacC</i> e <i>nuc-1</i> nas linhagens CBS, H6 e <i>pacC-1</i> de <i>T. rubrum</i> nas diferentes condições experimentais avaliadas. A cor verde claro representa a menor quantidade de transcritos e a cor vermelha claro indica a maior quantidade de transcritos.	87
Figura 29: Expressão relativa do gene <i>atg8</i> na linhagem CBS de <i>T. rubrum</i> , cultivada na presença de diferentes fontes nutricionais (glicose, glicina, glicose com glicina ou queratina). As condições referem-se aos meios de cultivo não tamponados com pH inicial 5,0. Análises estatísticas para avaliar as diferenças na expressão dos genes foram realizadas em relação ao tempo de 24h de cada fonte nutricional, e são representadas por (*), correspondendo a um valor de $p \leq 0,05$	88
Figura 30: Expressão do gene <i>atg15</i> na linhagem CBS de <i>T. rubrum</i> , cultivada na presença de diferentes fontes nutricionais (glicose, glicina, glicose com glicina ou queratina). As condições referem-se aos meios de cultivo não tamponados com pH inicial 5,0. Análises estatísticas para avaliar as diferenças na expressão dos genes foram realizadas em relação ao tempo de 24h de cada fonte nutricional, e são representadas por (*), correspondendo a um valor de $p \leq 0,05$	89
Figura 31: Expressão relativa do gene <i>atg8</i> nas linhagens H6 e <i>pacC-1</i> de <i>T. rubrum</i> , cultivadas na presença de queratina. As condições referem-se aos meios de cultivo não tamponados com pH inicial 5,0. Análises estatísticas para avaliar as diferenças na expressão dos genes foram realizadas em relação ao tempo de 24h de cada fonte nutricional, e são representadas por (*), correspondendo a um valor de $p \leq 0,05$	90

Figura 32: Expressão relativa dos genes <i>atg15</i> nas linhagens H6 e <i>pacC-1</i> de <i>T. rubrum</i> , cultivadas na presença de queratina. As condições referem-se aos meios de cultivo não tamponados com pH inicial 5,0. Análises estatísticas para avaliar as diferenças na expressão dos genes foram realizadas em relação ao tempo de 24h de cada fonte nutricional, e são representadas por (*), correspondendo a um valor de $p \leq 0,05$	90
Figura 33: Expressão relativa do gene <i>atg8</i> na linhagem CBS de <i>T. rubrum</i> , cultivada na presença de diferentes fontes nutricionais (glicose, glicina, glicose com glicina ou queratina). As condições referem-se aos meios de cultivo tamponados em pH 5,0 e pH 8,0. Análises estatísticas para avaliar as diferenças na expressão dos genes em pH alcalino foram realizadas em comparação com o meio ácido, e são representadas por (*), correspondendo a um valor de $p \leq 0,05$	91
Figura 34: Expressão relativa do gene <i>atg15</i> na linhagem CBS de <i>T. rubrum</i> , cultivada na presença de diferentes fontes nutricionais (glicose, glicina, glicose com glicina ou queratina). As condições referem-se aos meios de cultivo tamponados em pH 5,0 e pH 8,0. Análises estatísticas para avaliar as diferenças na expressão dos genes em pH alcalino foram realizadas em comparação com o meio ácido, e são representadas por (*), correspondendo a um valor de $p \leq 0,05$	91
Figura 35: Expressão relativa do gene <i>atg8</i> nas linhagens H6 e <i>pacC-1</i> de <i>T. rubrum</i> , cultivadas na presença de queratina. As condições referem-se aos meios de cultivo tamponados em pH 5,0 e pH 8,0. Análises estatísticas para avaliar as diferenças na expressão dos genes em pH alcalino foram realizadas em comparação com o meio ácido, e são representadas por (*), correspondendo a um valor de $p \leq 0,05$	92
Figura 36: Expressão relativa do gene <i>atg15</i> nas linhagens H6 e <i>pacC-1</i> de <i>T. rubrum</i> , cultivadas na presença de queratina. As condições referem-se aos meios de cultivo tamponados em pH 5,0 e pH 8,0. Análises estatísticas para avaliar as diferenças na expressão dos genes em pH alcalino foram realizadas em comparação com o meio ácido, e são representadas por (*), correspondendo a um valor de $p \leq 0,05$	93
Figura 37: <i>Heat map</i> de expressão gênica apresentando simultaneamente agrupamentos de amostras e genes. A matriz apresenta os valores em Log_2 obtidos a partir da expressão dos genes <i>atg8</i> e <i>atg15</i> nas linhagens CBS, H6 e <i>pacC-1</i> de <i>T. rubrum</i> nas diferentes condições experimentais avaliadas. A cor verde claro representa a menor quantidade de transcritos e a cor vermelho claro indica a maior quantidade de transcritos.....	94
Figura 38: Expressão relativa do gene <i>atg8</i> na linhagem CBS de <i>T. rubrum</i> cultivada na presença do inibidor de autofagia 3MA em meio mínimo tamponado contendo glicina (pH 8,0). O controle refere-se às células não tratadas com o inibidor 3MA. Análises estatísticas para avaliar as diferenças na expressão dos genes foram realizadas em relação ao seu respectivo controle e comparando o tempo mais curto e longo de incubação na presença do inibidor em cada condição específica, sendo representadas por (*), correspondendo a um valor de $p \leq 0,05$	95
Figura 39: Expressão relativa do gene <i>atg15</i> na linhagem CBS de <i>T. rubrum</i> cultivada na presença do inibidor de autofagia 3MA em meio mínimo tamponado contendo glicina (pH 8,0). O controle refere-se às células não tratadas com o inibidor 3MA. Análises estatísticas para avaliar as diferenças na expressão dos genes foram realizadas em relação ao seu respectivo controle e comparando o tempo mais curto e longo de incubação na presença do inibidor em cada condição específica, sendo representadas por (*), correspondendo a um valor de $p \leq 0,05$	96
Figura 40: Expressão relativa do gene <i>pacC</i> na linhagem CBS de <i>T. rubrum</i> cultivada na presença do inibidor de autofagia 3MA em meio mínimo tamponado contendo glicina (pH 8,0). O controle refere-se às células não tratadas com o inibidor 3MA. Análises estatísticas para avaliar as diferenças na expressão dos genes foram realizadas em relação ao seu respectivo controle e comparando o tempo mais curto e longo de incubação na presença do inibidor em cada condição específica, sendo representadas por (*), correspondendo a um valor de $p \leq 0,05$	96
Figura 41: <i>Heat map</i> de expressão gênica, apresentando simultaneamente agrupamentos de amostras e genes. A matriz apresenta os valores em Log_2 obtidos a partir da expressão dos genes <i>atg8</i> , <i>atg15</i> e <i>pacC</i> na linhagem CBS, de <i>T. rubrum</i> cultivada ou não na presença do inibidor de autofagia 3MA em meio mínimo tamponado contendo glicina (pH 8,0). A cor verde claro representa a menor quantidade de transcritos e a cor vermelho claro indica a maior quantidade de transcritos.....	97
Figura 42: Expressão relativa do gene <i>sowgp</i> na linhagem CBS de <i>T. rubrum</i> cultivada na presença de diferentes fontes nutricionais (glicose, glicina, glicose com glicina ou queratina). As condições referem-se aos meios de cultivo não tamponados com pH inicial 5,0. Análises estatísticas para avaliar as diferenças na expressão dos genes foram realizadas em relação ao tempo de 24h de cada fonte nutricional, e são representadas por (*), correspondendo a um valor de $p \leq 0,05$	98

Figura 43: Expressão relativa do gene <i>sowgp</i> nas linhagens H6 e <i>pacC-1</i> de <i>T. rubrum</i> cultivadas na presença de queratina. As condições referem-se aos meios de cultivo não tamponados com pH inicial 5,0. Análises estatísticas para avaliar as diferenças na expressão dos genes foram realizadas em relação ao tempo de 24h de cada fonte nutricional, e são representadas por (*), correspondendo a um valor de $p \leq 0,05$	99
Figura 44: Expressão relativa do gene <i>sowgp</i> na linhagem CBS de <i>T. rubrum</i> cultivada na presença de diferentes fontes nutricionais (glicose, glicina, glicose com glicina ou queratina). As condições referem-se aos meios de cultivo tamponados em pH 5,0 e pH 8,0. Análises estatísticas para avaliar as diferenças na expressão dos genes em pH alcalino foram realizadas em comparação com o meio ácido, e são representadas por (*), correspondendo a um valor de $p \leq 0,05$	100
Figura 45: Expressão relativa do gene <i>sowgp</i> nas linhagens H6 e <i>pacC-1</i> de <i>T. rubrum</i> cultivadas na presença de queratina. As condições referem-se aos meios de cultivo tamponados em pH 5,0 e pH 8,0. Análises estatísticas para avaliar as diferenças na expressão dos genes em pH alcalino foram realizadas em comparação com o meio ácido, e são representadas por (*), correspondendo a um valor de $p \leq 0,05$	101
Figura 46: <i>Heat map</i> de expressão gênica apresentando simultaneamente o agrupamento de amostras. A matriz apresenta os valores em Log_2 obtidos a partir da expressão do gene <i>sowgp</i> nas linhagens CBS, H6 e <i>pacC-1</i> de <i>T. rubrum</i> nas diferentes condições experimentais avaliadas. A cor verde claro representa a menor quantidade de transcritos e a cor vermelho claro indica a maior quantidade de transcritos.....	102
Figura 47: Expressão relativa dos genes <i>bZIP/cys-3</i> , <i>pacC</i> , <i>nuc-1</i> , <i>atg8</i> , <i>atg15</i> e <i>sowgp</i> após o cultivo da linhagem CBS por 72h em glicose, e retorno ao mesmo meio pH 5,0 por 5h. As condições referem-se aos meios de cultivo não tamponados. Análises estatísticas para avaliar as diferenças na expressão dos genes em 5h de cultivo foram realizadas em comparação com o tempo de 72h de cultivo, e são representadas por (*), correspondendo a um valor de $p \leq 0,05$	104
Figura 48: Expressão relativa dos genes <i>bZIP/cys-3</i> , <i>pacC</i> , <i>nuc-1</i> , <i>atg8</i> , <i>atg15</i> e <i>sowgp</i> após o cultivo da linhagem CBS por 72h em glicina, e retorno ao mesmo meio pH 5,0 por 5h. As condições referem-se aos meios de cultivo não tamponados. Análises estatísticas para avaliar as diferenças na expressão dos genes em 5h de cultivo foram realizadas em comparação com o tempo de 72h de cultivo, e são representadas por (*), correspondendo a um valor de $p \leq 0,05$	105
Figura 49: Expressão relativa dos genes <i>bZIP/cys-3</i> , <i>pacC</i> , <i>nuc-1</i> , <i>atg8</i> , <i>atg15</i> e <i>sowgp</i> após o cultivo da linhagem CBS por 72h em glicose com glicina, e retorno ao mesmo meio pH 5,0 5h. As condições referem-se aos meios de cultivo não tamponados. Análises estatísticas para avaliar as diferenças na expressão dos genes em 5h de cultivo foram realizadas em comparação com o tempo de 72h de cultivo, e são representadas por (*), correspondendo a um valor de $p \leq 0,05$	106
Figura 50: Expressão relativa dos genes <i>bZIP/cys-3</i> , <i>pacC</i> , <i>nuc-1</i> , <i>atg8</i> , <i>atg15</i> e <i>sowgp</i> após o cultivo da linhagem CBS por 72h em queratina, e retorno ao mesmo meio pH 5,0 por 5h. As condições referem-se aos meios de cultivo não tamponados. Análises estatísticas para avaliar as diferenças na expressão dos genes em 5h de cultivo foram realizadas em comparação com o tempo de 72h de cultivo, e são representadas por (*), correspondendo a um valor de $p \leq 0,05$	107
Figura 51: <i>Heat map</i> de expressão gênica, apresentando simultaneamente agrupamentos de amostras e genes. A matriz apresenta os valores em Log_2 obtidos a partir da expressão dos genes <i>bZIP/cys-3</i> , <i>pacC</i> , <i>nuc-1</i> , <i>atg8</i> , <i>atg15</i> e <i>sowgp</i> , obtidas após o cultivo da linhagem CBS de <i>T. rubrum</i> em diferentes fontes nutricionais por 72h e retorno da mesma por 5h ao respectivo meio com pH ácido 5,0. A cor verde claro representa a menor quantidade de transcritos e a cor vermelho claro indica a maior quantidade de transcritos..	108
Figura 52: Expressão relativa dos genes <i>atg8</i> , <i>atg15</i> , <i>sowgp</i> e <i>pacC</i> na linhagem CBS de <i>T. rubrum</i> , durante a interação com células e moléculas do microambiente hospedeiro. As condições referem-se aos cultivos em meio mínimo (MM - glicose), queratina, unha e pele humana, por 96h. Análises estatísticas para avaliar as diferenças na expressão dos genes foram realizadas em relação à expressão em meio mínimo contendo glicose e são representadas por (*), correspondendo a um valor de $p \leq 0,05$	109
Figura 53: <i>Heat map</i> de expressão gênica apresentando simultaneamente agrupamentos de amostras e genes. A matriz apresenta os valores em Log_2 obtidos a partir da expressão dos genes <i>atg8</i> , <i>atg15</i> , <i>sowgp</i> e <i>pacC</i> na linhagem CBS, de <i>T. rubrum</i> durante a interação por 96h com células e moléculas do microambiente hospedeiro (MM - glicose, queratina, unha ou pele humana). A cor verde claro representa a menor quantidade de transcritos e a cor vermelho claro indica a maior quantidade de transcritos.....	110
Figura 54: Cassete de inativação do gene <i>bZIP/cys-3</i> . Fragmento fusionado 5'UTR - Hygro ^R - 3'UTR. Marcador de peso molecular 1Kb ladder plus (Invitrogen).	111

Figura 55: Linhagens de *T. rubrum* resistentes à higromicina, que foram transformadas com os cassetes de inativação do gene *bZIP/cys-3*, cultivados em meio Sabouraud na presença de 450µg/ml higromicina. 112

Figura 56: Perfil eletroforético dos produtos de amplificação com os oligonucleotídios para PCR nested (Primers *bZIP/cys-3*-Nested F e R) para checagem de mutação do gene *bZIP/cys-3* em alguns transformantes. M: marcador de massa molecular 1Kb plus (Invitrogen). 1: linhagem selvagem. 2-13: linhagens transformantes. B: controle da reação de PCR (branco)..... 113

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Meio Extrato de Malte – MEA	50
Tabela 02: Meio Sabouraud para <i>T.rubrum</i>	51
Tabela 03: Meio Mínimo (MM)	51
Tabela 04: Solução de sais	51
Tabela 05: Solução de elementos traços	51
Tabela 06: Solução de lise	55
Tabela 07: Etanol 70%	55
Tabela 08: Tampão TE (Tris-EDTA)	55
Tabela 09: Solução de sal para extração de RNA	58
Tabela 10: Água livre de RNase /Água DEPC (0,1% v/v)	58
Tabela 11: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nos experimentos de PCR em tempo real	59
Tabela 12: Lista dos oligonucleotídeos utilizados para a construção dos cassetes de inativação do gene que codifica o fator de transcrição bZIP/Cys-3	65
Tabela 13: Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação de fragmentos 5' e 3' de bZIP/cys-3 utilizados na metodologia de split-marker	67
Tabela 14: Valores de pH aferidos para os meios de cultivo Sabouraud e meios mínimos não tamponados contendo diferentes fontes nutricionais em pH inicial 5,0, após o cultivo das linhagens de <i>T. rubrum</i>	73
Tabela 15: Valores de massa celular em gramas, obtidos após o cultivo das linhagens de <i>T. rubrum</i> em meio Sabouraud e meio mínimo não tamponado contendo diferentes fontes nutricionais em pH inicial 5,0	74
Tabela 16: Valores de massa celular em gramas, obtidos após o cultivo das linhagens de <i>T. rubrum</i> em meio Sabouraud e meio mínimo tamponado (pH 5,0 e pH 8,0) contendo diferentes fontes nutricionais.	75
Tabela 17: Comparação dos valores de pH e massa celular aferidos após 72h e 72/5h de cultivo da linhagem CBS de <i>T. rubrum</i>	103

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
1.1 Dermatofitoses e a interação dermatófito-hospedeiro	25
1.2 O fator de transcrição PacC e a resposta ao pH ambiente	28
1.3 O fator de transcrição Nuc-1	31
1.4 O fator de transcrição bZIP/Cys-3	34
1.5 O controle molecular da autofagia e o papel de Atg8 e Atg15	36
1.6 A glicoproteína SOWgp	39
 2 HIPÓTESE DO TRABALHO	 43
 3 OBJETIVO GERAL	 45
3.1 Objetivos específicos	45
 4 MATERIAIS E MÉTODOS	 48
4.1 Delineamento experimental	48
4.2 Microrganismos e condições de cultivo	49
4.3 Busca por regiões promotoras contendo a sequência consenso de ligação ao DNA dos fatores de transcrição bZIP/Cys-3, Nuc-1 e PacC	50
4.4 Meios de cultura celular	50
4.5 Condições de cultivo e cultura de células durante variações de pH e fontes nutricionais	52
4.6 Condições de cultivo na presença do inibidor 3-metiladenina (3MA)	53
4.7 Extração de ácido desoxirribonucleico (DNA) genômico	54
4.7.1 Soluções para extração de ácido desoxirribonucleico (DNA)	55
4.8 Obtenção das sequências genômicas parciais da linhagem H6	55
4.9 Reação de sequenciamento	56
4.10 Análise das sequências obtidas no sequenciamento	56
4.11 Extração de ácido ribonucleico (RNA)	57
4.11.1 Soluções para extração de RNA total	58
4.12 Síntese de cDNA	58
4.13 Construção de oligonucleotídeos	58
4.14 Análise da expressão gênica por PCR em Tempo Real	59
4.15 Modelos de infecção <i>ex vivo</i> de pele e unha	60

4.16 Análises em <i>MultiExperiment Viewer</i> (MeV)	62
4.17 Análise estatística dos dados obtidos por qRT-PCR	63
4.18 Inativação do gene codificante para o fator de transcrição bZIP/Cys-3.....	63
4.18.1 Obtenção dos cassetes de inativação gênica.....	63
4.18.1.1 Condições de amplificação dos cassetes de inativação	64
4.18.2 Metodologia do <i>Split-marker</i>	66
4.18.3 Transformação fúngica	67
5 RESULTADOS	70
5.1 Análise do crescimento das linhagens de <i>T. rubrum</i> em diferentes fontes nutricionais	70
5.2 Modulação do pH ambiente e massa celular ao final de cada cultivo.	72
5.3 Sequências genômicas parciais da linhagem de <i>T. rubrum</i> H6.	76
5.4 Comparação <i>in silico</i> dos fatores de transcrição bZIP/Cys-3, PacC e Nuc-1: busca por sequencias consenso de ligação ao DNA destes fatores de transcrição nas regiões promotoras dos genes anotados de <i>T. rubrum</i>	80
5.5 Análise da regulação gênica temporal no dermatófito <i>T. rubrum</i> em resposta a variações de pH, nutricional e durante a interação com moléculas do microambiente hospedeiro.....	82
5.5.1 Perfil transcricional dos genes <i>bZIP/cys-3</i> , <i>pacC</i> e <i>nuc-1</i> em função do pH e da fonte nutricional.....	82
5.5.2 Perfil transcricional dos genes <i>atg8</i> e <i>atg15</i> em função do pH e da fonte nutricional	88
5.5.3 Perfil transcricional dos genes <i>atg8</i> , <i>atg15</i> e <i>pacC</i> na presença do inibidor 3-metiladenina (3MA)	94
5.5.4 Perfil transcricional do gene <i>sowgp</i> em função do pH e da fonte nutricional.....	98
5.5.5 Perfil transcricional após a passagem do meio alcalino para o meio ácido (<i>shift</i> de pH).	103
5.5.6 Perfil transcricional de <i>T. rubrum</i> durante a interação com células e moléculas do microambiente hospedeiro.....	109
5.6 Nocaute gênico: obtenção das linhagens de <i>T. rubrum</i> com o gene <i>bZIP/cys-3</i> inativado.	110
5.6.1 Obtenção dos cassetes de inativação gênica.....	110
5.6.2 Transformação fúngica por eletroporação.....	112
5.6.3 Análise das linhagens transformantes quanto à recombinação homóloga.....	112
6 - DISCUSSÃO	115
6.1 Modulação do pH extracelular em função da fonte nutricional e do pH inicial durante o crescimento fúngico.....	116
6.2 Regulação transcricional dos genes <i>bZIP/cys-3</i> , <i>pacC</i> e <i>nuc-1</i> de <i>T. rubrum</i> em resposta a diferentes fontes nutricionais e pH extracelular.	120

6.3 Regulação transcricional dos genes <i>atg8</i> e <i>atg15</i> de <i>T. rubrum</i> em resposta a diferentes fontes nutricionais, pH extracelular, na presença do inibidor 3MA e durante a infecção <i>ex-vivo</i> .	125
6.4 Regulação transcricional do gene <i>sowgp</i> de <i>T. rubrum</i> em resposta a diferentes fontes nutricionais, pH extracelular e durante a infecção <i>ex-vivo</i> .	130
6.5 Inativação do gene <i>bZIP/cys-3</i> por recombinação homóloga.	132
7 CONCLUSÃO	136
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	139
ANEXOS	155
Anexo 01: Estágio de Doutorado em Bioquímica e Biologia de Sistemas - Bioinformática, Berlim – Alemanha (2012).	155
Anexo 02: Estágio de Doutorado Sanduíche em Genética Molecular e Biotecnologia Microbiana, Sevilla – Espanha (2012).	156
ANEXO DE PUBLICAÇÕES	159

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Os fungos se constituem em um reino próprio e são eucariotos primitivos de vida livre e saprobiótica, desempenhando um papel fundamental ao ser um dos constituintes da base de cadeias e teias alimentares, fazendo a decomposição da matéria orgânica. A importância econômica dos fungos é inegável, uma vez que são utilizados na produção de um grande número de produtos biotecnológicos. Por outro lado, muitos fungos são fitopatógenos, causando enormes perdas para a agricultura ou são patógenos humanos e animais, causando desde micoses cutâneas até sistêmicas (Murray et al., 2004; Schaechter et al., 2002).

Visto que os microrganismos evoluíram em ambientes hostis, onde muitos nutrientes vitais eram escassos e a competição intensa, a sua sobrevivência está diretamente ligada à adaptação a alterações ambientais como temperatura, salinidade, pH, entre outros. A quantidade de nutrientes no meio em que vivem (fontes de carbono, nitrogênio e fósforo) também interfere no seu desenvolvimento e durante a interação com o hospedeiro, no caso dos patógenos. Esta interação é um processo dinâmico, envolvendo a capacidade do organismo em atravessar o epitélio, disseminar para diversos tecidos e resistir aos mecanismos de defesa do hospedeiro (Kumamoto, 2008). Vários aspectos envolvidos nos estudos da patogenicidade fúngica estão ainda na sua fase inicial (Albrecht et al., 2008), porém estudos pioneiros de modelagem teórica da interação patógeno hospedeiro baseando-se em infecções causadas por *Candida albicans* tem elucidado diversos mecanismos biológicos importantes (Hummert et al., 2010).

É descrito que o pH homeostático governa o crescimento, a diferenciação e a viabilidade de todos os seres vivos, e que as células alteram sua resposta metabólica em função dos fatores abióticos presentes. Os microrganismos possuem a capacidade de adaptar-se ao pH ambiente modulando a expressão gênica para ajustes fisiológicos adequados. A expressão gênica ocorre de forma coordenada na célula em resposta a sinais internos ou externos, e dados experimentais comprovam que certos mecanismos de patogenicidade dependem direta ou indiretamente dos genes responsáveis pelo monitoramento do pH extracelular (Nozawa et al., 2003; Ferreira-Nozawa et al., 2006).

Tanto para explorar economicamente os fungos, quanto para controlar as infecções causadas por eles é fundamental entender os processos de sensoriamento do ambiente, a cascata de eventos fisiológicos que ocorre em função desse sensoriamento e os mecanismos moleculares envolvidos nas respostas adaptativas. A compreensão das respostas metabólicas

que governam a homeostase e o sensorialmento do pH ambiente, e a captação de nutrientes, é importante para os dermatófitos, fungos patogênicos queratinofílicos, uma vez que estes mecanismos estão possivelmente envolvidos na instalação, virulência, desenvolvimento e sobrevivência desses microrganismos no hospedeiro (Martinez-Rossi et al., 2011).

1.1 Dermatofitoses e a interação dermatófito-hospedeiro

A habilidade que os microrganismos possuem para causarem infecções está diretamente ligada com a relação complexa existente no processo de interação entre o patógeno e o hospedeiro. A instabilidade entre a resposta do hospedeiro e os mecanismos de virulência pode desencadear os processos que caracterizam a infecção, tais como: adesão, instalação, invasão e proliferação do microrganismo. A virulência e a patogenicidade destes organismos são determinadas por uma íntima relação com as estratégias que estes utilizam para infectar e sobreviver aos mecanismos de defesa e a resposta imune do hospedeiro. Portanto, o sucesso da infecção requer uma rápida adaptação do patógeno por meio de mudanças na expressão de determinados repertórios gênicos requeridos frente aos diferentes nichos do hospedeiro. Portanto, os estudos envolvendo análises de perfil transcricional vêm sendo amplamente utilizados na determinação dos mecanismos de adaptação, sobrevivência e patogenicidade desencadeados pelo patógeno durante o processo infeccioso (Kumamoto, 2008).

Estima-se que as infecções fúngicas superficiais afetem 20 a 25% da população mundial, sendo que sua incidência continua a aumentar. A maioria é causada por dermatófitos, que são fungos que necessitam de queratina para crescer, o que restringe o seu crescimento à pele, unhas e cabelo, poupando as mucosas (Sobera e Elewski, 2008). Os dermatófitos constituem um grupo de fungos que são inter-relacionados pela similaridade morfológica, fisiológica e de patogenicidade, e que em vida parasitária, têm a capacidade de invadir tecidos queratinizados de humanos e de outros animais, causando infecções denominadas dermatofitoses. As dermatofitoses são enfermidades infectocontagiosas, cujos agentes etiológicos pertencem aos gêneros *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton*, que constituem um dos grupos de infecções fúngicas mais frequentes na prática dermatológica. Além disso, podem ser divididos em conformidade com seu habitat primário, sendo que espécies geofílicas habitam o solo, zoofílicas os animais e as antropofílicas os seres humanos (Weitzman e Summerbell, 1995; Seebacher et al., 2008)

As dermatofitoses estão entre as doenças infecciosas cosmopolitas mais diagnosticadas no mundo e os dermatófitos estão entre os agentes etiológicos mais comuns de infecção no homem, não existindo povos ou regiões geográficas sem terem sido acometidas por eles. Essas infecções afetam aproximadamente 40% da população mundial, representando 30% de todas as infecções fúngicas cutâneas. Além disso, registros epidemiológicos apontam o predomínio das espécies *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes* como um dos principais agentes causadores de dermatofitoses em humanos, nas mais diversas manifestações clínicas (Ameen, 2010).

Atualmente, as infecções causadas por dermatófitos e outros fungos vêm aumentando consideravelmente entre crianças, idosos e principalmente na população imunocomprometida (Mukherjee et al., 2003). As dermatofitoses, também chamadas de *tinea*, são infecções muito comuns no mundo inteiro e têm como agente etiológico mais comum o fungo filamentoso e antropofílico *T. rubrum*, sendo isolado principalmente dos pés (*tinea pedis*), das unhas (*tinea unguinum*), das virilhas (*tinea cruris*) e do corpo (*tinea corporis*) (Weitzman e Summerbell, 1995; Elliset al., 2000). Estudos envolvendo este patógeno são cada vez mais importantes devido à sua incidência, ao aparecimento de linhagens resistentes aos medicamentos antifúngicos disponíveis no mercado e ao comportamento invasivo deste agente em pacientes com o sistema imune comprometido. Estes fatos levam à necessidade de se ampliar o conhecimento sobre a biologia deste microrganismo na tentativa de se desenvolver estratégias terapêuticas mais eficazes. Desta maneira, o genoma de *T. rubrum* e outras seis espécies de dermatófitos foram sequenciados, anotados e disponibilizados pelo *Broad Institute of MIT and Harvard* para a comunidade científica (<http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/dermatophytecomparative.2/MultiHome.html>), revelando que o tamanho do genoma de *T. rubrum* corresponde a 22,5 MB, corroborando com estudos anteriores que pela técnica de eletroforese em campo pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*), descreveram que o genoma da espécie apresentava 22MB (Cervelatti et al., 2004; Martinez et al., 2012).

Fungos antropofílicos causam uma infecção crônica, de progressão lenta, sugerindo que o fungo tenha se adaptado ao hospedeiro humano. A transmissão das dermatofitoses ou *tineas* ocorre por contato direto com animais e humanos infectados, ou indireto por fômites contaminados, e as formas clínicas variam de acordo com o agente etiológico (espécie) e o sítio anatômico acometido. Os sintomas podem ser brandos ou severos dependendo do estado imunológico do hospedeiro, e geralmente não ocorre invasão de tecidos subcutâneos ou órgãos internos (Weitzman e Summerbell, 1995; White et al., 2008, Peres et al., 2010a). As

lesões características nas infecções de pele são circulares, eritematosas e pruriginosas, sendo consequentes da ação direta do fungo ou reações de hipersensibilidade ao microrganismo e/ou a seus produtos metabólicos. Nas infecções de unha (onicomicoses) pode ocorrer descolamento das bordas, espessamento, aparecimento de manchas brancas e até distrofia total das unhas (Figura 01) (Degreef, 2008; Peres et al., 2010a).

Figura 01: Principais manifestações clínicas de dermatofitoses (*Tinea unguium* e *Tinea corporis*) causadas pelo patógeno *Trichophyton rubrum* (Fonte: Degreef, 2008 e <http://www.dermatlas.net>).

Durante o processo infeccioso, os dermatófitos se deparam com os mecanismos primários de defesa do hospedeiro, como a pele e sua microbiota normal, exposição à luz ultravioleta, falta de umidade, pH ácido e alta temperatura. Uma das mais importantes barreiras contra infecções é a queratinização dos tecidos superficiais, que consiste no processo de renovação do estrato córneo da pele, realizado pelos queratinócitos, levando a descamação epitelial. Para evitar a eliminação juntamente com a descamação do epitélio, o fungo deve se aderir à superfície do tecido. Para tanto, *T. rubrum* expressa proteínas que funcionam como adesinas e fatores de transcrição que regulam essas possíveis adesinas, responsáveis por mantê-lo na superfície da célula do hospedeiro (Kaufman et al., 2007; Vermout et al., 2008).

O microrganismo, já aderido à célula, necessita de nutrientes para seu desenvolvimento e manutenção. Para isso, o fungo utiliza macromoléculas presentes no tecido do hospedeiro para sua sobrevivência. Entretanto, devido à seletividade da membrana

plasmática, é necessário que ocorra a degradação destes compostos em moléculas menores, para que possam ser transportadas até o interior das células e então metabolizadas. A degradação destes compostos é realizada por enzimas hidrolíticas secretadas que apresentam especificidade para diferentes substratos. Esta maquinaria enzimática é um dos fatores de virulência mais bem caracterizados nos dermatófitos, permitindo a hidrólise de componentes estruturais da pele e possibilitando a invasão tecidual (Kaufman et al., 2007; Vermout et al., 2008). Uma vez estabelecidos, os dermatófitos desenvolvem uma resposta adaptativa regulada pelo pH ambiente, uma via intracelular bem conhecida em fungos modelo, e pela disponibilidade de nutrientes. Esta resposta é baseada na expressão de uma diversidade de proteínas com a finalidade de captação de nutrientes, regulação de prováveis fatores de virulência, desenvolvimento e sobrevivência do organismo (Ferreira-Nozawa et al., 2003; Peres et al., 2010a, Martinez-Rossi et al. 2011).

1.2 O fator de transcrição PacC e a resposta ao pH ambiente

A adaptação a mudanças ambientais, como variações de pH extracelular e limitação de fosfato inorgânico tem sido amplamente estudada em fungos modelos, como *Aspergillus nidulans* e *Neurospora crassa*, cujo principal objetivo são as abordagens biotecnológicas. Devido ao aumento da incidência de dermatofitoses em pacientes imunocomprometidos nos últimos anos, o estudo da adaptabilidade fúngica a variações ambientais tem sido de fundamental importância para a compreensão dos mecanismos de patogenicidade e resistência aos inibidores em organismos patogênicos (Nahas et al., 1982; Caddick et al., 1986; Peleg et al., 1996; Wu et al., 2004).

Em 1965, o pesquisador Dorn, utilizando-se da genética clássica, iniciou os primeiros estudos relacionados ao entendimento sobre regulação da expressão gênica em resposta ao pH ambiente no organismo *A. nidulans*. Esses estudos demonstraram que em concentrações limitantes de fosfato e em pH 6,5, mutações nos genes *pal* (*A*, *B*, *C*, *F*) apresentavam níveis altos de fosfatase ácida e baixos níveis de fosfatase alcalina, enquanto que os mutantes *pacC* apresentam altos níveis de fosfatase alcalina e redução de fosfatase ácida. Mas foi somente em 1982, que Nahas e colaboradores descreveram pela primeira vez a resposta adaptativa ao pH, quando foi demonstrado que, no fungo *N. crassa*, a secreção, mas não a síntese das fosfatases é pH dependente (Dorn, 1965; Nahas et al., 1982). O envolvimento dos genes *pal/pacC* no sensoramento do pH ambiente foi descrito por Caddick e colaboradores (1986) no fungo *A.*

nidulans, demonstrando que a resposta ao pH é mediada por uma via de sinalização constituída por pelo menos sete genes: os genes *pal* (*palA*, *B*, *C*, *F*, *H* e *I*) e o gene *pacC*.

No fungo *A. nidulans*, o gene *pacC* codifica um fator de transcrição de 678 aminoácidos (72KDa), contendo três dedos de zinco (*zinc-finger*) Cis_2His_2 , o qual reconhece a região consenso 5'-GCCAR(A/G)G-3' na região promotora de genes responsivos ao pH. Foi proposto um modelo de regulação pelo pH ambiente em *A. nidulans*, no qual o fator de transcrição PacC seria responsável pela ativação da transcrição de genes alcalino-específicos e repressão da transcrição de genes ácido-específicos, modulado por um sinal gerado pelos produtos dos genes *pal* (*A*, *B*, *C*, *F*, *H* e *I*) em resposta ao pH alcalino, em meios complexos (Tilburn et al., 1995; Freitas et al., 2011).

Estudos experimentais revelaram que o fator de transcrição PacC seria mantido inativo em pH ácido por interações intramoleculares na extremidade C-terminal. Em pH alcalino, os produtos dos genes *pal* introduzem uma modificação estrutural, ocasionando a quebra das interações intramoleculares e expondo uma região da proteína PacC à proteólise, o que deixaria esse fator de transcrição ativo e funcional, sendo capaz de induzir a transcrição de genes alcalinos e reprimir a transcrição de genes ácidos (Orejas et al., 1995). No entanto, existem evidências de que o fator de transcrição PacC é funcional tanto em meio ácido como alcalino, e que os mecanismos moleculares envolvidos na regulação da expressão gênica pelo pH em *A. nidulans* dependem das condições nutricionais encontradas pelo fungo (Freitas et al., 2007; Silva et al., 2008; Freitas et al., 2011; Rossi et al., 2013 *in press*).

O fungo filamentosso *Sclerotinia sclerotiorum* é um fitopatógeno capaz de causar perdas significativas para culturas agrícolas economicamente importantes. O sucesso do processo infeccioso desencadeado por esse fungo se deve inicialmente à síntese e secreção de ácido oxálico, que é dependente do pH do meio, via PacC. O pH neutro ou ligeiramente alcalino do tecido do hospedeiro estimula a síntese de oxalato, resultando em uma acidificação do meio extracelular que tem sido mostrada como um sinal chave na diferenciação entre o crescimento saprobiótico e o crescimento necrotrófico. O oxalato secretado além de ser diretamente tóxico à planta funciona como quelante de íons cálcio, desestabilizando o sistema bioquímico funcional do hospedeiro, sequestrando o cálcio da parede celular, suprimindo o estresse oxidativo gerado pela planta pela neutralização das espécies reativas de oxigênio e diminuindo a afinidade da ligação entre as poligalacturonases do fungo com os inibidores de poligalacturonases do hospedeiro (Rollins et al., 2001; Favaron et al., 2004; Durman et al., 2005).

Para que ocorra uma colonização bem sucedida do hospedeiro, os microrganismos devem inicialmente aderir a tecidos alvos e concomitantemente obter nutrientes essenciais para o seu crescimento. Estes organismos desenvolveram estratégias complexas para aquisição de micronutrientes, tais como o ferro, sendo que para muitos desses microrganismos a disponibilidade desse elemento é um sinal para a indução da expressão de fatores de virulência. No fungo patogênico *Cryptococcus neoformans* foi demonstrado que o excesso de ferro promove a exacerbação da meningite em um modelo animal de infecção cerebral e estudos recentes revelam que a absorção de ferro é regulada por uma rede de fatores de transcrição, incluindo o PacC, que atua na regulação de genes envolvidos na manutenção da homeostase de ferro, sensoriamento nutricional e biogênese da parede celular (Kronstad et al., 2013).

Nos patógenos *Candida albicans* e *C. neoformans* vários genes que respondem ao pH ambiente, incluindo o gene *pacC*, que codifica uma proteína homóloga da família PacC/Rim101p dos reguladores de transcrição em função do pH estão diretamente ligados a patogenicidade desses fungos. Em *C. albicans*, análises do fator de transcrição Rim101 revelaram que existem diferenças significativas na maneira como *rim101* é processado, os níveis relativos de ativação ou repressão da transcrição, assim como os tipos de genes regulados por ele, quando comparado aos seus homólogos Rim101 de *Saccharomyces cerevisiae* e PacC de *A. nidulans*. Porém, *C. albicans* tem aperfeiçoado sua via de sinalização em resposta ao pH, para se adaptar a sítios específicos de infecção dentro do hospedeiro humano. Já em *C. neoformans*, a linhagem mutante *Cnrim101*, é mais susceptível ao pH elevado e à privação de ferro, duas condições existentes no hospedeiro. Além disso, verificou-se em modelos experimentais de criptococose que essa linhagem apresenta dificuldades para fixação da cápsula, o principal fator de virulência para este fungo patogênico (Selvig e Alspaugh, 2011).

No dermatófito *T. rubrum* foi identificada uma proteína homóloga a PacC, cuja inativação gênica demonstrou que o desenvolvimento em queratina e a consequente degradação desta molécula estão de alguma forma sob regulação deste gene, interferindo na secreção e/ou atividade de proteases que apresentam atividade ótima em pH alcalino (Ferreira-Nozawa et al., 2006; Peres et al., 2010a). O fator de transcrição PacC está provavelmente associado à virulência do dermatófito *T. rubrum*, visto que para o estabelecimento da infecção, *T. rubrum* precisa mobilizar uma maquinaria enzimática, em função do pH ambiente, baseada na expressão de proteases que estão ativas em uma ampla

faixa de pH. Em 2004, foi proposto um modelo de regulação das enzimas proteolíticas pelo pH ambiente durante o processo infeccioso por dermatófitos. Nos estágios iniciais da infecção, ao entrar em contato com o pH ácido da pele, o patógeno sintetiza queratinases e proteases não específicas que atuam com atividade ótima em pH ácido. Estas atuam tanto em substratos queratinosos quanto em não queratinosos, gerando peptídeos que são hidrolisados em aminoácidos, que são utilizados pelo fungo como fonte de carbono, nitrogênio e enxofre. A metabolização de alguns aminoácidos, como a glicina, resulta na liberação de amônia elevando o pH do meio, adequando-o para ação das queratinases com atividade ótima em pH alcalino, o que possibilita a manutenção da infecção. Esta maquinaria metabólica permite que os dermatófitos utilizem proteínas para captação de nutrientes em um amplo espectro de pH, possibilitando a completa instalação, desenvolvimento e permanência do dermatófito no tecido hospedeiro (Martinez-Rossi et al., 2004; Martinez-Rossi et al., 2011).

Recentemente, estudos de genômica funcional, utilizando a linhagem mutante *pacC-1*, demonstraram que o fator de transcrição PacC atua direta ou indiretamente na regulação e modulação da expressão de uma gama de genes, que executam diversas funções celulares e que podem estar relacionados com a sobrevivência, patogenicidade e resposta adaptativa ao pH pelo dermatófito *T. rubrum*. Os genes identificados possuem funções biológicas relacionadas, desde as necessidades básicas celulares até mesmo a glicosilação proteica, que é um processo de manutenção da integridade da parede celular e consequente virulência de algumas espécies fúngicas, uma vez que essas enzimas também atuam na adesão do organismo à célula do hospedeiro (Cazzaniga, 2011; Mendes et al., 2012).

1.3 O fator de transcrição Nuc-1

O fosfato inorgânico (Pi) é um nutriente essencial em todos os organismos, necessário tanto para a estrutura e crescimento celular, como para respostas metabólicas, síntese de ácidos nucleicos e fosfolipídeos de membrana, sendo componente de inúmeros metabólitos celulares (Paytan e McLaughlin, 2007). Assim, a assimilação de fosfato do ambiente, em procariotos e em eucariotos primitivos, é um dos processos mais importantes de aquisição de nutrientes (Furukama et al., 1987). Os fungos *N. crassa* e *S. cerevisiae* são utilizados como modelos biológicos para a realização de estudos experimentais que visam o entendimento dos mecanismos moleculares desencadeados pela oscilação da concentração de Pi no ambiente. Nesses fungos, a aquisição celular, o estoque, a liberação e a integração metabólica do Pi dependem da participação de muitas enzimas, como nucleases, fosfatases ácida e alcalina,

permeases e outras, cuja expressão depende dos níveis intracelulares de Pi (Ogawa et al., 2000; Peleg et al., 1996; Persson et al., 2003).

Quando o fungo filamentoso *N. crassa* é cultivado em meio contendo quantidades limitantes de Pi, ou com ácidos nucleicos como única fonte de Pi, diversas enzimas são sintetizadas com a finalidade de disponibilizar mais fósforo para a célula. Em resposta a essa limitação, *N. crassa*, e provavelmente todos os organismos vivos, sintetiza fosfatases, nucleases e fósforo permeases para atender a demanda intracelular desse nutriente (Metzenberg e Chia, 1979; Nahas et al., 1982). Quando o Pi é insuficiente, as fosfatases são sintetizadas e secretadas no meio, sendo que alguns estudos demonstram que o pH extracelular é determinante para a secreção das fosfatases Pirepressíveis, como a fosfatase alcalina, codificada pelo gene *pho-2* (Grotelueschen et al., 1994), a qual é preferencialmente secretada quando o pH do meio é 8,0 (Nahas et al., 1982; Nozawa et al., 2002). Entretanto, é importante ressaltar que em *S. cerevisiae*, a indução de vários genes em pH alcalino ocorre por mecanismos independentes da via de sinalização de pH mediada por PacC (Lamb et al., 2001). Em *N. crassa*, embora o gene *pho-2* seja induzido tanto em pH ácido como alcalino, a forma estável e ativa da enzima é extensivamente secretada somente em pH alcalino, um processo dependente de glicosilação (Han et al., 1987; Palma et al., 1989; Thedei Jr et al., 1997).

Os mecanismos moleculares envolvidos no sensoriamento de fósforo e na sinalização celular para a biossíntese de enzimas e permeases envolvidas na homeostase de Pi, foram muito bem estabelecidos em *N. crassa* através de abordagens genéticas e bioquímicas, revelando que esse mecanismo de resposta ao Pi é mediado por pelo menos quatro genes regulatórios: *nuc-1*, *nuc-2*, *preg* e *pgov* (Metzenberg e Chia, 1979). Esses genes envolvidos na aquisição de Pi, mostram-se bastante conservados entre os fungos modelo *N. crassa* e *S. cerevisiae* (Davis, 2000).

Leal e colaboradores em 2007 propuseram uma modificação para o modelo de regulação da aquisição de fósforo em *N. crassa*, proposto anteriormente por Metzenberg em 1979. De acordo com esse modelo, a ação do produto do gene *nuc-1* permite a expressão de genes estruturais envolvidos na captação de Pi. A ação de NUC-1 é antagonizada pelos produtos dos genes *preg* e *pgov*, os quais são antagonizados pelo produto do gene *nuc-2*. NUC-2 é o componente que transmite o sinal de ativação desse circuito regulatório e sua ação é inativada pelo Pi ou um co-repressor derivado dele. Sendo assim, em baixa concentração de Pi, NUC-2 inibe o funcionamento do complexo PREG-PGOV, ativando assim o fator de

transcrição NUC-1 e a expressão de fosfatases ácida e alcalina, fosfato permeases e nucleases, entre outras. Assim, Leal e colaboradores em 2007, descreveram que os genes *nuc-1*, *nuc-2*, *preg* e *pgov* participam não apenas na regulação da transcrição de genes estruturais desse sistema, mas também no controle de modificações pós-transcricionais e/ou na secreção das fosfatases. (Metzenberg, 1979; Leal et al., 2007). Recentemente foi demonstrado que uma MAP quinase (MAK-2) representa um novo componente desta via, provavelmente interagindo com o complexo PREG-PGOV em condições repressíveis, como alta concentração de Pi extracelular, adicionando um novo componente ao modelo (Gras et al. 2013).

O gene *nuc-1* é expresso constitutivamente, independente das concentrações de Pi, e a atividade da proteína NUC-1, é positivamente regulada em condições limitantes de Pi, onde NUC-1 promove a ativação de fosfatases alcalinas Pi-repressível e fosfato permeases (Kang e Metzenberg, 1990). O fator de transcrição NUC-1 apresenta aproximadamente 802 aminoácidos, além de possuir na sua região carboxi-terminal um domínio funcional básico contendo um motivo de ligação ao DNA do tipo hélice-volta-hélice (ou *basic helix-loop-helix* – *bHLH*), que está presente em um grande número de fatores de transcrição envolvidos numa variedade de processos celulares, incluindo diferenciação, desenvolvimento, proliferação celular e resposta ao estresse. Esses fatores de transcrição, do tipo *bHLH* ligam-se às sequências consensos 5'-CACGTG-3' presentes no DNA formando dímeros ou combinações de heterodímeros com outras proteínas *bHLH* (Peleg e Metzenberg, 1994; Chen e Lopes, 2007).

O fator de transcrição NUC-1 é considerado uma proteína HLH atípica, pois apresenta algumas diferenças estruturais, em relação aos outros fatores de transcrição HLH, uma vez que NUC-1 possui adicionalmente um domínio de dimerização constituído por um motivo do tipo zíper, identificado também em outras proteínas HLH, as quais foram classificadas como proteínas HLH/Z. Porém, o motivo zíper identificado em NUC-1 apresenta regiões de repetições de alanina e metionina e não resíduos de leucina, como normalmente são encontrados nas proteínas HLH/Z (Peleg e Metzenberg, 1994). Outra característica estrutural da proteína NUC-1 descrita por Peleg e Metzenberg em 1994, por estudos proteômicos, é de que os domínios de hélice II e zíper são essenciais para a dimerização da proteína, enquanto que o domínio de hélice I está envolvido na ligação ao DNA. Além de possuir outros domínios funcionais, potencialmente envolvidos na interação com os fatores regulatórios negativos PREG/PGOV e com a ativação transcricional.

C. albicans é um patógeno oportunista que pode se proliferar no trato intestinal de pacientes criticamente imunocomprometidos, sendo um dos principais agentes responsáveis por doenças infecciosas causadas por fungos. Estudos experimentais envolvendo análises funcionais da linhagem mutante *pho4* de *C. albicans*, homólogo a *nuc-1*, revelaram que essa linhagem é mais virulenta quando comparada à selvagem, uma vez que a ausência da proteína PHO4 estimulou uma extensa filamentação em resposta à limitação de fosfato, indicando a importância dos genes *pho* na absorção e utilização de fosfato durante a infecção. A capacidade de sequestrar fosfato sem dúvida beneficia fungos para competir com a microbiota normal e representa uma aptidão para a adaptação ao ambiente com escassez nutricional (Dongliang et al., 2004; Romanowski et al., 2012). Embora as pesquisas avançaram rumo à compreensão da resposta adaptativa e do sensoramento dos fungos aos níveis de Pi disponíveis no ambiente, ainda não encontram-se totalmente esclarecidos os mecanismos moleculares envolvidos na regulação da expressão gênica do fator de transcrição NUC-1 em resposta à diferentes fontes nutricionais e seu papel na patogenicidade, adaptabilidade e na infectividade de fungos patogênicos, como o dermatófito *T. rubrum*.

1.4 O fator de transcrição bZIP/Cys-3

Estudos realizados em nosso laboratório por Silva e colaboradores (2008), utilizando a técnica de Hibridização Subtrativa Supressiva (SSH), avaliaram a expressão diferencial de genes na linhagem mutante de *A. nidulans biAlpalAl*, com o objetivo de identificar genes responsivos ao pH ambiente dependentes da proteína codificada pelo gene *palA*. Conforme mencionado anteriormente, os genes da família *pal* participam da cascata sinalizadora do pH ambiente promovendo a ativação da proteína PacC, responsável pela cascata de sinalização em resposta ao pH. Nesse estudo foi mostrado o acúmulo do transcrito do gene que codifica um fator de transcrição da família *bZIP* (ANID_4361.3) na linhagem mutante *biAlpalAl* (Silva et al, 2008).

Os reguladores do tipo bZIP são caracterizados pela presença da região denominada bZIP que apresenta usualmente 60 a 80 resíduos de aminoácidos específicos, sendo subdividida em dois domínios. O primeiro, denominado zíper de leucinas, é caracterizado por repetições de resíduos de leucina a cada sete aminoácidos numa extensão de 30 a 40 resíduos, sendo responsável por interações entre bZIPs, promovendo assim dimerizações. O segundo, adjacente ao zíper de leucinas, denominado domínio básico, sendo constituído por aproximadamente 30 resíduos dos quais a maioria deles apresenta caráter básico. Esse

domínio é responsável pela interação com o sítio alvo do DNA, que apresenta afinidade para sequências de DNA que apresentam um motivo 5'-ACGT-3' (domínio G-box). Vários estudos mostraram que os bZIPs apresentam preferências em relação às bases que flanqueiam o motivo 5'-ACGT-3' e estas definem a afinidade e especificidade da interação do diferentes fatores de transcrição bZIPs e o DNA (Foster et al., 1994; Williams et al., 1992).

Apesar dos reguladores do tipo bZIP apresentarem um domínio relativamente simples de ligação com o DNA, eles são capazes de reconhecer um grande número de sequências de DNA discriminando-as suficientemente a fim de regular a transcrição de diversos genes com diferentes promotores (Riechmann e Ratcliffe, 2002). Estudos filogenéticos realizados por Vincentz e colaboradores (2001 e 2003) demonstraram que o conjunto completo e não redundante dos fatores de transcrição bZIP de *Arabidopsis thaliana* foi agrupado em 13 sub-famílias. Essa classificação permitiu organizar 85 grupos de genes de cana-de-açúcar que codificam bZIPs, porém algumas sub-famílias de *A. thaliana* não foram encontradas em cana de açúcar, provavelmente devido ao baixo nível de expressão destas sub-famílias. Uma proteína bZIP de cana-de-açúcar, SCbZIP I, foi clonada e caracterizada bioquimicamente, e ensaios de mobilidade eletroforética mostraram que esta proteína liga-se fortemente a sondas de DNA do tipo G-box (*core* ACGT). Além disso, o perfil de expressão dos 85 genes que codificam bZIPs de cana-de-açúcar foi avaliado por microarranjos de cDNA sendo que, destes, 15 foram diferencialmente expressos durante o desenvolvimento das plântulas ou modulados por ação hormonal.

Corrêa e colaboradores (2008) demonstraram que *AtbZIP9* é um fator de transcrição do tipo bZIP, de *A. thaliana*, participando da adaptação de *Arabidopsis* ao estresse osmótico (salino ou hídrico) e que possivelmente sua atividade seja modulada por regulações pós-transcricionais. Em vegetais, o fator de transcrição bZIP designado *TabZIP1* é superexpresso durante o processo de infecção causado pelo fitopatógeno *Puccinia striiformis* e durante condições de estresse ambiental, tais como: temperatura, pH e salinidade (Zhang et al., 2009). A expressão do gene que codifica para uma proteína putativa do tipo bZIP de uma espécie de castanha-do-Brasil (homólogo ao gene Opaco-2/bZIP de milho e bZIP encontrado em raiz de mandioca), foi avaliada em experimentos de RT-PCR semi-quantitativa, que mostraram que este gene é expresso em grandes quantidades nas folhas e apresenta expressão regulada durante o desenvolvimento da semente, o que corrobora com a descrição já existente na literatura, onde o fator é descrito como ativador de genes de reserva de sementes em diferentes espécies vegetais (Souza et al., 2003; Segal et al., 2003).

Em fungos, os bZIPs são descritos como ativadores da transcrição de diversos genes envolvidos nos processos de divisão celular e no metabolismo de assimilação do enxofre. Em *N. crassa*, mutantes para o gene *cys3*, que codifica o fator de transcrição Cys3 pertencente à família *bZIP* e homólogo ao encontrado em *A. nidulans* (Silva et al. 2008), apresentaram baixa viabilidade celular, assim como comprometimento de atividades celulares básicas (Paietta, 2008; Kent et al., 2004). Em *A. nidulans* o gene *flbB* (um fator de transcrição do tipo bZIP) é expresso em hifas vegetativas e ativa a expressão do gene *brlA*, o principal regulador do processo de conidiação. Cepas mutantes para *flbB* apresentaram um padrão de ramificação das hifas defeituoso, revelando um papel importante no crescimento vegetativo, sendo um fator-chave na transição para o desenvolvimento assexuado (Etxebeste et al., 2009).

Os microrganismos crescem em habitats onde permanentemente são confrontados com uma variedade de agressões externas. Em *A. nidulans*, uma das estratégias para sobreviver ao estresse ambiental é o desenvolvimento de conídios resistentes. Hagiwara e colaboradores (2008) demonstraram que *A. nidulans* super-expressa em conídios o gene *atfA* que codifica para um fator de transcrição bZIP, que desempenha um papel crucial na tolerância contra o estresse oxidativo e variações de temperatura. No patógeno humano *C. albicans*, um fator de transcrição bZIP denominado CAP1 está envolvido na resistência a múltiplas drogas, principalmente em tratamentos utilizando o antifúngico fluconazol. Também está envolvido na proteção deste microrganismo contra os danos oxidativos causados pelos mecanismos de defesa do hospedeiro (Alarco e Raymond, 1999). No fungo filamentoso *Podospora anserina*, o fator de transcrição bZIP, teve sua expressão induzida durante o processo de morte celular (Dementhon et al., 2004).

1.5 O controle molecular da autofagia e o papel de Atg8 e Atg15

A autofagia (autodigestão) é um processo catabólico, conservado evolutivamente, que degrada e recicla componentes celulares. Esse mecanismo celular é disparado quando um sinal pró-autofágico (indutor de autofagia) é percebido pela célula, tanto fisiologicamente quanto em circunstâncias patológicas. Alguns sinais pró-autofágicos são classicamente descritos, tais como: proteínas danificadas, proteínas de longa vida e presença de compostos citotóxicos. Porém, condições de estresse como a variação e a privação de nutrientes e oxigênio, também são descritos como indutores do processo. Portanto, a autofagia está envolvida em diversos processos fisiológicos ou patológicos, como o desenvolvimento e a manutenção da homeostase, diferenciação celular, infecção, entre outros (Levine e Yuan, 2005).

São descritos na literatura pelo menos três formas de autofagia: a autofagia mediada por chaperonas, a microautofagia e a macroautofagia. Essas três formas diferem-se em relação à forma pela qual os componentes citoplasmáticos são levados ao lisossomo (Rubinsztein et al., 2007; Levine e Kroemer, 2008). No processo de autofagia mediada por chaperonas (CMA), as proteínas citoplasmáticas que possuem chaperonas ligadas são entregues aos lisossomos para degradação, e nesse caso a chaperona mais requisitada para o processo é a Hsp70. Chaperonas são as proteínas do retículo endoplasmático rugoso, responsáveis pelo dobramento correto das proteínas celulares. Nesse processo, as proteínas que são mal dobradas e permanecem com chaperonas ligadas são reconhecidas pelos lisossomos, sendo desdobradas e translocadas para degradação e reutilização dos produtos de degradação pela célula. Outros tipos de processos de autofagia degradam conjuntos de componentes celulares ao mesmo tempo, entretanto, a CMA degrada apenas certas proteínas e não organelas, e caracteriza-se pela autofagia de uma proteína por vez, o que caracteriza esse processo como bastante seletivo em relação ao componente celular que é degradado (Massey et al., 2006). Já no processo de microautofagia, os componentes celulares são englobados e degradados diretamente pelos lisossomos das células, por invaginação, protusão e/ou septação da membrana do lisossomo, e posteriormente os produtos da autofagia são reutilizados pela célula (Levine e Kroemer, 2008).

No decorrer deste trabalho, será referido como autofagia o processo denominado como macroautofagia. Este processo é responsável por mais de 90% da autofagia celular, sendo ainda um processo enigmático para diversos organismos, inclusive os fungos e seus processos patológicos, no entanto, é a autofagia mais estudada e conhecida para outros organismos eucariotos. Neste processo, o qual é induzido por sinais pró-autofágicos como drogas, hipóxia ou privação de nutrientes, existe o envolvimento de diversas proteínas, tais como a fosfatidilinositol 3-cinase classe III (PI3K III) e os membros da família Atg, principais controladores da autofagia (Behrends et al., 2010).

Como estamos descrevendo um processo evolutivamente conservado, vale ressaltar que a maquinaria molecular de controle da autofagia foi primeiramente descrita em leveduras, sendo regulada e coordenada por um grupo de genes da família Atg. As proteínas geradas a partir destes genes possuem funções específicas e fundamentais durante as diferentes etapas do processo autofágico, recebendo uma numeração de 1 a 16, além de outras nomenclaturas específicas (Suzuki et al., 2001). O início do processo de autofagia envolve a participação de diversos membros da família das proteínas Atgs, como Atg5, 6, 7, 10, 12 e 16, sendo que os

três principais membros desse complexo são Atg6, Atg5 e Atg12. No início, um sistema de conjugação envolvendo as proteínas Atg12 e Atg5 é utilizado na formação do autofagossomo. A proteína Atg12 é covalentemente ligada a Atg5 e direcionada à membrana do autofagossomo, sendo que essa conjugação é mediada pelas enzimas Atg7 e Atg10, funcionalmente semelhantes às ubiquitina-ligases E1 e E2, respectivamente. Finalmente, o membro da família Atg mais importante no processo de sequestro e formação do autofagossomo, o Atg8 (também chamada de LC3-II), sofre uma lipidação por Atg7 e, em consequência, se acopla à membrana do autofagossomo em formação. Outra proteína, muito importante durante a finalização do processo de autofagia é Atg15, uma lipase necessária para a lise intravacuolar dos corpos autofágicos, liberando os produtos finais da degradação celular (Mizushima et al., 1998; Suzuki et al., 2001; Wirawan et al., 2012).

Desta maneira, no início do processo de macroautofagia, uma dupla membrana de origem desconhecida forma uma estrutura chamada fagóforo. Essa membrana se expande sequestrando partes do citoplasma, como proteínas isoladas ou fragmentos de organelas, formando vesículas chamadas autofagossomo. Durante a maturação dessa vesícula, proteínas Atg8 são recrutadas para a membrana (Rubinsztein et al., 2007). Essas vesículas fundem-se com lisossomos, formando o autofagolisossomo, que por sua vez atua na degradação de proteínas e organelas que não são mais necessárias para o metabolismo celular (Okada e Mak, 2004; Maiuri et al., 2007). Já é descrito que em todas as células, encontra-se um nível basal do processo autofágico, uma vez que o mesmo é necessário e importante para a manutenção da homeostase celular (Mizushima et al., 1998).

Esta autodigestão pode representar uma adaptação ao estresse causado por privação ou variação de fontes nutricionais prevenindo a morte celular, resistência à drogas ou até mesmo uma rota alternativa para a morte celular (Reggiori e Klionsky, 2002; Okada e Mak, 2004). Por meio do processo de autofagia a célula adapta seu metabolismo à falta de nutrientes no ambiente extracelular, ao estresse ambiental como extremos de pH e temperatura ou à diminuição de metabólitos no ambiente intracelular. Pelo catabolismo de macromoléculas, a autofagia gera substratos que suprem as necessidades bioenergéticas das células (Maiuri et al., 2007).

Em microrganismos, estudos vêm demonstrando a importância da autofagia em diversos processos biológicos, entre os quais podemos citar a adaptação, a diferenciação e o desenvolvimento celular. O envolvimento mais conhecido e bem descrito do processo de autofagia é no que se refere ao controle da homeostase de micronutrientes, visando a

adaptação das células a nutrientes específicos e/ou na sobrevivência do organismo em condições de estresse (Takeshige et al., 1992; Onodera e Ohsumi, 2005).

Todos os fungos têm mecanismos homeostáticos para assegurar que quantidades mínimas de micronutrientes essenciais estejam disponíveis para suas necessidades metabólicas. Quando o fungo filamentoso patogênico *Aspergillus fumigatus* foi cultivado na ausência de micronutrientes essenciais, mimetizando as condições encontradas no hospedeiro durante o processo infeccioso, apresentava deficiência de crescimento, e o fungo passava a realizar processos autofágicos, reciclando proteínas associadas à micronutrientes pré-existentes. Dessa maneira ocorre a liberação de íons metálicos, deixando-os livres para utilização em processos metabólicos necessários para o crescimento do fungo e restabelecimento da homeostase, estabelecendo assim uma relação entre os processos biológicos de autofagia e homeostase de micronutrientes. Vale ressaltar que quando acrescentados os micronutrientes essenciais aos meios de cultura pobres, o crescimento do microrganismo foi normalizado (Richie e Askew, 2008).

No fitopatógeno *Magnaporthe oryzae*, agente causador da brusone, doença infecciosa que ataca culturas de arroz, a inativação dos genes *atgs* envolvidos na regulação da maquinaria autofágica causaram perda da patogenicidade do fungo durante experimentos de infecções *in vitro* em plantas hospedeiras. Esses resultados sugerem o envolvimento da autofagia na patogenicidade, auxiliando no desenvolvimento de novas estratégias de controle da doença. Porém, ainda existem muitas questões que precisam ser respondidas, sobre a maquinaria e as vias de sinalização envolvidas no processo de ativação e regulação da autofagia em fungos patogênicos (Liu et al., 2012).

Portanto, a autofagia é um processo celular onipresente nos eucariotos, que foi evidenciado há muitos anos, mas o conhecimento sobre esse processo sofreu um grande avanço na década passada, especialmente através de estudos genéticos em *S. cerevisiae* (Reggiori e Klionsky, 2002; Reggiori e Klionsky, 2005). Entretanto, mesmo levando-se em conta os inúmeros estudos realizados sobre autofagia em leveduras, poucos trabalhos têm focado este processo em fungos filamentosos (Cole et al., 1998; Reggiori e Klionsky, 2005).

1.6 A glicoproteína SOWgp

A adesão dos fungos no tecido do hospedeiro constitui um alvo potencial dos fármacos antifúngicos. E essa adesão é mediada pela ligação de proteínas de adesão fúngica aos receptores da célula hospedeira. Nas leveduras, a adesão é mediada por aspartil proteases e

fosfolipases. Na atualidade, estão sendo desenvolvidos compostos que bloqueiam as interações de adesão entre as células fúngicas e as células de mamíferos. A composição da parede celular dos fungos desempenha um importante papel na patogenia das infecções fúngicas e patógenos como *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides brasiliensis* modulam o comportamento e a composição de glicoproteínas em suas paredes celulares em resposta a interações com o sistema imune do hospedeiro (Ruiz-Herrera et al., 2006).

As glicoproteínas de parede celular são descritas como importantes fatores de virulência, facilitando a adesão dos microrganismos aos nichos específicos do hospedeiro, estabelecendo assim o processo de infecção fúngica. Um dos mecanismos de virulência de fungos patogênicos decorre de uma glicoproteína denominada SOWgp (*Spherule Outer Wall*), localizada na parede celular dos esporos, preferencialmente expressa na fase parasitária, a qual é indispensável para o reconhecimento do sistema imune, e para a opsonização destas proteínas por anticorpos específicos. Essa proteína permite ao microrganismo evadir das defesas do hospedeiro degradando imunoglobulinas e proteínas do sistema complemento, permitindo assim que cepas virulentas escapem da detecção e destruição pelo sistema imune do hospedeiro. (Moroyoqui e Figueroa, 2008).

O gênero *Coccidioides* (composto pelas duas espécies patogênicas que causam infecção, *Coccidioides immitis* e *Coccidioides posadasii*) é considerado um dos mais virulentos e infectantes patógenos fúngicos, sem predileção por sexo, raça e idade. *C. immitis* é o agente causador da coccidioidomicose, uma doença crônica que causa comprometimento pulmonar. Um dos principais fatores de virulência de *Coccidioides sp.* é a glicoproteína presente na parede externa de esporos SOWgp, codificada por um gene de cópia única no genoma, e que também é considerada um antígeno imunodominante, que estimula tanto a resposta imune mediada por células quanto por anticorpos (Johannesson et al., 2005). Este gene foi identificado por Hung e colaboradores (2002), e ensaios *in vitro*, com a proteína recombinante (rSOWp) mostraram que esta se liga à laminina, fibronectina e colágeno do tipo IV, sugerindo que este antígeno de superfície celular possa funcionar como uma adesina. A deleção do gene *sowgp* resultou na perda parcial da capacidade dos esporos em se ligar às proteínas da matriz extracelular (MEC), bem como uma significativa redução da virulência durante infecção de camundongos (Hung et al., 2002).

O fungo *C. immitis* expressa também uma metaloproteinase (MEP1) que atua na digestão da glicoproteína SOWgp na superfície dos esporos, evitando seu reconhecimento

pelo sistema imune, sugerindo que MEP1 desempenha um papel determinante na patogenicidade do gênero *Coccidioides* e contribui, assim, para a capacidade do patógeno de persistir no seu hospedeiro e escapar da resposta imune (Nosanchuk et al., 2007; Moroyoqui e Figueroa, 2008).

Entretanto, pouco se sabe sobre a relação da proteína SOWgp e os mecanismos de virulência fúngica em outros fungos patogênicos. No entanto, a aplicação de métodos baseados em genômica para estudos de interações patógeno-hospedeiro, será capaz de desvendar a função biológica dessa proteína durante a progressão da infecção causada por fungos filamentosos, assim como a sua relação com outros fatores de virulência (Hung et al., 2007).

Hipótese do Trabalho

2 HIPÓTESE DO TRABALHO

A sinalização celular gerada pela leitura do pH extracelular por fungos ocorre por meio de uma cascata molecular conservada, envolvendo a ativação do fator de transcrição PacC. Essa resposta adaptativa apresenta-se como um fenômeno universal, com reflexos em muitos processos metabólicos, biotecnológicos e relacionados à patogenicidade de alguns fungos. Nos últimos anos, o estudo desses processos biológicos envolvidos na adaptabilidade dos fungos às mudanças do ambiente passou a ser relevante para a medicina. Os fungos patogênicos, em especial o dermatófito *T. rubrum*, vem atuando de modo invasivo, sendo responsáveis pelo aumento da mortalidade de pacientes imunodeprimidos.

Assim, a hipótese desse trabalho foi verificar se há influência do pH e da fonte nutricional na modulação da expressão de genes de *T. rubrum* que codificam proteínas envolvidas nos processos de autofagia, adesão celular e fatores de transcrição, e se estes processos estão relacionados à patogenicidade deste dermatófito.

Objetivos

3 OBJETIVO GERAL

Estudos experimentais envolvendo o patógeno *T. rubrum* são cada vez mais necessários, devido à sua prevalência, ao surgimento de linhagens resistentes aos fármacos disponíveis, e pelo seu comportamento agressivo durante a infecção de pacientes imunocomprometidos. Embasado nesses fatos e na escassez de estudos relacionados à biologia deste microrganismo, o objetivo deste projeto foi estudar a regulação da expressão de genes codificantes para fatores de transcrição e genes envolvidos nos processos de autofagia e adesão celular, pelo pH ambiente, variações nutricionais e durante a interação com células e moléculas do microambiente hospedeiro, no patógeno humano *T. rubrum*, avaliando o papel dos mesmos na patogenicidade e sobrevivência desse dermatófito durante o processo infeccioso.

3.1 Objetivos específicos

3.1.1 – Análise *in silico* da região promotora dos genes anotados de *T. rubrum* no banco de dados do genoma estrutural (<http://www.broad.mit.edu/annotation/genome>), buscando por domínios consenso de ligação ao DNA dos fatores de transcrição bZIP/Cys-3, Nuc-1 e PacC, utilizando ferramentas de bioinformática, visando estabelecer uma relação hierárquica entre esses fatores de transcrição.

3.1.2 – Avaliar o perfil de crescimento das linhagens CBS, H6 e *pacC-1* de *T. rubrum* em diferentes fontes nutricionais e realizar o monitoramento do processo de alcalinização das culturas celulares, através da detecção do pH extracelular.

3.1.3 – Avaliar o perfil transcricional dos genes *bZIP/cys-3*, *pacC* e *nuc-1* (codificantes para fatores de transcrição), *atg8* e *atg15* (envolvidos no processo de macroautofagia) e do gene *sowgp* (glicoproteína) em função da fonte nutricional (glicose, glicina, glicose com glicina e queratina) e do pH do meio de cultivo, e analisar a modulação da expressão destes transcritos pelo fator de transcrição PacC.

3.1.4 – Avaliar o perfil transcricional dos genes *atg8*, *atg15* e *pacC* na presença do inibidor 3-metiladenina/3-MA (um fármaco que bloqueia o processo de autofagia celular).

3.1.5 – Avaliar o perfil transcricional dos genes envolvidos nos mecanismos de autofagia e adesão celular durante a interação com células e moléculas do hospedeiro na infecção *ex vivo* de pele e unha humana, buscando verificar o possível papel dos mesmos na patogenicidade fúngica desse dermatófito.

3.1.6 – Inativação gênica por recombinação homóloga: padronizar a construção do cassete de inativação gênica por meio da metodologia de PCR de fusão e a transformação da linhagem selvagem CBS-118892 de *T. rubrum* com os cassetes, para obtenção de uma linhagem inativada para o gene *bZIP/cys-3*.

Materiais e Métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

Figura 02: Desenho experimental e representativo das propostas e objetivos realizados neste trabalho.

4.2 Microrganismos e condições de cultivo

Foram utilizadas no desenvolvimento do trabalho, três linhagens de *Trichophyton rubrum*, que se encontram estocadas em nosso laboratório. O cultivo e condições de crescimento seguem os protocolos já descritos pelo grupo em suas publicações científicas.

A - Linhagem CBS-118892: foi doada pelo *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS – *Fungal Biodiversity Centre* - Holanda). Essa linhagem foi isolada, de um paciente alemão portador de onicomicose (*Tinea unguium*), pela Dra. Yvonne Gräser (*Consiliary Laboratory for Dermatophytes, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Institute of Microbiology, Berlin, Germany*). O genoma completo dessa linhagem encontra-se disponível no Banco do Genoma Comparativo de Dermatófitos do *Broad Institute of MIT and Harvard* em (<http://www.broad.mit.edu/annotation/genome>).

B - Linhagem H6 (ATCC MYA-3108): foi isolada de um paciente do sexo masculino portador de *tinea pedis*, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Essa linhagem foi identificada conforme descrito em McGinnis (1980), pela Profa. Dra. Cláudia Maria Leite Maffei, responsável pelo setor de Micologia Médica do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP (Fachin et al., 1996).

C - Linhagem mutante *pacC-1*: foi obtida a partir do isolado clínico H6 e possui o gene *pacC* de *T. rubrum* interrompido, em decorrência da inserção do gene higromicina fosfotransferase (*hph*), sob controle do promotor e terminador do gene *trpC* de *Aspergillus nidulans*. O gene *hph* é utilizado como gene repórter ou marcador de seleção, pois confere ao fungo resistência ao antibiótico higromicina, que também atua como antifúngico. Essa linhagem não apresenta diferenças macroscópicas em relação à linhagem selvagem H6, embora seja observada a diminuição da quantidade de conídios quando cultivada em ágar Sabouraud acrescido de higromicina (Ferreira-Nozawa et al., 2006).

4.3 Busca por regiões promotoras contendo a sequência consenso de ligação ao DNA dos fatores de transcrição bZIP/Cys-3, Nuc-1 e PacC

Recentemente o genoma do dermatófito *T. rubrum* foi disponibilizado pelo Broad Institute (<http://www.broad.mit.edu/annotation/genome>), possibilitando análises genômicas *in silico*. Com o objetivo de identificar genes possivelmente regulados pelos fatores de transcrição bZIP/Cys-3, Nuc-1 e PacC, análises de bioinformática foram realizadas para procurar no genoma de *T. rubrum* genes que apresentem em sua região promotora os sítios de ligação destes fatores de transcrição. Em nosso laboratório foi desenvolvido um programa de análise e busca de domínios conservados (proteicos ou nucleotídicos), denominado *Domain Search Tool* (<http://fox.fmrp.usp.br/domainsearch/>). Com esta ferramenta, foram analisadas as regiões a 1000pb *upstream* das ORFs preditas no genoma de *T. rubrum*, buscando-se a sequência consenso de ligação ao DNA de bZIP/Cys-3, Nuc-1 e PacC. O número de genes que apresentaram regiões consenso de ligação ao DNA para os fatores de transcrição citados e que possivelmente apresentam regulação pelos mesmos, foram representados esquematicamente no diagrama de Venn. Esse diagrama possui um papel fundamental na organização de dados obtidos em pesquisas, e foi criado com a finalidade de demonstrar as relações de união e intersecção entre os conjuntos de genes.

4.4 Meios de cultura celular

Tabela 01: Meio Extrato de Malte – MEA

Extrato de malte	20g
Glicose	20g
Peptona	1g
Ágar	20g
Água destilada estéril (q.s.p)	1000mL
O pH do meio foi ajustado para 5,7 , autoclavado a 1atm de pressão e 120°C por 20 min. Fonte: (Atlas, 1993).	

Tabela 02: Meio Sabouraud para *T. rubrum*

Glicose	20g
Peptona	10g
Água destilada estéril (q.s.p)	1000mL
O pH do meio foi ajustado para 5, 7. O meio foi autoclavado a 1atm de pressão a 120°C por 20 min. Fonte: (Atlas, 1993).	

Tabela 03: Meio Mínimo (MM)

Solução de sais	20mL
Elementos traços	1mL
Água destilada estéril (q.s.p)	1000mL
O pH do meio foi ajustado para 5,0 ou 8,0, conforme desejado. O meio foi autoclavado a 1atm de pressão a 120°C por 20 min. Fonte: Cove, 1996. Este meio não contém fonte de carbono, a qual será adicionada posteriormente de acordo com o delineamento experimental. Para todos os MMs foi adicionado ao meio nitrato de sódio na concentração de 70mM como fonte de nitrogênio. Quando de interesse, foi utilizado como tamponante o citrato de sódio (14,705g/L) em pH 5,0 ou Tris base (6,057g/L) em pH 8,0, ambos com concentração final de 50mM. Para variação das fontes nutricionais foram utilizados: glicose (55mM), glicina (50mM), glicose (55mM) e glicina (50mM), queratina bovina (4g/L).	

Tabela 04: Solução de sais

Cloreto de potássio	26g
Sulfato de magnésio heptahidratado	26g
Fosfato de potássio monobásico	30mg
Solução de elementos traços	50mL
Água destilada estéril (q.s.p)	1000mL
Nos experimentos, o fosfato foi omitido desta solução, sendo acrescentado separadamente para uma concentração de 2mM. Adicionar 3mL de clorofórmio como agente antimicrobiano e estocar a solução a 4°C. Fonte: (Cove, 1966).	

Tabela 05: Solução de elementos traços

Borato de sódio decahidratado	40mg
Sulfato de cobre pentahidratado	400mg
Sulfato de ferro heptahidratado	532mg
Sulfato de manganês monohidratado	292mg
Molibdato de sódio bihidratado	800mg
Sulfato de zinco heptahidratado	8g
Água destilada estéril (q.s.p.)	1000mL
Adicionar 2mL de clorofórmio como agente antimicrobiano e estocar a solução a 4°C. Fonte: (Cove, 1966)	

4.5 Condições de cultivo e cultura de células durante variações de pH e fontes nutricionais

As linhagens do dermatófito *T. rubrum* utilizadas na pesquisa foram cultivadas em meio sólido Extrato de Malte – MEA (*Malt Extract Agar*) (Atlas, 1993), pH 5,7, durante 17 – 22 dias a 28°C, sendo o meio da linhagem *pacC-1* acrescido de 450µg/mL de higromicina. De forma estéril, o micélio obtido foi transferido para solução salina (0,9%, NaCl e 0,001 de Tween) e agitado em vórtex por aproximadamente dez minutos, sendo posteriormente filtrado em lã de vidro para obtenção somente de conídios, presentes no filtrado. Após contagem em câmara de Neubauer, 1×10^7 conídios foram inoculados em frasco Erlenmeyer (125mL) contendo 50mL de Meio Sabouraud - SDB (*Sabouraud dextrose broth*) (Sambrook et al., 1989), líquido, pH 5,7 e incubados por 96h a 28°C, com agitação de 110 rpm, sendo o meio da linhagem *pacC-1* acrescido de higromicina (225µg/mL). O micélio resultante foi assepticamente lavado e transferido para os meios mínimos de cultura com variações de nutrientes e tempo de incubação.

O micélio obtido em cada Erlenmeyer de 125mL foi transferido individualmente para um frasco Erlenmeyer de 250mL contendo 100mL de meio mínimo (MM) (Cove, 1966). O meio mínimo foi suplementado com fosfato de potássio – KH_2PO_4 (2mM), o pH foi ajustado para 5,0, com a variação de nutrientes e tempo de incubação. Para variação das fontes nutricionais foram utilizados: glicose (55mM), glicina (50mM), glicose (55mM) e glicina (50mM) e queratina obtida a partir da unha espessa (casco) de bovinos (4g/L). Para tamponamento, o pH foi ajustado para 5,0 ou 8,0, sendo utilizado 50mM de citrato de sódio (pH 5,0) ou 50mM de Tris-HCl (pH 8,0). Nas condições de MM também foi acrescentado 225µg/mL de higromicina para os cultivos da linhagem *pacC-1*.

O micélio foi cultivado em MM não tamponado por 24, 48, 72 e 96 horas e em meio tamponado por 24 horas. Nos experimentos de *shift* de pH, após 72h de cultivo, o micélio foi transferido para seu respectivo MM, pH 5,0, e incubado novamente por 5h. Após cada período de cultivo, o pH do meio extracelular do meio de cultura foi aferido, utilizando-se um pHmetro calibrado, e as culturas filtradas assepticamente com o auxílio de uma bomba a vácuo, os micélios obtidos foram prensados entre folhas de papel de filtro esterilizado para remoção do excesso de meio de cultura, pesados, congelados em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C até o momento do uso (Padronizado por Santos, RS & Cruz, AHS).

4.6 Condições de cultivo na presença do inibidor 3-metiladenina (3MA)

A linhagem CBS-118892 de *T. rubrum* utilizada no experimento foi cultivada em meio sólido Extrato de Malte – MEA (*Malt Extract Agar*) (Atlas, 1993), pH 5,7, durante 17 – 22 dias a 28°C. De forma estéril, o micélio obtido foi transferido para solução salina (0,9%, NaCl e 0,001 de Tween) e agitado em vórtex por aproximadamente dez minutos, sendo posteriormente filtrado em lã de vidro para obtenção somente de conídios, presentes no filtrado. Após contagem em câmara de Neubauer, 1×10^7 conídios foram inoculados em frasco Erlenmeyer (125mL) contendo 25mL de Meio Sabouraud - SDB (*Sabouraud dextrose broth*) (Sambrook et al., 1989), líquido, pH 5,7 e incubados por 96h a 28°C, com agitação de 110rpm. O micélio resultante foi assepticamente lavado e transferido para os meios mínimos de cultura.

O micélio obtido em cada Erlenmeyer de 125mL foi transferido individualmente para um frasco Erlenmeyer de 250mL contendo 50mL de meio mínimo (MM) (Cove, 1966). O meio mínimo foi suplementado com fosfato de potássio – KH_2PO_4 (2mM), e como fonte nutricional foi utilizada a glicina (50mM) e o pH foi ajustado para 8,0, sendo utilizado 50mM de Tris-HCl para o tamponamento. Nesse meio de cultura, também foi adicionado o composto 3-metiladenina (3MA) (*Sigma-Aldrich Chemical*), usualmente utilizado para inibir e estudar o mecanismo de autofagia em várias condições experimentais (Figura 03). O composto 3MA foi dissolvido previamente em água milli-Q.

Figura 03: Estrutura química do composto 3-metiladenina (3MA) ($\text{C}_6\text{H}_7\text{N}_5$), que inibe a autofagia bloqueando a formação do autofagossomo (Fonte: *Sigma-Aldrich Chemical*, <http://www.sigmaaldrich.com>).

Portanto as células foram incubadas em meio MM tamponado com glicina pH 8,0 por 2, 5 e 24h, na presença ou não de 3MA, nas concentrações de 2,5mM e 5,0mM. Após cada período de cultivo, as culturas foram filtradas assepticamente com o auxílio de uma bomba a vácuo, os micélios obtidos foram prensados entre folhas de papel de filtro esterilizado para remoção do excesso de meio de cultura, pesados, congelados em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C até o momento do uso.

4.7 Extração de ácido desoxirribonucléico (DNA) genômico

Para extração do DNA genômico, os conídios de *T. rubrum* foram cultivados em MEA (líquido) por 72 horas a 30°C, em agitação de 35 x g. O micélio resultante foi filtrado (funil de Buchner) e congelado em nitrogênio líquido, podendo ser estocado a -80°C, para posterior extração. O micélio congelado foi macerado em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó bem fino que foi transferido para um tubo de microcentrífuga (Tipo Eppendorf) ou tubo de ensaio, dependendo da quantidade de micélio, ao qual foi adicionado 2ml de solução de lise para cada 100mg de micélio.

A mistura foi incubada a 68°C por 15 minutos, centrifugada a 3800 x g por 10 minutos e o sobrenadante transferido para um novo tubo. Quando era detectada a presença de debris celulares no sobrenadante, a amostra era centrifugada novamente e o sobrenadante transferido para um novo tubo. Ao sobrenadante foram acrescentados 40µl de acetato de potássio 5M pH 8,0, com incubação em gelo por 1 hora, sendo posteriormente centrifugado a 3800 x g por 10 minutos e o sobrenadante transferido para um novo tubo, usando uma ponteira cortada para evitar degradação mecânica do DNA.

Ao sobrenadante foi adicionado isopropanol na proporção de 1:2 (sobrenadante: isopropanol) e para precipitação do DNA resultante a solução foi centrifugada a 3800 x g por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet de DNA foi lavado com adição de 1mL de etanol 70%, centrifugado a 3800 x g rpm por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o tubo deixado a temperatura ambiente para secagem do DNA (e consequente evaporação do etanol restante).

Após seco, o DNA foi eluído em tampão TE (Tris-EDTA) contendo RNase (2µg/mL), e posteriormente estocado a -20°C. A concentração do DNA genômico obtido foi determinada utilizando-se o aparelho Nanodrop® (Thermo), pela absorbância das preparações em 260nm, utilizando 1_{OD260} = 40mg/mL de DNA como valor padrão. O grau de pureza foi avaliado pela relação OD 260/280nm, que deve ser próximo de 2,0 para ácidos nucleicos.

4.7.1 Soluções para extração de ácido desoxirribonucléico (DNA)

Tabela 06: Solução de lise

SDS	1%
EDTA pH 8,0	50mM
Água destilada estéril (q.s.p.)	200mL
A solução de lise deve ser preparada na hora do uso. Fonte: (Sambrook et al., 1989)	

Tabela 07: Etanol 70%

Etanol 100%	70mL
Água destilada estéril (q.s.p.)	30mL

Tabela 08: Tampão TE (Tris-EDTA)

Tris-HCl	10M
EDTA pH 8,0	1M
Água destilada estéril (q.s.p.)	1000mL
Ajustar o pH da solução para 8,0 e autoclavar a 1 atm de pressão, 120°C por 20 minutos. Fonte: (Sambrook et al., 1989).	

4.8 Obtenção das sequências genômicas parciais da linhagem H6

A linhagem H6 manipulada durante as etapas experimentais desse trabalho não possuía seu genoma sequenciado (análises do sequenciamento em fase de conclusão). Portanto, com a finalidade de avaliar e confirmar se os fragmentos gênicos manipulados são homólogos ao do genoma de referência de *T. rubrum* CBS, disponível no banco de dados do genoma estrutural (<http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/dermatophytecomparative/MultiHome.htm>), tornou-se necessário o sequenciamento de cada gene caracterizado. Para tanto, foram utilizados os primers construídos a partir da sequência disponibilizada para a linhagem CBS. Para cada par de primer foi realizado uma reação de PCR. Em cada reação de PCR foram utilizados 100ng de DNA genômico da linhagem H6, 2,5µl de tampão *Taq* polimerase recombinante (10X), 1,5µl de MgCl₂ (25mM), 2µl de dNTP (2,5mM), 0,1µl de cada primer sense e antisense (50mM), 0,5U de *Taq* polimerase e o volume final foi completado para 25µl de reação com água milli-Q. A reação foi submetida por 2 min a 94°C, seguido de 40 ciclos de 30s a 94°C, 45s a 60°C, 1 min a 72°C e uma extensão final de 10 min a 72°C. O produto

da reação foi fracionado em gel de agarose 1,5%. Em seguida os fragmentos amplificados para cada par de primer foram visualizados sob luz UV, recortados do gel e purificados, usando o *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*[®] (GE Healthcare), seguindo as normas do fabricante. O DNA de cada amostra foi eluído e a concentração determinada utilizando-se o aparelho Nanodrop[®] (Thermo), pela absorbância das preparações em 260nm, utilizando $1_{OD260} = 40 \text{ mg/mL}$ de DNA como valor padrão. O grau de pureza foi avaliado pela relação OD 260/280nm, estando próximo de 2,0. Os DNAs foram armazenados a -20°C para posterior utilização em reação de sequenciamento.

4.9 Reação de sequenciamento

As reações de sequenciamento foram realizadas no sequenciador automático ABI 3130 *Genetic Analyser* utilizando o Kit *Big Dye Terminator Cycle Sequencing I*, seguindo as recomendações disponibilizadas pelo fabricante. Foram utilizados 100 a 200ng dos produtos de PCR amplificados a partir do DNA genômico da linhagem H6 de *T. rubrum* (ATCC MYA 3108), 1μL de oligonucleotídeo de interesse, sentido sense ou antisense (2,5μmol), 2μL do reagente *Big Dye Terminator (v3.1)*, 2μL de tampão e água Milli-Q q.s.p. para um volume final de 10μL. Em seguida realizou-se a PCR para reação de sequenciamento, sendo as amostras desnaturadas por 1 min a 96°C, seguidas de 25 ciclos de 10s a 95°C, 5s a 52°C e 4 min a 60 °C, finalizando com a redução da temperatura para 4°C.

Após a ciclagem, as amostras foram precipitadas com isopropanol, para tanto foram adicionados 30μl de água Milli-Q, 60μL de isopropanol 100% e as amostras mantidas a temperatura ambiente por 20 minutos. Depois as amostras foram centrifugadas por 45 minutos a 2000x g e o isopropanol descartado por inversão dos tubos. Em seguida foi adicionado 200μL de etanol 70% e novamente centrifugado a 2000x g por 20 minutos. Todo etanol foi removido por *spin* invertido da placa, pois qualquer etanol residual resulta em manchas fluorescentes. Por fim, as amostras foram secas à temperatura ambiente ao abrigo da luz e envolvidas em papel alumínio, até o momento da aplicação. Depois de secas, as amostras foram ressuspensas com 2,5μL de *Loading Color* e 0,7μL e analisadas no sequenciador automático ABI 3130 *Genetic Analyser DNA Sequencer* (Applied Biosystems, Foster City, CA).

4.10 Análise das sequências obtidas no sequenciamento

Primeiramente, os cromatogramas foram analisados quanto à qualidade pelo *software Phred* (Ewing e Green, 1998). As sequências aceitas contêm pelo menos 80 nucleotídeos com qualidade *Phred* maior ou igual a 20. A seguir, as sequências idênticas foram agrupadas em

contigs através do programa CAP3 *Sequence Assembly Program* (Huang e Madan, 1999), disponível em <http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>.

As sequências formadas nos *contigs* foram avaliadas utilizando os programas *blastx* e *blastn* disponíveis em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Posteriormente, as sequências obtidas foram alinhadas com suas respectivas sequências homólogas depositadas no banco do genoma da linhagem referência *T. rubrum* CBS118892. O alinhamento foi realizado com o programa Clustal X (1.83), disponível em <http://www.clustal.org> (Thompson et al., 1997).

4.11 Extração de ácido ribonucleico (RNA)

Para avaliação da expressão gênica, o RNA total das três linhagens foi obtido com o uso do reagente TRIzol[®] (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante, com algumas modificações, a partir das células de *T. rubrum* cultivadas e estocadas a -80°C. Este protocolo foi adaptado para o patógeno *T. rubrum* por Santos, RS & Cruz, AHS em 2010.

- 1 – Trituração das células de *T. rubrum* por moagem sob baixa temperatura (Nitrogênio líquido).
- 2 – Adicionar 35µL de TRIzol[®] para cada 10mg de células maceradas.
- 3 – Agitar em vórtex por 10 minutos.
- 4 – Repousar a temperatura ambiente por 10 minutos
- 5 – Centrifugar por 10 minutos (2-8°C, 1500 x g)
- 6 – Com o auxílio de uma pipeta, transferir a fase superior para um tubo novo e anote o volume. Obs: Nessa etapa formam-se três fases. A fase superior (vermelha) contém o trizol e o RNA, a fase intermediária (branca) contém DNA e proteínas e a fase inferior contém restos celulares.
- 7 – Adicionar 0,2 mL de clorofórmio para 0,75mL de Trizol recuperado. O clorofórmio separa a solução em fase aquosa e orgânica e o RNA permanece exclusivamente na fase aquosa.
- 8 – Agitar vigorosamente em vórtex, 5 minutos. Caso não consiga, misturar vigorosamente por 5 minutos.
- 9 – Repousar a temperatura ambiente por 10 minutos.
- 10 – Centrifugar por 15 minutos (2-8°C, 1500 x g)
- 11 – Com o auxílio de uma pipeta, transferir a fase superior (aquosa – fase clara) para um tubo novo. Formam-se novamente as três fases, conforme item 06.
- 12 – Adicionar o volume recuperado no item anterior de uma mistura da Invitrogen composta por: Fenol: Clorofórmio: Álcool isoamílico (25:24:1).
- 13 – Agitar gentilmente (Não utilizar o vórtex).
- 14 – Repousar à temperatura ambiente por 10 minutos
- 15 – Centrifugar por 15 minutos (2-8°C, 1500 x g)
- 16 – Com o auxílio de uma pipeta transfira a fase superior (aquosa) para um tubo limpo e anote o volume.
Obs: Caso necessário repetir as etapas 12 a 16.
- 17 – Adicionar 0,25mL de solução de sal para cada 0,75mL de TRIzol[®] recuperado, logo após acrescentar 0,25mL de Isopropanol para cada 0,75mL de TRIzol[®] recuperado.
- 18 – Agitar gentilmente (homogeneizar por inversão). Nessa etapa a solução apresenta aspecto leitoso.
- 19 – Repousar à temperatura ambiente por 10 minutos ou armazenar *overnight* a -20°C.
- 20 – Centrifugar por 30 minutos (2-8°C, 1500 x g).
- 21 – Com o auxílio de uma pipeta, retirar o sobrenadante e descartar. O pellet é o próprio RNA.
- 22 – Adicionar 1 mL de Etanol 75%, preparado com água DEPC, para 0,75mL de TRIzol[®] recuperado. Obs: Não ressuspender o pellet.
- 23 – Centrifugar por 5 minutos (2-8°C, 1500 x g).
- 24 – Descartar o sobrenadante com cuidado para não ressuspender o pellet.
- 25 – Deixar o pellet secar à temperatura ambiente com o tubo aberto.
- 26 – Ressuspender o pellet com água bidestilada DEPC.
- 27 – Transferir para um tubo Eppendorf novo e deixar sempre no gelo, quando utilizar.
- 28 – Quantificar em espectrofotômetro e analisar em gel de agarose 0,8-1,0%.
- 29 – Tratar o RNA com DNase. Quantificar em espectrofotômetro e analisar em gel de agarose 0,8-1,0%.
- 30 – Preparar aliquotas para estoque e uso rotineiro.

4.11.1 Soluções para extração de RNA total

Tabela 09: Solução de sal para extração de RNA

Citrato de sódio 0,4M	5,9g
Cloreto de sódio 0,8M	2,34g
Água destilada (q.s.p.)	50mL

Tabela 10: Água livre de RNase /Água DEPC (0,1% v/v)

dietilpirocarbonato (DEPC)	1mL
Água destilada	1000mL
Em frasco âmbar, incubar a 37 °C por 18 - 20 horas e autoclavar por 30 minutos, a 1atm de pressão e 120°C. Fonte: (Sambrook et al., 1989).	

4.12 Síntese de cDNA

Após a obtenção do RNA total, o mesmo foi tratado com DNase-I livre de RNase (*Invitrogen*) para remover todas as contaminações com DNA genômico. A primeira fita de cDNA foi amplificada através da enzima transcriptase reversa (*Invitrogen*) a partir do RNA tratado com DNase-I, seguindo as normas do fabricante.

4.13 Construção de oligonucleotídeos

Para obtenção de sequências parciais do cDNA das moléculas de interesse foram desenhados oligonucleotídeos (Tabela 11) a partir das sequências obtidas do genoma de *T. rubrum* (<http://www.broadinstitute.org>). Para tanto, foi utilizado o programa *Gene Runner*, versão 3.01 (<http://www.generunner.net/>). Os genes endógenos utilizados foram gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (*gapdh* - TERG_04402) e a cadeia β de tubulina (*β -tub* - TERG_07904) seguindo informações de Jacob e colaboradores em 2012. Esses oligonucleotídeos foram utilizados no sequenciamento das sequências amplificadas por PCR a partir do DNA genômico da linhagem H6 e para mensurar a expressão gênica através da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR) de todas as linhagens utilizadas neste trabalho.

Tabela 11: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nos experimentos de PCR em tempo real

Gene	Número de acesso ^a	Nome do oligonucleotídeo	Sequência do oligonucleotídeo
<i>bZIP/cys-3</i>	TERG_07696.2	<i>bZIP/cys-3-S</i>	5' CGGCATAGACGAACAGCA 3'
		<i>bZIP/cys-3-AS</i>	5' GAGATGTGTTGGCAGGGAG 3'
<i>pacC</i>	TERG_00838.2	<i>pacC-S</i>	5' TCCCAGCAGCCCCAAC 3'
		<i>pacC-AS</i>	5' ATGTGGGAGGTGATGTGGT 3'
<i>nuc-1</i>	TERG_06960	<i>nuc-1-S</i>	5' GTCAGTCGTTTGTTCACCA 3'
		<i>nuc-1-AS</i>	5' GGAGTGGTGTATTCGGGGA 3'
<i>atg8</i>	TERG_06497.2	<i>atg8-S</i>	5' CGAGCACCCCTTTGAGA 3'
		<i>atg8-AS</i>	5' CGACGAAGATGAAGATGGC 3'
<i>atg15</i>	TERG_02016.2	<i>atg15-S</i>	5'AGAGGAGGCTGGAGAAGAG 3'
		<i>atg15-AS</i>	5' CGAGCCGCCTGAAGC 3'
<i>sowgp</i>	TERG_08024.2	<i>sowgp-S</i>	5' AAGACTGAGGAAAACAAGGAG 3'
		<i>sowgp-AS</i>	5' TCTCCTCGGGCTTTGAC 3'
<i>gapdh</i>	TERG_04402	<i>gapdh-S</i>	5' GCGTGACCCAGCCAACA 3'
		<i>gapdh-AS</i>	5' CGGTGGACTCGACGATGTAGT 3'
<i>β- tubulina</i>	TERG_07904	<i>tub-S</i>	5' CCGTATGATGGCCACTTT 3'
		<i>tub-AS</i>	5' CTGACCTGGGAAACGAAGAC 3'
^a Número de acesso ao gene através do genoma de <i>T. rubrum</i> no <i>Dermatophytes Genome Database (Broad Institute)</i> .			

4.14 Análise da expressão gênica por PCR em Tempo Real

As análises por PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) foram realizadas utilizando-se a metodologia de detecção por *SYBR Green*, de acordo com as instruções do fabricante (*Applied Biosystems*), no aparelho *StepOnePlus Real Time PCR* (*Applied Biosystems*). Cada reação, realizada em um volume final de 12,5µL, continha 1µL de cada oligonucleotídeo (2,5µM) iniciador, 6,25µL de *SYBR Green* (PCR mix) e 1µL de cDNA (50ng). As condições de ciclagem foram um passo inicial de 2 minutos a 50 °C e 10 minutos a 95 °C, seguindo-se de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 min.

A normalização dos dados foi realizada com o programa GenEx qPCR *data analysis* (<http://genex.gene-quantification.info/>), sendo que, a quantificação relativa dos genes de

interesse foi calculada pelo método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, normalizando-se os dados com dois controles endógenos, também chamados de genes de referência, cuja expressão não variasse significativamente entre as amostras analisadas. A quantificação relativa da expressão gênica é usada para descrever variação na expressão do gene de interesse, em um grupo de amostras em relação a uma amostra de referência, denominada calibrador, que neste caso, foi à amostra com menor ΔC_t .

O cálculo desta expressão relativa utiliza os valores de C_t dos controles endógenos, neste caso *gapdh* e *β -tub*, que foram somados e divididos por dois e então o valor obtido subtraído dos valores de C_t dos genes alvos, obtendo-se assim o ΔC_t de cada amostra. O ΔC_t do calibrador utilizado foi o de menor valor de expressão, que equivale ao maior valor de ΔC_t . O valor de ΔC_t do calibrador foi então subtraído do valor de ΔC_t das demais amostras, para obter o $\Delta\Delta C_t$. Finalmente, as quantificações relativas dos genes foram expressas como $2^{-\Delta\Delta C_t}$ e convertidas em Log_2 . Os gráficos finais e análises no programa MeV (*MultiExperiment Viewer*) foram obtidos a partir dos valores de Log_2 .

4.15 Modelos de infecção *ex vivo* de pele e unha

Para os experimentos de infecção *ex vivo* (Comitê de ética HCRP, nº 8330/2009) foram utilizados fragmentos de pele humana obtidos de pacientes submetidos à cirurgia plástica de abdômen no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, e cedidas pela equipe do Dr. Mário Eduardo Monteiro de Barros. Os fragmentos de pele foram estocados e mantidos em solução SGF (*Skin Graft Fluid*) até o momento do uso (Duek et al., 2004). Após a remoção do tecido adiposo, a camada superior foi cortada em fragmentos de 1cm^2 e então infectados com 1×10^4 conídios de *T. rubrum* (CBS) (Figura 04).

Figura 04: Pele humana utilizada para o experimento de infecção *ex vivo*, obtida de paciente submetido à cirurgia abdominal. O tecido adiposo foi retirado por raspagens consecutivas com bisturi em ambiente esterilizado e o fragmento de pele foi processado em pedaços de 1cm² e estocado em solução SGF a 4°C. Durante os ensaios de interação, os fragmentos de pele foram infectados com 1×10^4 conídios de *T. rubrum*, e foram incubados a 28°C por 96h. (Foto: Peres, NTA; 2009).

As peles infectadas foram colocadas em aproximadamente 5ml de SGF e a interação foi mantida a 28°C por 96h. Para a obtenção de RNA total, após incubação os fragmentos de pele infectados foram colocados em tubos de 50ml contendo 1ml de água esterilizada e 0,1% Triton X-100. Após intensa agitação em vórtex, a parte aquosa foi transferida para um tubo limpo, incubada a 37°C por 20 min e centrifugada a 1000×g por 5min. Em seguida, descartou-se o sobrenadante, o precipitado foi ressuscitado em 1ml de RNase (10μg/ml) e a mistura foi incubada a 37°C por 20min. Adicionou-se então, 1μl de inibidor de RNase (40U) e a mistura foi centrifugada a 5000×g por 5min. O sobrenadante foi descartado e o fungo congelado em nitrogênio líquido. A seguir, adicionou-se ao precipitado 1ml de acetona gelada, e após 18h a

-80°C, a acetona foi descartada e o precipitado (fungo) seco no aparelho *Concentrator 5301* (Eppendorf) por 20 min a 25°C. O micélio foi estocado à temperatura ambiente até o momento da extração de RNA total. Vale ressaltar que essa metodologia de infecção *ex vivo*

foi descrita por Duek e colaboradores em 2004 para o dermatófito *T. mentagrophytes*, porém para o fungo *T. rubrum* foi padronizado em nosso laboratório por Peres em 2009.

Para os experimentos de interação *in vitro* em unha, foi seguido o protocolo previamente estabelecido em nosso laboratório por Ferreira-Nozawa e colaboradores em 2006. Fragmentos de unha humana saudável, previamente mantidos em etanol 100% por 15 min e secos à temperatura ambiente, foram colocados em microtubos de 1,5ml. Em seguida, 1×10^4 conídios foram inoculados sobre cada fragmento de unha. Após 1h à temperatura ambiente, foram adicionados 200µl de água destilada esterilizada. Após 96h de incubação a 28°C, os fragmentos de unha infectados foram agitados em vortex para retirar as hifas. A seguir, os fragmentos de unha foram removidos com pinça e descartados, e o micélio foi centrifugado a $5000 \times g$ por 5 min. Adicionou-se então 1ml de acetona gelada, o micélio foi colocado a -80°C por 18h e seco no aparelho *Concentrator 5301* (Eppendorf) por 20 min a 25°C. O micélio foi mantido à temperatura ambiente até o momento da extração de RNA total. Para efeito de comparação do perfil transcricional durante os ensaios de interação, aproximadamente 1×10^6 conídios de *T. rubrum* foram inoculados em 100ml de meio de queratina comercial (*MP Biomedicals*) (2,5g/l) ou meio mínimo (MM - que contém glicose como fonte de carbono), pH 5,0, por 96h a 28°C.

O RNA total de cada condição de cultivo foi extraído com o *Illustra Spin RNA Isolation kit* (GE Healthcare), tratado com 1U de DNase I *Amplification Grade* (Invitrogen) e então convertido em cDNA, utilizando-se o *High Capacity cDNA Transcription kit* (Life Technologies). Para os experimentos de tempo real, visando as análises de expressão gênica, utilizando a quantificação relativa dos genes de interesse, seguimos os mesmos protocolos e regras de análise e normalização já padronizadas e descritas anteriormente para os experimentos de variações de pH e fontes nutricionais. A única exceção, é que para os experimentos de interação, utilizamos o gene *rpb2* (TERG_05742 *DNA-dependent RNA polymerase II*; *rpb2*-S: 5'TGCAGGAGCTGGTGGGAAGA3'; *rpb2*-AS: 5'GCTGGGAGGTACTGTTTGATCAA3'), como controle endógeno para normalização da expressão gênica, por apresentar expressão estável nas condições de cultivo avaliadas (Jacob et al., 2012).

4.16 Análises em *MultiExperiment Viewer* (MeV)

MultiExperiment Viewer (MeV) é um software disponível, que disponibiliza ferramentas modernas de bioinformática para análise, visualização e garimpagem de dados

genômicos em larga escala. Este programa gera imagens (*Heat map*), tabelas e gráficos informativos e inter-relacionados de expressão e anotação dos dados obtidos em experiências únicas ou múltiplas. No presente trabalho, este aplicativo foi utilizado para gerar imagens que correlacionam à expressão gênica, bem como a análise de classificação hierárquica dos transcritos por agrupamentos intergênicos e por fontes nutricionais, sendo utilizado o coeficiente de correlação paramétrico (*Pearson*).

4.17 Análise estatística dos dados obtidos por qRT-PCR

Para as análises estatísticas dos dados de qRT-PCR foi utilizado o software estatístico *GraphPad* (*GraphPad Software*, Prism 5), disponível em <http://www.graphpad.com/instat/instat.htm>. Para tanto foi utilizado o teste de análise de variância simples (*One-way ANOVA*), seguido do pós-teste Bonferroni. Com a análise de variância é possível testar de uma só vez se várias amostras pertencem ou não a uma mesma população. O teste de Bonferroni é um teste de comparações múltiplas baseado no teste *t*. Vale ressaltar, que os experimentos de expressão gênica foram realizados, com base em réplicas técnicas e biológicas de todas as condições estudadas.

4.18 Inativação do gene codificante para o fator de transcrição bZIP/Cys-3

4.18.1 Obtenção dos cassetes de inativação gênica

O nosso laboratório tem focado seus estudos, na caracterização funcional de diversos genes, envolvidos nos mais distintos processos biológicos e de patogenicidade fúngica, e para avaliar a funcionalidade de genes de *T. rubrum* no processo infeccioso e na adaptação a condições de estresse, a estratégia de inativação por recombinação homóloga está sendo empregada (Fachin et al., 2006). Nessa metodologia, os genes em estudo têm sua sequência interrompida pelo gene repórter que confere resistência à higromicina por meio da técnica de PCR de fusão (Yu et al., 2004).

Nessa metodologia, três etapas de reações de PCR são realizadas (Figura 05). Na primeira reação de PCR, os fragmentos do gene de interesse referentes às âncoras utilizadas para recombinação homóloga (5' *flanking* e 3' *flanking*), e o gene de resistência à higromicina (*marker*) são amplificados separadamente. A segunda reação de PCR consiste em fusionar os

três fragmentos, o que é possível devido à complementaridade das extremidades dos três fragmentos dada pela presença de sequências complementares aos oligonucleotídeos cinco e seis (utilizados para amplificar o gene marcador) nas extremidades dos oligonucleotídeos dois e três, respectivamente. A terceira reação de PCR consiste em amplificar o fragmento fusionado, que é então utilizado para transformar a linhagem selvagem de *T. rubrum*, esperando-se que ocorra recombinação homóloga e troca do gene de interesse pelo fragmento fusionado (cassete de inativação gênica).

Figura 05: Esquema da metodologia de PCR de fusão para obtenção dos cassetes de inativação gênica. Os números 1 a 8 representam os oligonucleotídeos utilizados para amplificar cada fragmento. Fonte: Figura adaptada de Yu et al., 2004.

4.18.1.1 Condições de amplificação dos cassetes de inativação

O gene que confere resistência à higromicina está inserido no plasmídeo pCSN43, obtido do *Fungal Genetics Stock Center*, e foi amplificado com os oligonucleotídeos universais M13F (5'- GTAAAACGACGGCCAGT- 3') e M13R (5'- CAGGAAACAGCTATGAC-3'), resultando em um fragmento de 2700pb. Para amplificação das âncoras, foram desenhados oligonucleotídeos para amplificar as regiões 5'UTR e 3'UTR (regiões não traduzidas dos genes, as quais chamamos de âncoras), afim de se retirar toda a ORF (*Open Read Frame*) do gene em estudo. A tabela 12 mostra as sequências dos oligonucleotídeos utilizados para construção dos cassetes de inativação do gene *bZIP/cys-3* da linhagem CBS de *T. rubrum*, e o tamanho dos respectivos produtos de PCR.

Tabela 12: Lista dos oligonucleotídeos utilizados para a construção dos cassetes de inativação do gene que codifica o fator de transcrição bZIP/Cys-3

Oligonucleotídeo	Sequência 5'-3'	Tamanho (pb)
1. <i>bZIP/cys-3-5F</i>	5'GCAAGCAAAACACGGAGA 3'	773
2. <i>bZIP/cys-3-5R</i>	5' <u>ACTGGCCGTCGTTTTACT</u> AGGCGGTGCTGTTGAGT 3'	
3. <i>bZIP/cys-3-3F</i>	5' <u>GTCATAGCTGTTTCCTGATGTGATGGGATGGTTCTATT</u> 3'	720
4. <i>bZIP/cys-3-3R</i>	5' TAGGTGGGTAGGCGACTG 3'	
7. <i>bZIP/cys-3-Nested F</i>	5'GGCAATCTAAAACGGCAG 3'	4193*
8. <i>bZIP/cys-3-Nested R</i>	5'TAGACCTGTATGGCTTGGC 3'	

Regiões sublinhadas correspondem às sequências de complementaridade com os oligonucleotídeos universais M13 F e M13R. Os números 1, 2, 3, 4, 7 e 8 correspondem aos oligonucleotídeos esquematizados na Figura 05.

(*) Amplificação do fragmento fusionado **5'UTR - Higo^R - 3'UTR**

Para a primeira etapa de PCR foram realizadas reações com volume final de 50µl, contendo 10µmol de cada oligonucleotídeo, 1µl de dNTPs (10mM), 2µl MgSO₄ (50mM), 5µl Tampão da Taq (10X), 10ng de DNA (DNA genômico de *T. rubrum* ou pCSN43), 0,2µl de *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (5U/µl) (*Invitrogen*). As condições de amplificação foram: 94°C por 2 min, 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 60°C por 45 seg, 68°C por 2 min, seguidos por uma extensão final de 68°C por 10 min.

Para a segunda etapa de PCR foram realizadas reações com volume final de 50µl, contendo 1µl de dNTPs (10mM), 2µl MgSO₄ (50mM), 5µl Tampão da Taq (10X), 0,2µl de *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (5U/µl) (*Invitrogen*). Nesta reação, não se usa oligonucleotídeos iniciadores, apenas os três fragmentos do 1º PCR, na seguinte proporção: 100ng : 300ng : 100ng (5'UTR : Higo^R : 3'UTR). As condições de amplificação foram: 94°C por 2 min, 26 ciclos de 94°C por 30 seg, 50°C por 30 seg, 68°C por 5 min, seguidos por uma extensão final de 68°C por 4 min.

Para amplificação dos produtos fusionados (terceira etapa de PCR), foram realizadas reações com volume final de 50µl, contendo 0,5µl do produto da segunda reação de PCR, 20 µmol de cada oligonucleotídeo (*Nested F* e *Nested R*), 2µl de MgSO₄ (50mM), 1µl dNTP (10mM), 5µl Tampão da Taq (10X), 0,2µl de *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (5U/µl) (*Invitrogen*). As condições de amplificação foram: 94°C por 2 min, 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 58°C por 30 seg, 68°C por 5 min, seguidos por uma extensão final de 68°C por 4 min. Os produtos da primeira e da terceira etapas de PCR foram analisados em gel de agarose 0,8% para confirmar a amplificação dos produtos de tamanho esperado, de acordo com a tabela 12.

4.18.2 Metodologia do *Split-marker*

A metodologia do *split-marker* (Catlett, 2003), também foi utilizada para a construção de cassetes de inativação gênica. Nessa metodologia ocorre a formação de dois fragmentos, além de serem necessários três eventos de recombinação homóloga para que ocorra a substituição do gene de interesse pela construção contendo a deleção e a marca de resistência (figura 06).

Figura 06: Estratégia de transformação com marcador dividido *split marker*. Nesta metodologia, três eventos de recombinação devem ocorrer, uma para que a sequência do gene que codifica o marcador de seleção fique intacta e a linhagem adquira resistência, e outras duas para recombinações envolvendo as âncoras homólogas ao gene que se pretende inativar (Fonte: Adaptado de Kuck e Hoff, 2010).

Partindo do produto de PCR de fusão obtido no item 4.17.1.1, foram amplificados dois fragmentos que consistem do fragmento 5' contendo a âncora e parte do gene da higromicina e o fragmento 3' contendo a outra âncora e parte do gene da higromicina, conforme esquematizado na figura 06. Aproximadamente 390pb do gene da higromicina está presente (sobrepondo) em ambos os fragmentos 5'e 3', de forma que a marca de resistência só fica íntegra se ocorrer um evento de recombinação homóloga entre os fragmentos 5'e 3' (figura 07).

Figura 07: Esquema ilustrando oligonucleotídeos utilizados para amplificação de fragmentos 5'e 3' do cassete de inativação utilizados na metodologia de *split-marker*.

Na tabela 13 estão descritos os oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos fragmentos 5' e 3' de *bZIP/cys-3*, contendo parte do gene de higromicina.

Tabela 13: Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação de fragmentos 5'e 3'de *bZIP/cys-3* utilizados na metodologia de *split-marker*

Oligonucleotídeo	Sequência 5'- 3'	Tamanho (pb)
1. <i>bZIP/cys-3-Nested F</i>	5'GGCAATCTAAAACGGCAG 3'	1865 ⁽¹⁾
2. <i>Hygro 5'Rev</i>	5'GATGTTGGCGACCTCGTATT 3'	
3. <i>Hygro_interno_F</i>	5'CTGCCTGAAACCGAACTGC 3'	2501 ⁽²⁾
4. <i>bZIP/cys-3-Nested R</i>	5'TAGACCTGTATGGCTTGGC 3'	

Cassete *bZIP/cys-3*(⁽¹⁾ fragmento 5' ⁽²⁾ fragmento 3')

4.18.3 Transformação fúngica

Os cassetes de inativação construídos foram utilizados para transformar conídios da linhagem selvagem de *T. rubrum* por eletroporação (Dobrowolska e Staczek, 2009). Aproximadamente 1×10^7 conídios de *T. rubrum* foram inoculados em 20ml de meio YG (0,5% extrato de levedura, 2% glicose) e incubados a 37°C por 2h, sob agitação (100rpm). Após centrifugação a $4000 \times g$ por 5 min, os conídios foram lavados duas vezes com 50ml de água esterilizada, ressuspensos em 2ml de YED (1% extrato de levedura, 1% glicose, 20mM HEPES, pH8,0) e incubados a 30°C por 45 min (agitação a 100rpm). Os conídios foram coletados por centrifugação e então ressuspensos em 1ml de tampão de eletroporação (50mM manitol, 1mM HEPES). Foram misturados 100µl desta solução de conídios e 1µg de DNA linear (cassete de inativação), a mistura foi colocada em gelo por 15 min, e então transferida para cubetas de eletroporação de 2cm. Os parâmetros de eletroporação foram 25µF, 600Ω e 1,5Kv. Após o choque elétrico, foi adicionado 1ml de YED gelado e a mistura foi incubada em gelo por 20 min e depois a 30°C por 1h. Os transformantes foram selecionados em meio Sabouraud contendo 450µg/ml higromicina, concentração que a linhagem selvagem é sensível, após 5 a 7 dias de incubação a 28°C.

Para verificar se houve recombinação homóloga, o DNA genômico das linhagens foi extraído e amplificado com oligonucleotídeos 5'F e 3'R de cada gene (Tabela 12), que amplificam fora da construção do cassete de inativação. Para o gene *bZIP/cys-3*, é esperado um produto com tamanho de 2.533pb para a linhagem selvagem e 4.193pb para a inativada.

Após essa primeira verificação, o DNA genômico dos transformantes que apresentarem o tamanho do fragmento recombinado esperado para uma linhagem inativada, será digerido com enzimas de restrição e utilizados para experimentos de *Southern blot* com o gene da higromicina e com o gene de interesse, marcados por quimioluminescência.

Resultados

Discussão

Conclusões

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achterman RR, White TC. A foot in the door for dermatophyte research. **Plos Pathog.** 8(3) e1002564, 2012.
- Alarco A. M. e Raymond M. The bZip Transcription Factor Cap1p Is Involved in Multidrug Resistance and Oxidative Stress Response in *Candida albicans*. **J Bacteriol** 181 (3), 700-708. 1999.
- Albrecht D, Guthke R, Kniemeyer O, Brakhage AA. **Systems biology of human-pathogenic fungi**. In: Daskalaki A. (Ed.), Handbook of Research on Systems Biology Applications in Medicine. Vol. 1. IGI Global, pp. 403–421. 2008.
- Ameen M. Epidemiology of superficial fungal infections. **Clin Dermatol**; 28 (2): 197-201. 2010.
- Apodaca, G. e Mckerrow, J. H. Regulation of *Trichophyton rubrum* proteolytic activity. **Infect Immun** 57(10): 3081-90.1989.
- Atlas RM. **Handbook of microbiological media**. Edited by Lawrence C. Perks.Ed. 1993.
- Baeza LC, Bailão AM, Borges CL, Pereira M, Soares CMA, Mendes-Giannini MJ. cDNA representational difference analysis used in the identification of genes expressed by *Trichophyton rubrum* during contact with keratin. **Microbes Infect** 9, 1415-1421. 2007.
- Bailão AM, Schrank A, Borges CL, Dutra V, Molinari-Madlum WIE, Soares Felipe MS, Soares, CMA. Differential gene expression by *Paracoccidioides brasiliensis* in host interaction conditions: representational difference analysis identifies candidate genes associated with fungal pathogenesis. **Microbes Infect** 8, 2686-2697. 2006.
- Bailão AM, Shrank A, Borges CL, Parente JA, Dutra V, Felipe MS, Fiúza RB, Pereira M, de Almeida Soares CMA. The transcriptional profile of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells is influenced by human plasma. **FEMS Immunol Med Microbiol.** (1): 43-57. 2007.
- Bartholomew, C. R., T. Suzuki, Z. Du, S. K. Backues, M. Jin. Ume6 transcription factor is part of a signaling cascade that regulates autophagy. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 109: 11206–11210. 2012.
- Behrends C, Sowa ME, Gygi SP, Harper JW. Network organization of the human autophagy system. **Nature.** 466: 68-76. 2010.

Blommaert EF, Krause U, Schellens JP, Vreeling-Sindelárová H, Meijer AJ. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. **Eur J Biochem.** 1997.

Brouta, F, Descamps, F, Fett, T, Losson, B, Gerday, C, Mignon, B. Purification and characterization of a 43 center dot 5kDa keratinolytic metalloprotease from *Microsporium canis*. **Med Mycol.** 39, 269-275. 2001.

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

Catlett, N. L., Lee, B. N., Yoder, O. C. e Turgeon, B. G. Split-marker recombination for efficient targeted deletion of fungal genes. **Fungal Genet Newsl** 50, 9-11. 2003.

Cazzaniga, R. A. Caracterização funcional do fator de transcrição PacC do dermatófito *Trichophyton rubrum*: regulação da expressão gênica em resposta ao pH ambiente e na interação com moléculas do hospedeiro. (Tese de Doutorado em Genética) - Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, **Universidade de São Paulo**, 2011.

Cervelatti, E. P., Ferreira-Nozawa, M. S., Aquino-Ferreira ,R., Fachin, A. L. e Martinez-Rossi, N. M. Electrophoretic molecular karyotype of the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Genet. Mol. Biol.**, 27, 99-102. 2004.

Chakraborty BN, Kapoor M. Transformation of filamentous fungi by electroporation. **Nucleic Acids Res**, 18(22):6737. 1990.

Chang YY, Juhász G, Goraksha-Hicks P, Arsham AM, Mallin DR, Muller LK, Neufeld TP. Nutrient-dependent regulation of autophagy through the target of rapamycin pathway. **Biochem Soc Trans.** (1):232-6. 2009.

Chen, M.; Lopes, J. M. Multiple basic helix-loop-helix proteins regulate expression of the *ENO1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryot. cell**, 6: 786-96. 2007.

Cole, L.; Orlovich, D. A.; Ashford, A. E. Structure, Function, and Motility of Vacuoles in Filamentous. **Fungal Genet. Biol.**, 24, 86-100. 1998.

Corrêa LG, Riaño-Pachón DM, Schrago CG, dos Santos RV, Mueller-Roeber B, Vincentz M. The role of bZIP transcription factors in green plant evolution: adaptive features emerging from four founder genes. **Plos One.** 13, 2944-60. 2008.

Cove DJ. The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus*. **CRC Press**.786. 1966.

Davis, R.H. *Neurospora: Contributions of a Model Organism*. Oxford University Press, Inc. New York. 319. 2000.

Degreef H. Clinical forms of dermatophytosis (ringworm infection). **Mycopathologia** 166, 257-265. 2008.

Dementhon K, Saupe SJ, Clavé C. Characterization of IDI-4, a bZIP transcription factor inducing autophagy and cell death in the fungus *Podospora anserina*. **Mol Microbiol** 53(6), 1625-40. 2004.

Dennis PB, Jaeschke A, Saitoh M, Fowler B, Kozma SC, Thomas G. Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. **Science**. 2001.

Dobrowolska, A. e Staczek, P. Development of transformation system for *Trichophyton rubrum* by electroporation of germinated conidia. **Curr Genet** 55, 537-542. 2009.

Dongliang W, Dou X, Hashmi SB, Osmani SA. The Pho80-like cyclin of *Aspergillus nidulans* regulates development independently of its role in phosphate acquisition. **J Biol Chem**, (36): 37693-703, 2004.

Dorn, G. Phosphatase mutants in *Aspergillus nidulans*. **Science**, 150, 1183-1184. 1965.

Duek L, Kaufman G, Ulman Y, Berdicevsky I: The pathogenesis of dermatophyte infections in human skin sections. **Journal of Infection**, 48 (2): 175-180. 2004.

Durman, S.B., Menendez, A.B., Godeas, A.M., Variation in oxalic acid production and mycelial compatibility within field populations of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Soil Biol & Biochem**, 37, 2180–2184, 2005.

Ellis, D., D. Marriott, R. A. Hajjeh, D. Warnock, W. Meyer e R. Barton. Epidemiology: surveillance of fungal infections. **Med Mycol**, 38 (1), 173-82. 2000.

Esquenazi D, de Souza W, Alviano CS, Rozental S. The role of surface carbohydrates on the interaction of microconidia of *Trichophyton mentagrophytes* with epithelial cells. **FEMS micro. biol. lett.** 35(2):113-123. 2003.

Esquenazi D, Alviano CS, de Souza W, Rozental S. The influence of surface carbohydrates during in vitro infection of mammalian cells by the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Res. Microbiol**, 155(3):144-153. 2004.

Ettxebeste O, Herrero-García E, Araújo-Bazán L, Rodríguez-Urra AB, Garzia A, Ugalde U, Espeso EA. The bZIP-type transcription factor FlbB regulates distinct morphogenetic stages of colony formation in *Aspergillus nidulans*. **Mol Microbiol**. 73, 775-89.2009.

Ewing, B. e P. Green. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Res**, 8, 186-94. 1998.

Fachin AL, Ferreira-Nozawa MS, Maccheroni W Jr, 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** 55, 1093-1099. 2006.

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. Mutant of *Trichophyton rubrum* resistant to griseofulvin and tioconazole. **Mycopathologia** 135(3):141-143. 1996.

Fang Y, Vilella-Bach M, Bachmann R, Flanigan A, Chen J. Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. **Science**. 30; 294 (5548): 1942-5. 2001.

Favaron, F., Sella, L. e D'Ovidio, R. Relationships Among Endo-Polygalacturonase, Oxalate, pH, and Plant Polygalacturonase-Inhibiting Protein (PGIP) in the Interaction Between *Sclerotinia sclerotiorum* and Soybean. **MPMI**, 17, 12, 1402–1409, 2004.

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

Ferreira-Nozawa, M. S., Silveira, H. C., Ono, C. J. Fachin, A. L., Rossi, A. e Martinez-Rossi, N. M. The pH signaling transcription factor PacC mediates the growth of *Trichophyton rubrum* on human nail *in vitro*. **Med Mycol** 44, 641-645. 2006.

Fleck CB, Schöbel F, Brock M. Nutrient acquisition by pathogenic fungi: Nutrient availability, pathway regulation, and differences in substrate utilization. **Int J Med Microbiol**. 301: 400-407. 2011.

Foster R, Izawa T e Chua N-H. Plant bZIP proteins gather at ACGT elements. **FASEB J**. 8, 192-200. 1994.

Freitas, J. S., E. M. Silva e A. Rossi. Identification of nutrient-dependent changes in extracellular pH and acid phosphatase secretion in *Aspergillus nidulans*. **Genet Mol Res**, 6, 721-9. 2007.

Freitas, J. S., E. M. Silva, J. Leal, D. E. Gras, N. M. Martinez-Rossi, L. D. Dos Santos, M. S. Palma e A. Rossi. Transcription of the Hsp30, Hsp70, and Hsp90 heat shock protein genes is modulated by the PalA protein in response to acid pH-sensing in the fungus *Aspergillus nidulans*. **Cell Stress Chap**, 16, 565-72. 2011.

Fujii Y, Shimizu T, Toda T, Yanagida M, Hakoshima T. Structural basis for the diversity of DNA recognition by bZIP transcription factors. **Nat Struct Biol**.7 (10): 889-893. 2000.

Furukama, K; Hasunuma, K; Shinohara, Y. Characterization of Pirepressible enzymes secreted in culture media by *Neurospora crassa* wild-type cells and null type mutants. **J Bacteriol**. 169 (10): 4790-4795. 1987.

Gibson, K. E.; Kobayashi, H.; Walker, G. C. Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. **Annu. Rev. Genet.**, 42, 413-441, 2008.

Gras DE, Persinoti GF, Peres NT, Martinez-Rossi NM, Tahira AC, Reis EM, Prade RA, Rossi A. Transcriptional profiling of *Neurospora crassa*Δ*mak-2* reveals that mitogen-activated protein kinase MAK-2 participates in the phosphate signaling pathway. **Fungal Genet Biol**. 2013.

Grotelueschen J; Peleg, Y; Glass, N.L; Metzenberg, R.L. Cloning and characterization of the *pho-2+* gene encoding a repressible alkaline phosphatase in *Neurospora crassa*. **Gene**. 144(1): 147-148. 1994.

Hagiwara D, Asano Y, Yamashino T, Mizuno T. Characterization of bZIP-type transcription factor AtfA with reference to stress responses of conidia of *Aspergillus nidulans*. **Biosci Biotechnol Biochem**, 72, 2756-60. 2008.

Han, S. W., Nahas, E. e Rossi, A. Regulation of synthesis and secretion of acid and alkaline phosphatases in *Neurospora crassa*. **Current Genetics**, 11, 521-527. 1987.

Huang X, Li Y, Niu Q, Zhang K. Suppression Subtractive Hybridization (SSH) and its modifications in microbiological research. **Appl Microbiol Biotechnol** 76, 753-760. 2007.

Huang, X. e A. Madan.CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Res**, 9, 868-77. 1999.

Hummert S, Hummert C, Schröter A, Hube B, Schuster S. Game theoretical modelling of survival strategies of *Candida albicans* inside macrophages. **J Theor Biol**, 64: 312–318. 2010.

Hung, C.-Y., Yu, J.-J., Seshan, K. R., Reichard, U., e Cole, G.T. A parasitic hase-specific adhesin of *Coccidioides immitis* contributes to the virulence of this respiratory fungal pathogen. **Infect. Immun**, 70: 3443–3456. 2002.

Hung, YC, Xue, J, Cole, GT. Virulence Mechanisms of *Coccidioides*. **Ann. NY Acad. Scienc**, 1111, 225-235.2007.

Inoue, Y., Suzuki, T., Hattori, M., Yoshimoto, K., Ohsumi, Y., Moriyasu, Y. AtATG genes, homologs of yeast autophagy genes, are involved in constitutive autophagy in Arabidopsis root tip cells. **Plant Cell Physiol**, 47, 1641–1652. 2006.

Jacob, T. R., Peres, N. T., Persinoti, G. F., Silva, L. G., Mazucato, M., Rossi, A. e Martinez-Rossi, N. M. *rpb2* is a reliable reference gene for quantitative gene expression analysis in the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Med Mycol**, 50 (4): 368-77.2012.

Johannesson H, Townsend JP, Hung CY, Cole GT, Taylor JW. Concerted evolution in the repeats of an immunomodulating cell surface protein, SOWgp, of the human pathogenic fungi *Coccidioides immitis* and *C. posadasii*. **Genetics**, 171: 109–117. 2005.

Jousson, O., Lechenne, B., Bontems, O., Mignon, B., Reichard, U., Barblan, J., Quadroni, M. and Monod, M. Secreted subtilisin gene family in *Trichophyton rubrum*. **Gene**, 339: 79-88.2004.

Kang, S.; Metzenberg, R. L. Molecular analysis of *nuc-1+*, a gene controlling phosphorus acquisition in *Neurospora crassa*. **Mol. Cell. Biol**, 10: 5839-5848. 1990.

Kato-Maeda, M.; Gao Q.; Small, P. M.; Microarray analysis of pathogens and their interaction with hosts. **Cell. Microbiol.**, 3, 713-719, 2001.

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

Kent N. A., Eibert S. M., Mellor J. Cbf1p is Required for Chromatin Remodeling at Promoter-proximal CACGTG Motifs in Yeast. **J Biol Chem** 279 (26), 27116 – 27123. 2004.

Khan IA, Lu JP, Liu XH, Rehman A, Lin FC: Multifunction of autophagy-related genes in filamentous fungi. **Microbiol Res**, 167 (6):339-345. 2012.

Kronstad JW, Hu G, Jung WH. An encapsulation of iron homeostasis and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Trends Microbiol**. 21(9): 457-65, 2013.

Kuck U, Hoff B. New tools for the genetic manipulation of filamentous fungi. **Appl Microbiol Biotechnol**, 86 (1): 51-62, 2010.

Kumamoto, CA. Molecular mechanisms of mechanosensing and their roles in fungal contact sensing. **Nature Rev. Microbiol.** 6, 667-673. 2008.

Lamb, T. M., Xu, W., Diamond, A. e Mitchell, A. P. Alkaline response genes of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to the *RIM101* pathway. **J. Biol. Chem.**, 276, 1850-1856. 2001.

Leal, J., Squina, F. M., Martinez-Rossi, N. M. e Rossi, A. The transcription of the gene for isoorotate decarboxylase (IDCase), an enzyme of the thymidine salvage pathway, is downregulated in the *preg^c* mutant strain of *Neurospora crassa* grown under phosphate starvation. **Can J Microbiol**, 53, 1011-1015. 2007.

Lee, Geon-Ho, Jae-Han Bae, Min-Jung Suh, In-Hwan Kim, Ching T. Hou, e Hak-Ryul Kim. New Finding and Optimal Production of a Novel Extracellular Alkaline Lipase from *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-2178. **J. Microb. Biotech.**, Korea, 17, 6, 1054–1057, 2007.

Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. **Cell**. 132 (1): 27-42. 2008.

Levine, B. e Yuan, J. Autophagy in cell death an innocent convict? **J. Clin. Invest.** 115 (10): 2679-88. 2005.

Lin, Chin Jia, e Barbosa, Angela Silva. Técnicas de Análise da Regulação da Transcrição Gênica e suas Aplicações na Endocrinologia Molecular. **Arq. Bras. Endoc Metabol**, 46 (4), 330-340. 2002.

Liu XH, Gao HM, Xu F, Lu JP, Devenish RJ, Lin FC. Autophagy vitalizes the pathogenicity of pathogenic fungi. **Autophagy**. 8 (10): 1415-25. 2012.

Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.** 8 (9): 741-52. 2007.

Mansour, S., Beckerich, J. M. e Bonnarne, P. Lactate and amino acid catabolism in the cheese-ripening yeast *Yarrowia lipolytica*. **Appl Environ Microbiol** 74 (21): 6505-12. 2008.

Maranhão, F. C., Paião, F. G. e Martinez-Rossi, N. M. Isolation of transcripts over-expressed in human pathogen *Trichophyton rubrum* during growth in keratin. **Microb Pathog**, 43 (4): 166-72. 2007.

Maranhão, F. C., Silveira, H. C., Rossi, A. e Martinez-Rossi, N. M. Isolation of transcripts overexpressed in the human pathogen *Trichophyton rubrum* grown in lipid as carbon source. **Can J Microbiol** 57 (4): 333-8.2011.

Martinez, D. A., B. G. Oliver, Y. Graser, J. M. Goldberg, W. Li, N. M. Martinez-Rossi, M. Monod, E. Shelest, R. C. Barton, E. Birch, A. A. Brakhage, Z. Chen, S. J. Gurr, D. Heiman, J. Heitman, I. Kosti, A. Rossi, S. Saif, M. Samalova, C. W. Saunders, T. Shea, R. C. Summerbell, J. Xu, S. Young, Q. Zeng, B. W. Birren, C. A. Cuomo e T. C. White. Comparative Genome Analysis of *Trichophyton rubrum* and Related Dermatophytes Reveals Candidate Genes Involved in Infection. **mBio**, 3 (5), 2012.

Martinez-Rossi N.M; Persinoti G.F; Peres N.T; Rossi A. Role of pH in the pathogenesis of dermatophytoses. **Mycoses**. (doi: 10.1111/j.1439-0507.2011.02162). 2011.

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

Massey, AC, Zhang, C e Cuervo, AM. Chaperone-mediated autophagy in aging and disease. **Curr.Top. Dev. Biol.** 73: 205-35. 2006.

Maza PK, Straus AH, Toledo MS, Takahashi HK, Suzuki E. Interaction of epithelial cell membrane rafts with *Paracoccidioides brasiliensis* leads to fungal adhesion and Src-family kinase activation. **Microbes Infect.** 10 (5): 540-7, 2008.

McGinnis MR. **Laboratory handbook of medical mycology**. Academic Press, New York. 1980.

McMahon JP, Wheat J, Sobel ME, Pasula R, Downing JF, Martin WJ 2nd. Murine laminin binds to *Histoplasma capsulatum*. A possible mechanism of dissemination. **J Clin Invest.** 96 (2):1010-7. 1995.

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

Mendes, N. S., Trevisan, G. L., Cruz, A. H. S., Santos, R. S., Peres, N. T., Martinez-Rossi, N. M. e Rossi, A. Transcription of *N*- and *O*-linked mannosyltransferase genes is modulated by the *pacC* gene in the human dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **FEBS OpenBio**, 2: 294-7. 2012.

Meshi T e Iwabuchi M. Plant transcription factors. **Plant Cell Physiol.** 36 (8), 1405-1420. 1995.

Metzenberg, R. L.; Chia, W. Genetic control of phosphorus assimilation in *Neurospora crassa*: dose-dependent dominance and recessive ness in constitutive mutants. **Genetics**, 93: 625-43. 1979.

Metzenberg, R.L. Implications of some genetic control mechanisms in *Neurospora*. **Microbiol Rev.** 43 (3): 361-383. 1979.

Mizushima N, Noda T, Yoshimori T, Tanaka Y, Ishii T, George MD, Klionsky DJ, Ohsumi M, Ohsumi Y. A protein conjugation system essential for autophagy. **Nature**. 395: 395-98. 1998.

Monod M. Secreted proteases from dermatophytes. **Mycopathologia**, 166, 285-294. 2008.

Moroyoqui, N. L. A.; Figueroa, S. S. R. Coccidioidomycosis. **Med. Int. México**. 24 (2), 125 – 141. 2008.

Mukherjee PK, Leidich SD, Isham N, Leitner I, Ryder NS, Ghannoum MA. Clinical *Trichophyton rubrum* strain exhibiting primary resistance to terbinafine. **Antimicrob Agents Chemother**, 47, 82-86.2003.

Murray, P. R., G. S. Kobayashi, M. A. Pfaller e K. S. Rosenthal. **Microbiologia Médica**. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, RJ. 755 pgs. 2004.

Myers LC, e Kornberg RD. Mediator of transcriptional regulation. **Annu Rev Biochem**, 69, 729-49. 2000.

Nahas, E., H. F. Terenzi e A. Rossi. 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, 2017-2021. 1982.

Ninomiya Y, Suzuki K, Ishii C, Inoue H. Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for non-homologous end-joining. **Proc Natl Acad Sci**, 101(33):12248-12253. 2004.

Nishizawa M, Tanigawa M, Hayashi M, Maeda T, Yazaki Y, Saeki Y, Toh-e A. Pho85kinase, a cyclin-dependent kinase, regulates nuclear accumulation of the Rim101transcription factor in the stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryot Cell**. 9 (6): 943-51, 2010.

Nosanchuk, Jieh-Juen, Y.; Chiung-Yu, H.; Casadevall A.; Cole, G. T. *Coccidioides posadasii* produces melanin in vitro and during infection. **Fungal Genet Biol**, 44 (6), 517- 520.2007.

Nozawa, S. R., G. Thedei, L. S. P. Crott, J. E. Barbosa e A. Rossi. The synthesis of phosphate-repressible alkaline phosphatase does not appear to be regulated by ambient pH in the filamentous mould *Neurospora crassa*. **Braz. J. Microb.**, 33, 92-95. 2002.

Nozawa, SR; Ferreira-Nozawa, MS; Martinez-Rossi, NM; Rossi, A. The pH-induced glycosylation of secreted phosphatases is mediated in *Aspergillus nidulans* by the regulatory gene *pacC*-dependent pathway. **Fungal Genet Biol**, 39, 286-295. 2003.

Ogawa, N; DeRisi, J; Brown, P.O. New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis. **Mol Biol Cell**. 11(12): 4309-4321. 2000.

Okada, H e Mak, TW. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumor cells. **Nat. Rev. Cancer**. 4 (8): 592-603. 2004.

Onodera J., Ohsumi, Y. Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation. **J Biol Chem**. 280: 31582–31586. 2005.

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

Paietta, John V. DNA-binding specificity of the CYS3 transcription factor of *Neurospora crassa* defined by binding-site selection. **Fungal Genet Biol**, 45, 1166-1171. 2008.

Palma, M. S., Han, S. W. e Rossi, A. Dissociation and Catalytic Activity of Phosphate-Repressible Alkaline-Phosphatase from *Neurospora crassa*. **Phytochemistry** 28, 3281-3284. 1989.

Paytan, A.; McLaughlin, K. The oceanic phosphorus cycle. **Chem. Rev.**, 107: 563-576. 2007.

Peleg, Y.; Aramayo, R.; Kang, S.; Hall, J. G.; Metzenberg, R. NUC-2, a component of phosphate-regulated signal transduction pathway in *Neurospora crassa*, is an ankyrin repeat protein. **Mol. Gen. Genet**. 252, 709-716. 1996.

Peleg, Y.; Metzenberg, R. L. Analysis of the DNA-binding and dimerization activities of *Neurospora crassa* transcription factor NUC-1. **Mol. Cell Biol.**, 14: 7816-26. 1994.

Peres NTA. Perfil transcricional do fungo patogênico *Trichophyton rubrum* durante a interação com células da epiderme e o efeito de antifúngicos que interferem com a resposta osmótica. (Tese de Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) - Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, **Universidade de São Paulo**, 2009.

Peres, N. T., Maranhao, F. C., Rossi, A. e Martinez-Rossi, N. M. Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. **An Bras Dermatol**, 85 (5): 657-67. 2010a

Peres, N.T.A.; Sanches, P.R.; Falcão, J.P.; Silveira, H.C.S.; Paião, F. G.; Maranhão, F.C.A.; Gras, D.E.; Segato, F.; Cazzaniga, R. A.; Mazucato, M.; Cursino-Santos, J.R.; Aquino-Ferreira, R.; Rossi, A.; Martinez-Rossi, N. M. Transcriptional profiling reveals the expression of novel genes in response to various stimuli in the human dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **BMC Microbiology**.10 (39).1-10. 2010b.

Persson, B. L.; Lagerstedt, J. O.; Pratt, J. R.; Granberg-Pattison, J.; Lundh, K.; Shokrollahzadeh, S.; Lundh, F. Regulation of phosphate acquisition in *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr. Genet.**, 43: 225-244. 2003.

Pollack JK, Harris SD, Marten MR. Autophagy in filamentous fungi. **Fungal Genet Biol**. 46(1):1-8, 2009.

Ramón AM, Fonzi WA. Diverged binding specificity of Rim101p, the *Candida albicans* ortholog of PacC. **Eukaryot Cell**. 2 (4):718-28, 2003.

Rappleye CA, Goldman W E. Defining virulence genes in the dimorphic fungi. **Annu Rev Microbiol**. 60: 281-303. 2006.

Reggiori, F., Klionsky DJ. Autophagy in the eukaryotic cell. **Eukaryot Cell**.1 (1): 11-21. 2002.

Reggiori, F., Klionsky, D. J. Autophagosomes: biogenesis from scratch? **Curr. Opin. Cell Biol.**, 17, 415-422, 2005.

Reggiori F, Klionsky DJ. Autophagic processes in yeast: mechanism, machinery and regulation. **Genetics**. 194(2):341-61, 2013.

Richie, D. L e Askew D.S. Autophagy a role in metal ion homeostasis? **Landes Bioscience**, 4:1, 115-117. 2008.

Riechmann JL, Ratcliffe OJ. Arabidopsis transcription factors and the regulation of flowering time: a genomic perspective. **Curr. Mol. Biol**. 4, 77-91. 2002.

Rollins, J.A, Dickman, M.B. pH Signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: Identification of a *pacC/RIM1* Homolog. **App. Envir Microbiol**, 67, 01, 75-81, 2001.

Romanowski K, Zaborin A, Valuckaite V, Rolfes RJ, Babrowski T, Bethel C, Olivas A, Zaborina O, Alverdy JC. *Candida albicans* isolates from the gut of critically ill patients respond to phosphate limitation by expressing filaments and a lethal phenotype. **Plos One**, 7 (1), 2012.

Rossi, A, Cruz, AHS, Santos, RS, Silva, PM, Silva, EM, Mendes, NS, Martinez-Rossi, NM. Ambient pH Sensing in Filamentous Fungi: Pitfalls in Elucidating Regulatory Hierarchical Signaling Networks. **IUBMB Life**, 2013, *in press*.

Rubinsztein DC, Gestwick, JE, Murphy LO, Klionsky, DJ. Potential therapeutic applications of autophagy. **Nat. Rev. Drug Discov**. 6 (4): 304-12. 2007.

Ruiz-Diez B. Strategies for the transformation of filamentous fungi. **J Appl Microbiol**, 92 (2): 189-195. 2002.

Ruiz-Herrera J, Victoria Elorza M, Valentin E. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. **FEMS Yeast Res**. 6:14–29. 2006.

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

Schaechter, M., N. C. Engleberg, B. J. Eisenstein e G. Medoff. **Microbiologia: Mecanismos das Doenças Infecciosas**. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, RJ. 642 pgs. 2002.

Seebacher, C., J. P. Bouchara e B. Mignon. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. **Mycopathologia**, 166, 335-52. 2008.

Segal DJ, Stege JT, Barbas CF. Zinc Fingers and green thumb: manipulating gene expression in plants. **Curr. Opin. Plant Biol**. 6,163-168. 2003.

Selvig, K. e Alspaugh, J.A. pH response pathways in fungi: adapting to host-derived and environmental signals. **Mycobiol** 39, 249–256. 2011.

Shelest E. Transcription factors in fungi. **FEMS Microbiol Lett**, 286 (2): 145-51. 2008.

Shpilka T, Weidberg H, Pietrokovski S, Elazar Z: Atg8: an autophagy-related ubiquitin-like protein family. **Genome Biol** 12 (7): 226, 2011.

Sikander, A.; Hameedullah R.; Ikram, U. H. Production of an extracellular lipase from *Candida lipolytica* and parameter significance analysis by Plackett Burman design. **Revista Eng. Life Science**, Pakistan, 10, 5, 465-473, 2010.

Silva, E. M., Freitas, J. S., Gras, D. E., Squina, F. M., Leal, J. Silveira, H. C. S., Martinez-Rossi, N. M. e Rossi, A. Identification of genes differentially expressed in a strain of the mold *Aspergillus nidulans* carrying a lost-of-function mutation in the *palA* gene. **Can J Microbiol** 54, 803-811. 2008.

Silveira, H. C., Gras, D. E., Cazzaniga, R. A., Sanches, P. R., Rossi, A. e Martinez-Rossi, N. M. Transcriptional profiling reveals genes in the human pathogen *Trichophyton rubrum* that are expressed in response to pH signaling. **Microb Pathog** 48 (2): 91-6.2010.

Sobera JO, Elewski BE. **Fungal Diseases**. In: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP, editors. Dermatology. 2ª ed. Madrid: Mosby Elsevier; p.1135-48, 2008.

Souza, C. R. B., Almeida ERP ; Carvalho LJCB, Gander ES. Studies Toward The Identification of Transcription Factors In *Cassava* Storage Root. **Braz. J. Plant Phys.** 15, 167-170. 2003.

Squina FM, Leal J, Cipriano VT, Martinez-Rossi NM, Rossi A. Transcription of the *Neurospora crassa* 70-kDa class heat shock protein genes is modulated in response to extracellular pH changes. **Cell Stress Chap.** 2010.

Suzuki K, Kirisako T, Kamada Y, Mizushima N, Noda T, Ohsumi Y. The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of ATG genes is essential for autophagosome formation. **Embo J.** 20 (21): 5971-81. 2001.

Takeshige, K., M. Baba, S. Tsuboi, T. Noda, e Y. Ohsumi. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. **J. Cell Biol.** 119: 301–311. 1992.

Thedei Jr., G., Nozawa, S.R., Simões, A.L., Rossi, A. Gene *pho-2* codes for the multiple active forms of Pi-repressible alkaline phosphatase in the mould *Neurospora crassa*. **World J. Microb. Biotech.** 13, 609-611. 1997.

Thedei Jr., G., T. H. Doubowetz e A. Rossi. 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**, 27, 1129-34. 1994.

Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. e Higgins, D. G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res** 25 (24): 4876-82.1997.

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

Trevisan, G. L., Oliveira, E. H., Peres, N. T., Cruz, A. H.S., Martinez-Rossi, N. M. e Rossi, A. Transcription of *Aspergillus nidulans* pacC is modulated by alternative RNA splicing of *palB*. **FEBS Lett** 585 (21): 3442-5.2011.

Tsuboi, R., I. J. Ko, K. Takamori e H. Ogawa. Isolation of a keratinolytic proteinase from *Trichophyton mentagrophytes* with enzymatic activity at acidic pH. **Infect Immun**, 57, 3479-3483. 1989.

Vermout, S., J. Tabart, A. Baldo, A. Mathy, B. Losson e B. Mignon. Pathogenesis of dermatophytosis. **Mycopathologia**, 166, 267-75. 2008.

Vicentini, A. P.; Gesztesi, J.L.; Franco, M.F.; de Souza, W.; de Moraes, J.Z.; Travassos, L.R.; Lopes, J.D. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. **Infect. Immun.** 62, 1465-1469. 1994.

Vincentz, M, Schlögl, PS, Corrêa, LG, Küne, F, Leite, A. Phylogenetic relationships between Arabidopsis and sugarcane bZIP transcriptional regulatory factors. **Genet. Mol. Biol.** 24, 55-60. 2001.

Vincentz, M. ; Bandeira-Kobarg, C. ; Gauer, I. ; Schlögl, P. S. ; Leite, A. Evolutionary Pattern of Angiosperm bZIP Factors Homologous to the Maize Opaque2 Regulatory Protein. **J. Mol. Evol.** 56, 105-116. 2003.

Weitzman, I. e R. C. Summerbell. The Dermatophytes. **Clin Microbiol Rev**, 8, 240-259. 1995.

Whiston E, Zhang Wise H, Sharpton TJ, Jui G, Cole GT, Taylor JW. Comparative transcriptomics of the saprobic and parasitic growth phases in *Coccidioides spp.* **Plos One**. 2012.

White, T., B. G. Oliver, Y. Gräser e M. R. Henn. Generating and testing molecular hypotheses in the Dermatophytes. **Eukariotic Cell**. 2008.

Williams ME, Foster R e Chua N. Sequences flanking the hexameric G-Box core CACGTG affect the specificity of protein binding. **The Plant Cell**. 4, 485-496. 1992.

Wirawan E, Vanden Berghe T, Lippens S, Agostinis P, Vandenabeele P. Autophagy: for better or for worse. **Cell Res**. 22 (1): 43-61, 2012.

Wise RP, Moscou MJ, Bogdanove AJ, Whitham SA. Transcript profiling in host-pathogen interactions. **Ann. Rev. Phytopathol** 45, 329-369. 2007.

Wu, D; Dou, X; Hashmi, SB; Osmani, SA. The Pho80-like cyclin of *Aspergillus nidulans* regulates development independently of its role in phosphate acquisition. **J. Biol. Chem.**, 279, 37693-703. 2004.

Wu J, Dang Y, Su W, Liu C, Ma H, Shan Y, Pei Y, Wan B, Guo J, Yu L. Molecular cloning and characterization of rat LC3A and LC3B--two novel markers of autophagosome. **Biochem Biophys Res Commun.** 6, 339 (1): 437-42, 2006.

Yorimitsu T, Klionsky DJ: Autophagy: molecular machinery for self-eating. **Cell Death Differ** 12 (2): 1542-1552, 2005.

Yu JH, Hamari Z, Han KH, Seo JA, Reyes-Dominguez Y, Scazzocchio C: Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. **Fungal Genet Biol** 41 (11): 973-981. 2004.

Zacchi LF, Gomez-Raja J, Davis DA. Mds3 regulates morphogenesis in *Candida albicans* through the TOR pathway. **Mol Cell Biol**, 30:3695-710. 2010.

Zhang Y.; Zhang G.; Ning G.; Wang X.; Huang L.; Kang Z. Cloning and characterization of a bZIP transcription factor gene in wheat and its expression in response to stripe rust pathogen infection and abiotic stress. **Phys. mol plant pathology** .73, 88-94. 2009.

Anexos

ANEXOS

Anexo 01: Estágio de Doutorado em Bioquímica e Biologia de Sistemas - Bioinformática, Berlim – Alemanha (2012).

O Estágio de Doutorado em Bioquímica e Biologia de Sistemas - Bioinformática, ocorreu na cidade de Berlim (Alemanha) no *Computational Systems Biology Group, Institute for Molecular Genetics - International Max Planck Research School e Humboldt-Universität zu Berlin*, sob supervisão da Profa. Dra. Edda Klipp. As atividades foram realizadas dentro do projeto: “*Genomics and Systems Biology of Molecular Networks*”, com suporte financeiro da CAPES PROEX (Mobilidade Internacional) - Departamento de Genética (FMRP-USP) e da Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência – FAEPA (HC-FMRP/USP).

HUMBOLDT-UNIVERSITÄT ZU BERLIN

HJ Institut für Biologie - Theoretische Biophysik - Invalidenstr. 42 - 10115 Berlin

To
Rodrigo da Silva Santos, M.Sc
 Dept. of Genetics
 School of Medicine of Ribeirão Preto
 University of São Paulo, SP
 Brazil

Mathematisch-
 Naturwissenschaftliche
 Fakultät I

Institut für Biologie

Theoretische Biophysik

Prof. Dr. Dr. h.c. Edda Klipp

(Ref.): PhD-stage of one week in our Theoretical Biophysics Group (Computational Systems Biology Group) - Institute for Biology of Humboldt-Universität zu Berlin and International Max Planck Research School, Institute for Molecular Genetics, Computational Biology and Scientific Computing. In the Period 18 to 22 June 2012.

Datum:
 21.06.2012

Bearbeiter/in:
 Sabine Wagnitz
 sabine.wagnitz@biologie.hu-berlin.de

To whom it may concern,

Hereby, I confirm that the researcher and PhD student Rodrigo da Silva Santos, M.Sc, visited my Computational Systems Biology Group, and held research stage/training in Biochemistry and Systems Biology/Bioinformatics (Genomics and Systems Biology of Molecular Networks). The training took place after the 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology 2012 (ISHAM 2012).

Postanschrift:
 Humboldt-Universität zu Berlin
 Institut für Biologie
 Theoretische Biophysik
 Invalidenstr. 42
 10115 Berlin

Tel: +49-30-2093 8698
 Fax: +49-30-2093 8813

Yours sincerely,

Prof. Dr. Dr. h.c. Edda Klipp

Verkehrsverbindungen:
 U-Bahnhof Naturkundemuseum:
 Linie U6
 Tram M6

S-Bahnhof Nordbahnhof:
 S-Bahn S1, S2, S25
 Tram M8, M10, 12

Bankverbindung:
 Berliner Bank
 BLZ 100 708 48
 Konto 512 6206 01
 BIC/SWIFT: DEUTDE33HAN
 IBAN: DE95 1007 0848 0512 6206 01

Anexo 02: Estágio de Doutorado “Sanduíche” em Genética Molecular e Biotecnologia Microbiana, Sevilla – Espanha (2012).

O Estágio de Doutorado “Sanduíche” em Genética Molecular e Biotecnologia Microbiana, foi realizado no Departamento de Genética e no *Centro de Investigación, Tecnología e Innovación* (CITIUS) no Campus de Excelência Internacional (CEI-Andalucía TECH) da Universidade de Sevilla (Espanha), sob supervisão do Prof. Dr. Sebastián Chávez de Diego em parceria estabelecida com o Prof. Dr. Antonio Rossi Filho. Durante o estágio foi desenvolvido o projeto “*Isolation of genes whose overexpression impairs growth of yeast cells lacking TFIIS*”, financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), *European Molecular Biology Laboratory (EMBL - Heidelberg/Germany)* e Ministério Espanhol de Investigação e Inovação. O doutorando recebeu suporte financeiro da CAPES-PROEX (Mobilidade Internacional) - Departamento de Genética (FMRP-USP) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Proc: nº 142311/2010-3).

Title: Isolation of genes whose overexpression impairs growth of yeast cells lacking TFIIS.
(PhD Student: Santos, RS)

TFIIS is a cleavage factor that allows backtracked RNA polymerase II to resume transcription elongation. *dst1Δ* yeast cells (lacking TFIIS) are viable but strongly sensitive to drugs causing depletion of NTP pools, like 6-azauracil (6AU) and mycophenolic acid (MPA). Negative genetic interactions between *dst1Δ* and other deletion mutations have been described; genetic suppressors of the *dst1Δ* sensitivity to NTP-depleting drugs have been also isolated. For instance, overexpression of *IMD2*, encoding IMP dehydrogenase, suppresses *dst1Δ* sensitivity to 6AU and MPA. Chavez’s lab has recently shown that mutations affecting the regulation of ribosomal protein genes can also suppress *dst1Δ* sensitivity to 6AU and MPA (Gómez-Herrero et al, 2012). These examples demonstrate the power of yeast genetics to define functional relationships across the genome. In order to increase our knowledge on TFIIS function, we will carry out a new genetic screening based on *dst1Δ*. In this case we will look for genes whose overexpression impairs *dst1Δ* growth, in the absence of any drug. In order to select for cells that are not proliferating, we will utilize a novel technique recently developed by the Chavez’s lab, based on single cell microencapsulation coupled to flow cytometry (Gómez-Herrero et al, 2012). Following this procedure, encapsulated yeast cells that are not able to form a microcolony can be sorted out by a flow cytometer. We will transform cells not expressing TFIIS, with a high copy gene library, and we will isolate those transformants that were unable to proliferate. Expression of TFIIS will then be induced, and those transformants that were rescue will be identified.

Schedule: Construction of a *GAL::DSTIS. cerevisiae* strain and Screening (Transformation of this strain with a 2microns gene library, microencapsulation, incubation in YPD medium, flow cytometry analysis, sorting for not growing cells, incubation in YPGal, sorting for growing microcolonies, confirmation of isolated clones, Sequencing and identification of positive clones.

Prof. Sebastián Chávez
 Departamento de Genética
 Facultad de Biología
 Avda. Reina Mercedes, 6
 E-41012 Sevilla
 Phone: +34-954550920
 Fax: +34-954557104
 schavez@us.es

Sevilla, 11 de Diciembre de 2012

A quien pueda interesar:

Rodrigo da Silva Santos ha realizado en mi laboratorio una estancia predoctoral de tres meses, desarrollando bajo mi supervisión el proyecto de investigación titulado "Isolation of genes whose overexpression impairs growth of yeast cells lacking TFIIIS". Durante este tiempo, el licenciado Santos ha venido completando con éxito las primeras fases del proyecto, demostrando una gran capacidad de trabajo y aprendiendo las nuevas técnicas necesarias para su realización. Entre las tareas realizadas cabe destacar la construcción de una nueva estirpe de la levadura *Saccharomyces*, necesaria para el proyecto, y la optimización del procedimiento de microencapsulación de levaduras para el escrutinio genético.

El rendimiento de Rodrigo ha sido muy satisfactorio y ha contribuido muy positivamente al proyecto, que esperamos ver concluido en los próximos meses.

Sebastián Chávez
 Catedrático de Genética
 Universidad de Sevilla

Anexo de Publicações

ANEXO DE PUBLICAÇÕES

J_ID: IUB Customer A_ID: IUB1217 Cadmus Art: IUB1217 Ed. Ref. No.: 13-0093-WJW.R2 Date: 9-October-13

Stage: Page: 1

Hypothesis

Ambient pH Sensing in Filamentous Fungi: Pitfalls in Elucidating Regulatory Hierarchical Signaling Networks

Antonio Rossi^{1*}
 Aline H. S. Cruz²
 Rodrigo S. Santos²
 Patricia M. Silva¹
 Emiliana M. Silva¹
 Nieve S. Mendes²
 Nilce M. Martinez-Rossi²

¹Department of Biochemistry and Immunology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

²Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

In this article, the experiments used to construct the ambient pH-signaling network involved in the secretion of enzymes by filamentous fungi have been reviewed, focusing on the phosphate-repressible phosphatases in *Aspergillus nidulans*. Classic and molecular genetics have been used to demonstrate that proteolysis of the transcription factor PacC at alkaline ambient pH is imperative for its action, implying that the full-length version is not an active molecular form of PacC. It

has been hypothesized that the transcriptional regulator PacC may be functional at both acidic and alkaline ambient pH, in either the full-length or the proteolyzed form, if it carries a *pal*-dependent molecular tag. The products of the *pal* genes are involved in a metabolic pathway that led to the synthesis of effector molecules that tag the *pacC* product, perhaps facilitating its proteolysis. © 2013 IUBMB Life, 00(00):000–000, 2013

Keywords: PacC activation; pH regulation; *pacC* gene; *pal* genes; phosphate sensing; Pi-repressible phosphatases; acid phosphatase; alkaline phosphatase

Introduction

The diverse molecular mechanisms used by filamentous fungi to sense and transduce environmental signals are mediated by a broad range of biochemical networks, in which interwoven metabolic pathways support cellular sensing and the transduction of a myriad of ambient signals (1). One such signal that is sensed and transduced by fungal cells is ambient pH (2–4). All microbial organisms must adapt physiologically to ambient pH changes by, for example, appropriately adjusting the secretion of nutritional enzymes with optimal activity accordingly, that is, phosphate (Pi)-repressible acid and alkaline phosphatases have their secretion increased at pH 5.0 and 8.0, respectively

(2,3). Coordination of environmental and nutrient sensing with the control of genetic responses to molecular signals is crucial for the growth and proliferation of most living organisms, including fungi, because the failure to regulate cellular responses to changing environmental pH would have a negative impact on the competitiveness of an organism. Thus, fungi have evolved elaborate signal transduction networks to allow adaptation to ambient pH changes (2,3,5–7). These metabolic pathways regulate the secretion of hydrolytic enzymes, membrane remodeling, cell adhesion, cellular transport, growth, development, iron uptake, stress, molecular defense, and virulence responses at both acidic and alkaline pH (8–12). Gene regulation by pH involves the highly conserved PacC/Pal signal transduction pathway that mediates a myriad of metabolic events in filamentous fungi and is widely accepted that it governs the response to neutral to alkaline pH. The *pacC* gene codes for a Zn-finger transcription factor, and the six *pal* genes (*pal A, B, C, F, H, and I*) are members of a signaling cascade that senses alkalinity and promotes the proteolytic activation of PacC (4,13–18). The alkaline ambient pH signal is sensed by the transmembrane proteins PalI and PalH (19) and transmitted from the plasma membrane complex to the endosomal membrane complex on the surface of the endosome,

© 2013 International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Volume 00, Number 00, Month/Month 2013, Pages 00–00

*Address correspondence to: Antonio Rossi, Department of Biochemistry and Immunology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, 14049-900 Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. E-mail: anrossi@usp.br

Received 9 June 2013; Accepted 25 September 2013

DOI 10.1002/iub.1217

Published online 00 Month 2013 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

IUBMB Life

1

ID: nareshrao Time: 13:33 | Path: N:/3b2/IUB#Vol00000/130081/APPF#e/JW-IUB#130081

IUBMB LIFE

possibly with the involvement of proteins PalC and PalF (20). The PacC protein undergoes a two-step proteolytic processing in response to neutral to alkaline pH (4). The PalA protein interacts with the YPX1A motifs in PacC⁷² (full-length version of PacC) mediating a protein-protein interaction, which is required for the proteolytic conversion of PacC⁷² to PacC⁵³. This proteolytic step is possibly mediated by PalB, a calpain-like cysteine protease. In the second, pH-independent step, PacC⁵³ is converted to PacC²⁷. The PacC²⁷ form prevents transcription in neutral to alkaline conditions of those genes expressed preferentially at acidic pH. Thus, whatever the ambient pH, loss-of-function mutations in the *pal* genes shall lead to a wild-type acidic growth phenotype, that is, the full-length version of PacC would be inactive in the absence of *pal* signaling or under acidic growth pH (4). However, it is uncertain whether the highly conserved PacC pathway governs only the expression of alkaline-responsive genes, and even if it is the sole mechanism that governs pH-responsive gene expression in fungi.

The *pacC/pal* Genes and Mutations

Several conserved genes in which mutations alter the response of fungi to ambient pH were first identified in the fungus *Aspergillus nidulans* by Dorn in the early 1960s (21). *A. nidulans* has optimal growth pH on solid medium at a pH near to 6.5. At least six genes have been identified for which a mutation interferes with pH regulation of the synthesis of Pi-repressible extracellular enzymes and permeases. Mutations in the *pal A*, *B*, *C*, *E*, and *F* genes increase colony staining for acid phosphatase at pH 4.8. By contrast, mutations in the *pacC* gene increase colony staining for alkaline phosphatase at pH 8.2. Dorn suggested that the *pacC* gene encoded a Pi-repressible acid phosphatase and that the *pal* genes encoded Pi-repressible alkaline phosphatases. These predictions assume that increased colony staining corresponds to an increased expression of both enzymes. Indeed, the early work of Dorn revealed that the *pacC5* mutant of *A. nidulans* synthesizes temperature-sensitive acid phosphatase, mutant *palB7*, a temperature-sensitive alkaline phosphatase, and mutant *palA1*, temperature-sensitive acid and alkaline phosphatases (21). In an attempt to interpret these and other data generated by classical genetics studies, Dorn proposed a hypothesis whereby acid and alkaline phosphatases may be composed of two different monomers, with one monomer common to two of these enzymes (PalcA), thus implying a structural function for the *pacC*, *palB*, and *palC* genes. However, the classic work of Caddick et al. (3) in the 1980s showed that mutations in any of the *pal* or *pacC* genes (e.g., *palA1*, *palB7*, *palF15*, *pacC5*, and *pacC14*) increased the levels of Pi-repressible acid (PacA) and alkaline (PalD) phosphatase, respectively, at pH 6.5. This finding implies that at a pH near 6.5, the *pal* and *pacC* mutants show a response similar to the wild-type strain at a more acidic and alkaline pH, respectively. The *pacC5* and the *pacC14* mutations are alleles and code for truncated proteins

in which the acidic C-terminal segment is absent; however, the zinc-finger region of PacC is conserved (4). A null mutant (*pacC*⁻) deleted for the entire *pacC* coding region mimics acidic growth conditions more extremely and, in addition, results in cryosensitive growth, poor growth, and conidiation. This strain is very sick probably because both the positive and negative actions of PacC are prevented. Classical and molecular genetics analyses have supported that the *pacC* gene is a wide-domain regulatory gene whose products directly mediate pH regulation, whereas the products of the *palA*, *B*, *C*, *E*, and *F* genes are involved in a metabolic pathway that leads to the synthesis of an effector molecule that interacts with the *pacC* product (3,13). This cognate effector molecule would be able to prevent the positive and negative action of the *pacC* gene; in other words, the product of the *pacC* gene acts positively on the transcription of *palD* and negatively on the transcription of *pacA* at alkaline pH (4). Thus, in the absence of a functional *pacC* product, the presence or absence of the cognate effector molecule would be of no consequence. In the absence of the cognate effectors, the derepression of *pacA* transcription at alkaline pH would occur. Interestingly, although the promoters of alkaline-expressed genes such as *ipnA*, *pacC*, and the alkaline protease-encoding *priA* contain a number of PacC-binding sites (consensus 5'-GCCARG-3'), the pH-regulated acid phosphatase-encoding *pacA* gene contains none in the 1,311-bp upstream of the initiation codon (4,22). Regardless of the underlying reason, it is clear that the structural and regulatory hypotheses are incompatible (23). As the regulatory nature of the *pacC* gene is now well documented, is it possible to reconcile these two hypotheses?

Secretion of Pi-Repressible Phosphatases and Other Hydrolytic Enzymes

Most microorganisms modulate their metabolic activities through a complex network that involves several genes that sense the availability of Pi. Under Pi shortage, this metabolic pathway signals for the derepression of phosphatases and transporters to satisfy the cellular demand for Pi. High Pi concentrations repress the function of PalcA, a transcriptional regulator homologous to the *Neurospora crassa* NUC-1 protein. PalcA is a highly conserved DNA-binding protein that is involved in the sensing of Pi deprivation. The promoter region of genes *pacA* and *palD* contains NUC-1-binding sites (consensus 5'-CACGTG-3'), and under conditions of Pi shortage, the NUC-1 repressor is removed. Consequently, the Pi-repressible phosphatases are transcribed (24–26).

The secretion of both acid and alkaline Pi-repressible phosphatases (among other proteins and enzymes) responds to ambient pH under the regulation of the Pal/PacC signal transduction pathway. Thus, if the *pal* genes represent metabolic steps involved in the activation of a single regulatory protein (transcription factor PacC), the molecular properties of the secreted Pi-repressible acid phosphatase, for example, should

C
O
L
O
R

FIG 1

Predicted PacC proteins: *PacC*⁷², *PacC*⁶³, *PacC*⁶², and *PacC*²⁷. Predicted DNA-binding domains in the proteins are indicated by red arrows. The predicted binding site residues in the *PacC*⁷² and *PacC*²⁷ proteins are indicated by the amino acid residue numbers, which were determined based on protein sequence. Predictions were generated using the I-TASSER server (30–32).

be identical in all *pal* mutants and wild-type strain. However, this is not the case, as indicated by the molecular mass, electrophoretic mobility, chromatographic behavior, thermostability, kinetic properties, and glycosylation of the acid phosphatases that are secreted by the *palA1*, *palB7*, *palC4*, and *palF15* mutant strains (27–29). We hypothesized that each of the *pal* genes perform specific functions in the activation of PacC including, in addition to proteolysis, other post-translational modifications, such as glycosylation. It is worth noting that a large number of enzymatic steps are necessary to accomplish the full glycosylation needed to secrete Pi-repressible phosphatases in the native form. Incomplete post-translational modifications may change the affinity of enzymes involved in tagging PacC, which probably occurred with the truncated *PacC14* protein, that is, *PacC14* affinity for the PacC-binding sites has F1 probably been changed (Fig. 1). It is likely that the alterations in steady-state kinetic properties, temperature sensitivity, and electrophoretic mobility reflect structural changes in the enzyme molecule synthesized by the *pal* and *pacC* mutant strains. For example, the acid phosphatase secreted by the *palB*⁺ strain at pH 6.5 showed hydrolytic activity over *p*-nitrophenyl phosphate (PNP-P) with negative cooperativity, whereas the enzyme secreted by the *palB7* mutant showed Michaelian behavior (23). This difference could explain the approximately twofold increase in the enzyme activity secreted by the *palB7* strain, as shown by colony staining or enzymatic hydrolysis of PNP-P. This occurs because enzymes showing Michaelian behavior hydrolyze substrate faster than isoenzymes showing

negative cooperativity, assuming that substrate concentrations are equivalent (23). The *pacC14* mutant should poorly secrete the Pi-repressible acid phosphatase, as irrespective of the ambient pH, the secretion of alkaline phosphatase would be predominant; however, this is also not the case. Indeed, the level of *pacA*-encoded acid phosphatase secreted by the *pacC14* mutant at pH 5.0 was comparable with that secreted by the *pacC*⁺ strain when the temperature of the fungal culture was decreased from 37 °C to 22 °C (8). Moreover, the *pacC14* mutation drastically reduced the mannose and *N*-acetylglucosamine content of the *pacA*-encoded acid phosphatase that was secreted at pH 5.0. In addition, the *pacA*-encoded acid phosphatase secreted by the *pacC14* mutant strain was not observed by staining for this enzyme in cultures grown at the restrictive temperature of 37 °C. Thus, it seems that one of the PacC-dependent metabolic responses to pH signaling in both *N. crassa* and *A. nidulans* is not transcriptional regulation of phosphatases, but rather the pH-dependent multistep glycosylation of secreted Pi-repressible phosphatases.

Is Proteolysis of the Transcription Regulator PacC Imperative for Its Function?

The molecular characterization of the *pal/pacC* genes of *A. nidulans* helped to improve the understanding of ambient pH signaling in fungi. The *pal* genes (*palA*, *B*, *C*, *F*, *H*, and *I*) are

C
O
L
O
R

FIG 2

Model proposed for the activation of PacC^{72} in response to ambient pH signaling. Predicted binding site residues in the PacC^{72} and PacC^{52} proteins are represented by DNA/protein interactions shown in red. PacC^{52} is the predicted truncated protein synthesized by the pacC^{14} mutant strain of *Aspergillus nidulans*. Truncated arrows (X) indicate inactivity of PacC^{52} in response to ambient pH signaling. The 3D predictions of the protein structure were generated using the I-TASSER server (30–32).

putative members of a signaling cascade involved in both acidic and alkaline ambient pH sensing. Their function is thought to be promotion of the proteolytic activation of PacC, as expression of C-terminal-truncated PacC derivatives suppresses *pal* mutant effects, as shown in the pacC^{55} , pacC^{14} , and other supposedly gain-of-function mutations. An interesting finding is that unlike *pacC*, transcription of the six *pal* genes is apparently not pH-regulated (19,33). The *pal* genes would be necessary for the proteolytic activation of PacC, that is, the full-length version of PacC (PacC^{72}) would be converted to PacC^{27} , the active form of PacC. However, this active metabolic phenotype was not confirmed in the pacC^{14} strain carrying a truncated *pacC* gene that transcribes a truncated PacC^{52} protein (Figs. 1 and 2). A full-length version of the *pacC*-1 gene cloned from *N. crassa* complemented the pacC^{14} mutation of *A. nidulans*. The acid and alkaline phosphatases secreted at pH 5.0 by the pacC^{14} mutant strain were both remediated in the pacC^{+} transformant, confirming a loss-of-function (rather than a gain-of-function) effect of the pacC^{14} mutation in *A. nidulans* (8). This finding implies that for the proteolytic activation of PacC it requires, in addition to the interaction of PacC^{72} with two PalA molecules (34), *pal*-dependent synthesis of another effector molecule that tags the *pacC* product. Interestingly, sequence prediction analyses suggest that

both PacC^{53} and PacC^{52} truncated proteins do not have an adequate conformation to show *in silico* DNA-binding properties (Fig. 1). Admitting that both structures bind DNA, they would have at least a lowered affinity for DNA binding, which would be enough to show differences in the transcription profiling of different genes. Thus, irrespective of ambient pH, if full-length PacC is inactive in the absence of *pal* signaling, loss-of-function mutations in any *pal* gene should lead to a defective metabolic phenotype. Indeed, loss-of-function mutations in the *palA*, *palB*, or *pacC* genes lowered the mannose content in the phosphate (Pi)-repressible acid phosphatase secreted by *A. nidulans* in an acidic milieu. In addition, by using an mRNA differential display (DDRT-PCR), we isolated one cDNA, not detected in the *palB7* strain, that encodes a mannosyltransferase (8,28,29). In *Trichophyton rubrum*, disruption of the *pacC* gene resulted in decreased growth on human nails and decreased secretion of keratinolytic proteases possibly through transcriptional modulation of the O- and N-linked mannosyltransferase genes (6,35). Transcription profiling of these two mannosyltransferases revealed a high level of complexity because their transcription were also affected by nutrients, culture pH, and the functioning of the *pacC* gene (35). We hypothesized that putative *pal*-dependent PacC post-translational modifications are determinants for the conversion of PacC to its functional form, irrespective of

AQ1 4

Ambient Ph Sensing in Filamentous Fungi

ambient pH, in which the active PacC protein should carry the post-translational modification promoted by the *pal*-signaling cascade. Putative candidate post-translational modifications predicted by sequence analysis of PacC⁷² include phosphorylation, glycosylation, sumoylation, palmitoylation, and/or acetylation of PacC⁷². Interestingly, phosphorylation is important for the nuclear localization of RIM101 transcription factor (an ortholog of PacC) in *Saccharomyces cerevisiae*. When the cyclin-dependent kinase Pho85 (an ortholog of PGOV in *N. crassa*) is functional, RIM101 localizes in the cytoplasm, a physiological condition in which Pi is abundant. When functional Pho85 is absent, RIM101 accumulates in the nucleus (25,36). It has been reported that the full-length form of RIM101 could localize in the nucleus as well and bind DNA (37). Also interesting are the observations that a mammalian PalB homolog shows preferential nuclear localization when expressed in COS cells (28,38,39), suggesting that PalB has specific functions in the processing of transcription factors, as does its homolog Rim13p in *S. cerevisiae* (40,41). PacC is also phosphorylated in *A. nidulans*; however, in this case, it was speculated that phosphorylation leads to recruitment of the proteasome machinery (17). Moreover, even in the presence of the *pal* signal, a fraction of the full-length form of PacC is localized in the nucleus at both acidic and alkaline pH (42).

Transcription of the *pacC* gene is also modulated in response to nutrient changes, phosphate and carbon availability, and alternative splicing of the *palB* gene, which showed variant mRNA splicing patterns in response to changes in growth conditions (43–45). The *palB* pre-RNA was spliced in strains cultured in minimal medium, regardless of extracellular pH and Pi changes, whereas it was apparently not spliced in yeast extract (YE) cultures, except when grown in low Pi at pH 5.0. Interestingly, the intronic regions I and III of *palB* pre-RNA were spliced concomitantly, resulting in a predicted inactive PalB protein when introns I and/or III were not spliced. Thus, we presumed that PalB is inactive in YE cultures at pH 8.0, an experimental condition in which PacC is active, suggesting that PacC protein is potentially activated through an alternative metabolic pathway to PalB proteolysis (Fig. 2). Thus, it remains possible that a full-length version of PacC is functional (8,43). Accumulation of higher levels of *pacC* transcripts in low-Pi YE cultures at pH 8.0 may be correlated with the absence of spliced forms of the *palB*⁺ allele. Furthermore, transcription of *pacC* is downregulated in *palB*⁺ and *palB*[−] strains grown in high- or low-Pi cultures, respectively. Downregulation of *pacC* in a *palB*[−] background probably occurs because the protease PalB is inactive. Moreover, transcription of Pi-repressible phosphatases is modulated by Pi and pH and, consequently, depends on both PalA and PacC transcription factors. This finding suggests the occurrence of crosstalk between the pH- and Pi-regulatory circuits, implying synergy between the regulators PalA and PacC. Thus, the transcription regulator PacC may be functional in both acidic and alkaline ambient pH, in the full-length or proteolyzed form, if it carries in either case the *pal*-dependent molecular tag. If it is

demonstrated that the full-length version is the only active molecular form of PacC, the implication will be that the proteolysis event regulates PacC turnover.

Acknowledgements

This work was supported by research grants from the Brazilian funding agencies FAPESP (Grant No. 2008/58634-7 and Postdoctoral position No. 2012/03689-7), CNPq, CAPES, and FAEPA. The authors thank C. A. Vieira and S. H. Castrechini for technical assistance.

References

- [1] Li, X., Wang, X., and Snyder, M. (2012) Systematic investigation of protein-small molecule interactions. *IUBMB Life* 65, 2–8.
- [2] Nahas, E., Terenzi, H. F., and Rossi, A. (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, 2017–2021.
- [3] Caddick, M. X., Brownlee, A. G., and Arst, H. N. (1986) Regulation of gene-expression by pH of the growth-medium in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* 203, 346–353.
- [4] Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D. A., Espeso, E. A., Orejas, M., et al. (1995) The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J.* 14, 779–790.
- [5] Li, M. C., Martin, S. J., Bruno, V. M., Mitchell, A. P., and Davis, D. A. (2004) *Candida albicans* Rim13p, a protease required for Rim101p processing at acidic and alkaline pHs. *Eukaryot. Cell* 3, 741–751.
- [6] Ferreira-Nozawa, M. S., Silveira, H. C. S., Ono, C. J., Fachin, A. L., Rossi, A., et al. (2006) The pH signaling transcription factor PacC mediates the growth of *Trichophyton rubrum* on human nail in vitro. *Med. Mycol.* 44, 641–645.
- [7] Martinez-Rossi, N. M., Persinoti, G. F., Peres, N. T. A., and Rossi, A. (2012) Role of pH in the pathogenesis of dermatophytoses. *Mycoses* 55, 381–387.
- [8] Nozawa, S. R., Ferreira-Nozawa, M. S., Martinez-Rossi, N. M., and Rossi, A. (2003) The pH-induced glycosylation of secreted phosphatases is mediated in *Aspergillus nidulans* by the regulatory gene *pacC*-dependent pathway. *Fungal Genet. Biol.* 39, 286–295.
- [9] Eisendle, M., Oberegger, H., Buttinger, R., Illmer, P., and Haas, H. (2004) Biosynthesis and uptake of siderophores is controlled by the PacC-mediated ambient-pH regulatory system in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* 3, 561–563.
- [10] Wang, Q., and Szanislo, P. J. (2009) Roles of the pH signaling transcription factor PacC in *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*. *Fungal Genet. Biol.* 46, 657–666.
- [11] Silveira, H. C. S., Gras, D. E., Cazzaniga, R. A., Sanches, P. R., Rossi, A., et al. (2010) Transcriptional profiling reveals genes in the human pathogen *Trichophyton rubrum* that are expressed in response to pH signaling. *Microb. Pathog.* 48, 91–96.
- [12] Trushina, N., Levin, M., Mukherjee, P. K., and Horwitz, B. A. (2013) PacC and pH-dependent transcriptome of the mycotrophic fungus *Trichoderma virens*. *BMC Genomics* 14, 138.
- [13] Orejas, M., Espeso, E. A., Tilburn, J., Sarkar, S., Arst, H. N., et al. (1995) Activation of the *Aspergillus* PacC transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxy-terminal moiety. *Genes Dev.* 9, 1622–1632.
- [14] Maccheroni, W., Jr., May, G. S., Martinez-Rossi, N. M., and Rossi, A. (1997) The sequence of *palF*, an environmental pH response gene in *Aspergillus nidulans*. *Gene* 194, 163–167.
- [15] Calcagno-Pizarelli, A. M., Negrete-Urtasun, S., Denison, S. H., Rudnicka, J. D., Bussink, H. J., et al. (2007) Establishment of the ambient pH signaling complex in *Aspergillus nidulans*: PalI assists plasma membrane localization of PalH. *Eukaryot. Cell* 6, 2365–2375.
- [16] Galindo, A., Hervas-Aguilar, A., Rodriguez-Galan, O., Vincent, O., Arst, H. N., Jr., et al. (2007) PalC, one of two Bro1 domain proteins in the fungal pH

IUBMB LIFE

- signalling pathway, localizes to cortical structures and binds Vps32. Traffic 8, 1346–1364.
- [17] Hervas-Aguilar, A., Rodriguez, J. M., Tilburn, J., Arst, H. N., Jr., and Peñalva, M. A. (2007) Evidence for the direct involvement of the proteasome in the proteolytic processing of the *Aspergillus nidulans* zinc finger transcription factor PacC. J. Biol. Chem. 282, 34735–34747.
- [18] Galindo, A., Calcagno-Pizarelli, A. M., Arst, H. N., Jr., and Peñalva, M. A. (2012) An ordered pathway for the assembly of fungal ESCRT-containing ambient pH signalling complexes at the plasma membrane. J. Cell Sci. 125, 1784–1795.
- [19] Negrete-Urtasun, S., Reiter, W., Diez, E., Denison, S. H., Tilburn, J., et al. (1999) Ambient pH signal transduction in *Aspergillus*: completion of gene characterization. Mol. Microbiol. 33, 994–1003.
- [20] Peñalva, M. A., Tilburn, J., Bignell, E., and Arst, H. N., Jr. (2008) Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. Trends Microbiol. 16, 291–300.
- [21] Dorn, G. (1965) Phosphatase mutants in *Aspergillus nidulans*. Science 150, 1183–1184.
- [22] Sarkar, S., Caddick, M., Bignell, E., Tilburn, J., and Arst, H. N., Jr. (1995) Regulation of gene expression by ambient pH in *Aspergillus*: genes expressed at acid pH. Biochem. Soc. Trans. 24, 360–363.
- [23] Maccheroni, W., Jr., Martinez-Rossi, N. M., and Rossi, A. (1995) Does gene *palB* regulate the transcription or the post-translational modification of Pi-repressible phosphatases of *Aspergillus nidulans*? Braz. J. Med. Biol. Res. 28, 31–38.
- [24] Peleg, Y., Addison, R., Aramayo, R., and Metzenberg, R. L. (1996) Translocation of *Neurospora crassa* transcription factor NUC-1 into the nucleus is induced by phosphorus limitation. Fungal Genet. Biol. 20, 185–191.
- [25] Gras, D. E., Persinoti, G. F., Peres, N. T. A., Martinez-Rossi, N. M., Tahira, A. C., et al. Transcriptional profiling of *Neurospora crassa* Δ mak-2 reveals that mitogen-activated protein kinase MAK-2 participates in the phosphate signaling pathway. Fungal Genet. Biol., in press.
- AQ6 [26] Metzenberg, R. L. (1979) Implications of some genetic control mechanisms in *Neurospora*. Microbiol. Rev. 43, 361–383.
- [27] Palma, M. S., Han, S. W., and Rossi, A. (1989) Dissociation and catalytic activity of phosphate-repressible alkaline-phosphatase from *Neurospora crassa*. Phytochemistry 28, 3281–3284.
- [28] Nozawa, S. R., May, G. S., Martinez-Rossi, N. M., Ferreira-Nozawa, M. S., Coutinho-Netto, J., et al. (2003) Mutation in a calpain-like protease affects the posttranslational mannosylation of phosphatases in *Aspergillus nidulans*. Fungal Genet. Biol. 38, 220–227.
- [29] Silva, E. M., Freitas, J. S., Gras, D. E., Squina, F. M., Leal, J., et al. (2008) Identification of genes differentially expressed in a strain of the mold *Aspergillus nidulans* carrying a loss-of-function mutation in the *palA* gene. Can. J. Microbiol. 54, 803–811.
- [30] Roy, A., Kucukural, A., and Zhang, Y. (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. Nat. Protoc. 5, 725–738.
- [31] Roy, A., Yang, J., and Zhang, Y. (2012) COFACTOR: an accurate comparative algorithm for structure-based protein function annotation. Nucleic Acids Res. 40, W471–W477.
- [32] Zhang, Y. (2008) I-TASSER server for protein 3D structure prediction. BMC Bioinformatics 9, 40.
- [33] Maccheroni, W., Jr., May, G. S., Martinez-Rossi, N. M., and Rossi, A. (2000) The levels of mRNA expressed by gene *palF* of *Aspergillus nidulans* do not appear to be pH regulated. Fungal Genet. Newsl. 47, 72–73.
- [34] Vincent, O., Rainbow, L., Tilburn, J., Arst, H. N., and Peñalva, M. A. (2003) YPXL1 is a protein interaction motif recognized by *Aspergillus* *PalA* and its human homologue, AIP1/Alix. Mol. Cell Biol. 23, 1647–1655.
- [35] Mendes, N. S., Trevisan, G. L., Cruz, A. H. S., Santos, R. S., Peres, N. T. A., et al. (2012) Transcription of N- and O-linked mannosyltransferase genes is modulated by the *pacC* gene in the human dermatophyte *Trichophyton rubrum*. FEBS Open Bio. 2, 294–297.
- [36] Nishizawa, M., Tanigawa, M., Hayashi, M., Maeda, T., Yazaki, Y., et al. (2010) Pho85 kinase, a cyclin-dependent kinase, regulates nuclear accumulation of the Rim101 transcription factor in the stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. Eukaryot. Cell 9, 943–951.
- [37] Lamb, T. M., and Mitchell, A. P. (2003) The transcription factor Rim101p governs ion tolerance and cell differentiation by direct repression of the regulatory genes *NRG1* and *SMP1* in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell Biol. 23, 677–686.
- [38] Futai, E., Kubo, T., Sorimachi, H., Suzuki, K., and Maeda, T. (2001) Molecular cloning of *PalBH*, a mammalian homologue of the *Aspergillus* atypical calpain *PalB*. Biochim. Biophys. Acta 1517, 316–319.
- [39] Sorimachi, H., Toyama-Sorimachi, N., Saido, T. C., Kawasaki, H., Sugita, H., et al. (1993) Muscle-specific calpain, p94, is degraded by autolysis immediately after translation, resulting in disappearance from muscle. J. Biol. Chem. 268, 10593–10605.
- [40] Lamb, T. M., Xu, W., Diamond, A., and Mitchell, A. P. (2001) Alkaline response genes of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to the RIM101 pathway. J. Biol. Chem. 276, 1850–1856.
- [41] Li, W., and Mitchell, A. P. (1997) Proteolytic activation of RIM1p, a positive regulator of yeast sporulation and invasive growth. Genetics 145, 63–73.
- [42] Mingot, J. M., Espeso, E. A., Diez, E., and Peñalva, M. A. (2001) Ambient pH signaling regulates nuclear localization of the *Aspergillus nidulans* PacC transcription factor. Mol. Cell Biol. 21, 1688–1699.
- [43] Trevisan, G. L., Oliveira, E. H., Peres, N. T. A., Cruz, A. H., Martinez-Rossi, N. M., et al. (2011) Transcription of *Aspergillus nidulans* *pacC* is modulated by alternative RNA splicing of *palB*. FEBS Lett. 585, 3442–3445.
- [44] Freitas, J. S., Silva, E. M., and Rossi, A. (2007) Identification of nutrient-dependent changes in extracellular pH and acid phosphatase secretion in *Aspergillus nidulans*. Genet. Mol. Res. 6, 721–729.
- [45] Dechant, R., and Peter, M. (2008) Nutrient signals driving cell growth. Curr. Opin. Cell Biol. 20, 678–687.

Transcription of N- and O-linked mannosyltransferase genes is modulated by the *pacC* gene in the human dermatophyte *Trichophyton rubrum*

Niege S. Mendes^a, Glaucel L. Trevisan^b, Aline H. Silva Cruz^a, Rodrigo S. Santos^a, Nalu T.A. Peres^a, Nilce M. Martinez-Rossi^a, Antonio Rossi^{b,*}

^aDepartamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

^bDepartamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 July 2012

Received in revised form 21 September 2012

Accepted 24 September 2012

Keywords:

Glycosylation

Enzyme secretion

pH regulation

Transcription profiling

ABSTRACT

In fungi, ambient pH sensing involves the activation of the Pal/PacC signalling pathway. In the dermatophyte *Trichophyton rubrum*, pH-dependent secretion of keratinases, which are major virulence determinants, is affected by disruption of the *pacC* gene. Here, the transcription profiling of the genes coding for N- and O-linked mannosyltransferases, enzymes involved in protein glycosylation, was evaluated in *T. rubrum* in response to disruption of the *pacC* gene and growth in keratin, glucose, and glucose plus glycine. We show that transcription of these mannosyltransferase genes is affected by nutrients at acidic pH and by PacC.

© 2012 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Dermatophytes are the most common organisms infecting keratinized structures such as skin, hair, and nails, and their ability to degrade keratin is believed to be a major virulence factor [1,2]. A correlation between keratinolytic activity and pathogenesis has been proposed because dermatophytes secrete a battery of endo- and exo-proteases during infection that degrade keratinized structures into oligopeptides and free amino acids for use as nutrients [3,4]. It is likely that proteases with optimal activity at both acidic and alkaline pHs are important virulence factors in dermatophytes, and that their regulation during infection is crucial [5]. In the early stages, and in response to the acidic pH of human skin, the pathogen de-represses the synthesis of non-specific keratinases and proteases that have optimal activity at acidic pH. They act on skin proteins, producing peptides that are hydrolyzed into amino acids, which are then used by the fungus as sources of carbon, nitrogen, and sulfur. The metabolism of some amino acids promotes the alkalization of the host microenvironment, making it suitable for the action of keratinases with optimal activity at alkaline pH. The dermatophyte *Trichophyton rubrum* rapidly responds to pH changes by modulating the expression of genes, allowing the use of skin proteins over a wide pH range, thereby enabling the development of infection and persistence of the dermatophyte in

host tissues [6,7]. Moreover, inactivation of the *pacC* gene, a component of the pH signalling pathway in *T. rubrum*, reduces the activity of secreted keratinases [3], indicating that the *pacC* gene is somehow involved in the regulation of keratinolytic activity, and consequently in the virulence and pathogenicity of this organism.

Protein secretion from a eukaryotic cell requires movement through the endoplasmic reticulum (ER) and the Golgi apparatus. In the course of trafficking, the secreted proteins undergo glycosylation, which is the major post-translational molecular event [8–14]. In secreted proteins, the glycosyl groups are usually attached to either an amide group (N-glycosylation) or a hydroxyl residue (O-glycosylation), which are mainly found on serine and threonine residues. During glycosylation, the oligosaccharide GlcNAc2Man9Glc3 is transferred to an Asn residue within the sequence Asn-XSer/Thr by an oligosaccharyltransferase, where X represents any amino acid except proline [15,16]. O-glycosylation occurs via several pathways. In higher eukaryotes, the main pathway utilizes sugar nucleotides and is located in the Golgi apparatus [17]. In yeasts, O-mannosylation begins in the ER lumen and, like N-glycosylation, it requires dolichol phosphate-activated sugar residues. The initial reaction is catalyzed by proteins from the evolutionarily conserved mannosyltransferase (Pmt) family [18,19]. Proteins secreted from yeast cells are usually heavily N- and/or O-glycosylated. In proteins that are glycosylated at both sites, it is not known whether N-glycosylation precedes O-mannosylation, or vice versa [20]. It is also unknown whether the O-mannosylation that takes place in the ER prevents N-glycosylation; however, there is some evidence for the opposite situation [21]. Altered glycosylation may affect the stability and half-life of proteins, thus changing their activities or affinities towards

* Corresponding author. Address: Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av Bandeirantes 3900, 14049-900-Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. Fax: +55 16 3633 6840.
E-mail address: anrossi@usp.br (A. Rossi).

substrates [22,23].

Delineating the mechanisms underlying fungal adaptability to ambient variation is fundamental to an understanding of the mechanisms of pathogenicity and resistance to inhibitors in pathogenic organisms. This work was aimed at investigating the expression of genes encoding dolichyl-P-Man:Man(5)GlcNAc(2)-PP-dolichyl mannosyltransferase and an O-mannosyltransferase (referred to as the *N-man* and *O-man* genes, respectively) in the dermatophyte *T. rubrum* in response to nutrients, ambient pH, and disruption of the *pacC* gene. Our findings revealed a relationship between the expression of these two mannosyltransferase genes and the *pacC* gene in response to ambient pH and carbon source.

2. Materials and methods

2.1. Strains and growth conditions

T. rubrum clinical isolate H6 (ATCC MYA-3108) and a *pacC-1* mutant that carries a disrupted *pacC* gene, which were used throughout this study, were selected as previously described [3,24]. The H6 and *pacC-1* strains were cultivated on Sabouraud glucose agar for 15 days at 28 °C, and *pacC-1* cultures were supplemented with 450 µg/ml hygromycin. Mycelia were collected with a sterile spatula, vortexed in saline solution [0.9% (w/v) NaCl] with 0.01% (v/v) Tween, filtered through fiberglass to remove mycelial debris, and then centrifuged to recover the conidia. Then, 10⁶ conidia were transferred to 50 ml of Sabouraud broth, and germination was carried out at 28 °C for 72 h on an orbital shaker at 180 rpm (control). After incubation, the final pH of the culture medium was measured with a pH meter, and the resulting mycelia were harvested by filtration through sterilized Whatman paper (Whatman International, Maidstone, UK), washed with sterilized water, and transferred to minimal medium (MM) [25] at pH 5.0 or pH 8.0, which was, in some cases (as indicated), buffered with 50 mM sodium citrate or 50 mM Tris-HCl, respectively. MM was supplemented with glucose (50 mM) or glucose plus glycine (50 mM each) and sodium nitrate (70 mM). MM was also supplemented with keratin from bovine hooves (2.5 g/l) as a nutrient source. All cultures were incubated at 28 °C for 3, 6, and 24 h with agitation.

2.2. RNA extraction and cDNA synthesis

Mycelia obtained from each culture were harvested by filtration, and total RNA was extracted from approximately 100 mg of frozen mycelium using TRIzolTM reagent, and treated with RNase-free DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA), following the manufacturer's instructions. One microgram of DNase-treated RNA was reverse transcribed into cDNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) according to the manufacturer's instructions. The cDNA from 3 independent biological experiments was quantified spectrophotometrically, and stored at –80 °C until PCR amplification.

2.3. Real-time PCR

For quantitative real-time PCR analyses, the genes encoding dolichyl-P-Man:Man(5)GlcNAc(2)-PP-dolichyl mannosyltransferase (*N-man*, TERC.06338; GenBank: XM.003233297) and O-mannosyltransferase (*O-man*, TERC.06465; GenBank: XM.003233430) were amplified from cDNA using the following primers (5'–3'): TAAACGACAGTGGTATGCCG (*N-man*FWD) and TGTAGCCTGTTGGTTCTCT (*N-man*REV); CCATGGGACGTGTACTC (*O-man*FWD) and CGTCATCATAGCAACATTCAG (*O-man*REV). Reactions were performed in three independent experiments using SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), in the StepOne Plus Real-Time PCR system. A 12.5-µl reaction was set up using 50 ng of cDNA and 300 nM of each primer, and the PCR cycle

was as follows: 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. Melting curve analyses were performed after each cycling to exclude primer dimers and nonspecific PCR products. Relative transcript quantities were calculated using the $\Delta\Delta C_t$ method using the experimental condition that yielded the lowest C_t value (*N-man*, non-buffered H6 cultures in keratin, 6 h incubation) [26,27]. The *T. rubrum* α -actin (TERG.06637) and β -tubulin (TERG.07904) genes, which were used as endogenous reference genes, were amplified using the following oligonucleotides (sequence 5'–3'): AACGCCATCATGAAGTGT (*actin*FWD) and TCCTTCTGCATACGGTCAGA (*actin*REV); CCGTATGATGGCCACTTT (*tubulin*FWD) and CTGACCTGGGAAACGAAGAC (*tubulin*REV). Data normalization and analyses were performed using the GenEx 5 MultiD Analyses AB (www.multid.se). To confirm the identity of the genes analyzed in this work, as well as the endogenous reference genes, the PCR products were sequenced and analyzed by alignment with sequences retrieved from the Broad Institute Dermatophyte Comparative Database (<http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/dermatophyte.comparative/MultiHome.html>).

3. Results

In vitro growth of the dermatophyte *T. rubrum* is dependent on the initial culture pH, with apparent optimal growth at pH 4.0–5.0, irrespective of carbon source (glucose, glycine, or protein). The initial pH of the *T. rubrum* cultures increased from 5.0 to a pH that ranged from 8.3 to 8.9 after 72–96 h of incubation in glycine or keratin. This effect was not observed when the fungus was cultivated with glucose as the carbon source, and the pH was maintained at approximately 5.0 [28,29]. Hydrolysis of keratin and other proteins releases amino acids, such as glycine, whose metabolism leads to the secretion of ammonia, thereby shifting the pH of the culture from acidic to alkaline [28]. Therefore, the metabolism of both glycine and keratin at pH 5.0 were alkalizing events [28,29], even though the culture pH was still acidic after 24 h of incubation in glycine or keratin (Fig. 1). Moreover, disruption of the *pacC* gene in *T. rubrum* neither affects this pH shift (Fig. 1) [30] nor its growth on Sabouraud solid and in liquid media [3]. However, a marked decrease in the conidiation on Sabouraud solid medium and in the secretion of keratinolytic activity by the *pacC-1* mutant, which correlated with its reduced capacity to infect human nails *in vitro*, were observed as compared to the control strain [3]. No ambient pH changes were observed when the fungus was cultured in buffered media (data not shown). *T. rubrum* grows poorly in culture medium with a starting pH of 8.0, even though the culture becomes acidified after incubation with glucose as a carbon source (Fig. 1). Growth in glycine or keratin dropped the pH of the culture to approximately 7 after the first 3–6 h of incubation, which increased to approximately pH 7.5 after 24 h of incubation (Fig. 1). An attractive hypothesis is that *T. rubrum* senses the alkaline environment and then acidifies the culture medium to an ambient pH at which its growth is stimulated. Metabolism of glycine or keratin leads to the secretion of ammonia, which shifts the culture pH to alkaline pH values. Therefore, to better understand the transcription of both the *O-man* and *N-man* genes during the first 24 h of incubation, when the pH of the medium was still acidic in non-buffered cultures (Fig. 1), we estimated the expression of both genes by qRT-PCR in different culture conditions.

Transcription of the *O-man* and *N-man* genes in both the H6 and *pacC-1* mutant strains was affected differently by the carbon source, the culture pH, and the time of incubation (Fig. 2). At pH 5.0, *O-man* was preferentially transcribed in both buffered and non-buffered keratin cultures, whereas *N-man* was apparently preferentially transcribed in non-buffered glucose cultures. The expression of *N-man* decreased as incubation time increased at pH 5.0, but the expression decreased more consistently in buffered glucose cultures (Fig. 2). Disruption of the *pacC* gene decreased transcription of *O-man* in both glucose and keratin at pH 5.0; however, *O-man* expression was

296

Niege S. Mendes et al. / FEBS Open Bio 2 (2012) 294–297

Fig. 1. Evaluation of pH changes during the cultivation of *Trichophyton rubrum* with glucose, glucose plus glycine, or keratin, as the carbon source, for 3, 6 and 24 h. The initial pH of the culture medium was 5.0 or 8.0. The bars in the columns represent the standard deviation of data obtained from three independent experiments.

enhanced in glucose plus glycine. Interestingly, the transcription of *N-man* in keratin cultures was enhanced in the *pacC-1* mutant at pH 5.0. Therefore, at acidic pH, transcription of the *O-man* and *N-man* genes was positively and negatively affected, respectively, by the *pacC* gene in keratine cultures (Fig. 2). Moreover, transcription of the *O-man* and *N-man* genes in buffered cultures indicated that the *O-man* gene was preferentially transcribed at acidic pH in the presence of keratin compared to glucose or glucose plus glycine as the carbon sources, whereas transcription of the *N-man* gene was almost the same in both acidic and alkaline pH in the presence of keratin, and these properties were affected by disruption of the *pacC* gene (Fig. 2). It is also worth noting that while the disruption of the *pacC* gene resulted in changed transcription of the *O-man* gene in the different conditions at pH 5.0, it also resulted in the opposite changes for growth in glucose and glucose plus glycine at pH 8.0. Thus, our results suggest that the product of the *pacC* gene negatively affect both the transcription of the *N-man* gene in keratin at pH 5.0 and the *O-man* gene at pH 8.0 in the presence of different nutrients (Fig. 2) i.e., the *pacC* gene is functional irrespective of the culture conditions assayed.

4. Discussion

It has been well documented that the dermatophyte *T. rubrum*, as well as other filamentous fungi, acidifies the culture medium and represses the secretion of proteases during growth in glucose as the sole carbon source [31,32]. Moreover, during growth in glycine or keratin, the culture medium is alkalinized; however, this change is dependent on the initial pH of the culture, with an apparent optimum at pH 4.0–5.0. Interestingly, glycine utilization is apparently not repressed by glucose, because alkalization of the culture medium occurs with glucose and glycine as carbon sources [29,33]. However, it is worth noting that during the first 24 h of cultivation, the pH of the medium is still acidic (Fig. 1), implying that the metabolism of glycine or keratin, an alkalinizing event, occurs during the first 24 h of cultivation, exclusively in an acidic environment.

In the model fungi *Neurospora crassa* and *Aspergillus nidulans*, one of the metabolic responses to the pH of the culture medium is the pH-dependent glycosylation of secreted enzymes [34–37]. For example, the level of glycosylation of the Pho-2 alkaline phosphatase synthesized by *N. crassa* at alkaline pH differs from that synthesized at acidic pH, which is approximately 13% and 21% for the Pho-2 enzyme purified from mycelium grown at pH 5.4 and 7.8, respectively [37,38]. The loss of enzymatic activity observed for the Pi-repressible alkaline phosphatase secreted at acidic pH is probably because the glycosylation of this enzyme is lower than that secreted at alkaline pH. We have also provided evidence that glycosylation of secreted enzymes, as documented for the Pi-repressible phosphatases in *N. crassa* and *A. nidulans*, is PacC-dependent [35].

In *T. rubrum*, disruption of the *pacC* gene, as in the *pacC-1* mutant strain, resulted in decreased growth on human nails and decreased

Fig. 2. Expression of mannosyltransferase genes (*O-man* and *N-man*) in *T. rubrum* by quantitative real-time RT-PCR. Strains H6 and *pacC-1* were cultured with glucose, glucose plus glycine, or keratin as the carbon source, for 3, 6, and 24 h. The initial pH of the culture medium was 5.0 or 8.0. The expression of the mannosyltransferase genes at 0 h is indicated (control). The bars in the columns represent the standard deviation of data obtained from three independent experiments.

secretion of keratinolytic proteases in liquid medium when supplemented with keratin, which suggests that the keratinases secreted by *T. rubrum* are somehow regulated by the PacC protein [3]. PacC might be involved in the glycosylation of these keratinases through transcriptional modulation of O- and N-linked mannosyltransferases, a hypothesis supported by the results described here. Transcriptional profiling of both the *O-man* and *N-man* genes revealed a high level of complexity, because transcription of these genes was affected by nutrients, culture pH, and the functioning of the *pacC* gene. Disruption of the *pacC* gene increased the expression of *N-man* at pH 5.0 in keratin cultures. Moreover, if O-mannosylation precedes N-glycosylation in *T. rubrum*, as demonstrated in yeast [20], this physiological effect is dependent on the function of the *pacC* gene at acidic pH.

In conclusion, the genes encoding the O- and N-mannosyltransferases had different expression profiles, and the *O-man* gene was preferentially expressed at acidic pH when *T. rubrum* was grown on medium containing keratin. The balance between *N-man* and *O-man* expression levels in cultures at acidic pH may be under the control of the PacC transcription factor (in response to different carbon sources). Therefore, the product of the *pacC* gene of *T. rubrum* is functional at acidic pH. Moreover, transcription of the *N-man* and *O-man* genes might be required at different culture pHs for the glycosylation of transported proteins, according to the stage of infection, which suggests a possible role in cell adhesion and activation of signalling pathways regulating the production of enzymes that enable nutrient uptake for fungal development and maintenance in the host [39–41].

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Brazilian funding agencies FAPESP, CNPq, CAPES and FAPEA. We thank M. Mazucato and S.H. Castrechini for skilled technical assistance.

References

- [1] Achterman R.R., White T.C. (2012) Dermatophyte virulence factors: identifying and analyzing genes that may contribute to chronic or acute skin infections. *Int J Microbiol.* 2012, 358305.
- [2] Peres N.T.A. (2010) Transcriptional profiling reveals the expression of novel genes in response to various stimuli in the human dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *BMC Microbiol.* 10, 39.
- [3] Ferreira-Nozawa M.S., Silveira H.C.S., 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.
- [4] Monod M. (2008) Secreted proteases from dermatophytes. *Mycopathologia.* 166, 285–294.
- [5] Tsuboi R., Ko I.J., Takamori K., Ogawa H. (1989) Isolation of a keratinolytic proteinase from *Trichophyton mentagrophytes* with enzymatic activity at acidic pH. *Infect Immun.* 57, 3479–3483.
- [6] Martinez-Rossi N.M., Ferreira-Nozawa M.S., Graminha, M.A.S., Nozawa, S.R., Fachin, A.L., Cervellati, E.P., Prade, R.A., Rossi, A. (2004) in: *Fungi in Human and Animal Health*, vol. 9 (Kushwaha, R.K.S., Ed.), pp. 143–165, Scientific Publishers, Jodhpur, India.
- [7] Martinez-Rossi N.M., Persinoti G.F., Peres N.T., Rossi A. (2012) Role of pH in the pathogenesis of dermatophytes. *Mycoses.* 55, 381–387.
- [8] Gentzsch M., Tanner W. (1996) The PMT gene family: protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae* is vital. *EMBO J.* 15, 5752–5759.
- [9] Gemmill T.R., Trimble R.B. (1999) Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. *Biochim Biophys Acta.* 1426, 227–237.
- [10] Motteram J., Lovegrove A., Pirie E., Marsh J., Devonshire J., van de Meene A. et al. (2011) Aberrant protein N-glycosylation impacts upon infection-related growth transitions of the haploid plant-pathogenic fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Mol Microbiol.* 81, 415–433.
- [11] Lommel M., Schott A., Jank T., Hofmann V., Strahl S. (2011) A conserved acidic motif is crucial for enzymatic activity of protein O-mannosyltransferases. *J Biol Chem.* 286, 39768–39775.
- [12] Mouyna I. (2010) Members of protein O-mannosyltransferase family in *Aspergillus fumigatus* differentially affect growth, morphogenesis and viability. *Mol Microbiol.* 76, 1205–1221.
- [13] Shibata N., Kobayashi H., Suzuki S. (2012) Immunochromatography of pathogenic yeast, *Candida* species, focusing on mannans. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 88, 250–265.
- [14] Lussier M., Solcu A.M., Bussey H. (1999) The KTR and MNN1 mannosyltransferase families of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta.* 1426, 323–334.
- [15] Knauer R., Lehle L. (1999) The oligosaccharyltransferase complex from *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation of the OST6 gene, its synthetic interaction with OST3, and analysis of the native complex. *J Biol Chem.* 274, 17249–17256.
- [16] Helenius A., Aebi M. (2001) Intracellular functions of N-linked glycans. *Science.* 291, 2364–2369.
- [17] Brockhausen I. (1995) Substrate specificity and inhibition of UDP-GlcNAc:GlcNAc beta 1-2Man alpha 1-6R beta 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase V using synthetic substrate analogues. *Glycoconj J.* 12, 371–379.
- [18] Strahl-Bolsinger S., Gentzsch M., Tanner W. (1999) Protein O-mannosylation. *Biochim Biophys Acta.* 1426, 297–307.
- [19] Lengele K.B., Tielker D., Ernst J.F. (2008) Protein-O-mannosyltransferases in virulence and development. *Cell Mol Life Sci.* 65, 528–544.
- [20] Ecker M., Mirsa V., Hagen I., Deutzmann R., Strahl S., Tanner W. (2003) O-mannosylation precedes and potentially controls the N-glycosylation of a yeast cell wall glycoprotein. *EMBO Rep.* 4, 628–632.
- [21] Hartly C., Strahl S., Romisch K. (2001) O-mannosylation protects mutant alpha-factor precursor from endoplasmic reticulum-associated degradation. *Mol Biol Cell.* 12, 1093–1101.
- [22] Gorka-Niec W., Kania A., Perłinska-Lenart U., Smolenska-Sym G., Palamarczyk G., Kruszewska J.S. (2011) Integration of additional copies of *Trichoderma reesei* gene encoding protein O-mannosyltransferase I results in a decrease of the enzyme activity and alteration of cell wall composition. *Fungal Biol.* 115, 124–132.
- [23] Maddi A., Free S.J. (2010) alpha-1,6-Mannosylation of N-linked oligosaccharide present on cell wall proteins is required for their incorporation into the cell wall in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell.* 9, 1766–1775.
- [24] Fachin A.L., Maffei C.M.L., Martinez-Rossi N.M. (1996) *In vitro* susceptibility of *Trichophyton rubrum* isolates to griseofulvin and itraconazole. Induction and isolation of a resistant mutant to both antimycotic drugs. *Mycopathologia.* 135, 141–143.
- [25] Cove D.J. (1966) The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim Biophys Acta.* 113, 51–56.
- [26] Winer J., Jung C.K., Shackel I., Williams P.M. (1999) Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes *in vitro*. *Anal Biochem.* 270, 41–49.
- [27] Jacob T.R., Peres N.T., Persinoti G.F., Silva L.G., Mazucato M., Rossi A. et al. (2012) *rpb2* is a reliable reference gene for quantitative gene expression analysis in the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *Med Mycol.* 50, 368–377.
- [28] Ferreira-Nozawa M.S., Nozawa S.R., Martinez-Rossi N.M., Rossi A. (2003) The dermatophyte *Trichophyton rubrum* secretes an EDTA-sensitive alkaline phosphatase on high-phosphate medium. *Braz J Microbiol.* 34, 161–164.
- [29] Maranhão F.C.A., Paão F.G., Martinez-Rossi N.M. (2007) Isolation of transcripts over-expressed in human pathogen *Trichophyton rubrum* during growth in keratin. *Microb Pathog.* 43, 166–172.
- [30] Silveira H.C.S., Gras D.E., Cazzaniga R.A., Sanches P.R., Rossi A., Martinez-Rossi N.M. (2010) Transcriptional profiling reveals genes in the human pathogen *Trichophyton rubrum* that are expressed in response to pH signaling. *Microb Pathog.* 48, 91–96.
- [31] Meevootisom V., Niederpruem D.J. (1979) Control of exocellular proteases in dermatophytes and especially *Trichophyton rubrum*. *Sabouraudia.* 17, 91–106.
- [32] Apodaca G., McKerrow J.H. (1989) Regulation of *Trichophyton rubrum* proteolytic activity. *Infect Immun.* 57, 3081–3090.
- [33] Thedei Jr. G., Doubowetz T.H., Rossi A. (1994) 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.* 27, 1129–1134.
- [34] Nozawa S.R., May G.S., Martinez-Rossi N.M., Ferreira-Nozawa M.S., Coutinho-Netto J., Maccheroni Jr. W. et al. (2003) Mutation in a calpain-like protease affects the posttranslational mannosylation of phosphatases in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol.* 38, 220–227.
- [35] Nozawa S.R., Ferreira-Nozawa M.S., Martinez-Rossi N.M., Rossi A. (2003) The pH-induced glycosylation of secreted phosphatases is mediated in *Aspergillus nidulans* by the regulatory gene *pacC*-dependent pathway. *Fungal Genet Biol.* 39, 286–295.
- [36] Nahas E., Rossi A. (1984) Properties of a repressible alkaline-phosphatase secreted by the wild-type strain 74A of *Neurospora crassa*. *Phytochemistry.* 23, 507–510.
- [37] Palma M.S., Han S.W., Rossi A. (1989) Dissociation and catalytic activity of phosphate-repressible alkaline-phosphatase from *Neurospora crassa*. *Phytochemistry.* 28, 3281–3284.
- [38] Nozawa S.R., Thedei G., Crott L.S.P., Barbosa J.E., Rossi A. (2002) The synthesis of phosphate-repressible alkaline phosphatase does not appear to be regulated by ambient pH in the filamentous mould *Neurospora crassa*. *Brazilian Journal of Microbiology.* 33, 92–95.
- [39] Kotz A., Wagener J., Engel J., Routier F.H., Echtenacher B., Jacobsen I. et al. (2010) Approaching the secrets of N-glycosylation in *Aspergillus fumigatus*: characterization of the Afoch1 protein. *PLoS One.* 5, e15729.
- [40] Sheth C.C., Hall R., Lewis L., Brown A.J., Odds F.C., Erwig L.P. et al. (2010) Glycosylation status of the *C. albicans* cell wall affects the efficiency of neutrophil phagocytosis and killing but not cytokine signaling. *Med Mycol.* 49, 513–524.
- [41] Diaz-Jimenez D.F., Mora-Montes H.M., Hernandez-Cervantes A., Luna-Arias J.P., Gow N.A., Flores-Carreon A. (2012) Biochemical characterization of recombinant *Candida albicans* mannosyltransferases Mnt1, Mnt2 and Mnt5 reveals new functions in O- and N-mannan biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 419, 77–82.