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

**Mecanismos moleculares envolvidos no sensoriamiento de
nutrientes e a possível relevância destes na patogenicidade
de *Trichophyton rubrum***

Aline Helena da Silva Cruz

Ribeirão Preto/SP

2013

ALINE HELENA DA SILVA CRUZ

**Mecanismos moleculares envolvidos no sensoriamento de
nutrientes e a possível relevância destes na patogenicidade
de *Trichophyton rubrum***

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/SP

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Cruz, Aline Helena da Silva

Mecanismos moleculares envolvidos no sensoriamiento de nutrientes e a possível relevância destes na patogenicidade de *Trichophyton rubrum*
Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

p.165 : 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

1. *Trichophyton rubrum*. 2.Ciclo celular (*mad2* e *mad2B*). 3. Queratinases (*sub3* e *sub5*). 4. Ciclo de Krebs (*idh1*, *idh2* e *idhp*), Ciclo do Glioxilato (*icl*) e Ciclo do Metilcitrato (*meicl*).

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 142511/2010-2).

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

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

O doutorado sanduíche na *Universidad de Sevilla* foi realizado com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

Banco Santander (Bolsa Mobilidade Internacional COPGRAD.01-121/2012).

CAPES PROEX-Departamento de Genética FMRP-USP.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq
(Proc: nº 142511/2010-2).

A participação no 18º ISHAM e estágio na *Humboldt University* foram realizados com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

Pró-Reitoria de Pós-Graduação da Universidade de São Paulo
(Proc. nº 12.1.9756.1.2.).

CAPES PROEX-Departamento de Genética (FMRP-USP).

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.

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho ao meu Deus
e à minha família.*

*A vocês todas as minhas conquistas
do passado, presente e futuro.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A quem é digno de honra, honra! Não há como deixar de agradecer de forma especial àqueles que amo e são a razão da minha existência.

A Deus, meu salvador Jesus Cristo, meu criador, Senhor todo poderoso da minha vida a quem dedico toda honra, glória, gratidão, tudo que tenho e tudo que sou.

Aos instrumentos de Deus na minha vida, com os quais aprendi a amar a Deus e confiar Nele, destaco a nossa sincera melodia “*O que é que eu faço sem você? Nada!*”. Minha amada família, Papai José Bomtempo que sempre me dizia uma frase muito sábia e importante que cumpri “*faça o bem e fuja do mau, e de todos aqueles que cooperam com ele*”. Mamãe Ivoneides que sempre me ensinou a cuidar de mim, me educou a depender de Deus e não do ser humano, a lutar pelos meus sonhos de forma digna e ética. Minhas irmãs Adda e Elaine, que sempre foram minhas amigas e companheiras, incentivadoras, suporte na minha vida, que sempre me alertavam: “*não é um título que faz uma pessoa, mas quem ela realmente é independente dele*”. Cunhado Eli, que se tornou um irmão e companheiro. Meu sobrinho Guilherme que mesmo distante de mim sempre abre o sorriso no skype e grita titia. Meu amado noivo João Paulo, por confiar em mim, por me dizer todos os dias *Eu te amo* e assim como os meus familiares, sonhar e realizar os meus sonhos comigo. Por nosso namoro ser guiado por Deus, rico em fidelidade, sinceridade e companheirismo. Eu amo vocês!

A minha amada vovó Caetana que foi morar com Deus enquanto eu estava em um Congresso no Guarujá, não há palavras que expressem meu amor e gratidão. Vovó, obra prima de Deus, a neguinha índia da minha vida, como sou feliz em seguir seus conselhos, pilar na minha vida, sigo seu exemplo de vida e amor a Deus, suas orações ainda hoje são respondidas na minha vida e de minha família. Meu obrigado também aos demais membros da minha grande família, minhas primas, primos, tias e tios, que mantiveram seus joelhos no chão clamando por sabedoria, proteção e direção de Deus durante esses anos. Eliana e família obrigada pelos nhiques maravilhosos. Andréia obrigada pela recepção em Portugal.

Minha família em Cristo Jesus da Igreja Presbiteriana do Novo Horizonte, Igreja Presbiteriana Ebenezer, minhas queridas amigas BFFs (que sempre me telefonaram e enviaram e-mails), Desperta Débora, Semear e Banda ZAOS. Somente quem vive sob a graça de Deus e em comunhão com Ele, consegue entender nossas vidas e união. Vidas no reino de *paz, alegria e justiça*. Afinal, Jesus nunca disse que não teríamos aflições, mas que tivéssemos bom ânimo porque Ele já venceu o mundo.

Meu grande amigo e de minha família, Rodrigo Santos: incentivador da realização deste sonho, companheiro de luta e de comemorações, coração de ouro. Ninguém além de Deus e nossas famílias podem nos entender, simplesmente porque somente eles nos conhecem de verdade, conhecem nosso verdadeiro caráter e nos valorizam como realmente merecemos. Amigo não é quem te enche de presentes, mas quem luta com você e por você, mesmo na sua ausência, que compartilha a oração, o pão, o chocolate belga, a pamonha e o pequi, rsrs.

Minhas amigas Glauce Trevisan e Lílían Castro, o que dizer dessas meninas com potencial tão grande, mas, desconhecido por muitos? Sou muito grata pelas contribuições

intelectuais nos trabalhos, caronas, ânimo, conversas, orações, e claro, as visitas ao Mc Donalds e ao Silvão. Vocês são Demais e merecedoras de grandes vitórias. Agradeço ainda de forma especial a Silvinha Helena que nos recebeu como filhos, nos apoiando, amando, e também repreendendo, rsrs. Você é maravilhosa, exemplo de pessoa, que Deus te abençoe!

Meus queridos, também aqueles que não citei os nomes, mas são igualmente especiais, obrigada por fortalecerem meu coração e minha alma!

Pois como disse Madre Tereza de Calcutá: *“Se você tem paz e é feliz, poderão sentir inveja. Seja feliz assim mesmo! O bem que você faz hoje, poderão esquecer-lo amanhã. Faça o bem assim mesmo! (...) Veja você que, no final das contas é entre você e Deus. Nunca foi entre você e os outros!”*

AGRADECIMENTOS

A Universidade de São Paulo, que com toda sua estrutura física, financeira e intelectual colaborou com o início, desenvolvimento e conclusão dessa tese.

Ao Prof. Dr. Antonio Rossi Filho, pela oportunidade concedida, orientação, incentivos, discussões científicas, apoio no desenvolvimento do projeto, estrutura laboratorial e financeira, pois nunca faltaram reagentes ou equipamentos para o desenvolvimento desse trabalho. Agradeço o exemplo de pesquisador, de dedicação em busca de bons projetos, artigos, recursos físicos e financeiros, e também o exemplo de apoio aos outros laboratórios, alunos e docentes, deixando claro que as portas do laboratório devem estar sempre abertas para o progresso da ciência e todos devem ser bem recebidos.

À Profa. Dra. Nilce Maria Martinez Rossi pelas discussões valiosíssimas desde o início do desenvolvimento do projeto, por abrir as portas do seu laboratório disponibilizando tanto os recursos físicos, financeiros e humanos, por sempre me receber com um sorriso todas as vezes que a solicitei. Agradeço todos os incentivos e exemplo de ética, postura profissional, inclusive no lidar com as burocracias institucionais. Obrigada pelo seu exemplo de mulher na ciência.

A todos os professores da USP que de alguma forma contribuíram para minha formação no doutorado, professores dos Departamentos de Genética, Bioquímica e Imunologia e Biologia Celular, principalmente: Dr Antonio Rossi, Dra Nilce Martinez Rossi, Dr Roberto Nascimento, Dra Cacilda Casartelli, Dr Ademilson Espencer, Dr Roy Larson, Dr Luiz Lamberti, Dr Luiz Ricardo Tosi, Dr Ricardo Guelerman, Dra Maria Helena Goldman, Dra Maura Mafrin. À Dra Cacilda e ao Dr Roberto agradeço também pelas caronas, conselhos, palavras de incentivo e exemplos de vida.

Aos membros dos laboratórios, onde trabalhei, agradeço pelo convívio, contribuições, caronas e confraternizações durante esses anos.

Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Fungos: Dra Glauce Trevisan e Rodrigo Santos M.Sc (obrigada pelos ensinamentos científicos sem fim, trabalho, palavras de apoio, vocês foram essenciais para o desenvolvimento e conclusão desse trabalho), Nieve Mendes M.Sc (obrigada por toda ajuda), Marcelina Vieira e Davi Antonio Rugiero Innocent (a pouca convivência com vocês foi o bastante para perceber o quanto são maravilhosos como pessoas e profissionais).

Laboratório de Genética e Biologia Molecular de Fungos: Dr Rodrigo Cazzaniga (quantas conversas maravilhosas e ensinamentos), Dra Nalu Peres (valiosas discussões durante trabalho e no conhecimento do organismo de estudo), Dra Elza Lang (não tenho palavras para agradecer todo seu apoio), Dra Gabriela Persinotti (sempre prestativa e incentivadora), Hemelin Ludmila M.Sc (loira, você é demais), Larissa Gomes M.Sc (só alegria), Tiago Jacob M.Sc (as disciplinas com você e a Larissa foram experiências únicas, obrigada), Maíra Pompeu M.Sc (obrigada pelo apoio e disposição em conciliar todos os experimentos), Pablo Sanches M.Sc (sempre prestativo).

Aos demais pós-graduandos do Departamento de Genética e de Bioquímica e Imunologia obrigada pelo convívio, apoio nas disciplinas e no PAE, em especial: Everton, Flávia, Léo, Adriana, Dr Felipe, Lara, Amanda e Wellington.

Aos técnicos dos laboratórios que me apoiaram no desenvolvimento da tese, mesmo quando isso se tratava de preparar 1000 ponteiras ou 100 erlenmeyers: Silvia Helena (sem palavras para agradecer sua ajuda, você se superou a cada dia), Cuca (obrigada por trabalhar além do seu horário comigo, por me ajudar em tudo que precisei, sua ajuda e apoio foram valiosos), Marcos (agora a sujeira vai diminuir, rsrs), Mendel (sua alegria, sequenciamentos e tantos outros trabalhos), Rose (mesmo com pouco convívio, meu muito obrigada pela simpatia que me recebeu no grupo). Aos demais técnicos que me ajudaram mesmo com um sorriso, quando o cansaço já me preenchia: Zuleica (seu sorriso e exemplo sempre me ajudaram), Silvinha (obrigada pelo sorriso e por achar as pérolas de vidro), Odete (alegria constante com todos os tridentes de melancia, rs) e Vera (sentirei falta do seu bom dia renovador).

Aos funcionários das secretarias da Genética e da Bioquímica que não mediram esforços em nos ajudar mesmo que fosse com um simples grampeador e, é claro, nos lembrando de cumprir todas as normas da USP nas datas corretas: Susie (você sempre foi especial, mesmo antes da seleção de doutorado), Sílvia, Ana Cláudia, Gustavo, Ronaldo, Ivone e Lúcia.

Agradeço ao Departamento de Genética e à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pela estrutura oferecida para minha formação na pós-graduação.

À CAPES, FAEPa, CNPq, FAPESP, Pró-Reitoria de Pós-graduação da USP, CAPES-PROEX-Departamento de Genética e Banco Santander pelos auxílios financeiros recebidos durante o curso de doutorado.

À Dra Edda Klipp e todos do *Theoretical Biophysics Group* da *Humboldt-Universität Zu Berlin*, pelo apoio e recepção durante o estágio.

Ao Dr Jesús de La Cruz Diaz, todo laboratório de Biogênese ribossomal, em especial o doutorando Francisco J. Espinar-Marchena e a Dra Olga Rodríguez-Galán, a Universidade de Sevilla e ao Departamento de Genética, meu muito obrigado pelo apoio, recepção, conselhos, aprendizado e experiências científicas obtidas durante o doutorado sanduíche.

À Dra Gláucia Cavasin, Dra Joana D'Arc, e todo grupo do Departamento de Morfologia da UFG e Biologia EAD-UFG e a Profa. Joana Faria do IFG pelo apoio na vinda e permanência no doutorado.

À Secretaria da Educação do Estado de Goiás, Equipe gestora da *Escola Estadual Andreilino Rodrigues de Moraes* e demais funcionários da SEDUC que não mediram esforços para liberação da minha licença de aprimoramento profissional. Em nome da Dra Milca Severino e Thiago Mello Peixoto da Silveira, que foram os Secretários de Estado da Educação – GO durante o meu doutorado, meus sinceros agradecimentos a todos e ao Governo do Estado de Goiás.

Agradeço também a disposição dos membros da banca examinadora para avaliar e discutir a presente Tese.

Aos demais que aqui não foram citados, mas são dignos de agradecimento, meu muito obrigado!

Science is a human enterprise. It has drama, frequent disappointments and moments of extreme excitement. (...) women also possess an eagerness for discovery and they bring a fresh vision and approach to science. (...) Contemporary and future societies cannot afford to lose half their potential, intelligence and talent by failing to include women's creativity, determination, and unique perspective and approaches to science and technology.

A ciência é um empreendimento humano. Tem drama, decepções frequentes e momentos de extrema emoção. (...) as mulheres também possuem uma ânsia de descoberta e trazem uma nova visão e abordagem para a ciência. (...) Sociedades contemporâneas e futuras não podem se dar ao luxo de perder metade do seu potencial, inteligência e talento ao não incluir a criatividade, determinação, e perspectiva e abordagens únicas das mulheres para a ciência e tecnologia.

IANAS Women for Science
Women Scientists in the Americas: their Inspiring Stories, 2013.

Sorrisos Na Tempestade

Raízes

(Gladson Freitas e Max Muniz)

Na tempestade vejo os teus olhos
Tanta saudade de tudo que já passou
Tento entender todo mistério do amor
Tento tocar e uma canção vai dizer
Que a tua inocência me faz mais do que um herói
E em meio ao mar bravio, não posso deixar de sorrir

Sorrisos na tempestade
Momento de acreditar,
Que o sonho não vai ter fim
Que o sol ainda vai brilhar
Que o dia já amanheceu no teu olhar

Mesmo entre as ondas
A Luz não me abandonou
Consolo e abrigo - sinais do perfeito amor
Acreditar que a paz guarda o coração
Que entendeu o bem que nasceu da dor
E o vento vai me levar
De volta ao meu lugar
E em meio ao mar bravio, não posso deixar de sorrir

Sorrisos na tempestade...

RESUMO

CRUZ, A. H. S. **Mecanismos moleculares envolvidos no sensoramento de nutrientes e a possível relevância destes na patogenicidade de *Trichophyton rubrum***. 2013. 165 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, 2013.

Os fungos dermatófitos são caracterizados pela capacidade de invadir os tecidos queratinizados, usando queratina como principal fonte de nutrientes. Ao invadirem os tecidos hospedeiros eles causam um tipo de micose chamada de dermatofitose. Dentre os dermatófitos, a espécie *Trichophyton rubrum* é o causador mais comum de *tinea pedis*, *tinea unguium*, *tinea cruris* e *tinea corporis*, sendo considerado um fungo antropofílico e cosmopolita. Entretanto, o conhecimento da interação deste patógeno com o hospedeiro é escasso. Devido à importância clínica de *T. rubrum*, este trabalho analisou a composição de aminoácidos de proteínas queratinas oriundas de *Homo sapiens* e *Bos taurus* e a expressão de genes envolvidos na degradação de queratina, metabolismo e controle do ciclo celular. O perfil de expressão dos genes *sub3* e *sub5* que codificam para queratinases, *mad2* e *mad2B* que codificam proteínas envolvidas no controle da mitose, e os genes *idh1* (subunidade regulatória da isocitrato desidrogenase - NAD⁺), *idh2* (subunidade catalítica da isocitrato desidrogenase - NAD⁺), *idhp* (isocitrato desidrogenase - NADP⁺), *icl* (isocitrato liase) e *meicl* (metilisocitrato liase), que codificam proteínas envolvidas em vias metabólicas, foi analisado após o cultivo de *T. rubrum* em meios contendo glicose, glicina, glicose com glicina, ou queratina. A atividade queratinolítica foi avaliada após o cultivo de *T. rubrum* nesses meios e também em unha humana. Além disto, o efeito do antifúngico terbinafina na atividade queratinolítica e na expressão dos genes *sub3* e *sub5* foi analisado em meios contendo unha humana ou queratina. Após o cultivo de *T. rubrum* a atividade das enzimas IDH e IDHP componentes do ciclo de Krebs, ICL do ciclo do glioxilato e MeICL do ciclo do metilcitrato também foram avaliadas. Essas análises revelaram que a variação da fonte nutricional, do pH do meio de cultivo, e a presença/ausência do fator de transcrição PacC, proporcionam às diferentes linhagens de *T. rubrum* utilizadas neste trabalho (CBS, H6 e *pacC-1*) uma modulação diferenciada do acúmulo de transcritos dos genes, bem como da atividade queratinolítica e atividade das enzimas IDH, IDHP, ICL e MeICL. Outro fenômeno verificado foi que o antifúngico terbinafina afeta o acúmulo de transcritos dos genes *sub3* e *sub5*, e a atividade queratinolítica de acordo com a fonte nutricional e a linhagem de *T. rubrum*. Além disso, em condições de estresse por pH alcalino a enzima IDHP é preferencialmente requisitada para manutenção do ciclo de Krebs, sendo que a linhagem mutante *pacC-1* requisita em maior proporção as vias anapleróticas do que a linhagem selvagem H6. É importante enfatizar que a enzima ICL de *T. rubrum* possui atividade enzimática regulada por fosforilação, sendo sua atividade reduzida por esta modificação pós traducional. A identificação deste mecanismo de regulação da ICL por fosforilação e as análises dos transcritos de *icl* sugerem que em *T. rubrum* a regulação do fluxo de carbono no ciclo do glioxilato ocorra tanto em nível transcricional como pós-traducional. Os resultados obtidos possibilitaram ainda propor o primeiro modelo para *T. rubrum* que relaciona vias metabólicas, amparado por dados experimentais obtidos após o cultivo deste dermatófito em queratina.

Palavras-chave: *Trichophyton rubrum*, Ciclo celular (*mad2* e *mad2B*), Queratinases (*sub3* e *sub5*), Ciclo de Krebs (*idh1*, *idh2* e *idhp*), Ciclo do Glioxilato (*icl*) e Ciclo do Metilcitrato (*meicl*).

ABSTRACT

CRUZ, A. H. S. **Molecular mechanisms involved in nutriente sensing and its possible relevance for the pathogenicity of *Trichophyton rubrum***. 2013. 165 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, 2013.

Dermatophytes are fungi characterized by the ability to invade keratinized tissues using keratin as a major source of nutrients. When they invade host tissues they cause a type of ringworm called dermatophytosis. Among the dermatophytes, the species *Trichophyton rubrum* is the most common cause of *tinea pedis*, *tinea unguium*, *tinea cruris*, and *tinea corporis*, being considered an anthropophilic and cosmopolitan fungus. However, the knowledge of the interaction of this pathogen with the host is scarce. Due to the clinical importance of *T. rubrum*, this study analyzed the amino acid composition of keratin proteins derived from *Homo sapiens* and *Bos taurus*, and the expression of genes involved in keratin degradation, metabolism, and cell cycle control. The expression profile of the *sub3* and *sub5* genes, encoding keratinases, *mad2* and *mad2B*, encoding proteins involved in the control of mitosis, and the genes *idh1* (regulatory subunit of NAD⁺-isocitrate dehydrogenase), *idh2* (catalytic subunit of NAD⁺-isocitrate dehydrogenase), *idhp* (NADP⁺-isocitrate dehydrogenase), *icl* (isocitrate lyase), and *meicl* (metilicisocitrate lyase), which encode proteins involved in metabolic pathways, was analyzed after cultivation of *T. rubrum* in media containing glucose, glycine, glucose and glycine, or keratin. The keratinolytic activity was evaluated after cultivation of *T. rubrum* in these media and also in human nail. Furthermore, the effect of the antifungal agent terbinafine in keratinase activity and *sub3* and *sub5* gene expression was analyzed in media containing human nail or keratin. After culturing *T. rubrum* the enzyme activity of IDH and IDHP, components of the Krebs cycle, ICL of the glyoxylate cycle, and MeICL of the metilicitrato cycle were also evaluated. These analyses revealed that the variation in the nutritional source, the pH of the medium, and the presence/absence of the transcription factor PacC, provide to the different *T. rubrum* strains used in this study (CBS, H6 and *pacC-1*) differential modulation of transcripts accumulation of the genes, as well as keratinolytic activity and enzymatic activities of IDH, IDHP, ICL and MeICL. Another phenomenon observed was that the antifungal terbinafine affects the accumulation of transcripts of the genes *sub3*, *sub5*, and the keratinolytic activity according to nutritional source and *T. rubrum* strain. In addition, in stress conditions by alkaline pH the IDHP enzyme is preferably required for maintenance of the Krebs cycle, and the mutant *pacC-1* requests the anaplerotic pathways in greater proportion than the wild type strain H6. It is important to emphasize that *T. rubrum* ICL enzyme has its enzymatic activity regulated by phosphorylation, being reduced by this post translational modification. The identification of this regulation mechanism by phosphorylation of ICL and *icl* transcripts analysis suggest that in *T. rubrum* the carbon flux regulation in the glyoxylate cycle occurs at both transcriptional and post-translational levels. The results also made possible the proposition of the first model for *T. rubrum* correlating metabolic pathways, supported by experimental data obtained after cultivation of this dermatophyte in keratin.

Keywords: *Trichophyton rubrum*, Cellular Cycle (*mad2* e *mad2B*), Keratinases (*sub3* e *sub5*), Krebs cycle (*idh1*, *idh2* e *idhp*), Glyoxylate Cycle (*icl*) e Methylcitrate Cycle (*meicl*).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Anverso e reverso da colônia de <i>T. rubrum</i> cultivada em meio Sabouraud.	24
Figura 2: Corte histológico de pele da planta do pé, coloração HE	27
Figura 3: Regulação da divisão celular (<i>spindle-assembly checkpoint</i>).....	31
Figura 4: Esquema representativo do ciclo de Krebs, ciclo do glioxilato e gliconeogênese.....	33
Figura 5: Ciclo do Glioxalato e metilcitrato com vias metabólicas correlacionadas em <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	35
Figura 6: Alinhamento de sequências parciais do gene <i>gapdh</i> das linhagens de <i>T. rubrum</i>	Erro! Indicador não definido.
Figura 7: Alinhamento de sequências parciais do gene β - <i>tubulina</i> das linhagens de <i>T. rubrum</i>	Erro! Indicador não definido.
Figura 8: Alinhamento de sequências parciais do gene <i>mad2</i> das linhagens de <i>T. rubrum</i>	Erro! Indicador não definido.
Figura 9: Alinhamento de sequências parciais do gene <i>mad2B</i> das linhagens de <i>T. rubrum</i>	Erro! Indicador não definido.
Figura 10: Alinhamento de sequências parciais do gene <i>sub3</i> das linhagens de <i>T. rubrum</i>	Erro! Indicador não definido.
Figura 11: Alinhamento de sequências parciais do gene <i>sub5</i> das linhagens de <i>T. rubrum</i>	Erro! Indicador não definido.
Figura 12: Alinhamento de sequências parciais do gene <i>idh1</i> das linhagens de <i>T. rubrum</i>	Erro! Indicador não definido.
Figura 13: Alinhamento de sequências parciais do gene <i>idh2</i> das linhagens de <i>T. rubrum</i>	Erro! Indicador não definido.
Figura 14: Alinhamento de sequências parciais do gene <i>idhp</i> das linhagens de <i>T. rubrum</i>	Erro! Indicador não definido.
Figura 15: Alinhamento de sequências parciais do gene <i>icl</i> das linhagens de <i>T. rubrum</i>	Erro! Indicador não definido.
Figura 16: Alinhamento de sequências parciais do gene <i>mei1</i> das linhagens de <i>T. rubrum</i>	Erro! Indicador não definido.
Figura 17: Identificação da sequência consenso de ligação ao DNA pelo fator de transcrição PacC GCCA(AG)G, na região promotora dos genes estudados.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 18: Identificação da sequência consenso de ligação ao DNA pelo fator de transcrição PacC na forma reversa e complementar C(CT)TGGC, na região promotora dos genes estudados.	Erro! Indicador não definido.
Figura 19: Cultivos em placa contendo meio MEA das linhagens de <i>T. rubrum</i> durante 21 dias.	Erro! Indicador não definido.
Figura 20: Valores de pH aferidos nos meios de cultivo, não tamponados, das linhagens de <i>T. rubrum</i> CBS, H6 e <i>pacC-1</i> , na presença de diferentes fontes nutricionais.	Erro! Indicador não definido.
Figura 21: Valores de massa do micélio obtido após os cultivos das linhagens de <i>T. rubrum</i> CBS, H6 e <i>pacC-1</i> em meios não tamponados.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 22: Valores de massa do micélio obtido após os cultivos das linhagens de <i>T. rubrum</i> CBS, H6 e <i>pacC-1</i> em meios tamponados.....	Erro! Indicador não definido.

Figura 23: Expressão gênica de *mad2* e *mad2B* na linhagem CBS cultivada na presença de diferentes fontes nutricionais. As condições referem-se a meios de cultivo não tamponados....**Erro! Indicador não definido.**

Figura 24: Expressão gênica de *mad2* e *mad2B* nas linhagens H6 e *pacC-1* cultivadas na presença de diferentes fontes nutricionais. As condições referem-se a meios de cultivo não tamponados**Erro! Indicador não definido.**

Figura 25: Expressão gênica de *mad2* e *mad2B* na linhagem CBS cultivada na presença de diferentes fontes nutricionais. As condições referem-se a meios de cultivo tamponados com pH 5,0 e pH 8,0. Diferenças estatísticas na expressão do gene em pH alcalino quando comparado ao ácido, em cada fonte nutricional, são representadas por (*) e correspondem a um valor de $P < 0,05$. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 26: Expressão gênica de *mad2* e *mad2B* nas linhagens H6 e *pacC-1* cultivadas na presença de diferentes fontes nutricionais. As condições referem-se a meios de cultivo tamponados**Erro! Indicador não definido.**

Figura 27: *Heat map* de expressão gênica dos genes *mad2* e *mad2B* nas linhagens de *T. rubrum*..
.....**Erro! Indicador não definido.**

Figura 28: Múltiplo alinhamento de sequências deduzidas de aminoácidos de proteases subtilisinas SUB3 de fungos dermatófitos.....**Erro! Indicador não definido.**

Figura 29: Predição de localização da SUB3.....**Erro! Indicador não definido.**

Figura 30: Predição de localização da SUB3.....**Erro! Indicador não definido.**

Figura 31: Expressão gênica de *sub3* e *sub5* na linhagem CBS cultivada na presença de diferentes fontes nutricionais. As condições referem-se a meios de cultivo não tamponados... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 32: Expressão gênica de *sub3* e *sub5* nas linhagens H6 e *pacC-1* cultivadas na presença de diferentes fontes nutricionais. As condições referem-se a meios de cultivo não tamponados....**Erro! Indicador não definido.**

Figura 33: Expressão gênica de *sub3* e *sub5* na linhagem CBS cultivada na presença de diferentes fontes nutricionais. As condições referem-se a meios de cultivo tamponados. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 34: Expressão gênica de *sub3* e *sub5* nas linhagens H6 e *pacC-1* cultivadas na presença de diferentes fontes nutricionais. As condições referem-se a meios de cultivo tamponados.....**Erro! Indicador não definido.**

Figura 35: *Heat map* de expressão gênica dos genes *sub3* e *sub5*.**Erro! Indicador não definido.**

Figura 36: Expressão gênica de *sub3* e *sub5* nas linhagens CBS, H6 e *pacC-1* cultivadas na presença de queratina bovina e fragmentos de unha humana, com e sem a adição do antifúngico terbinafina. Todas as condições referem-se a meios de cultivo não tamponados**Erro! Indicador não definido.**

Figura 37: *Heat map* de expressão gênica de cultivos em terbinafina, dos genes *sub3* e *sub5*...**Erro! Indicador não definido.**

Figura 38: Expressão gênica de *idh1*, *idh2*, *idhp*, *icl* e *meicl* na linhagem CBS cultivada na presença de diferentes fontes nutricionais. As condições referem-se a meios de cultivo não tamponados
.....**Erro! Indicador não definido.**

Figura 39: Expressão gênica de *idh1*, *idh2*, *idhp*, *icl* e *meicl* na linhagem CBS cultivada na presença de diferentes fontes nutricionais. As condições referem-se a meios de cultivo não tamponados.
.....**Erro! Indicador não definido.**

Figura 40: Expressão gênica de *idh1*, *idh2*, *idhp*, *icl* e *meicl* nas linhagens H6 e *pacC-1* cultivadas na presença de diferentes fontes nutricionais. As condições referem-se a meios de cultivo não tamponados com pH inicial de 5,0. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 41: Expressão gênica de *idh1*, *idh2*, *idhp*, *icl* e *meicl* na linhagem CBS cultivada na presença de diferentes fontes nutricionais. As condições referem-se a meios de cultivo tamponados **Erro! Indicador não definido.**

Figura 42: Expressão gênica de *idh1*, *idh2*, *idhp*, *icl* e *meicl* na linhagem CBS cultivada na presença de diferentes fontes nutricionais. As condições referem-se a meios de cultivo tamponados **Erro! Indicador não definido.**

Figura 43: Expressão gênica de *idh1*, *idh2*, *idhp*, *icl* e *meicl* nas linhagens H6 e *pacC-1* cultivadas na presença de diferentes fontes nutricionais. As condições referem-se a meios de cultivo tamponados com pH 5,0 e pH 8,0. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 44: *Heat map* de expressão gênica apresentando simultaneamente agrupamentos de amostras e genes. A matriz apresenta os valores em Log₂ obtidos a partir da expressão dos genes *idh1*, *idh2*, *idhp*, *icl* e *meicl* nas linhagens CBS, H6 e *pacC-1*. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 45: Expressão gênica de *sub3 sub5*, *mad2*, *mad2B*, *idh1*, *idh2*, *idhp*, *icl*, e *meicl*, obtidas após o cultivo da linhagem CBS por 72h e retorno da mesma por 5h ao respectivo meio com pH inicial 5,0. As condições referem-se a meios de cultivo não tamponados. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 46: Expressão gênica de *sub3 sub5*, *mad2*, *mad2B*, *idh1*, *idh2*, *idhp*, *icl*, e *meicl*, obtidas após o cultivo da linhagem CBS por 72h e retorno da mesma por 5h ao respectivo meio com pH inicial 5,0. As condições referem-se a meios de cultivo não tamponados. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 47: Expressão gênica de *sub3 sub5*, *mad2*, *mad2B*, *idh1*, *idh2*, *idhp*, *icl*, e *meicl*, obtidas após o cultivo da linhagem CBS por 72h e retorno da mesma por 5h ao respectivo meio com pH inicial 5,0. As condições referem-se a meios de cultivo não tamponados. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 48: Expressão gênica de *sub3 sub5*, *mad2*, *mad2B*, *idh1*, *idh2*, *idhp*, *icl*, e *meicl*, obtidas após o cultivo da linhagem CBS por 72h e retorno da mesma por 5h ao respectivo meio com pH inicial 5,0. As condições referem-se a meios de cultivo não tamponados. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 49: *Heat map* de expressão gênica apresentando dendograma. A matriz apresenta os valores em Log₂ obtidos a partir da expressão dos genes *sub3 sub5*, *mad2*, *mad2B*, *idh1*, *idh2*, *idhp*, *icl*, e *meicl*, obtidas após o cultivo da linhagem CBS em diferentes fontes nutricionais por 72h e retorno das mesmas por 5h ao respectivo meio com pH ácido (5h). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 50: Esquema representativo dos ciclos do ácido tricarboxílico, glioxilato e metilcitrato em *T. rubrum*, após 24h de cultivo da linhagem CBS em meio mínimo contendo queratina. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 51: Esquema representativo dos ciclos do ácido tricarboxílico, glioxilato e metilcitrato em *T. rubrum*, após 96h de cultivo da linhagem CBS em meio mínimo contendo queratina. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 52: Esquema representativo dos ciclos do ácido tricarboxílico, glioxilato e metilcitrato em *T. rubrum*, após 24h de cultivo da linhagem H6 em meio mínimo contendo queratina. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 53: Esquema representativo dos ciclos do ácido tricarboxílico, glioxilato e metilcitrato em *T. rubrum*, após 96h de cultivo da linhagem H6 em meio mínimo contendo queratina. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 54: Esquema representativo dos ciclos do ácido tricarboxílico, glioxilato e metilcitrato em *T. rubrum*, após 24h de cultivo da linhagem *pacC-1* em meio mínimo contendo queratina.**Erro!**
Indicador não definido.

Figura 55: Esquema representativo dos ciclos do ácido tricarboxílico, glioxilato e metilcitrato em *T. rubrum*, após 96h de cultivo da linhagem *pacC-1* em meio mínimo contendo queratina..**Erro!**
Indicador não definido.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Meio Extrato de Malte – MEA.....	46
Tabela 2: Meio Sabouraud modificado – MS	46
Tabela 3: Meio Mínimo – MM	46
Tabela 4: Solução de sais	47
Tabela 5: Solução de elementos traços	47
Tabela 6: Solução de Lise	48
Tabela 7: Etanol 70%	48
Tabela 8: Tampão TE (Tris-EDTA).....	48
Tabela 9: Solução de sal para extração de RNA	52
Tabela 10: Água livre de RNase /Água DEPC (0,1% v/v)	52
Tabela 11: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nos experimentos de <i>qRT-PCR</i>	53
Tabela 12: Reação enzimática de ICL (30°C).....	57
Tabela 13: Reação enzimática de MeICL (30°C).....	58
Tabela 14: Reação enzimática de IDH (24°C)	59
Tabela 15: Reação enzimática de IDHP (24°C)	59
Tabela 16: Valores de pH e massa micelial aferidos após o cultivo da linhagem CBS	Erro!
Indicador não definido.	
Tabela 17: Atividade queratinolítica em meio de cultivo não tamponado (U/mg)... ..	Erro! Indicador não definido.
Tabela 18: Atividade queratinolítica em meio de cultivo não tamponado (U/mg).. ..	Erro! Indicador não definido.
Tabela 19: Atividade queratinolítica no meio de cultivo tamponado (U/mg)....	Erro! Indicador não definido.
Tabela 20: Atividade queratinolítica no meio de cultivo não tamponado (U/mg)....	Erro! Indicador não definido.
Tabela 21: Atividade de enzimas intracelulares (U/μg).....	Erro! Indicador não definido.
Tabela 22: Relação entre quantidade de transcritos e atividade de enzimas intracelulares.	Erro! Indicador não definido.
Tabela 23: Atividade de ICL na presença e ausência de FastAP (U/μg).	Erro! Indicador não definido.
Tabela 24: Relação entre quantidade de transcritos e atividade de enzimas intracelulares.	Erro! Indicador não definido.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	Fungos e dermatofitoses.....	22
1.1.1	<i>Trichophyton rubrum</i>	23
1.2	Queratinas e sua participação na composição dos tecidos do hospedeiro.....	26
1.3	Queratinases	27
1.4	Controle de mitose por MAD2 e MAD2B	30
1.5	Ciclo do ácido tricarboxílico.....	32
1.6	Ciclo do glioxilato e ciclo do metilcitrato.....	34
2	HIPÓTESE DO TRABALHO.....	39
3	OBJETIVO GERAL	41
3.1	Objetivos Específicos.....	41
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
5	RESULTADOS.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
5.1	Análise de sequências de aminoácidos de proteínas queratinas.....	Erro! Indicador não definido.
5.1.1	Queratina Bovina	Erro! Indicador não definido.
5.1.2	Queratina Humana	Erro! Indicador não definido.
5.2	Sequenciamento de fragmentos gênicos da linhagem de <i>T. rubrum</i> H6 (ATCC MYA 3108)	Erro! Indicador não definido.
5.3	Presença de sequência consenso de ligação ao DNA do fator de transcrição PacC....	Erro! Indicador não definido.
5.4	Valores de pH e massa micelial obtidos ao final de cada cultivo	Erro! Indicador não definido.
5.5	Análise da regulação da expressão de genes de <i>T. rubrum</i> e do perfil transcricional resultante do metabolismo de diferentes fontes nutricionais.....	Erro! Indicador não definido.
5.5.1	Expressão dos genes <i>mad2</i> e <i>mad2B</i>	Erro! Indicador não definido.
5.5.2	Subtilisinas: <i>sub3</i> e <i>sub5</i>	Erro! Indicador não definido.
5.5.3	Influência do antifúngico Terbinafina na expressão das subtilisinas: <i>sub3</i> e <i>sub5</i>	Erro! Indicador não definido.
5.5.4	Genes que codificam proteínas envolvidas em ciclos metabólicos: <i>idh1</i> , <i>idh2</i> , <i>idhp</i> , <i>icl</i> e <i>meicl</i>	Erro! Indicador não definido.
5.5.5	Expressão gênica após a variação do pH alcalino para ácido	Erro! Indicador não definido.
5.6	Atividade de enzimas extracelulares	Erro! Indicador não definido.

- 5.6.1 Atividade queratinolítica em meios de cultivo não tamponados...**Erro! Indicador não definido.**
- 5.6.2 Atividade queratinolítica em meios de cultivos tamponados**Erro! Indicador não definido.**
- 5.6.3 Atividade queratinolítica em cultivos contendo o antifúngico terbinafina **Erro! Indicador não definido.**
- 5.7 Atividade de enzimas intracelulares.....**Erro! Indicador não definido.**
- 5.8 Relação entre a transcrição e atividade de enzimas participantes do Ciclo do ácido tricarboxílico, Ciclo do Glioxilato e Ciclo do metilcitrato.....**Erro! Indicador não definido.**
- 5.9 Influência da defosforilação na atividade de ICL**Erro! Indicador não definido.**
- 5.10 Correlação dos Ciclos do ácido tricarboxílico, Glioxilato e metilcitrato ..**Erro! Indicador não definido.**
- 6 DISCUSSÃOERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- 6.1 Modulação da variação do pH do meio extracelular em cultivos de *T. rubrum***Erro! Indicador não definido.**
- 6.2 Análise do crescimento micelial do dermatófito *T. rubrum*.....**Erro! Indicador não definido.**
- 6.3 Análise da regulação da expressão dos genes *mad2* e *mad2B* no dermatófito *T. rubrum*
Erro! Indicador não definido.
- 6.4 Análise da regulação da expressão dos genes *sub3* e *sub5*, que codificam para subtilisinas no dermatófito *T. rubrum*.....**Erro! Indicador não definido.**
- 6.4.1 Influência da variação nutricional na expressão dos genes *sub3* e *sub5* **Erro! Indicador não definido.**
- 6.4.2 Influência do antifúngico terbinafina na expressão dos genes *sub3* e *sub5* de *T. rubrum* **Erro! Indicador não definido.**
- 6.5 Atividade queratinolítica.....**Erro! Indicador não definido.**
- 6.5.1 Atividade queratinolítica em meios de cultivos de *T. rubrum* não tamponados e tamponados**Erro! Indicador não definido.**
- 6.5.2 Interferência do antifúngico terbinafina na atividade queratinolítica de *T. rubrum*
Erro! Indicador não definido.
- 6.6 Análise transcricional de genes que codificam para proteínas envolvidas em vias metabólicas de *T. rubrum*: *idh1*, *idh2*, *idhp*, *icl*, *meicl*.....**Erro! Indicador não definido.**
- 6.7 Análise da expressão de genes da linhagem CBS de *T. rubrum* após a variação do pH dos meios de cultivo de alcalino para ácido**Erro! Indicador não definido.**
- 6.8 Atividade de enzimas participantes do Ciclo do ácido tricarboxílico, Ciclo do Glioxilato e Ciclo do metilcitrato.....**Erro! Indicador não definido.**
- 6.9 Regulação por fosforilação da enzima isocitrato liase de *T. rubrum* .**Erro! Indicador não definido.**

6.10	Relação entre a transcrição e atividade enzimática de enzimas participantes do Ciclo do ácido tricarboxílico, Ciclo do Glioxilato e Ciclo do metilcitrato ...	Erro! Indicador não definido.
6.11	Correlação dos Ciclos do ácido tricarboxílico, glioxilato e metilcitrato ...	Erro! Indicador não definido.
7	CONCLUSÕES	66
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
	ANEXOS.....	77
	Anexo 1: Estágio na <i>Humboldt University</i> (Berlim – Alemanha).....	77
	Anexo 2: Doutorado Sanduíche na <i>Universidad de Sevilla</i> (Sevilha – Espanha)	79
	Anexo 3: Publicações	158

Introdução

Considero que os projetos genoma estabeleceram nova cultura científica, uma visão holística da célula ou da espécie. (...) A Genômica, associada à Bioinformática, será sem dúvida o pilar mais forte da Genética nas próximas décadas.

Nilce Maria Martinez-Rossi (Brasil).

1 Introdução

1.1 Fungos e dermatofitoses

Os fungos, juntamente com as bactérias heterotróficas, são os principais decompositores da biosfera, capazes de degradar a matéria orgânica, reciclando o carbono, o nitrogênio e outros componentes que são liberados no solo e no ar. Como decompositores, entram em conflito direto com os interesses do ser humano, atacando quase todas as substâncias concebíveis. Por isso, muitos fungos são economicamente importantes como destruidores de alimentos estocados e outros materiais orgânicos, e outros fungos, atacam organismos vivos e são, portanto, agentes causadores de doenças em plantas, animais domésticos e no ser humano (RAVEN et al., 2001).

Dentre os fungos causadores de doenças, destacamos os dermatófitos. Os dermatófitos são caracterizados pela capacidade de invadir os tecidos queratinizados como pele, cabelo e unhas, de seres humanos e outros animais. Ao invadirem os tecidos hospedeiros eles causam um tipo de micose comumente chamada de dermatofitose. Estes organismos, ao contrário da maioria dos outros fungos, são particularmente bem adaptados para infectar tecidos queratinizados porque eles podem usar como fonte de nutrientes a proteína queratina, embora eles não façam parte da flora normal da pele humana (WEITZMAN, SUMMERBELL, 1995).

Os dermatófitos estão entre os poucos fungos que causam doenças transmissíveis, ou seja, que podem ser adquiridas a partir de fômites ou animais infectados. Estes organismos pertencem à classe dos Eufungi e gêneros *Trichophyton*, *Epidermophyton* e *Microsporum*, sendo classificados de acordo com seus principais habitats em: antropofílicos, fungos que infectam o ser humano e que raramente infectam outros animais; zoofílicos, que geralmente infectam animais ou estão associados a animais, mas que ocasionalmente também podem infectar seres humanos; geofílicos, que estão primariamente associados a materiais queratinosos presentes no solo que dissociaram de animais vivos ou que estão em processo de decomposição, como cabelos, penas, cascos e chifres, podendo também infectar seres humanos e animais (WEITZMAN, SUMMERBELL, 1995; MARTINEZ-ROSSI et al., 2011).

As dermatofitoses são micoses comuns que vem aumentando em uma escala global. Por isso, em algumas regiões geográficas, elas são consideradas como um importante

problema de saúde pública (WANG et al., 2006). Estas micoses são tradicionalmente nomeadas de acordo com as localizações anatômicas da infecção, sendo utilizado o termo em latim para designar o local do corpo em que o fungo está instalado. Como por exemplo: *tinea capitis* (micose do couro cabeludo, sobrancelhas e cílios), *tinea barbae* (micose da barba e bigode), *tinea corporis* (micose na pele do corpo), *tinea manuum* (micose na mão), *tinea pedis* (micose no pé), *tinea cruris* (micose na virilha) e *tinea unguium* (micose nas unhas) (WEITZMAN, SUMMERBELL, 1995).

Apesar da disponibilidade de novas terapias sistêmicas de antifúngicos, as dermatofitoses, particularmente as infecções de unhas são difíceis de erradicar, apresentando uma taxa de recorrência de 25-40% (WANG et al., 2006). Por isso, durante as últimas décadas, extensas pesquisas têm sido realizadas com dermatófitos e dermatofitoses, o que amplia os conhecimentos sobre a epidemiologia dessas infecções (SEEBACHER et al., 2008a)

Com o sequenciamento e anotação de muitos genomas de dermatófitos, bem como os avanços em técnicas para manipulação genética destes, espera-se elucidar mecanismos de virulência destes patógenos. Já que, o entendimento de fatores de virulência específicos que contribuem para a patogenicidade de dermatófitos pode ajudar no desenvolvimento de terapêuticos específicos para dermatofitoses (ACHTERMAN, WHITE, 2012). Principalmente porque as respostas a uma infecção por dermatófitos podem variar em consequência não só de reações do hospedeiro aos produtos metabólicos do fungo, mas também da virulência da linhagem ou espécie infectante, localização anatômica da infecção e fatores ambientais (WEITZMAN, SUMMERBELL, 1995).

1.1.1 *Trichophyton rubrum*

Apesar de vários sítios anatômicos poderem ser infectados por espécies de dermatófitos individuais, e de diferentes espécies poderem produzir lesões clinicamente idênticas (WEITZMAN, SUMMERBELL, 1995), o causador mais comum de *tinea pedis*, *tinea unguium*, *tinea cruris* e *tinea corporis* em todo mundo é o dermatófito *Trichophyton rubrum* (SEEBACHER et al., 2008a).

O gênero *Trichophyton* inclui várias espécies, sendo a colônia em ágar caracterizada pela aparência aveludada ou cerosa, com pigmentação no verso (Figura 1), uma característica utilizada para a identificação das espécies dentro deste gênero (JAGDISH, 1995 apud LAKSHMIPATHY, KANNABIRAN, 2010;

(WEITZMAN,SUMMERBELL, 1995). A espécie *T. rubrum* tem sido considerada como um fungo dermatófito antropofílico, filamentosso, patogênico e cosmopolita, além de ser um modelo ideal para estudo de mecanismos moleculares relacionados ao crescimento, metabolismo, patogenicidade e resistência aos antifúngicos de micoses superficiais. Mas o conhecimento sobre a interação deste patógeno com o hospedeiro é escasso, embora alguns grupos estejam estudando aspectos moleculares de seus genes, como aqueles provavelmente envolvidos em sua patogenicidade (FERREIRA-NOZAWA et al., 2006; MARANHÃO et al., 2007; YANG et al., 2007).

Figura 1: Anverso e reverso da colônia de *T. rubrum* cultivada em meio Sabouraud sólido durante 22 dias em estufa a 28°C. Na frente da colônia observa-se a característica cotonosa do micélio e no verso a coloração rubra que nomeia a espécie (Foto: CRUZ A.H.S.).

A importância destes estudos decorre do fato de que, quando o dermatófito adere ao hospedeiro, ele passa a obter nutrientes deste para seu desenvolvimento e sobrevivência. Para tanto, o fungo utiliza uma maquinaria composta por enzimas hidrolíticas que são secretadas e apresentam especificidade por diferentes substratos. Por essa razão, a secreção de uma ampla variedade de enzimas pelos dermatófitos, como proteases, lipases, elastases, collagenases, fosfatases e esterases, é considerada um dos fatores mais importantes durante o processo infeccioso (APODACA,MCKERROW, 1989; PERES et al., 2010a)

Análises *in vitro* revelaram que durante o crescimento de *T. rubrum* em fontes nutricionais como glicina, queratina e triglicerides, o pH extracelular é modificado de ácido para alcalino, por ajustes do dermatófito provavelmente através da secreção de amônia. Foi sugerido que a combinação de mudança de pH ambiental e presença de queratina pode ser necessária para induzir a expressão de genes que possibilitem uma estratégia eficiente para o sucesso da instalação, desenvolvimento e manutenção do dermatófito no hospedeiro (MARTINEZ-ROSSI et al., 2011).

É importante ressaltar que durante a disseminação do artroconídio e a transmissão da infecção para diferentes hospedeiros e/ou sítios anatômicos, os dermatófitos migram de

um ambiente alcalino para um ácido, que é o pH normal da pele. Esse mecanismo envolve a detecção de pH ácido, que desencadeia adaptações metabólicas específicas ao re-iniciar o ciclo de sensoramento do pH (MARTINEZ-ROSSI et al., 2011). Essa regulação molecular de respostas adaptativas dos micro-organismos às condições ambientais revelou-se extremamente complexa, envolvendo vários genes que monitoram, por exemplo, a disponibilidade de fosfato inorgânico e as próprias alterações de pH extracelular, permitindo a sinalização intracelular para síntese de macromoléculas necessárias para manutenção da homeostase celular (KANG, METZENBERG, 1990; KNIGHT et al., 2004; WATERS et al., 2004).

A via transdutora de sinal em resposta adaptativa ao pH, por exemplo, é mediada pelo fator de transcrição PacC e tem sido descrita atuante em muitos eventos metabólicos de *A. nidulans* e outros fungos. O PacC é um fator de transcrição *zinc-finger* e seis genes *pal* (*A*, *B*, *C*, *F*, *H* e *I*) são membros putativos de uma cascata sinalizadora que promoveria a ativação proteolítica de PacC, supostamente em ambiente alcalino (PEÑALVA et al., 2008)). Apesar disto, existem evidências de que o fator de transcrição PacC seja funcional tanto em meio ácido como alcalino, e que os mecanismos moleculares envolvidos na regulação da expressão gênica pelo pH em *A. nidulans* dependam das condições nutricionais encontradas pelo fungo (FREITAS et al., 2007; SILVA et al., 2008; FREITAS et al., 2011).

Assim como *A. nidulans*, *T. rubrum* apresenta o fator de transcrição PacC. E com a ruptura do gene *pacC* em uma linhagem de *T. rubrum* (*pacC-1*) foi possível verificar uma redução não só no crescimento, mas também na atividade queratinolítica, sugerindo que estas proteínas são de alguma forma reguladas pela proteína PacC (FERREIRA-NOZAWA et al., 2006). Além disso, a caracterização da linhagem mutante *pacC-1* tem revelado que o fator de transcrição PacC regula a expressão de um amplo espectro de genes, envolvidos em diferentes processos celulares, cuja expressão em *T. rubrum* é requerida durante o desenvolvimento deste dermatófito em substratos presentes no tecido hospedeiro e na resposta adaptativa ao pH ambiente, como por exemplo a transcrição de proteases, enzimas envolvidas no metabolismo e até mesmo *N*- e *O*-manosiltransferases (CAZZANIGA, 2011; MENDES et al., 2012).

1.2 Queratinas e sua participação na composição dos tecidos do hospedeiro

Como já mencionado, *T. rubrum* é o principal patógeno das dermatofitoses de pele, unha, pé e virilha (SEEBACHER et al., 2008a) e em todas estas regiões do corpo este fungo encontra nutrientes necessários para o seu desenvolvimento. Um nutriente do hospedeiro muito utilizado pelo fungo é a proteína queratina. As queratinas são proteínas que formam a família mais diversificada dos filamentos intermediários, que são fibras semelhantes a cabos e que fornecem resistência mecânica à célula. Estes filamentos, juntamente com os microfilamentos e microtúbulos são responsáveis pela grande variedade funcional do citoesqueleto nas células (ALBERTS et al., 2004).

As queratinas também são caracterizadas como heterogêneas, possuindo 400-644 resíduos de aminoácidos e ponto isoelétrico (pI) variando de 4,7-8,4, sendo notoriamente insolúveis devido à sua estrutura primária. A nomenclatura das queratinas foi originalmente baseada na separação de proteínas por tamanho e carga, através de eletroforese bidimensional. Atualmente, a comparação de cada sequência de aminoácido ou estrutura gênica revelam dois distintos grupos de aproximadamente igual número de membros de queratina, designados proteínas tipo I e tipo II. As queratinas tipo I tendem a ser menores (40-64 kDa) e ácidas (pI 4,7-6,1) em comparação ao tipo II, que são maiores (52-68kDa) e de carga basineutra (pI 5,4-8,4) (COULOMBE et al., 2004).

Apesar da variedade de proteínas queratina, o termo "queratina" é hoje, geralmente, aceito para se referir as queratinas epiteliais de tecidos epiteliais macios, tais como da epiderme (MCLEAN,MOORE, 2011). Na pele observamos uma porção conjuntiva de origem mesodérmica (derme), e uma porção epitelial de origem ectodérmica (epiderme), que formam cinco camadas: basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea (JUNQUEIRA,CARNEIRO, 2008) (Figura 2). A instalação dos dermatófitos ocorre justamente na camada córnea. Essa camada possui espessura variável e é constituída por células achatadas, mortas e sem núcleo, com citoplasma repleto de queratina. A composição dos tonofilamentos se modifica à medida que os queratinócitos se diferenciam, sendo que, as células da camada basal apresentam queratinas de baixo peso molecular, enquanto os queratinócitos mais diferenciados sintetizam queratinas de peso molecular maior. Na camada córnea os tonofilamentos se aglutinam junto com uma matriz formada pelos grânulos de querato-hialina (JUNQUEIRA,CARNEIRO, 2008).

Figura 2: Corte histológico de pele da planta do pé. Epiderme: estrato córneo (1), estrato granuloso (2), estrato espinhoso (3), estrato germinativo (4). Derme (5). Fonte: Morfologia-ICB2–UFG (Universidade Federal de Goiás).

Mas, os tecidos epiteliais rígidos, tais como cabelo e unhas também expressam um grupo especializado de proteínas de queratina tipo I e tipo II que possui excepcionalmente alto conteúdo de cisteína (MCLEAN,MOORE, 2011). Essas queratinas de cabelo são uma família de proteínas estruturais encontradas abundantemente em cabelos e unhas, como já dito, e são frequentemente chamadas como queratinas *hard* (rígida) como oposição às queratinas *soft* (macia) que também são encontradas em tecidos epiteliais (HILL et al., 2010).

A disposição das proteínas queratinas também é importante na formação da unha, pele e cabelo. Pois, as unhas são constituídas essencialmente por escamas córneas compactadas, fortemente aderidas umas às outras, formando placas de células queratinizadas localizadas na superfície dorsal das falanges terminais dos dedos. Já os pelos, são estruturas delgadas e queratinizadas que se desenvolvem a partir de uma invaginação de epiderme. Mas enquanto os pelos têm uma estrutura compacta constituída de queratina mais dura e demoram meses para morrer, a epiderme produz uma camada superficial de células mortas contendo queratina relativamente mole, com pouca adesividade e que se descama continuamente (JUNQUEIRA,CARNEIRO, 2008).

1.3 Queratinases

Para utilização da queratina, os fungos dermatófitos dependem de enzimas especiais, pois, além destas proteínas possuem essa resistência mecânica, elas são extremamente resistentes à degradação por enzimas proteolíticas comuns (GRADISAR et al., 2000). Por isso, independentemente da fase de crescimento de *T. rubrum* durante as infecções humanas, este organismo possui claramente um arsenal proteolítico necessário

para parasitar os tecidos cornificados do corpo (APODACA, MCKERROW, 1989). Além disso, proteases secretadas por *T. rubrum* são consideradas os principais fatores de virulência durante a infecção do hospedeiro (LENG et al., 2009).

As enzimas são catalisadores extraordinariamente eficientes e são classificadas de acordo com a reação específica que catalisam (NELSON, COX, 2011). As queratinases, por exemplo, são enzimas proteolíticas capazes de degradar a proteína insolúvel queratina. Essas enzimas são produzidas por diversos micro-organismos e mostram uma grande diversidade em suas propriedades bioquímicas e biofísicas. Estudos indicam que queratinases são frequentemente serina e metaloproteases, com várias aplicações atuais e potenciais nos domínios agro-industriais, farmacêuticos e biomédicos (BRANDELLI et al., 2010).

Algumas investigações têm fornecido padrões de expressão e da dinâmica dos genes das proteases secretadas pertencentes às famílias das subtilisinas (SUB) e metaloproteases (MEP) de *T. rubrum*. Substratos como queratina, colágeno e elastina induziram a expressão de genes de protease semelhantes, e os padrões de expressão e dinâmica dos genes de proteases em meios contendo pele humana foram diferentes daqueles contendo proteína individual como substrato. De acordo com a dinâmica de expressão desses genes de proteases, concluiu-se que Sub3, Sub4 e MEP4 podem ser as principais proteases secretadas pelo *T. rubrum* durante a infecção do hospedeiro, e que estas proteases podem ser bons alvos para novos agentes antifúngicos e marcadores de diagnósticos moleculares (LENG et al., 2009).

Análises de expressão gênica de *T. rubrum*, através de bibliotecas de hibridização subtrativa por supressão (*suppression subtractive hybridization* - SSH), após o cultivo deste dermatófito em queratina e glicose, revelaram a superexpressão em queratina de genes que codificam para SUB3, SUB5, MEP3 e MEP4 (MARANHÃO et al., 2007). A comparação de *T. rubrum* cultivado em meio com pele e unhas também mostrou substratos favoritos diferentes para secreção de endoproteases. Os genes MEP2, SUB5, SUB2 e SUB3 foram mais ativos durante o crescimento em meio de pele. Estas proteases têm, possivelmente, maior afinidade com a queratina da pele. Enquanto as estruturas de SUB1, SUB4 e MEP4 podem ser mais adequadas para a degradação da queratina ungueal (CHEN et al., 2010).

No dermatófito zoofílico *Arthroderma benhamiae* também foi observado uma maior expressão dos genes que codificam para SUB3, SUB4, MEP1, MEP3 E MEP4 na

presença de queratina-soja. Comparando a expressão de SUB3 E SUB4, somente a expressão de SUB3 foi ativada durante a infecção em cobaias, embora essa expressão tenha sido em um nível relativamente baixo. Em contrapartida, a expressão de *sub6* que não foi verificada *in vitro* na presença de queratina, foi super-expressa especificamente após a interação com cobaias (STAIB et al., 2010). Esta subtilisina tem sido identificada como principal alérgeno Tri r2 em *T. rubrum*. A caracterização de antígenos de *Trichophyton* fornece ferramentas moleculares únicas não só para o desenvolvimento de estratégias imunoterapêuticas relacionadas com dermatofitoses crônicas e doenças associadas à alérgenos, mas também em análises de mecanismos imunológicos que regulam respostas imunes em seres humanos (WOODFOLK et al., 1998).

Em *Microsporum canis*, um dermatófito patogênico causador de micose superficial cutânea principalmente em gatos e seres humanos, demonstrou-se pela primeira vez que um papel importante na patogenicidade pode ser atribuído à protease SUB3. A linhagem SUB3 silenciada tem dramática perda de capacidade de aderência aos corneócitos felinos, quando comparado com a linhagem selvagem. Como a linhagem silenciada não adere à pele, a aderência foi promovida artificialmente, sendo possível observar a inexistência de diferenças significativas durante a infecção por linhagens controle e a linhagem SUB3 silenciada, indicando que a secreção de SUB3 é necessária para adesão, mas não é essencial para os mecanismos posteriores de invasão de estruturas epidérmicas (BALDO et al., 2010). É importante ressaltar que *sub3* está entre os genes com expressão diferencial no transcriptoma obtido a partir do cultivo de células de micélio de *T. rubrum* na presença de queratina (MARANHAO et al., 2007; PERES et al., 2010b);, indicando a possibilidade de atuação ativa desta enzima na patogenicidade, assim como em outros micro-organismos.

Durante o estabelecimento da infecção de *T. rubrum*, ocorre a mobilização da maquinaria enzimática, também em função do pH ambiente, através da 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 e utilizados pelo fungo como fonte de carbono, nitrogênio e enxofre. A metabolização de alguns aminoácidos, como a glicina, resulta na liberação de amônia pelo fungo, elevando o pH do

meio, adequando-o para ação das queratinases com atividade ótima em pH alcalino, o que possibilita a manutenção da infecção (MARTINEZ-ROSSI et al., 2004; PERES et al., 2010a).

1.4 Controle de mitose por MAD2 e MAD2B

A coordenação de sensoriamento ambiental, os estímulos de nutrientes e defesa do hospedeiro com o controle das respostas genéticas a estes sinais moleculares é fundamental para os dermatófitos no sucesso da colonização do tecido hospedeiro (MARTINEZ-ROSSI et al., 2004; PERES et al., 2010a). Nesse processo de colonização, a mitose se torna essencial. A mitose é a divisão celular necessária para o crescimento e desenvolvimento dos seres vivos. Corresponde a divisão do núcleo de uma célula eucariótica, envolvendo a condensação do DNA em cromossomos visíveis e a separação dos cromossomos duplicados para formar dois conjuntos idênticos de cromossomo, sendo distinguidas as fases: prófase, metáfase, anáfase e telófase. (ALBERTS et al., 2004).

De acordo com a revisão realizada por Silva e colaboradores (SILVA et al., 2011), falhas na mitose causam danos severos nas células finais e uma segregação cromossômica correta exige a formação da placa metafásica, e alinhamento de todos os cromossomos para início da anáfase. Além disso, as células eucarióticas possuem um mecanismo de espera da anáfase chamado *spindle assembly checkpoint* (SAC), que é o ponto de inspeção/checagem da montagem do fuso mitótico, este mecanismo tem a finalidade de impedir a transição da metáfase para a anáfase até que todos os cromossomos atinjam a placa metafásica. A inibição exercida pelo SAC envolve proteínas que impedem Cdc20 de ativar o complexo promotor da anáfase (APC – *anaphase promoting complex*): MAD (MAD1 E MAD2), captura mitótica defeituosa (*mitotic arrest deficient*) e BUB (BUB1, BUB3 E BUBR1/MAD3), brotamento inibido por benzimidazol (*budding uninhibited by benzimidazole*).

O APC é uma ubiquitina ligase, que é ativada em mitose pela CDC20 e inibida pela proteína de verificação MAD2. Mas a inibição de MAD2 não ocorre diretamente em APC e sim no seu ativador, pois MAD2 é um inibidor específico de CDC20 (Figura 3) (CHEN,FANG, 2001). Em *Candida albicans* é descrito um indispensável papel da proteína Mad2 no SAC para sobrevivência e virulência deste micro-organismo em camundongos. Sugere-se que as funções de revisão do ciclo celular, especialmente as que monitoram a

integridade do DNA e segregação dos cromossomos, podem ser requisitadas para reparar danos provocados por mecanismos de defesa do hospedeiro (BAI et al., 2002).

Figura 3: Regulação da divisão celular (*spindle-assembly checkpoint*). a) Antes da divisão celular, as cromátides irmãs de todos os cromossomos se ligam aos pólos do fuso mitótico. Enquanto os cromossomos que estão presentes não obedecerem a essa regra, um sistema de vigilância celular conhecido como o *checkpoint* mitótico está ativo. Isso inibe a continuação da divisão celular e, portanto, impede que um número anormal de cromátides irmãs atinja cada célula filha. b) Do ponto de vista molecular, as proteínas do *spindle-assembly checkpoint* Mad2 e BubR1 associam com Cdc20 e inibem a sua capacidade de ativar a ubiquitina ligase APC / C, que é exigido para a progressão da divisão celular (PETERS, 2007).

Essa suposição ocorre devido à observação do mutante para MAD2 exibir um aumento na frequência de perda cromossômica, além de uma redução significativa da virulência, provavelmente pela inabilidade de células mutantes pararem o ciclo celular quando componentes celulares ou estruturas monitoradas por SAC, importantes na segregação cromossômica, são danificados por defesas do hospedeiro. Apoiando essa hipótese, experimentos comprovaram que as células selvagens de *C. albicans* proliferaram dentro e, eventualmente, fora dos macrófagos, mas a maioria das células mutantes foi incapaz de sobreviver nestas condições. O que indica SAC como um potencial alvo terapêutico devido à importância deste na sobrevivência de *C. albicans* no hospedeiro (BAI et al., 2002).

Uma outra proteína que também tem se destacado como inibidor de APC é a proteína MAD2B, que é homóloga a MAD2. Mas, em contraste com MAD2, MAD2B também inibe CDH1-APC e CDC20-APC, sendo esta inibição direcionada a CDH1 e

CDC20, mas não diretamente ao APC. Além disso, esta inibição não é específica a um substrato particular. Ao contrário de MAD2, cuja interação com MAD1 é exigida para o controle mitótico de verificação, MAD2B não interage com o MAD1, sugerindo que MAD2B possa retransmitir um sinal celular diferente da via do APC (CHEN, FANG, 2001).

MAD2B, também conhecido como Rev7 e MAD2L2, pode ainda agir na coordenação de respostas do ciclo celular a danos ao DNA, atuando na replicação do DNA e nos principais reguladores do ciclo celular. hRev7 é uma proteína importante, necessária para a máxima fosforilação do fator de transcrição Elk-1, a qual é mediada pela JNK MAPK (*c-Jun N-terminal protein kinase mitogen-activated protein kinase*) em condições de tratamento de células *HeLa* com agentes que danificam o DNA (ZHANG et al., 2007).

Elk-1 é um membro da subfamília TCF (*Ternary Complex Factor*), subgrupo da família de fatores de transcrição Ets (*E twenty-six domain transcription factors*). Proteínas Ets desempenham papéis importantes em várias funções celulares como o crescimento, desenvolvimento, diferenciação e apoptose (OIKAWA, YAMADA, 2003). TCFs desempenham um papel fundamental na transdução de estímulos extracelulares em alterações da expressão de genes, com evidências de atuação na proteção da célula contra morte por apoptose (VICKERS et al., 2004). Portanto, como a fosforilação de Elk-1 potencializa a atividade de seu domínio de ativação transcricional, hRev7, contribui para a regulação positiva de genes alvos de Elk-1, sugerindo que hRev7 tenha um papel mais amplo na coordenação da resposta celular a danos no DNA (ZHANG et al., 2007).

Na linhagem mutante *biA1 palA1* de *A. nidulans*, que apresenta perda de função para o gene *palA*, o gene *mad2B* apresentou expressão elevada quando comparada a linhagem selvagem, em cultivos de fosfato limitante e pH 5,0 (SILVA et al., 2008). Esses dados sugerem que MAD2B é importante não só em mecanismos de revisão mitótica em células humanas, mas também em células fúngicas.

1.5 Ciclo do ácido tricarboxílico.

Apesar da queratina ser utilizada pelos dermatófitos como fonte de nutrientes, a D-glicose é um excelente combustível e ocupa uma posição central no metabolismo da maioria dos organismos, além de ser um precursor capaz de suprir uma vasta gama de intermediários metabólicos que são os materiais primários necessários para as reações

biossintéticas. Nos vegetais superiores e nos animais, a glicose possui quatro destinos principais: ser usada na síntese de polissacarídeos complexos; ser armazenada como um polissacarídeo (glicogênio, amido) ou como sacarose; ou por meio da glicólise, oxidada a compostos de três átomos de carbono (piruvato), ou ainda oxidada por meio das pentoses fosfato (fosfogliconato) (NELSON, COX, 2011).

Destes processos, destacamos a glicólise, que foi a primeira via metabólica a ser elucidada e provavelmente a mais bem entendida. É através dela que ocorre o maior fluxo de carbono na maioria das células. Nesta via metabólica ocorre o catabolismo da glicose até piruvato acompanhado pela formação de ATP. O piruvato representa um ponto de junção importante no catabolismo dos carboidratos. Em condições aeróbicas, o piruvato é oxidado a acetato e depois a acetil-CoA (NELSON, COX, 2011).

Na respiração celular a formação oxidativa do acetil-CoA a partir de piruvato, ácidos graxos e alguns aminoácidos é seguida pela degradação dos resíduos de acetil pelo ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), também conhecido por ciclo do ácido cítrico ou ciclo de Krebs (CK), com a liberação de CO_2 e de coenzimas reduzidas. Por fim, ocorre a transferência de elétrons para o oxigênio molecular, acoplada à fosforilação do ADP em ATP. O TCA ocorre na mitocôndria de eucariotos e no citosol dos procariotos (NELSON, COX, 2011) e pode ser observado de forma simplificada na figura 3.

Figura 4: Esquema representativo do ciclo de Krebs, ciclo do glioxilato e gliconeogênese. Na figura estão evidenciados os passos enzimáticos básicos presentes no ciclo do ácido tricarboxílico (linhas contínuas), ciclo do glioxalato (linhas tracejadas), além dos passos compartilhados pelos dois ciclos (linhas contínuas em negrito). A reação inicial de gliconeogênese é observada em linhas pontilhadas. (LORENZ, FINK, 2002).

A velocidade global e fluxo de carbono do ciclo são controlados pela velocidade de conversão do piruvato em acetil-CoA, entrada de acetil-CoA (oriundo de outras vias) no ciclo e pela atividade das enzimas isocitrato desidrogenase e α -cetoglutarato desidrogenase (NELSON, COX, 2011). Isocitrato desidrogenase dependente de NAD^+ (IDH) está localizada na matriz mitocondrial e realiza a conversão de isocitrato a α -cetoglutarato. Análises cinéticas sítio dirigidas em mutantes de leveduras indicam que IDH é um complexo formado por IDH-1, a subunidade regulatória, e IDH-2, a subunidade catalítica, sendo ambas necessárias para a realização da atividade enzimática (KEYS et al., 1990).

As células eucarióticas contém isozimas de isocitrato desidrogenase específicas para NADP^+ . Estas enzimas são estruturalmente e cataliticamente mais semelhantes às enzimas do TCA de células bacterianas. Mas em *S. cerevisiae* IDH – NAD^+ é crítica para o funcionamento do ácido tricarboxílico, e seu papel não é compensado pela atividade da isocitrato desidrogenase – NADP^+ mitocondrial (KEYS et al., 1990).

Em *A. nidulans* também existem isocitrato desidrogenases dependentes de NADP^+ , com localização mitocondrial, citosólica e peroxissomal, sendo isoenzimas sintetizadas a partir de um único gene (SZEWCZYK et al., 2001). Esta enzima catalisa a descarboxilação oxidativa de isocitrato à cetoglutarato pelo uso de NADP^+ como um aceptor de equivalentes redutores (BROCK, 2005). Esses dados revelam que estas duas enzimas são importantes no TCA de fungos.

1.6 Ciclo do glioxilato e ciclo do metilcitrato

Os produtos intermediários do ácido cítrico também são empregados como precursores na biossíntese de aminoácidos e de outras biomoléculas. Quando isso ocorre, as concentrações dos intermediários do ciclo são recolocadas em níveis normais por meio das reações anapleróticas (NELSON, COX, 2011). Uma reação anaplerótica solicitada por sementes em germinação e pelos micro-organismos é o Ciclo do Glioxalato (CG) (Figura 4 e Figura 5), esta é uma via alternativa para o TCA e ocorre nos glioxissomos. O CG permite a oxidação de acetato (acetil-CoA), para formação de ácidos dicarboxílicos (succinato, malato e oxaloacetato) (FLAVELL, WOODWARD, 1970), sendo que neste processo participam enzimas comuns ao TCA e também as específicas do CG, a isocitrato liase (ICL) e a malato sintase (MLS). A enzima ICL catalisa a reação de clivagem do

Environ. Biol. Fish.	1997, 48: 1–16	6.6.11.1	6.6.11.3	3
----------------------	----------------	----------	----------	---

© 2000 KORNBERG BEEVERS

Essa enzima e a frutose-1,6-bifosfatase (FBP) são as mais importantes na gliconeogênese, por atuarem como regulatórias na síntese de glicose. Em *S. cerevisiae*, Fbp1 é um gene altamente induzido em leveduras sob fagocitose, validando a idéia de que a finalidade primária da indução do CG é a produção de glicose (LORENZ,FINK, 2001).

Foi descrito que o CG e as enzimas ICL e MLS são importantes para a virulência de muitos patógenos como *C. albicans*(LORENZ,FINK, 2002), *Cryptococcus neoformans* (RUDE et al., 2002) e o fungo fitopatogêneo *Leptosphaeria maculans* (IDNURM,HOWLETT, 2002). No entanto, em *A. fumigatus* a ICL não é importante para o desenvolvimento da aspergilose invasiva em modelos de infecção murinos (SCHOBEL et al., 2007).

Estudos utilizando isolados de *C. albicans* coletados de três grupos de pacientes apresentando candidíase em regiões diferentes do corpo, mostraram a atividade das enzimas ICL e MLS em todos os casos analisados, confirmando a presença do CG como fator de virulência para este fungo. Entre os três grupos de pacientes analisados, os níveis de atividade dessas enzimas do fungo se mostraram alterados dependendo do local da infecção. Estudos utilizando isolado de *C. albicans* proveniente de pacientes diabéticos desenvolvendo candidíase vulvovaginal apresentaram níveis de atividade de ICL e MLS mais elevados quando comparado a isolado obtido da cavidade orofaríngea dos pacientes HIV/AIDS e da pele de pacientes queimados (LATTIF et al., 2006).

Uma reação análoga à da isocitrato liase na conversão de isocitrato em glioxalato e succinato ocorre na mitocôndria durante o metabolismo de propionil-CoA através do ciclo do 2-metilcitrato (Figura 5). Esse ciclo inicia-se pela síntese de 2-metilcitrato a partir de oxaloacetato e propionil-CoA. A molécula de 2-metilcitrato é então convertida em 2-metilisocitrato que é clivado em piruvato e succinato pela 2-metilisocitrato liase (MeICL) (LUTTIK et al., 2000).

A indução de MeICL em *E. coli* e *A. nidulans* é observada quando o meio é suplementado com propionato. O succinato resultante do ciclo do metilcitrato é reoxidado a oxaloacetato pela condensação com propionil-CoA, dando origem ao metilcitrato, completando o ciclo. O piruvato é outro metabólito resultante e pode ser usado para o metabolismo de energia e síntese de biomassa (BROCK et al., 2001).

A ausência do ciclo do glioxalato em mamíferos, bem como sua inter-relação com o ciclo do 2-metilcitrato, elege as enzimas envolvidas nesse último como potentes alvos para agentes antimicrobianos. Genes codificantes para as enzimas do ciclo do glioxalato e do

ciclo do 2-metilcitrato tem se mostrado importantes para a virulência de micro-organismos patogênicos, propiciando a sobrevivência dos mesmos dentro de macrófagos (MUNOZ-ELIAS, MCKINNEY, 2005).

Análises em bibliotecas subtrativas (SSH) da linhagem H6 de *T. rubrum* também revelaram a superexpressão dos genes que codificam para as enzimas ICL, MeICL e aconitase em meio mínimo contendo glicose, fosfato limitante e pH 5,0 quando comparado ao pH 8,0 (PERES et al., 2010b); (SILVEIRA et al., 2010). Os genes *icl* e *mls* também foram diferencialmente transcritos por *T. rubrum* cultivado com proteína de soja e queratina com soja, quando comparado com o meio Sabouraud *dextrose*. A regulação do CG em *T. rubrum* pode ser importante na patogenicidade deste fungo (ZAUGG et al., 2009), mas vale ressaltar que já é descrito para *A. fumigatus* que a ICL não é requerida para o desenvolvimento da aspergilose invasiva e o ciclo do glioxilato não é requisitado para síntese anaplerótica de oxaloacetato em condições de infecção (SCHOBEL et al., 2007).

Além disso, o gene para a enzima chave do TCA, a isocitrato desidrogenase, foi identificado em biblioteca de cDNA construída após 10 dias de cultivo de *T. rubrum* na presença de proteína de soja (ZAUGG et al., 2009). Sabendo-se que *T. rubrum* é dependente do processo de alcalinização do meio extracelular e da ocorrência de transcritos de ICL e IDH na presença das mesmas fontes de carbono, a hipótese de uma modulação metabólica na obtenção de energia de acordo com as variações de pH extracelular torna-se alvo de interesse das nossas pesquisas.

Hipótese do Trabalho

*It is quite awe-inspiring to gaze at that wonderful dark sky, but even better to actually
know what you are looking at...*

María Teresa Ruiz (Chile)

2 Hipótese do Trabalho

A elevada incidência de infecções causadas por dermatófitos, principalmente o dermatófito antropofílico *T. rubrum*, expõe a necessidade de se conhecer os mecanismos moleculares utilizados por este patógeno durante os processos de instalação e manutenção da infecção, além da sobrevivência do mesmo no ambiente e no hospedeiro. Por isso, o presente trabalho teve como hipótese avaliar se a exposição de *T. rubrum* a diferentes fontes nutricionais modularia a expressão de genes que codificam para proteínas envolvidas tanto na aquisição de nutrientes, como proteases, quanto no controle da mitose e de vias metabólicas diferentes. Pretendendo-se também avaliar se o metabolismo deste fungo pode sofrer desvios, durante os períodos de cultivo, elegendo vias preferenciais como ciclo de Krebs, ciclo do glioxilato e ciclo do metilcitrato, proporcionando, desta forma, um maior entendimento não só das respostas adaptativas deste fungo às diferentes fontes nutricionais, mas também de possíveis mecanismos de sobrevivência do dermatófitos no hospedeiro.

Objetivos

It is worth trying to change the world through your work
Ángela Restrepo Moreno (Colômbia)

3 Objetivo Geral

A importância clínica de *T. rubrum* gera a necessidade de se adquirir conhecimento e entendimento de respostas adaptativas deste fungo às diferentes fontes nutricionais, bem como os mecanismos utilizados por este dermatófito para sobrevivência no hospedeiro. Assim, este projeto visou à análise da expressão de genes que codificam para proteases, como queratinases, proteínas envolvidas nos mecanismos de controle de mitoses e vias metabólicas diferentes e enzimas participantes do ciclo de Krebs, ciclo do glioxilato e ciclo do metilcitrato.

3.1 Objetivos Específicos

3.1.1 Analisar por ferramentas de bioinformática a composição de aminoácidos de queratinas oriundas de *Bos taurus* e *Homo sapiens*.

3.1.2 Analisar, na presença de glicose, glicina e queratina, o perfil transcricional de genes que codificam para as seguintes proteínas: SUB3 (TERG_03815.2) e SUB5 (TERG_01271), serina proteases com atividade queratinolítica; Isocitrato liase (TERG_00825.2), enzima que participa do ciclo do glioxalato; metilisocitrato liase (TERG_ TERG_01271), enzima que participa do ciclo do metilcitrato; Isocitrato desidrogenase dependente de NAD^+ (IDH1- TERG_01670.2 e IDH2 -TERG_07814.2) e Isocitrato desidrogenase dependente de NADP^+ (TERG_06075.2), enzimas do ciclo do ácido tricarboxílico; MAD 2 (TERG_03823.2) e MAD2B (TERG_02307.2), proteínas envolvidas no *spindle checkpoint*.

3.1.3 Verificar a interferência do antifúngico terbinafina na expressão dos genes que codificam para as subtilisinas SUB3 e SUB5.

3.1.4 Verificar a atividade queratinolítica após o cultivo de *T. rubrum* em meios contendo glicose, glicina, queratina e unha humana, bem como, o efeito do antifúngico terbinafina na atividade queratinolítica em meios contendo unha humana ou queratina.

3.1.5 Verificar a atividade enzimática das proteínas seguintes proteínas envolvidas em vias metabólicas: isocitrato desidrogenase dependente de NAD^+ (IDH), isocitrato desidrogenase dependente de NADP^+ (IDHP), isocitrato liase (ICL) e metilisocitrato liase (MeICL).

Materiais e Métodos

*We are all offered a range of choices in life; you have to choose a path
and focus on it in order to be successful...*

Eugenia M. del Pino (EUA)

4. Materiais e Métodos

4.1. Organismos: no desenvolvimento deste trabalho foram utilizadas três linhagens de *Trichophyton rubrum*, as quais estão estocadas no nosso laboratório.

4.1.1. *T. rubrum* (CBS_118892): esta linhagem foi doada pelo *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS - Holanda) e possui o genoma sequenciado e disponível em <http://www.broadinstitute.org>.

4.1.2. *T. rubrum* H6 (ATCC MYA 3108): esta linhagem foi isolada de um paciente do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, do sexo feminino, portador de *tinea pedis*. E gentilmente cedida pela Profa. Dra Cláudia M. Leite Maffei, que era responsável pelo setor de Micologia do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP.

4.1.3. *T. rubrum pacC-1*: A linhagem mutante 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. Esta 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).

4.2. Análise por bioinformática de sequências de aminoácidos de queratinas.

Sequências de proteínas que codificam para queratinas presentes em seres humanos (*Homo sapiens*) e em gado (*Bos taurus*) foram obtidas no banco de proteínas do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>). A composição de aminoácidos destas proteínas foi analisada no programa de bioinformática ProtParam (GASTEIGER et al., 2005) disponível em <http://web.expasy.org/protparam/>.

4.3. Busca do consenso de ligação ao DNA do fator de transcrição PacC no genoma de *T. rubrum*

Com o objetivo de verificar se os genes a serem estudados neste trabalho podem ser potencialmente regulados pelo fator de transcrição PacC, análises de bioinformática foram realizadas buscando no genoma de *T. rubrum* o sítio de ligação desta proteína na região promotora dos genes analisados no trabalho. Para tanto, foi utilizado um programa de análise e busca de domínios conservados (proteicos ou nucleotídicos), desenvolvido em nosso laboratório, denominado *Domain Search Tool*, disponível em http://fox.fmrp.usp.br/domainsearch/index_login.html. Foram analisados os 1000 nucleotídeos que antecedem o códon de iniciação, para localização do consenso para a proteína PacC, descrito como GCCA(A/G)G e também o mesmo na forma reversa e complementar C(C/T)TGGC.

4.4. Condições de Cultivo:

4.4.1. As linhagens do dermatófito *T. rubrum* 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 450 µg/mL de higromicina. De forma estéril, o micélio obtido foi transferido para solução salina (0,9%, NaCl e 0,001 Tween) e agitado em vórtex por aproximadamente cinco minutos, sendo posteriormente filtrado em lã de vidro para obtenção somente de conídios, presentes no filtrado.

4.4.2. Após contagem em câmara de Neubauer, 1×10^7 conídios foram inoculados em frasco Erlenmeyer (125 mL) contendo 50 mL de Meio Sabouraud - SDB (Sabouraud dextrose broth) (SAMBROOK et al., 1989), líquido, pH 5,7 e incubados por 96 h a 28°C, com agitação de 110 rpm, sendo o meio da linhagem *pacC-1* acrescido de higromicina (225 µg/mL). O micélio resultante foi *asepticamente* transferido para os meios mínimos de cultura com variações de nutrientes e tempo de incubação.

4.4.3. O micélio obtido em cada Erlenmeyer de 125 mL foi transferido individualmente para um frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de Meio mínimo (MM) (COVE, 1966). O meio mínimo foi suplementado com fosfato de potássio – KH_2PO_4 (2 mM), o pH foi ajustado para 5,0, com a variação de nutrientes e tempo de incubação. Para variação das fontes nutricionais foram utilizados: glicose (55 mM), glicina

(50mM), glicose (55 mM) e glicina (50mM), queratina (4g/L), unha (4g/L). Para tamponamento, o pH foi ajustado para 5,0 ou 8,0, sendo utilizado 50 mM de citrato de sódio (pH 5,0) ou 50 mM de Tris-HCl (pH 8,0). Nas condições de MM também foi acrescentado 225 µg/mL de higromicina para os cultivos da linhagem *pacC-1*.

4.4.4. O micélio foi cultivado em MM não tamponado por 24, 48, 72 e 96 horas e em meio tamponado por 24 horas, sendo que, após 72h, 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 foi aferido, as culturas filtradas *aspticamente* 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.

4.4.5. Para os testes com terbinafina as linhagens foram crescidas seguindo os procedimentos dos itens 4.4.2 e 4.4.3, exceto pelo fato de os cultivos serem realizados em erlenmeyers menores, mantendo-se sempre a mesma proporção no uso dos frascos e meios, e serem adicionados 1×10^6 conídios para as linhagens H6 e *pacC-1*, para que, ao final de cada cultivo o pH do meio ainda estivesse ácido. O micélio resultante do cultivo em meio Sabouraud foi inoculado e cultivado durante 24h na presença de MM não tamponado contendo queratina ou fragmentos de unha humana, com e sem o antifúngico terbinafina. A terbinafina utilizada é identificada como: (E)-N-(6,6-Dimethyl-2-hepten-4-ynyl)-N-methyl-1-naphthalene methanamine ou $C_{21}H_{25}N$ e é comercializada e fabricada pelo laboratório Sandoz com o nome comercial de Lamisil. A solução estoque foi preparada em água na concentração de 2,5 mg/mL (SEGATO et al., 2008). A concentração de terbinafina utilizada equivale a 70% da concentração inibitória mínima estabelecida em meio RPMI, sendo 0,2 µg/mL para linhagem CBS (JACOB et al., 2012) e 0,07 µg/mL para as linhagens H6 (PAIÃO et al., 2007) e *pacC-1*. As unhas humanas utilizadas foram obtidas a partir das porções distais de lâminas ungueais, de indivíduos sem histórico de infecções fúngicas. Os fragmentos foram cortados em tamanho aproximado de 0,3 mm e autoclavados a 120°C por 20 min.

4.5. Meios de cultivo

Tabela 1: Meio Extrato de Malte – MEA

Extrato de malte	20 g
Glicose	20 g
Peptona	1 g
Ágar	20 g
Água destilada (q.s.p)	1000 mL

O pH do meio foi ajustado para 5,7 , autoclavado a 1 atm de pressão e 120°C por 20 min. Fonte: (ATLAS, 1993).

Tabela 2: Meio Sabouraud modificado – MS

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

O pH do meio foi ajustado para 5, 7. O meio foi autoclavado a 1 atm de pressão a 120°C por 20 min. Fonte: (ATLAS, 1993).

Tabela 3: Meio Mínimo – MM

Solução de sais	20 mL
Elementos traços	1 mL
Água destilada (q.s.p)	1000 mL

O pH do meio foi ajustado para 5,0 ou 8,0, conforme desejado. O meio foi autoclavado a 1 atm 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 70 mM como fonte de nitrogênio. Quando de interesse, foi utilizado como tamponante citrato de sódio (14,705 g/L) em pH 5,0 ou Tris base (6,057g/L) em pH 8,0, ambos com concentração final de 50 mM. Para variação das fontes nutricionais foram utilizados: glicose (55 mM), glicina (50mM), glicose (55 mM) e glicina (50mM), queratina (4g/L), unha (4g/L).

Tabela 4: Solução de sais

Cloreto de potássio	26 g
Sulfato de magnésio heptahidratado	26 g
Fosfato de potássio monobásico	30 mg
Solução de elementos traços	50 mL
Água destilada (q.s.p)	1000 mL

Nos experimentos, o fosfato foi omitido desta solução, sendo acrescentado separadamente para uma concentração de 2mM. Adicionar 3 mL de clorofórmio como agente antimicrobiano e estocar a solução a 4°C. Fonte: (COVE, 1966).

Tabela 5: Solução de elementos traços

Borato de sódio decahidratado	40 mg
Sulfato de cobre pentahidratado	400 mg
Sulfato de ferro heptahidratado	532 mg
Sulfato de manganês monohidratado	292 mg
Molibdato de sódio bihidratado	800 mg
Sulfato de zinco heptahidratado	8 g
Água destilada (q.s.p.)	1000 mL

Adicionar 3 mL de clorofórmio como agente antimicrobiano e estocar a solução a 4°C. Fonte: (COVE, 1966)

4.6. 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 (Eppendorf ou tubo de ensaio – dependendo da quantidade de micélio), ao qual foi adicionado 2 ml de solução de lise para cada 100 mg 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, na presença de debris celulares no sobrenadante, o sobrenadante foi centrifugado mais uma vez e o sobrenadante transferido

para um novo tubo. Ao sobrenadante foram acrescentados 40µl de 5M acetato de potássio 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 DNA 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 água MilliQ, estocado a -20°C e posteriormente tratado com a enzima RNase (2 µg/ml), seguindo as normas do fabricante. A concentração do DNA genômico obtido foi determinada utilizando-se o aparelho Nanodrop® (Thermo), pela absorbância das preparações em 260 nm, utilizando $1_{OD260} = 40$ mg/mL de DNA como valor padrão. O grau de pureza foi avaliado pela relação OD 260/280 nm, estando próximo de 2,0.

4.6.1 Soluções para Extração de Ácido Desoxirribonucléico (DNA)

Tabela 6: Solução de Lise

SDS	1%
EDTA pH 8,0	50mM
Água destilada (q.s.p.)	200mL

A solução de lise deve ser preparada na hora do uso. Fonte: (SAMBROOK et al., 1989)

Tabela 7: Etanol 70%

Etanol 100%	70mL
Água destilada	30mL

Tabela 8: Tampão TE (Tris-EDTA)

Tris-HCl	10 M
EDTA pH 8,0	1 M
Água destilada (q.s.p.)	1000 mL

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).

4.7. Obtenção das sequências genômicas da linhagem H6

Somente a linhagem de *T. rubrum* CBS possui o genoma disponibilizado no banco de dados de genoma estrutural, *Broad Institute* (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/dermatophyte_comparative/MultiHome.html), por isso, as sequências dos genes trabalhados foram também obtidas na linhagem H6. Para tanto, foram utilizados os *primers* contruídos a partir da sequência disponibilizada para a linhagem CBS (item 4.12). Para cada par de *primer* foi realizado uma reação de PCR. Em cada reação de PCR foram utilizados 100 ng de DNA genômico da linhagem H6, 2,5 µl de tampão *Taq* polimerase recombinante (10x), 1,5 µl de MgCl₂ (25mM), 2 µl de dNTP (2,5 mM), 0,1 µl de cada primer Forward e Reverse (50mM), 0,5 U de *Taq* polimerase e o volume final foi completado para 25 µl de reação com água milliQ. A reação foi submetida por 2 min a 94°C, seguido de 40 ciclos de 30 s a 94°C, 45 s 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 visualizadas sob luz UV, recortados do gel e purificados, usando o *PureLink Quick Gel Extraction kit*[®] (GE Healthcare), seguindo as normas do fabricante. O DNA de cada amostra foi eluído em água milli-Q, a concentração determinada utilizando-se o aparelho Nanodrop[®] (Thermo), pela absorbância das preparações em 260 nm, utilizando 1_{OD260} = 40 mg/mL de DNA como valor padrão. O grau de pureza foi avaliado pela relação OD 260/280 nm, estando próximo de 2,0. Os DNAs foram armazenados a -20°C para posterior utilização em reação de sequenciamento.

4.8. 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 200 ng dos produtos de PCR amplificados a partir do DNA genômico da linhagem H6 de *T. rubrum* (ATCC MYA 3108), 1 µL de oligonucleotídeo de interesse, sentido sense ou antisense (2,5 µmol), 2 µL do reagente *Big Dye Terminator (v3.1)*, 2 µL de tampão e água Mili-Q *q.s.p.* para um volume final de 10 µL. 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 Mili-Q, 60 µL 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 200 µL 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 2,5 µL de *Loading Color* e 0,7 µL e analisadas no sequenciador automático ABI 3130 *Genetic Analyser DNA Sequencer* (Applied Biosystems, Foster City, CA).

4.9. Análise das sequências obtidas no sequenciamento

Primeiramente, os cromatogramas foram analisados quanto à qualidade pelo *software Phred* (EWING, 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, 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 foram alinhadas com suas respectivas sequências depositadas no banco de dados de *T. rubrum* CBS 118892, previamente depositadas no *Broad Institute*. O alinhamento foi realizado com o programa *Clustal X* (1.83), disponível em <http://www.clustal.org> (THOMPSON et al., 1997).

4.10. 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 e Cruz, AHS.

- 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 0,75 mL de TRIzol® recuperado, logo após acrescentar 0,25 mL de Isopropanol para cada 0,75 mL 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 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 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 alíquotas para estoque e uso rotineiro.

4.10.1. Soluções para extração de RNA total

Tabela 9: 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 1 atm de pressão e 120 °C. Fonte: (SAMBROOK et al., 1989).

4.11. Síntese de cDNA

Após obtenção do RNA total, a remoção de todas as contaminações com DNA genômico ocorreu com o tratamento das amostras com DNase-I livre de RNase (Invitrogen). 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.

4.12. Construção de oligonucleotídeos

Para obtenção de sequências parciais do cDNA das moléculas de interesse foram desenhados oligonucleotídeos (Tabela 11) a partir das seqüências 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 et al. (2012). Estes oligonucleotídeos foram utilizados no sequenciamento das seqüências 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 *qRT-PCR*.

Gene	Número de acesso ^a	Nome do oligonucleotídeo	Sequência do oligonucleotídeo
<i>sub3</i>	TERG_03815	SUB3-S	5' CTGGTATCTTCGTGGCTGT 3'
		SUB3-AS	5' AGCGGAGAGGATGTTGG 3'
<i>sub5</i>	TERG_08201	SUB5-S	5' TTTATGCTCCCGGTCACAAT 3'
		SUB5-AS	5' AGTGGGCTGACTGAGCTGTT 3'
<i>mad2</i>	TERG_03823	MAD2-S	5' TGAAAACGCCAATCCG 3'
		MAD2-AS	5' CCATTCCAGAGGCACTTC 3'
<i>mad2B</i>	TERG_02307	MAD2B- S	5' CGAGCCATTGACGCAG 3'
		MAD2B- AS	5' CGCAGTTTCTTCCACACAG 3'
<i>idh1</i>	TERG_01670	IDH1-S	5' TAAGGACCAGGCTAACCC 3'
		IDH1-AS	5' GACGGCTCGGGTGAAC 3'
<i>idh2</i>	TERG_07814	IDH2-S	5' GGTTCGCTCCCGATA 3'
		IDH2-AS	5' TGTTTTGATGATGGCGT 3'
<i>Idhp</i>	TERG_06075	IDHP-S	5' TCCTGAAGAAATACGATGGC 3'
		IDHP-AS	5' CGGCAGGGGTGGTCA 3'
<i>Icl</i>	TERG_00825	ICL-S	5' ACCGACTTGTAGCCATCC 3'
		ICL-AS	5' GTTCTTGCCCGCTTGCTCT 3'
<i>Meicl</i>	TERG_01271	MeICL - S	5' CGCAGAGATTGATGTTTACG 3'
		MeICL- AS	5' GGGTTCTTCGTGTATTTGG 3'
<i>Gapdh</i>	TERG_04402	gapdh - S	5' GCGTGACCCAGCCAACA 3'
		gapdh - AS	5' CGGTGGACTCGACGATGTAGT 3'
β - tubulina	TERG_07904	tub- S	5' CCGTATGATGGCCACTTT 3'
		tub- AS	5' CTGACCTGGGAAACGAAGAC 3'

^a Número de acesso ao gene através do genoma de *T. rubrum* no *Dermatophytes Genome Database* (Broad Institute).

4.13. Análise da expressão gênica

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 12,5 μ L, continha 1 μ L de cada oligonucleotídeo (2,5 μ M) iniciador, 6,25 μ L de *SYBR Green* (PCR mix) e 1 μ L de cDNA (50 ng). 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 $2^{-\Delta\Delta Ct}$, 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 a amostra com menor ΔCt .

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

4.14. Análises em *Multi Experiment Viewer* (MeV)

MeV é um aplicativo para a análise, visualização e garimpagem de dados genômicos em larga escala. Este programa gera imagens, 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 a 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*).

4.15. 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, Inc. Prism 5 for Windows, Version 5.01*, agosto, 7, 2007), 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 Bonferoni é um teste de comparações múltiplas baseado no teste *t*.

.16. Atividade queratinolítica em meio de cultivo

O ensaio para análise das atividades de proteases queratinolíticas foi realizado segundo (GRADISAR et al., 2000), com modificações, consistindo nas seguintes etapas:

- A) A primeira etapa consiste na obtenção da solução de enzimas, que é o sobrenadante dos cultivos. O sobrenadante foi obtido de forma estéril por filtração dos cultivos e separação da massa micelial do meio líquido.
- B) Montagem da reação e controle da reação.

Reação	Controle da reação
4 mL de tampão Tris-HCL (28mM)	4 mL de tampão Tris-HCL (28mM)
20 mg substrato*	20 mg substrato*
-----	2 mL de TCA 10%
1 mL de solução de enzima (sobrenadante)	1 mL de solução de enzima (sobrenadante)

*Foram utilizados três substratos: caseína (*casein*, *acid hydrolysate*) – Sigma; Queratina industrializada (*Keratin*) – MP; queratina obtida em nosso laboratório através de cascos de bovinos. Os substratos foram analisados em reações independentes.

- C) As reações foram homogeneizadas e incubadas a 45°C, durante 30 minutos e em agitação constante de aproximadamente 50 x g.
- D) Após o período de incubação a 45°C, foi acrescentado 2 mL de TCA 10% nos frascos nomeados Reação, para parar a atividade das proteases e queratinases.
- E) Todos os tubos foram então incubados a 4°C durante 30 minutos.
- F) Depois foram centrifugados a 634 x g, durante 19 minutos a 4°C.
- G) O sobrenadante foi coletado e utilizado para análise em espectrofotômetro de absorvância a 280nm. O espectrofotômetro utilizado foi o Ultrospec 2000 / UV/ Visible Spectrophotometer da Pharmacia Biotech.
- H) Uma unidade (1U) de atividade queratinolítica é definida como um aumento de A_{280} no valor corrigido para 0,100 sob as condições descritas.

I) O cálculo foi definido em três etapas:

- Abs = Absorbância da reação – Absorbância do controle da reação
- 1U equivale a 0,1 de Abs obtida, logo, por regra de três simples:

$$\begin{array}{l} 1\text{U} \text{-----} 0,1 \\ X \text{-----} \text{Abs} \end{array}, \text{ sendo } X = \text{quantidade de Unidades da condição avaliada.}$$

- Por fim, analisa-se a quantidade de U por mg de proteína da condição avaliada, dividindo-se o valor de X pela concentração de proteína da condição após quantificação por Bradford. Ao final temos a atividade queratinolítica em U/mg.

4.17. Extração de proteínas intracelulares

Para análise da atividade de enzimas intracelulares, as células congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C foram trituradas mecanicamente, ou seja, maceradas em nitrogênio líquido até completa pulverização com o uso de gral e pistilo de porcelana. Após a obtenção das células como um pó fino, estas foram maceradas por mais 30 minutos em nitrogênio líquido. O macerado foi transferido para tubos tipo Falcon de 50mL já resfriados em gelo e em seguida foi adicionado tampão Tris-HCl (50mM Tris-HCl, 2mM MgCl₂, 2mM DTT, pH8,0) e as amostras mantidas sempre em gelo. A quantidade de tampão variou de acordo com a quantidade de macerado obtido, não podendo ser adicionado em grande quantidade para evitar que a mistura fosse muito diluída. Após a adição do tampão o macerado foi rapidamente agitado em vortex, distribuído em tubos Eppendorf de 2mL e centrifugado durante 30 minutos a 1268 x g e 4°C. O sobrenadante foi coletado e transferido para outro tubo Eppendorf já resfriado em gelo e o pellet descartado. As amostras de extrato proteico (sobrenadante) foram mantidas em gelo até o uso nas atividades, para uso a fresco, e para serem quantificadas.

4.18. Quantificação das proteínas presentes no extrato protéico

As proteínas presentes no extrato proteico foram quantificadas através do método baseado na formação do complexo entre Coomassie Brilliant Blue G-250 e as proteínas em solução. Para tanto foi utilizado o reagente de Bradford segundo as normas do fabricante (Sigma-Aldrich). O reagente Bradford consiste em *Coomassie Brilliant Blue G* dissolvido

em ácido fosfórico e metanol. A mensuração da quantidade proteínas foi realizada em absorbância de 595nm.

4.19. Ensaio enzimático para detecção de atividade da enzima isocitrato liase (ICL).

A atividade de ICL foi determinada no ensaio baseado em fenilidrazina como previamente descrito por (EBEL et al., 2006). A reação foi iniciada com a adição do substrato isocitrato. A formação do produto glioxalato fenilidrazona foi determinada a 324nm (ϵ 16.8 mM⁻¹.cm⁻¹) (BROCK et al., 2001), sendo que uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima produzindo 1 μ mol de glioxalato fenilidrazona por minuto sob as condições do experimento. A atividade específica foi estabelecida como U/ μ g de proteína utilizada no experimento.

Tabela 12: Reação enzimática de ICL (30°C)

Reagente	Concentração final dos reagentes na reação
Tampão Fosfato de Potássio (KH ₂ PO ₄), pH 7,0	50 mM
Cloreto de Magnésio (MgCl ₂)	2 mM
Cloridrato de Fenilidrazina (Sigma- Aldrich)**	10 mM
Ditioneitol (DTT)	2 mM
Isocitrato (D, L-Isocitric acid (Sigma- Aldrich))	2 mM
Extrato proteico	*
Água destilada (q.s.p.)	1 mL

*A quantidade de proteína utilizada variou de 50-200 μ g.

4.20. Ensaio enzimático para detecção de atividade da enzima metilisocitrato liase (MeICL).

A atividade de MeICL foi determinada através da formação de piruvato fenilidrazona, como previamente descrito por (BROCK et al., 2001). A reação foi iniciada com a adição do substrato metilisocitrato. A formação do produto piruvato fenilidrazona

foi determinada a 324nm (ϵ 16.8 mM⁻¹.cm⁻¹) (BROCK et al., 2001), sendo que uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima produzindo 1 μ mol de piruvato fenilidrazona por minuto sob as condições do experimento. A atividade específica foi estabelecida como U/ μ g de proteína utilizada no experimento.

Tabela 13: Reação enzimática de MeICL (30°C)

Reagente	Concentração final dos reagentes na reação
Tampão Fosfato de Potássio (KH ₂ PO ₄), pH 7,0	50 mM
Cloreto de Magnésio (MgCl ₂)	2 mM
Cloridrato de Fenilidrazina (Sigma- Aldrich)**	10 mM
Ditiotreitol (DTT)	2 mM
Metilisocitrato (<i>threo</i> -2-methylisocitrate) **	0,1 mM
Extrato proteico	*
Água destilada (q.s.p.)	1 mL

*A quantidade de proteína utilizada variou de 50-200 μ g.

** O reagente metilisocitrato, que é o substrato da MeICL, foi gentilmente doado pelo Dr Matthias Brock (*Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology, Hans Knoell Institute, Jena – Alemanha*).

4.21. Ensaio enzimático para detecção de atividade da enzima Isocitrato desidrogenase dependente de NAD⁺ (IDH).

A atividade da IDH foi determinada no ensaio baseado na formação de NADH como previamente descrito por (LIN,MCALISTER-HENN, 2002). A reação foi iniciada com a adição do extrato proteico. A formação do produto foi determinada a 340nm, sendo que uma unidade de atividade enzimática foi definida como a formação de 1 μ mol de NADH por minuto sob as condições do experimento. A atividade específica foi estabelecida como U/ μ g.

Tabela 14: Reação enzimática de IDH (24°C)

Reagente	Concentração final dos reagentes na reação
Tampão Tris-HCL, pH 7,6	40 mM
Cloreto de Magnésio (MgCl ₂)	4 mM
NAD ⁺	0,5 mM
Isocitrato (<i>D, L-Isocitric acid</i> (Sigma- Aldrich))	2 mM
Extrato proteico	*
Água destilada (q.s.p.)	1 mL

*A quantidade de proteína utilizada variou de 50-200µg.

4.22. Ensaio enzimático para detecção de atividade da enzima Isocitrato desidrogenase dependente de NADP⁺ (IDHP).

A atividade da IDH foi determinada no ensaio baseado na formação de NADPH como previamente descrito por (KEYS,MCALISTER-HENN, 1990). A reação foi iniciada com a adição do extrato proteico. A formação do produto foi determinada a 340nm, sendo que uma unidade de atividade enzimática foi definida como a formação de 1 µmol de NADH por minuto sob as condições do experimento. A atividade específica foi estabelecida como U/µg.

Tabela 15: Reação enzimática de IDHP (24°C)

Reagente	Concentração final dos reagentes na reação
Tampão Fosfato de potássio (KPO ₄), pH 7,4	50 mM
Cloreto de Magnésio (MgCl ₂)	10 mM
NADP ⁺	0,25 mM
Isocitrato (<i>D, L-Isocitric acid</i> (Sigma- Aldrich))	2,5 mM
Extrato proteico	*
Água destilada (q.s.p.)	1 mL

*A quantidade de proteína utilizada variou de 50-200µg.

4.23. Predição de localização da proteína SUB3

A predição da possível localização transmembrana da proteína SUB3 foi realizada com o software PRED-TMBB (BAGOS et al., 2004), disponível em <http://biophysics.biol.uoa.gr/PRED-TMBB/input.jsp>.

Resultados

*...science is about data, perseverance, discipline and often about love,
and women know a lot about all this.*

Idelisa Bonnelly (República Dominicana)

Discussão

*Women have had the privilege of gaining access to the world of knowledge.
They have had to test their sensitivity in search of a new social ethics based on
truth, equity and harmony between human beings.*

Mayra Luz Pérez Díaz (Nicarágua)

Conclusões

Do not let anything hold you back
Eugenia Sacerdote de Lustig (Argentina)

7 Conclusões

Referências Bibliográficas

...Women are more intuitive, which [...] is an important characteristic for science.

Mayana Zatz (Brasil)

Referências Bibliográficas

- ACHTERMAN, R. R. and WHITE, T. C. Dermatophyte virulence factors: identifying and analyzing genes that may contribute to chronic or acute skin infections. **Int J Microbiol** 2012: 358305.2012.
- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. and WALTER, P. (2004). Biologia molecular da célula. Porto Alegre, **Artmed**.
- APODACA, G. and MCKERROW, J. H. Regulation of *Trichophyton rubrum* proteolytic activity. **Infect Immun** 57(10): 3081-90.1989.
- ATLAS, R. M. (1993). Handbook of microbiological media, **CRC Press**.
- BAI, C., RAMANAN, N., WANG, Y. M. and WANG, Y. Spindle assembly checkpoint component CaMad2p is indispensable for *Candida albicans* survival and virulence in mice. **Mol Microbiol** 45(1): 31-44.2002.
- BALDO, A., MATHY, A., TABART, J., CAMPONOVA, P., VERMOUT, S., MASSART, L., MARECHAL, F., GALLEN, M. and MIGNON, B. Secreted subtilisin Sub3 from *Microsporum canis* is required for adherence to but not for invasion of the epidermis. **Br J Dermatol** 162(5): 990-7.2010.
- BENTRUP, K. H. Z., MICZAK, A., SWENSON, D. L. and RUSSELL, D. G. Characterization of activity and expression of isocitrate lyase in *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis*. **J Bacteriol** 181(23): 7161-7.1999.
- BRANDELLI, A., DAROIT, D. J. and RIFFEL, A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. **Appl Microbiol Biotechnol** 85(6): 1735-50.2010.
- BROCK, M. Generation and phenotypic characterization of *Aspergillus nidulans* methylisocitrate lyase deletion mutants: methylisocitrate inhibits growth and conidiation. **Appl Environ Microbiol** 71(9): 5465-75.2005.
- BROCK, M., DARLEY, D., TEXTOR, S. and BUCKEL, W. 2-Methylisocitrate lyases from the bacterium *Escherichia coli* and the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*: characterization and comparison of both enzymes. **Eur J Biochem** 268(12): 3577-86.2001.
- CAZZANIGA, R. A. (2011). 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. Departamento de Genética. Ribeirão Preto-SP, **Universidade de São Paulo**. Doutorado: 111.
- CHAUVIN, M. F. D. A study on the decontamination of insoles colonized by *Trichophyton rubrum*: effect of terbinafine spray powder 1% and terbinafine spray solution 1%. **J Eur Acad Dermatol Venereol** 26(7): 875-8.2011.

CHEN, J. and FANG, G. MAD2B is an inhibitor of the anaphase-promoting complex. **Genes Dev** 15(14): 1765-70.2001.

CHEN, J., YI, J., LIU, L., YIN, S., CHEN, R., LI, M., YE, C., ZHANG, Y. Q. and LAI, W. Substrate adaptation of *Trichophyton rubrum* secreted endoproteases. **Microb Pathog** 48(2): 57-61.2010.

COULOMBE, P. A., BERNOT, K. M., EDITORS-IN-CHIEF: WILLIAM, J. L. and LANE, M. D. (2004). Keratins and the Skin. Encyclopedia of Biological Chemistry. New York, **Elsevier**: 497-504.

COVE, D. J. The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. **Biochim Biophys Acta** 113(1): 51-6.1966.

CRUZ, A. H., BROCK, M., ZAMBUZZI-CARVALHO, P. F., SANTOS-SILVA, L. K., TROIAN, R. F., GOES, A. M., SOARES, C. M. and PEREIRA, M. Phosphorylation is the major mechanism regulating isocitrate lyase activity in *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. **FEBS J** 278(13): 2318-32.2011.

CUPP, J. R. and MCALISTER-HENN, L. Kinetic analysis of NAD(+)-isocitrate dehydrogenase with altered isocitrate binding sites: contribution of IDH1 and IDH2 subunits to regulation and catalysis. **Biochemistry** 32(36): 9323-8.1993.

DE LUCAS, J. R., VALENCIANO, S., LABORDA, F. and TURNER, G. Glucose-induced inactivation of isocitrate lyase in *Aspergillus nidulans*. **Arch Microbiol** 162(6): 409-13.1994.

EBEL, F., SCHWIENBACHER, M., BEYER, J., HEESEMANN, J., BRAKHAGE, A. A. and BROCK, M. Analysis of the regulation, expression, and localisation of the isocitrate lyase from *Aspergillus fumigatus*, a potential target for antifungal drug development. **Fungal Genet Biol** 43(7): 476-89.2006.

EWING, B. and GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Res** 8(3): 186-94.1998.

FERREIRA-NOZAWA, M. S., NOZAWA, S. R., MARTINEZ-ROSSI, N. M. and ROSSI, A. The dermatophyte *Trichophyton rubrum* secretes an EDTA-sensitive alkaline phosphatase on high-phosphate medium. **Braz J Microbiol** 34(2): 161-164.2003.

FERREIRA-NOZAWA, M. S., SILVEIRA, H. C. S., ONO, C. J., FACHIN, A. L., ROSSI, A. and MARTINEZ-ROSSI, N. M. The pH signaling transcription factor PacC mediates the growth of *Trichophyton rubrum* on human nail *in vitro*. **Med Mycol** 44(7): 641-5.2006.

FLAVELL, R. B. and WOODWARD, D. O. The concurrent regulation of metabolically related enzymes. The Krebs cycle and glyoxylate shunt enzymes in *Neurospora*. **Eur J Biochem** 17(2): 284-91.1970.

FREITAS, J. S., SILVA, E. M., LEAL, J., GRAS, D. E., MARTINEZ-ROSSI, N. M., DOS SANTOS, L. D., PALMA, M. S. and ROSSI, A. 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 Chaperones** 16(5): 565-72.2011.

FREITAS, J. S., SILVA, E. M. and ROSSI, A. Identification of nutrient-dependent changes in extracellular pH and acid phosphatase secretion in *Aspergillus nidulans*. **Genet Mol Res** 6(3): 721-9.2007.

GASTEIGER, E., HOOGLAND, C., GATTIKER, A., DUVAUD, S., WILKINS, M. R., APPEL, R. D. and BAIROCH, A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. The Proteomics Protocols Handbook. WALKER, J. M. Totowa, New Jersey, **Humana Press Inc**: 571-607

GRADISAR, H., KERN, S. and FRIEDRICH, J. Keratinase of *Doratomyces microsporus*. **Appl Microbiol Biotechnol** 53(2): 196-200.2000.

GRUMBT, M., MONOD, M. and STAIB, P. Genetic advances in dermatophytes. **FEMS Microbiol Lett** 320(2): 79-86.2011.

HILL, P., BRANTLEY, H. and VAN DYKE, M. Some properties of keratin biomaterials: kerateines. **Biomaterials** 31(4): 585-93.2010.

HUANG, X. and MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Res** 9(9): 868-77.1999.

IDNURM, A. and HOWLETT, B. J. Isocitrate lyase is essential for pathogenicity of the fungus *Leptosphaeria maculans* to canola (*Brassica napus*). **Eukaryot Cell** 1(5): 719-24.2002.

JACOB, T. R., PERES, N. T., PERSINOTI, G. F., SILVA, L. G., MAZUCATO, M., ROSSI, A. and 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.

JAGDISH, C. Dermatophytoses. **Medical Mycology**, v1, p.106-107, 1995 apud LAKSHMIPATHY, D.T., KANNABIRAN, K. Review on dermatomycosis: pathogenesis and Treatment. **Natural Science**, v.2, p.726-731, 2010.

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.

JUNQUEIRA, L. C. U. and CARNEIRO, J. (2008). Histologia Básica, Guanabara Koogan. KANG, S. and METZENBERG, R. L. Molecular analysis of nuc-1+, a gene controlling phosphorus acquisition in *Neurospora crassa*. **Mol Cell Biol** 10(11): 5839-48.1990.

KAUFMAN, G., HORWITZ, B. A., DUEK, L., ULLMAN, Y. and BERDICEVSKY, I. Infection stages of the dermatophyte pathogen *Trichophyton*: microscopic characterization and proteolytic enzymes. **Med Mycol** 45(2): 149-55.2007.

- KEYS, D. A. and MCALISTER-HENN, L. Subunit structure, expression, and function of NAD(H)-specific isocitrate dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Bacteriol** 172(8): 4280-7.1990.
- KNIGHT, J. P., DALY, T. M. and BERGMAN, L. W. Regulation by phosphorylation of Pho81p, a cyclin-dependent kinase inhibitor in *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr Genet** 46(1): 10-9.2004.
- KORNBERG, H. L. The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*. **Biochem J** 99(1): 1-11.1966.
- KORNBERG, H. L. and BEEVERS, H. A mechanism of conversion of fat to carbohydrate in castor beans. **Nature** 180(4575): 35-6.1957.
- LAKSHMIPATHY, D.T., KANNABIRAN, K. Review on dermatomycosis: pathogenesis and Treatment. **Natural Science**, v.2, p.726-731, 2010.
- LATTIF, A. A., PRASAD, R., BANERJEE, U., GUPTA, N., MOHAMMAD, S. and BAQUER, N. Z. The glyoxylate cycle enzyme activities in the pathogenic isolates of *Candida albicans* obtained from HIV/AIDS, diabetic and burn patients. **Mycoses** 49(2): 85-90.2006.
- LENG, W., LIU, T., WANG, J., LI, R. and JIN, Q. Expression dynamics of secreted protease genes in *Trichophyton rubrum* induced by key host's proteinaceous components. **Med Mycol** 47(7): 759-65.2009.
- LIN, A. P. and MCALISTER-HENN, L. Isocitrate binding at two functionally distinct sites in yeast NAD⁺-specific isocitrate dehydrogenase. **J Biol Chem** 277(25): 22475-83.2002.
- LOPEZ-BOADO, Y. S., HERRERO, P., FERNANDEZ, T., FERNANDEZ, R. and MORENO, F. Glucose-stimulated phosphorylation of yeast isocitrate lyase in vivo. **J Gen Microbiol** 134(9): 2499-505.1988.
- LORENZ, M. C. and FINK, G. R. The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. **Nature** 412(6842): 83-6.2001.
- LORENZ, M. C. and FINK, G. R. Life and death in a macrophage: role of the glyoxylate cycle in virulence. **Eukaryot Cell** 1(5): 657-62.2002.
- LUTTIK, M. A., KOTTER, P., SALOMONS, F. A., VAN DER KLEI, I. J., VAN DIJKEN, J. P. and PRONK, J. T. The *Saccharomyces cerevisiae* ICL2 gene encodes a mitochondrial 2-methylisocitrate lyase involved in propionyl-coenzyme A metabolism. **J Bacteriol** 182(24): 7007-13.2000.
- MANSOUR, S., BECKERICH, J. M. and BONNARME, 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. and 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. and 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.

MARANHÃO, F. C. A., PAIÃO, F. G. and MARTINEZ-ROSSI, N. M. Isolation of transcripts over-expressed in human pathogen *Trichophyton rubrum* during growth in keratin. **Microb Pathog** 43: 166-72.2007.

MARTINEZ-ROSSI, N. M., FERREIRA-NOZAWA, M. S., GRAMINHA, M. A. S., NOZAWA, S. R., FACHIN, A. L., CERVELATTI, E. P., PRADE, R. A. and ROSSI, A. (2004). Molecular aspects of dermatophyte-host interactions. Fungi in human and animal health. KUSHWAHA, R. K. S. Jodhpur, India, **Scientific Publishers**. 9: 143-165.

MARTINEZ-ROSSI, N. M., PERES, N. T. A. and ROSSI, A. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. **Mycopathologia** 166: 369-383.2008.

MARTINEZ-ROSSI, N. M., PERSINOTI, G. F., PERES, N. T. and ROSSI, A. Role of pH in the pathogenesis of dermatophytoses. **Mycoses** 55(5): 381-7.2011.

MCLEAN, W. H. and MOORE, C. B. Keratin disorders: from gene to therapy. **Hum Mol Genet** 20(R2): R189-97.2011.

MENDES, N. S., TREVISAN, G. L., SILVA CRUZ, A. H., SANTOS, R. S., PERES, N. T., MARTINEZ-ROSSI, N. M. and ROSSI, A. Transcription of N- and O-linked mannosyltransferase genes is modulated by the *pacC* gene in the human dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **FEBS Open Bio** 2: 294-7.2012.

MONOD, M. Secreted proteases from dermatophytes. **Mycopathologia** 166(5-6): 285-94.2008.

MONOD, M., CAPOCCIA, S., LECHENNE, B., ZAUGG, C., HOLDOM, M. and JOUSSON, O. Secreted proteases from pathogenic fungi. **Int J Med Microbiol** 292(5-6): 405-19.2002.

MUNOZ-ELIAS, E. J. and MCKINNEY, J. D. *Mycobacterium tuberculosis* isocitrate lyases 1 and 2 are jointly required for in vivo growth and virulence. **Nat Med** 11(6): 638-44.2005.

NELSON, D. L. and COX, M. M. (2011). Princípios de Bioquímica de Lehninger, **ARTMED**.

NOZAWA, S. R., FERREIRA-NOZAWA, M. S., MARTINEZ-ROSSI, N. M. and 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(3): 286-295.2003.

OIKAWA, T. and YAMADA, T. Molecular biology of the Ets family of transcription factors. **Gene** 303: 11-34.2003.

OSBORNE, C. S., LEITNER, I., HOFBAUER, B., FIELDING, C. A., FAVRE, B. and RYDER, N. S. Biological, biochemical, and molecular characterization of a new clinical *Trichophyton rubrum* isolate resistant to terbinafine. **Antimicrob Agents Chemother** 50(6): 2234-6.2006.

PAIÃO, F. G., SEGATO, F., CURSINO-SANTOS, J. R., PERES, N. T. and MARTINEZ-ROSSI, N. M. Analysis of *Trichophyton rubrum* gene expression in response to cytotoxic drugs. **FEMS Microbiol Lett** 271(2): 180-6.2007.

PEÑALVA, M. A., TILBURN, J., BIGNELL, E. and ARST JR., H. N. Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. **Trends Microbiol** 16: 291-300.2008.

PERES, N. T., MARANHÃO, F. C., ROSSI, A. and MARTINEZ-ROSSI, N. M. Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. **An Bras Dermatol** 85(5): 657-67.2010a.

PERES, N. T., SANCHES, P. R., FALCAO, J. P., SILVEIRA, H. C., PAIAO, F. G., MARANHÃO, F. C., GRAS, D. E., SEGATO, F., CAZZANIGA, R. A., MAZUCATO, M., CURSINO-SANTOS, J. R., AQUINO-FERREIRA, R., ROSSI, A. and MARTINEZ-ROSSI, N. M. Transcriptional profiling reveals the expression of novel genes in response to various stimuli in the human dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **BMC Microbiol** 10: 39.2010b.

PERES, N. T. A. (2009). 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. Departamento de Imunologia. Ribeirão Preto, **Universidade de São Paulo**.

PETERS, J. M. Cell biology: the checkpoint brake relieved. **Nature** 446(7138): 868-9.2007.

RAVEN, P. H., EVERT, R. F. and EICHHORN, S. E. (2001). *Biologia Vegetal*. Rio de Janeiro-RJ, **Guanabara Koogan S.A.**

ROBERTSON, E. F., HOYT, J. C. and REEVES, H. C. Evidence of histidine phosphorylation in isocitrate lyase from *Escherichia coli*. **J Biol Chem** 263(5): 2477-82.1988.

RUA, J., DE ARRIAGA, D., BUSTO, F. and SOLER, J. Effect of glucose on isocitrate lyase in *Phycomyces blakesleeana*. **J Bacteriol** 171(11): 6391-3.1989.

RUDE, T. H., TOFFALETTI, D. L., COX, G. M. and PERFECT, J. R. Relationship of the glyoxylate pathway to the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun** 70(10): 5684-94.2002.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. and MANIATIS, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, **Cold Spring Harbor Laboratory Press**.

SCHOBEL, F., IBRAHIM-GRANET, O., AVE, P., LATGE, J. P., BRAKHAGE, A. A. and BROCK, M. *Aspergillus fumigatus* does not require fatty acid metabolism via isocitrate lyase for development of invasive aspergillosis. **Infect Immun** 75(3): 1237-44.2007.

SEEBACHER, C., BOUCHARA, J. P. and MIGNON, B. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. **Mycopathologia** 166(5-6): 335-52.2008a.

SEGATO, F., NOZAWA, S. R., ROSSI, A. and MARTINEZ-ROSSI, N. M. Over-expression of genes coding for proline oxidase, riboflavin kinase, cytochrome c oxidase and an MFS transporter induced by acriflavin in *Trichophyton rubrum*. **Med Mycol** 46(2): 135-9.2008.

SHARMA, A., CHANDRA, S. and SHARMA, M. Difference in keratinase activity of dermatophytes at different environmental conditions is an attribute of adaptation to parasitism. **Mycoses** 55(5): 410-5.2012.

SILVA, E. M., FREITAS, J. S., GRAS, D. E., SQUINA, F. M., LEAL, J., SILVEIRA, H. C. S., MARTINEZ-ROSSI, N. M. and ROSSI, A. 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(10): 803-11.2008.

SILVA, P., BARBOSA, J., NASCIMENTO, A. V., FARIA, J., REIS, R. and BOUSBAA, H. Monitoring the fidelity of mitotic chromosome segregation by the spindle assembly checkpoint. **Cell Prolif** 44(5): 391-400.2011.

SILVEIRA, H. C., GRAS, D. E., CAZZANIGA, R. A., SANCHES, P. R., ROSSI, A. and 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.

STAIB, P., ZAUGG, C., MIGNON, B., WEBER, J., GRUMBT, M., PRADERVAND, S., HARSHMAN, K. and MONOD, M. Differential gene expression in the pathogenic dermatophyte *Arthroderma benhamiae* in vitro versus during infection. **Microbiology** 156(Pt 3): 884-95.2010.

STEINSTRÄESSER, L., SORKIN, M., NIEDERBICHLER, A. D., BECERIKLI, M., STUPKA, J., DAIGELER, A., KESTING, M. R., STRICKER, I., JACOBSEN, F. and SCHULTE, M. A novel human skin chamber model to study wound infection ex vivo. **Arch Dermatol Res** 302(5): 357-65.2010.

THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F. and 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.

TREVISAN, G. L., OLIVEIRA, E. H., PERES, N. T., CRUZ, A. H., MARTINEZ-ROSSI, N. M. and ROSSI, A. Transcription of *Aspergillus nidulans* *pacC* is modulated by alternative RNA splicing of *palB*. **FEBS Lett** 585(21): 3442-5.2011.

- UCHIYAMA, H., ANDO, M., TOYONAKA, Y. and TABUCHI, T. Subcellular localization of the methylcitric-acid-cycle enzymes in propionate metabolism of *Yarrowia lipolytica*. **Eur J Biochem** 125(3): 523-7.1982.
- VICKERS, E. R., KASZA, A., KURNAZ, I. A., SEIFERT, A., ZEEF, L. A., O'DONNELL, A., HAYES, A. and SHARROCKS, A. D. Ternary complex factor-serum response factor complex-regulated gene activity is required for cellular proliferation and inhibition of apoptotic cell death. **Mol Cell Biol** 24(23): 10340-51.2004.
- WANG, L., MA, L., LENG, W., LIU, T., YU, L., YANG, J., YANG, L., ZHANG, W., ZHANG, Q., DONG, J., XUE, Y., ZHU, Y., XU, X., WAN, Z., DING, G., YU, F., TU, K., LI, Y., LI, R., SHEN, Y. and JIN, Q. Analysis of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* expressed sequence tags. **BMC Genomics** 7: 255.2006.
- WATERS, N. C., KNIGHT, J. P., CREASY, C. L. and BERGMAN, L. W. The yeast Pho80-Pho85 cyclin-CDK complex has multiple substrates. **Curr Genet** 46(1): 1-9.2004.
- WEITZMAN, I. and SUMMERBELL, R. C. The Dermatophytes. **Clin Microbiol Rev** 8(2): 240-259.1995.
- WOODFOLK, J. A., WHEATLEY, L. M., PIYASENA, R. V., BENJAMIN, D. C. and PLATTS-MILLS, T. A. Trichophyton antigens associated with IgE antibodies and delayed type hypersensitivity. Sequence homology to two families of serine proteinases. **J Biol Chem** 273(45): 29489-96.1998.
- YANG, J., CHEN, L., WANG, L., ZHANG, W., LIU, T. and JIN, Q. TrED: the *Trichophyton rubrum* Expression Database. **BMC Genomics** 8: 250.2007.
- ZAUGG, C., MONOD, M., WEBER, J., HARSHMAN, K., PRADERVAND, S., THOMAS, J., BUENO, M., GIDDEY, K. and STAIB, P. Gene expression profiling in the human pathogenic dermatophyte *Trichophyton rubrum* during growth on proteins. **Eukaryot Cell** 8(2): 241-50.2009.
- ZHANG, L., YANG, S. H. and SHARROCKS, A. D. Rev7/MAD2B links c-Jun N-terminal protein kinase pathway signaling to activation of the transcription factor Elk-1. **Mol Cell Biol** 27(8): 2861-9.2007.
- ZHAO, J., LIU, S., WANG, H., ZHANG, X., KANG, T., LI, Z., DENG, H., YUE, W. and CAO, S. Mitotic arrest deficient protein MAD2B is overexpressed in human glioma, with depletion enhancing sensitivity to ionizing radiation. **J Clin Neurosci** 18(6): 827-33.2011.

Anexos

Being a scientist does not conflict with feminine values; you can be a mother, a housewife and glamorous!

Grace Sirju- Charran (Caribe)

Anexos

Anexo 1: Estágio na *Humboldt University* (Berlim-Alemanha).

O suporte financeiro para participação do 18º ISHAM (18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology) e estágio na *Humboldt University* foi concedido pela Pró-Reitoria de Pós-Graduação da Universidade de São Paulo (processo nº 12.1.9756.1.2.) e CAPES PROEX-Departamento de Genética (FMRP-USP).

HUMBOLDT-UNIVERSITÄT ZU BERLIN

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

To
Aline Helena da Silva Cruz, 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) - Insititute 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,

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

Hereby, I confirm that the researcher and PhD student Aline Helena da Silva Cruz, 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).

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 2: Doutorado Sanduíche na *Universidad de Sevilla* (Sevilha – Espanha).

O suporte financeiro para realização do doutorado sanduíche na Universidad de Sevilla foi concedido pelo Banco Santander (Edital Santander PRPG 2012; COPGRAD.01 – 121/2012), CAPES PROEX-Departamento de Genética (FMRP-USP) e CNPq (taxa bancada da bolsa de doutorado). O projeto desenvolvido é financiado pelo Governo da Espanha (Ministério de Pesquisa e Inovação), Junta de Andalucía e FEDER- *Fondo Europeo de Desarrollo Regional*.

Prof. Jesús de la Cruz
Departamento de Genética
Facultad de Biología
Avda. Reina Mercedes, 6
E-41012 Sevilla
Phone: +34-954557106
Fax: +34-954557104
jdlcd@us.es

Sevilla, 11 de Diciembre de 2012

A quien pueda interesar:

D. Aline Helena da Silva Cruz ha realizado en mi laboratorio una estancia predoctoral de tres meses, desarrollando bajo mi supervisión el proyecto de investigación titulado **"Defining the requirements of yeast RNA helicases in ribosome biogenesis"**. Durante este tiempo, la licenciada da Silva 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 obtención de mutantes que suprimen el crecimiento lento de la deficiencia de la helicasa de RNA Dbp7 en *Saccharomyces cerevisiae* y la identificación molecular de las mutaciones.

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

Jesús de la Cruz
Catedrático de Genética
Universidad de Sevilla

Anexo de Publicações

*Build a house, which is my family; plant a tree, which is my children's development and
write a book, which is my occupation, to feel that it was worth having lived*
Ruth Shady Solís (Peru)

journal homepage: www.FEBSLetters.org

Transcription of *Aspergillus nidulans* *pacC* is modulated by alternative RNA splicing of *palB*

Glauce L. Trevisan^a, Ernna H.D. Oliveira^b, Nalu T.A. Peres^b, Aline H.S. Cruz^b, Nilce M. Martinez-Rossi^b, Antonio Rossi^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil

^b Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 26 July 2011
Revised 24 September 2011
Accepted 29 September 2011
Available online 5 October 2011

Edited by Judit Ovádi

Keywords:
pH Regulation
RNA splicing
Phosphate regulation
pacC
palB
Aspergillus nidulans

ABSTRACT

Fungi have evolved elaborate signal transduction networks for remodeling metabolic pathways to scavenge nutrients, including the secretion of nutritional enzymes. This adaptive response involves the conserved PacC/Pal signal transduction pathway, which mediates the transcriptional response to ambient pH. In this study, we show that transcription of the gene for PacC is modulated in response to nutrient changes, phosphate and carbon sources, and pH. In addition, we show that transcription of *pacC* is modulated in response to alternative RNA splicing of the *palB* gene. These results reveal novel aspects of the complex network involved in modulation of *pacC*.

© 2011 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Coordination of environment and nutrient sensing with control of genetic responses to molecular signals is crucial for fungal growth and proliferation. Thus, most fungi have evolved elaborate signal transduction networks for remodeling metabolic pathways to scavenge nutrients [1–5]. The filamentous fungus *Aspergillus nidulans* responds to ambient pH changes by adjusting the secretion of enzymes with optimal activity accordingly [5–8]. Gene expression regulation by pH involves the highly conserved PacC/Pal signal transduction pathway that mediates diverse metabolic events in *A. nidulans* and other eukaryotic microorganisms. The *pacC* gene encodes a Zn-finger transcription factor that is activated by a conserved signaling cascade of six *pal* genes (*palA*, *palB*, *palC*, *palF*, *palH*, *palI*). This hierarchical regulatory network governs the transcriptional response to both acidic and alkaline pH [8–13]. The PalA protein interacts with YPXL/I motifs in the full-length version of the transcription regulator PacC (PacC⁷²), mediating a protein–protein interaction that is necessary for proteolytic activation of PacC [11,14]. The first step in the proteolytic conversion of PacC⁷² to PacC⁵³ is possibly mediated by PalB, a calpain-like cysteine protease. In the second, pH-independent step, PacC⁵³ is

converted to PacC²⁷, the active form of PacC [8,14]. Thus, irrespective of ambient pH, if full-length PacC is inactive in the absence of *pal* signaling, loss-of-function mutations in any *pal* genes should lead to a defective metabolic phenotype. In fact, loss-of-function mutations in *pacC*, *palA*, or *palB* genes lower the mannose content in the phosphate (Pi)-repressible acid phosphatase secreted by *A. nidulans* in an acidic milieu [11,15,16].

This study was designed to identify nutrient-dependent changes in the transcription modulation of the *pacC* gene in *A. nidulans*. We showed that expression of gene *pacC* is modulated in response to the availability of nutrients including Pi and carbon sources, and pH, and is downregulated in a *palB*[−] background (*palB7* mutant strain).

2. Materials and methods

2.1. *A. nidulans* strains, and culture conditions

The *pabaA1* (*p*-aminobenzoic acid requiring) and the strain with a loss-of-function mutation in the *palB* gene (*pabaA1 palB7*) were isolated by backcrosses, maintained on silica at 4 °C, and revived on solid complete medium before use. The *A. nidulans* mutant strains used here are available from the Fungal Genetics Stock Center (www.fgsc.net). *pabaA1* is the control strain for pH responses, Pi acquisition, and sensing. The strain responds positively to colony

* Corresponding author. Fax: +55 16 3633 6840.
E-mail address: anrossi@usp.br (A. Rossi).

staining for Pi-repressible acid phosphatase and secretes this enzyme in liquid medium when cultured under limited Pi conditions at pH 5.0. The *pabaA1 palB7* strain has enhanced colony staining for acid phosphatase at pH 6.5, and grows very poorly on solid medium but reasonably well in liquid medium, both media adjusted to pH 8.0 (www.fgsc.net). The *palB7* mutant was selected for showing reduced alkaline phosphatase and increased acid phosphatase activities at pH 6.5. This was visualized by growing the colonies on solid medium lacking Pi and staining for Pi-repressible phosphatases [1,6]. The *palB7* allele has a single mutation that results in a stop codon in the *palB7* transcript, truncating the predicted *PalB7* protein after Ser790 [17]. The *palB* gene encodes a nuclear calpain-like protease that may have specific functions in the processing of the transcription factor PacC, a key element in induction/repression of genes responsive to ambient pH [8,17].

Conidia from each strain (approximately 10^7 cells/ml) were inoculated into minimal liquid medium (MM) or yeast extract medium (YEM) (www.fgsc.net) at 37 °C with continuous shaking at 200 rpm for 17 h in low- or high-Pi MM. Low-Pi cultures (final concentrations) had 200 μ mol/l Pi for MM and 700 μ mol/l Pi for YEM [1], and high-Pi media had 10 mmol/l Pi. The culture media, adjusted to pH 5.0 (buffered with 50 mmol/l sodium citrate), or pH 8.0 (buffered with 50 mmol/l Tris-HCl) were supplemented with 1% D-glucose and 70 mmol/l sodium nitrate and prepared as previously described (www.fgsc.net). Magnesium sulphate was omitted in the YEM media. Low-Pi media were supplemented with 10 mmol/l KCl.

2.2. RNA extraction, and cDNA synthesis

Total RNA from control and *palB7* mutant strains was extracted from approximately 100 mg of frozen mycelium grown in liquid medium using TRIzol™ reagent and treated with RNase-free DNase I following the manufacturer's specifications (Invitrogen, Carlsbad, CA). One microgram of purified RNA from each strain was reverse-transcribed to cDNA with the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems, Foster City, CA). The cDNA from three independent biological experiments was quantified spectrophotometrically, and stored at –80 °C until PCR amplifications.

2.3. Transcriptional profiling of *pacC* and *palB* genes

For qualitative expression analyses, the genes *pacC* or *palB* were amplified from cDNA to amplify a PCR product surrounding an intron sequence of the genes using the primers: CAATGCTGC CTCTCTGTC (*pacC*Fw) and AGGTGTGTCGTCTCTTTCG (*pacC*Rev); CTCCGTTGTTGCCAGTCTTT (*palB*Fw) and CTACTTCAACGGGTGCT TCC (*palB*Rev). A typical PCR reaction used approximately 100 ng cDNA and 10 pmol of each oligonucleotide. An universal amplification program was used, with an annealing temperature of 61 °C.

Quantitative real-time PCR amplifications of gene *pacC* used the StepOne Plus Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster

City, CA) with the same oligonucleotides as the qualitative analyses. Melting curve analysis was performed using Dissociation Curves Software version 1.0 (Applied Biosystems) to exclude primer dimers and unspecific PCR products. Relative transcript quantities were calculated using the $\Delta\Delta C_t$ method [10,18] with *A. nidulans* β -actin and β -tubulin as the endogenous reference genes. The oligonucleotides (5'–3') were: TCCACGTCACCACTTTCAAC (*actin*Fw), AGTATTTCGCTCAGGAGGA (*actin*Rev), ACCTGCTCAACCT GTTCC (*tubulin*Fw), and TCCATCTCATCCATCCCTTC (*tubulin*Rev). Data normalization was carried out using the GenEx 5 MultiD Analyses AB (www.multid.se).

3. Results and discussion

Qualitative gene-expression analyses by RT-PCR revealed that the intronic region of the *pacC* pre-RNA was spliced in both YEM and MM liquid cultures, apparently leading to the same mRNA molecule, regardless of extracellular pH and Pi changes. Splicing of *pacC* pre-RNA was also not affected by *palB7* background (Fig. 1). Transcription of gene *palB* in the control and *palB7* mutant strains showed variant splicing patterns of intron III in response to changes in growth conditions (Fig. 1). Of note, *palB* pre-RNA was spliced in the control strain cultured in MM, regardless of extracellular pH and Pi changes, whereas *palB* pre-RNA was apparently not spliced in YEM cultures except for growth in low Pi, pH 5.0. Both spliced and non-spliced forms of the *palB7* allele were observed during growth in MM, whereas non-spliced forms of the *palB7* allele were predominant in YEM cultures. The *palB7* mutation possibly affected the control of a steady-state level of non-spliced/spliced forms of the RNA synthesized by the *palB7* mutant strain (Supplementary Fig. 1). Interestingly, the intronic regions I and III of *palB* pre-RNA were spliced concomitantly (not shown), resulting in a predicted inactive PalB protein when introns I and/or III are not spliced (Supplementary Fig. 2). Thus, we presume that PalB is inactive in YEM cultures at pH 8.0, an experimental condition in which PacC is active, suggesting that PacC protein is possibly activated through an alternative metabolic pathway to PalB proteolysis. Moreover, an active full length version of PacC should not be discarded [15]. Modulation of pre-RNA splicing in response to environment stimuli could be an additional control over protein or enzyme activities [19–23]. We recently showed that a splice variant of *hex-1* mRNA is modulated in the fungus *Neurospora crassa* by extracellular Pi and pH changes [10]. The *hex-1* gene encodes the major component of the Woronin body, a septal pore-associated organelle specific to filamentous ascomycetes that is crucial for preventing cytoplasmic bleeding after hyphal injury [24].

Expression analyses by quantitative RT-PCR amplifications (qRT-PCR) revealed that *pacC* transcripts accumulated almost equally in the mycelia of the control strain grown for 17 h in either low-Pi MM or YEM at pH 5.0. At pH 8.0, *pacC* transcripts accumulated in YEM to approximately five times the level in MM (Fig. 2). Splicing of *palB* pre-RNA was observed in mycelia grown in MM

Fig. 1. Transcriptional profiling of *pacC* and *palB* genes in *Aspergillus nidulans* by qualitative RT-PCR. The *pacC* and *palB* genes were amplified from cDNA obtained from mycelia grown under various culture conditions. MM, Minimal Medium; YEM, Yeast Extract Medium; Control, *pabaA1* strain. Arrows indicate high-Pi (↑) or low-Pi (↓) media.

Fig. 2. Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) analysis of *pacC* transcript levels in *Aspergillus nidulans*. The *pacC* gene was amplified from cDNA obtained from mycelia of control (*palB*⁺) and *palB7* mutant strains grown in low-Pi or high-Pi culture media. MM, Minimal Medium; YEM, Yeast Extract Medium. qRT-PCR data are representative of the average values $\pm$ standard deviation (S.D.) obtained from three independent experiments.

regardless of the extracellular Pi and pH changes, whereas its splicing was observed in mycelia grown in YEM only in low-Pi cultures, at pH 5.0 (Fig. 1). Thus, accumulation of higher levels of *pacC* transcripts in low-Pi YEM cultures at pH 8.0 may be correlated with the absence of spliced forms of the *palB*⁺ allele. Furthermore, transcription of *pacC* was downregulated in a *palB7* background in low-Pi medium, and was also greatly affected in MM at pH 8.0 (Fig. 2).

Transcription of *pacC* was reduced in cultures of the control strain grown in high-Pi medium, but was greatly affected in MM pH 5.0 or in YEM at pH 8.0 (Fig. 2). Furthermore, a loss-of-function mutation in *palB* lowered the expression of *pacC* in high-Pi medium, except in YEM at pH 8.0. High-Pi cultures repress the function of PalcA [6,7], a transcriptional regulator homologous to *N. crassa* Nuc-1 protein, a highly conserved DNA binding regulator that is involved in the sensing of Pi deprivation. In *N. crassa* and other fungi, including *A. nidulans*, the molecular mechanism controlling the response to phosphorus deprivation includes four regulatory genes: *nuc-2*, *preg*, *pgov*, and *nuc-1* in a highly conserved hierarchical relationship [3]. Pi shortage is sensed by the *nuc-2* gene, the product of which inhibits the function of the PREG-PGOV complex. This allows the translocation of NUC-1 into the nucleus [25]. NUC-1 is a basic helix-loop-helix transcription regulator involved in the derepression of nucleases, phosphatases and transporters necessary for fulfilling the cell's Pi requirements [26]. Regulation of gene expression by pH in *A. nidulans* or *N. crassa* and other filamentous fungi involves the conserved PacC signal transduction pathway that mediates metabolic events in either acidic or at alkaline pH [5,7,8,10,11]. In *A. nidulans*, PacC is required, among other functions, for development and glycosylation of the Pi-repressible acid phosphatase that is secreted in an acidic milieu, a condition in which the transcription factor PalcA is functional [6,7]. PacC protein is proteolytically activated by the calpain-like cysteine protease PalB. Transcription of *pacC* gene is auto-activated by the active form of PacC protein. Thus, downregulation of *pacC* in a *palB7* background probably occurs because the protease PalB is inactive [15,16]. Moreover, expression of the Pi-repressible acid phosphatase is modulated by Pi and pH changes, and its expression is dependent on both PalcA and PacC transcription factors, suggesting the occurrence of crosstalk between the pH and Pi regulatory circuits, i.e., synergy between the protein regulators PacC and PalcA [10,11,27]. Furthermore, transcription modulation of gene *pacC* also responds to carbon source, indicating that interactions between ambient pH, carbon source, and Pi changes are of great complexity [2]. In conclusion, in spite of this nutrient-sensing

complexity, modulation of *pacC* depends upon specific culture conditions, revealing novel aspects of the metabolic network involved in the expression of *pacC* in *A. nidulans* and probably other filamentous fungi.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Brazilian funding agencies FAPESP, CNPq, CAPES, and FAPESP. We thank C.A. Vieira, Pablo R. Sanchez, and M. Mazucato for skilled technical assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.febslet.2011.09.037.

References

- 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.
- Dechant, R. and Peter, M. (2008) Nutrient signals driving cell growth. *Curr Opin Cell Biol* 20, 678–687.
- Metzenberg, R.L. (1979) Implications of some genetic control mechanisms in *Neurospora*. *Microbiol Rev* 43, 361–383.
- LaFayette, S.L., Collins, C., Zaas, A.K., Schell, W.A., Betancourt-Quiroz, M., Gunatilaka, A.A., Perfect, J.R. and Cowen, L.E. (2010) PKC signaling regulates drug resistance of the fungal pathogen *Candida albicans* via circuitry comprised of Mkc1, calcineurin, and Hsp90. *PLoS Pathog* 6, e1001069. doi: 10.10101.1001371/journal.ppat.1001069.
- 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.
- Dom, G. (1965) Phosphatase mutants in *Aspergillus nidulans*. *Science* 150, 1183–1184.
- 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.
- Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D.A., Espeso, E.A., Orejas, M., Mungroo, J., Peñalva, M.A. and Arst Jr., H.N. (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.
- Freitas, J.S., Silva, E.M., Leal, J., Gras, D.E., Martinez-Rossi, N.M., Dos Santos, L.D., Palma, M.S. and Rossi, A. (2011) 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 Chaperones* 16, 565–572.
- Leal, J., Squina, F.M., Freitas, J.S., Silva, E.M., Ono, C.J., Martinez-Rossi, N.M. and Rossi, A. (2010) A splice variant of the *Neurospora crassa* *hec-1* transcript, which encodes the major protein of the Woronin body, is modulated by extracellular phosphate and pH changes. *FEBS Lett* 583, 180–184.

- [11] Silva, E.M., Freitas, J.S., Gras, D.E., Squina, F.M., Leal, J., Silveira, H.C.S., Martinez-Rossi, N.M. and Rossi, A. (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.
- [12] Silveira, H.C.S., Gras, D.E., Cazzaniga, R.A., Sanches, P.R., Rossi, A. and 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.
- [13] Squina, F.M., Leal, J., Cipriano, V.T., Martinez-Rossi, N.M. and Rossi, A. (2010) Transcription of the *Neurospora crassa* 70-kDa class heat shock protein genes is modulated in response to extracellular pH changes. *Cell Stress Chaperones* 15, 225–231.
- [14] Vincent, O., Rainbow, L., Tilburn, J., Arst, H.N. and Peñalva, M.A. (2003) YPXL/I is a protein interaction motif recognized by *Aspergillus* PalA and its human homologue, AIP1/Alix. *Mol Cell Biol* 23, 1647–1655.
- [15] 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.
- [16] Nozawa, S.R., May, G.S., Martinez-Rossi, N.M., Ferreira-Nozawa, M.S., Coutinho-Netto, J., Maccheroni Jr., W. and Rossi, A. (2003) Mutation in a calpain-like protease affects the posttranslational mannosylation of phosphatases in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* 38, 220–227.
- [17] Peñas, M.M., Hervas-Aguilar, A., Munera-Huertas, T., Reoyo, E., Peñalva, M.A., Arst Jr., H.N. and Tilburn, J. (2007) Further characterization of the signaling proteolysis step in the *Aspergillus nidulans* pH signal transduction pathway. *Eukaryot Cell* 6, 960–970.
- [18] Winer, J., Jung, C.K., Shackel, I. and 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.
- [19] Morozov, I.Y., Negrete-Urtasun, S., Tilburn, J., Jansen, C.A., Caddick, M.X. and Arst Jr., H.N. (2006) Nonsense-mediated mRNA decay mutation in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* 5, 1838–1846.
- [20] Ruger-Herreros, C., Rodriguez-Romero, J., Fernandez-Barranco, R., Olmedo, M., Fischer, R., Corrochano, L.M. and Canovas, D. (2011) Regulation of conidiation by light in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 188, 809–822.
- [21] Caddick, M.X., Jones, M.G., van Tonder, J.M., Le Cordier, H., Narendja, F., Strauss, J. and Morozov, I.Y. (2006) Opposing signals differentially regulate transcript stability in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 62, 509–519.
- [22] Prade, R.A. and Timberlake, W.E. (1993) The *Aspergillus nidulans* *brlA* regulatory locus consists of overlapping transcription units that are individually required for conidiophore development. *EMBO J* 12, 2439–2447.
- [23] Zhao, X., Hume, S.L., Johnson, C., Thompson, P., Huang, J., Gray, J., Lamb, H.K. and Hawkins, A.R. (2010) The transcription repressor NmrA is subject to proteolysis by three *Aspergillus nidulans* proteases. *Protein Sci* 19, 1405–1419.
- [24] Tenney, K., Hunt, I., Sweigard, J., Pounder, J.L., McClain, C., Bowman, E.J. and Bowman, B.J. (2000) Hex-1, a gene unique to filamentous fungi, encodes the major protein of the Woronin body and functions as a plug for septal pores. *Fungal Genet Biol* 31, 205–217.
- [25] Peleg, Y., Addison, R., Aramayo, R. and Metzberg, 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.
- [26] Ogawa, N., DeRisi, J. and Brown, P.O. (2000) New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis. *Mol Biol Cell* 11, 4309–4321.
- [27] Gras, D.E., Silveira, H.C.S., Peres, N.T.A., Sanches, P.R., Martinez-Rossi, N.M. and Rossi, A. (2009) Transcriptional changes in the *nuc-2A* mutant strain of *Neurospora crassa* cultivated under conditions of phosphate shortage. *Microbiol Res* 164, 658–664.

journal homepage: www.elsevier.com/locate/febsopenbio

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*, TERG.06338; GenBank: XM.003233297) and O-mannosyltransferase (*O-man*, TERG.06465; GenBank: XM.003233430) were amplified from cDNA using the following primers (5'–3'): TAAACGACAGTGGTATGCCG (*N-man*FWD) and TGTAGCCTGTGGGTTCTCT (*N-man*REV); CCATGGGACGTGTATACTC (*O-man*FWD) and CGTCATCATAGCAACATTGAG (*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

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 keratin 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 alkalized; 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 alkalizing 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 FAEPA. 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 dermatophytoses. *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) Immunochimistry of pathogenic yeast, *Candida* species, focusing on mannan. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 88, 250–265.
- [14] Lussier M., Sdicu A.M., Bussey H. (1999) The KTR and MN11 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] Lengeler 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., Mra 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] Harty 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., Perlinska-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 tioconazole. 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 L., 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) *tpb2* 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.* 48, 513–524.
- [41] Diaz-Jimenez D.F., Mora-Montes H.M., Hernandez-Cervantes A., Luna-Arias J.P., Cow 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.