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

A capacidade de infecção do dermatófito *Trichophyton rubrum* está correlacionada com a sinalização do pH extracelular

Henrique César Santejo Silveira

Ribeirão Preto
2007

Henrique César Santejo Silveira

A capacidade de infecção do dermatófito *Trichophyton rubrum* está correlacionada com a sinalização do pH extracelular

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 (Genética).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Nilce M. Martinez Rossi

Co-orientador: Prof. Dr. Antônio Rossi Filho

Ribeirão Preto
2007

Silveira, Henrique César Santejo

A Capacidade de infecção do dermatófito *Trichophyton rubrum* está correlacionada com a sinalização do pH extracelular. Ribeirão Preto, 2007.

121 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Departamento de Genética.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Martinez Rossi, N. M.

Co-orientador: Prof. Dr. Rossi, A.

1. Biblioteca Subtrativa. 2. *Trichophyton rubrum*. 3. pH.

Apoio Institucional e Suporte Financeiro

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética e Biologia Molecular de Fungos, localizado no Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo– (USP) com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

- ✓ Fundação de Apoio de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)
 - ✓ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
 - ✓ Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da FMRP – USP (FAEPA).
 - ✓ Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).
-

Dedico Especialmente este Trabalho

A minha esposa, **Márcia M C Marques Silveira**

Por todo seu amor, respeito, cumplicidade, incentivo em todos os momentos desta etapa vivida e por estarmos realizando juntos um grande sonho, sermos pais.

Obrigado !!!

Ofereço Especialmente este Trabalho

A minha mãe, **Ana Maria**

Pelo amor incondicional, por todo incentivo e apoio que me possibilitou concluir esta bonita e importante etapa da minha vida.

Obrigado !!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente, Prof^a. Dr^a. Nilce M. Martinez Rossi, por sua orientação, por seu exemplo de seriedade, profissionalismo, pela dedicação incondicional para realização deste trabalho e por toda confiança e incentivo durante esses 4 anos de doutorado, imprescindíveis para o meu crescimento profissional. Aprendi muito com você!

Obrigado Nilce.

Agradeço ao Prof. Dr. Antônio Rossi Filho, pela imprescindível co-orientação neste trabalho, pelo apoio e amizade em todos estes anos de convivência. Muito obrigado pela disponibilidade com que sempre ofereceu seu laboratório, e pelos conselhos que serão sempre lembrados.

A Prof^a. Dr^a. Elza T. Sakamoto Hojo por disponibilizar seu laboratório para que fossem realizados os experimentos de microscopia.

Ao Prof. Dr. Geraldo Aleixo da Silva Passos pela disposição de recursos do seu laboratório para o desenvolvimento de alguns experimentos.

A Coordenadora de Pós-Graduação Prof^a. Dr^a. Lucia Regina Martelli pela dedicação e competência.

Aos docentes, pós-graduandos e funcionários da área de Pós-graduação do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pela agradável convivência. Em especial as secretárias Suzie, Maria Aparecida e Cleusa pelo carinho, dedicação, amizade e empenho ao longo desses anos.

Ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto por proporcionar condições para realização deste trabalho.

A Dr^a Ana Lucia Fachin que me apresentou a Prof^a Nilce possibilitando que eu viesse a dar continuidade a minha pós-graduação em Ribeirão Preto.

A grande *hermana* Diana Ester Gras (Lady), pelo incentivo, apoio e companheirismo em todos os momentos no laboratório.

A Nalu Peres pela amizade e ajuda nos ensaios enzimáticos e algumas correções.

Ao grande amigo Pablo Sanches, pelo apoio na bioinformática, facilitando enormemente as análises das seqüências (ESTs) através do desenvolvimento do *pipeline*.

A Maria Sol, pela ajuda nos experimentos de microscopia.

Aos amigos do grupo de Genética e Biologia Molecular de Fungos (de todas as épocas) do Departamento de Genética da FMRP-USP: Fernando Segato, André Andrade, Fernanda Paião, Jeny, Fernanda Maranhão, Rodrigo, Luciene, Eliane, Juliana Falcão, Sérgio e Mônica.

Aos funcionários Ana Claudia, Mendelson Mazucato e Roseli de Aquino Ferreira, cujo apoio técnico ao longo dos anos foi imprescindível para realização deste trabalho.

Aos amigos do laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Fungos do Departamento de Bioquímica e Imunologia: Juliana, Emiliana, Janaína, Erna, Vivian, Carlos e Fábio.

A CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado.

A FAPESP, CNPq e FAEPA pelos auxílios concedidos.

A todos aqueles que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Modelo proposto para regulação de enzimas proteolíticas pelo pH, secretadas pelos dermatófitos	5
Figura 2. Representação esquemática do modelo formal de regulação pelo pH em <i>A. nidulans</i>	7
Figura 3. Modelo molecular de ativação do fator de transcrição PacC em resposta ao pH ambiente alcalino em <i>A. nidulans</i>	9
Figura 4. Análise da integridade dos RNAs utilizados nas bibliotecas subtrativas	35
Figura 5. Ilustração da metodologia de construção de bibliotecas de subtração pela técnica <i>Suppression Subtractive Hybridization</i>	36
Figura 6. Representação esquemática do funcionamento do kit <i>SMART PCR cDNA synthesis</i>	38
Figura 7. Representação esquemática do delineamento experimental da Biblioteca Subtrativa Supressiva.....	49
Figura 8. Alinhamento de regiões conservadas da proteína PacC de <i>T. rubrum</i> com outros membros da família PacC/Rim101.....	51
Figura 9. Análise de <i>Northern blotting</i> do gene <i>pacC</i> de <i>T. rubrum</i>	52
Figura 10. Disrupção do gene <i>pacC</i> de <i>T. rubrum</i>	53
Figuras 11. Análises por <i>Western blotting</i> revelaram o processamento da proteína PacC e o efeito do nocaute do gene <i>pacC</i> na proteína PacC de <i>T. rubrum</i>	55
Figura 12. Efeito da disrupção do gene <i>pacC</i> no crescimento de <i>T. rubrum</i>	57
Figura 13. Crescimento do dermatófito <i>T. rubrum</i> em função do tempo de cultivo na unha humana como única fonte de nutriente.....	58
Figura 14. Efeito do nocaute do gene <i>pacC</i> em <i>T. rubrum</i> sob condições ácidas e alcalinas.	59
Figura 15. Determinação da atividade queratinolítica	60
Figura 16. Amplificação dos clones por PCR.....	62
Figura 17. Rastreamento dos clones por <i>Reverse Northern blotting</i>	63
Figura 18. Classificação funcional dos cDNAs de <i>T. rubrum</i> originados da biblioteca de subtração no tempo de 30 minutos em pH 5,0	67
Figura 19. Análises de <i>Northern blotting</i> dos cDNAs diferencialmente expressos em exposição no tempo de 30 minutos em pH 5,0.....	68
Figura 20. Amplificação dos clones por PCR.....	69
Figura 21. Rastreamento dos clones por <i>Reverse Northern blotting</i> ..	70

Figura 22. Classificação funcional dos cDNAs de <i>T. rubrum</i> originados da Biblioteca de subtração no tempo de 1 hora em pH 5,0	78
Figura 23. Análises de <i>Northern blotting</i> dos cDNAs diferencialmente expressos em exposição no tempo de 1 hora em pH 5,0	80

ÍNDICE DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Cepas de <i>E. coli</i> e seus respectivos genótipos	13
Tabela 2. Seqüência dos <i>primers</i> utilizados na amplificação do fragmento utilizado como sonda nos experimentos de <i>Northern blotting</i>	25
Tabela 3. Descrição dos cDNAs empregados na construção das bibliotecas de subtração <i>forward</i> e <i>reverse</i> , no tempo de exposição de 30 minutos em pH ácido e alcalino.....	61
Tabela 4. Descrição dos cDNAs empregados na construção das bibliotecas de subtração <i>forward</i> e <i>reverse</i> , no tempo de exposição de 1 hora em pH ácido e alcalino.....	61
Tabela 5. ESTs identificados por <i>Reverse Northern blotting</i> após exposição do <i>T. rubrum</i> por 30 minutos em pH 5,0	65
Tabela 6. ESTs identificados por <i>Reverse Northern blotting</i> após exposição do <i>T. rubrum</i> por 1 hora em pH 5,0.....	72

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Trichophyton rubrum</i>	2
1.2 Os dermatófitos na interação com o hospedeiro	3
1.3 Regulação gênica em resposta ao pH ambiente	6
2. OBJETIVOS DO TRABALHO	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1 Linhagens.	13
3.1.2 Linhagem de <i>Trichophyton rubrum</i>	13
3.1.3 Cepas bacterianas.	13
3.1.4 Suspensão de conídios de <i>T. rubrum</i>	13
3.2 Meios de cultura	14
3.2.1 Meio mínimo	14
3.2.2 Solução de sais	14
3.2.3 Solução de elementos-traço.	14
3.2.4 Meio Agar-Sabouraud	15
3.2.5 Meio LB	15
3.2.6 Meio SOB	15
3.2.7 Solução de casaminoácidos	15
3.3 Soluções para experimentos de biologia molecular	16
3.3.1 Solução de hibridização e pré-hibridização (<i>Southern blotting</i>)	16
3.3.2 Denhardt's (50X)	16
3.3.3 Solução de hibridização e pré-hibridização (<i>Northern blotting</i>)	16
3.3.4 Solução de Church para hibridização e pré-hibridização (<i>Northern blotting</i>)	16
3.3.5 Solução I de lavagem (<i>Northern blotting</i>)	17
3.3.6 Solução II de lavagem (<i>Northern blotting</i>)	17
3.3.7 Solução I (para extração de DNA plasmidial)	17
3.3.8 Solução II (para extração de DNA plasmidial)	17
3.3.9 Solução III (para extração de DNA plasmidial)	17
3.3.10 Solução Desnaturante (para tratamento de gel de agarose e membranas)	17
3.3.11 Solução Neutralizante (para tratamento de gel de agarose e membranas)	17
3.3.12 Solução de Lavagem I (<i>Southern blotting</i>)	18

3.3.13 Solução de Lavagem II (<i>Southern blotting</i>).....	18
3.3.14 SSC 20X (para tratamento de gel de agarose e membranas).....	18
3.3.15 Solução de IPTG.....	18
3.3.16 Solução de <i>X-gal</i>	18
3.3.17 Poceau's	18
3.4 Tampões	19
3.4.1 Tampão TAE (50X)	19
3.4.2 Tampão de migração para RNA (5X).....	19
3.4.3 Tampão Tris Glicina.....	19
3.4.4 Tampão PBS.....	19
3.4.5 Tampão TBS (20X)	19
3.4.6 Tampão TE	19
3.5 Metodologia utilizada nos experimentos de Biologia molecular e de Bioquímica...	20
3.5.1 Extração de DNA plasmidial (<i>mini prep</i>)	20
3.5.2 Extração de DNA genômico.....	20
3.5.3 Extração de bandas de DNA de géis de agarose	21
3.5.4 Ligação de fragmentos de DNA	21
3.5.5 Sequenciamento	21
3.5.6 <i>Southern blotting</i>	22
3.5.6.1 Hibridização (<i>Southern blotting</i>).....	22
3.5.7 <i>Northern blotting</i>	23
3.5.7.1 Cultivo das linhagens utilizadas nos experimentos de <i>Northern blotting</i>	23
3.5.7.2 Extração do RNA total.....	23
3.5.7.3 Preparação das amostras de RNA	24
3.5.7.4 Gel para RNA.....	24
3.5.7.5 Hibridização do <i>Northern blotting</i>	25
3.5.7.6 Sonda utilizada na análise de expressão do gene <i>pacC</i> de <i>T. rubrum</i>	25
3.5.8 <i>Western blotting</i>	25
3.5.8.1 Obtenção do extrato bruto de <i>T. rubrum</i> cultivado em diferentes pH	25
3.5.8.2 Quantificação de proteína	26
3.5.8.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).....	26
3.5.8.4 Coloração para proteínas com Coomassie Blue R	27
3.5.8.5 Detecção imunológica.....	27
3.5.8.6 Anticorpo anti-PacC utilizado nos experimentos de <i>Western blotting</i>	28
3.5.9 Marcação de sondas de ácidos nucleicos com radioisótopos	28
3.5.10 Marcação de sondas não radioativa	28

3.5.10.1 Detecção do sinal.....	29
3.5.11 Obtenção de células competentes para <i>Heat-shock</i>	30
3.5.11.1 Transformação de células competentes por <i>Heat-shock</i>	30
3.5.12 Obtenção de células competentes para eletroporação.....	31
3.5.12.1 Transformação de células competentes por eletroporação	31
3.5.13 Nocaute do gene <i>pacC</i> de <i>T. rubrum</i>	31
3.6 Teste de patogenicidade <i>in vitro</i>	33
3.7 Atividade queratinolítica	33
3.8 Biblioteca Subtrativa SSH (<i>Suppression Sbtractive Hybridization</i>)	34
3.8.1 Condições de cultivo da linhagem H6 para construção da SSH	34
3.8.2 Extração de RNA total utilizado na construção SSH	34
3.8.3 Construção da biblioteca de subtração de cDNAs (SSH)	35
3.8.4 Síntese de cDNAs	36
3.8.5 Purificação dos cDNAs	38
3.8.6 Digestão com <i>Rsa</i> I	39
3.8.7 Ligação dos adaptadores.....	39
3.8.8 Primeira e segunda hibridização.....	40
3.8.9 Amplificação por PCR	41
3.8.10 Clonagem dos fragmentos de cDNA da biblioteca de subtração.....	42
3.8.11 Transformação por <i>Heat-shock</i>	43
3.8.12 Validação do processo de subtração.....	43
3.8.12.1 Construção de macroarranjos de DNA e <i>Reverse Northern blotting</i>	43
3.8.12.2 Amplificação dos clones por PCR.....	43
3.8.12.3 Preparo das membranas com 96 amostras	44
3.8.12.4 Preparo das sondas de cDNA e marcação a frio.....	44
3.8.12.5 Hibridização e lavagem das membranas.....	44
3.8.12.6 Preparação das sondas para marcação radioativa.....	45
3.8.12.7 Hibridização e lavagem das membranas marcadas radioativamente.....	45
3.8.12.8 Extração de DNA plasmidial em microplaca	45
3.8.12.9 Sequenciamento de DNA dos clones selecionados como diferencialmente expressos.....	46
3.8.13 Análises por Bioinformática.....	47
3.8.14 Confirmação dos genes diferencialmente expressos	48
4. RESULTADOS	50
4.1 Caracterização do gene <i>pacC</i> de <i>T. rubrum</i>	50
4.1.1 Alinhamento da proteína PacC	50

4.1.2 Expressão do gene <i>pacC</i> de <i>T. rubrum</i>	51
4.1.3 Linhagem mutante <i>pacC-1</i>	52
4.1.4 Análises de <i>Western blotting</i>	54
4.1.5 Efeito da inativação do gene <i>pacC</i> em <i>T. rubrum</i>	55
4.1.5.1 Teste de patogenicidade <i>in vitro</i>	55
4.1.6 Determinação da atividade queratinolítica	59
4.1.7 Identificação de genes preferencialmente expressos em resposta a condições ácidas	60
4.1.7.1 Identificação de clones diferencialmente expressos pelo <i>T. rubrum</i> após exposição de 30 minutos em pH 5,0	62
4.1.7.2 Sequenciamento dos clones validados por <i>reverse Northern blotting</i> e análises por Bioinformática	64
4.1.7.3 Validação dos genes diferencialmente expressos por <i>Northern blotting</i>	67
4.1.7.4 Rastreamento de clones diferencialmente expressos pelo <i>T. rubrum</i> após 1 hora em pH 5,0	69
4.1.7.5 Sequenciamento dos clones e análise por bioinformática	71
4.1.7.6 Validação da expressão dos genes diferencialmente expressos por <i>Northern blotting</i>	79
5. DISCUSSÃO	81
6. CONCLUSÕES	96
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
ANEXOS	107

RESUMO

Dermatofitoses são comumente causadas por fungos que parasitam pele e unha de humanos, cuja propagação depende do contato entre os hospedeiros infectados e não infectados. Muitos fatores contribuem para a patogenicidade dos dermatófitos, dentre eles, a capacidade de se instalar no ambiente ácido da pele se reveste de importância. Sendo assim, para ser bem sucedido, o dermatófito precisa ter capacidade aderente, germinação e penetração rápida das hifas e, portanto, dispor de uma maquinaria metabólica que atue de forma eficiente em pH ácido. A fim de identificar genes supostamente expressos nos passos iniciais da infecção, submetemos a linhagem H6 do dermatófito *T. rubrum* ao pH ácido por 30 minutos e 1 hora e isolamos dessas condições experimentais os transcritos com elevada expressão, empregando a metodologia de Biblioteca Subtrativa Supressiva (SSH). Obtivemos um total de 234 unigenes cujos transcritos revelaram ampla diversidade funcional. Esses transcritos estão envolvidos em 13 processos celulares diferentes, tais como, metabolismo, defesa e virulência, síntese de proteínas e transporte celular. Desses, confirmamos por *Northern blotting*, os genes que expressam as proteínas carboxipeptidase S1, acetoamidase, aconitase, dessaturase, a proteína TINA, transportador de aminoácidos, fator de alongamento alfa 1, proteína ribossomal L10, e uma proteína hipotética. Nesses experimentos também foi utilizada a linhagem de *T. rubrum pacC-1*, que tem o seu gene *pacC* rompido, com o objetivo de verificar se estes genes isolados seriam regulados pela proteína PacC. O gene *pacC* codifica uma proteína homóloga ao regulador transcricional PacC/Rim101p da conservada via de sinalização do pH. Verificamos que o gene *pacC* se expressa preferencialmente em pH 8.0 e que embora o padrão de processamento da proteína PacC seja dependente do pH a forma íntegra da proteína PacC foi identificada tanto em pH ácido como alcalino. Por outro lado, o mutante *pacC-1* apresentou diminuída capacidade infectiva em fragmentos de unha humana quando comparado com a linhagem selvagem. Além disto, a atividade queratínolítica do mutante também se mostrou diminuída quando comparada ao controle, confirmando o papel da proteína PacC na capacidade infectiva do *T. rubrum*.

ABSTRACT

Dermatophytosis is commonly caused by fungi that parasite human skin and nail, whose propagation depends on the contact between infected and non-infected hosts. Many factors contribute to the pathogenicity of the dermatophytes. Among them, the capacity to install in the skin's acid ambient bears great importance. Thus, in order to be successful, the dermatophyte needs to have adhering capacity, fast germination and penetration of hyphae and, therefore, needs to afford a metabolic machinery which acts efficiently in acid pH. In order to identify genes supposedly expressed in the initial steps of infection, we submitted the strain H6 of the dermatophyte *T. rubrum* to the acid pH for 30 minutes and 1 hour and isolated, from this experimental conditions, the transcripts with high expression, employing the suppression subtractive hybridization (SSH). We obtained a total of 234 unigenes whose transcripts revealed a wide functional diversity. These transcripts are involved in 13 different cell processes, such as metabolism, defense and virulence, protein synthesis and cell transport. Among these, we confirmed through *Northern blotting* the genes which express the proteins carboxipeptidase S1, acetamidase, aconitase, fatty acid desaturase, NIMA interactive protein (TINA), amino acid permease, elongation factor 1-alpha, 60S ribosomal protein L10 and a hypothetical protein. In these experiments, we also used the *T. rubrum pacC-1* strain, which has its *pacC* gene disrupted, aiming at verifying whether these isolated genes would be regulated by the PacC protein. The *pacC* gene encodes a protein homologous to the PacC/Rim101p transcriptional regulator of the conserved route of pH signaling. We verified that the *pacC* gene is expressed preferentially in both pH, and that although the processing pattern of the PacC protein is dependent on the pH, the full form of the PacC was identified as alkaline. On the other hand, the *pacC-1* mutant presented diminished infecting capacity in human nail fragments when compared to the wild strain. Moreover, the keratinolytic activity of the mutant also seemed diminished when compared to the control, confirming the role of the PacC protein in the infecting capacity of *T. rubrum*.

INTRODUÇÃO

1. Introdução

Os fungos devido as suas características morfológicas e fisiológicas são importantes instrumentos da biotecnologia. A habilidade de secretar enzimas, antibióticos e outros produtos de interesse comercial torna-os atrativos para serem estudados. Entre as estimadas 1,5 milhão de espécies de fungos, 70.000 foram identificadas e cerca de 300 são classificadas como patógenos humanos, animais e vegetais (Odom, 1993; Hawksworth e Rossman, 1997). Dentre os fungos patogênicos, os dermatófitos representam um total de 34 espécies, sendo 19 conhecidos como patógenos humanos. Eles são classificados em três gêneros de acordo com a formação e morfologia de seus conídeos (estruturas de reprodução assexuada), *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton* (Emons, 1934), e divididos em espécies zoofílicas, geofílicas ou antropofílicas, de acordo com seu habitat primário (animais, solo ou humanos, respectivamente). Assim, dermatófitos antropofílicos são associados com humanos e raramente infectam animais; os zoofílicos usualmente infectam animais, mas ocasionalmente humanos; os geofílicos utilizam substratos queratinosos como cabelo, penas, chifres, que estão em processo de decomposição.

Os dermatófitos são queratinofílicos, ou seja, utilizam substratos queratinizados como fonte de carbono, nitrogênio e enxofre, e são especializados na infecção de unha, cabelo e pele, causando *tinea pedis*, *tinea corporis* e *tinea unguium* (Gupta & Summerbell, 2000). A tínea é consequência da reação do hospedeiro às enzimas liberadas pelo fungo durante o processo de digestão dos tecidos queratinizados para a obtenção de nutrientes. A propagação das dermatofitoses depende do contato direto ou indireto entre os hospedeiros infectados e não infectados (Weitzman & Summerbell, 1995). Entretanto, os dermatófitos também atuam de modo invasivo e são responsáveis pelo aumento da mortalidade de pacientes imunodeprimidos. Além disso, esses microrganismos infectam milhares de indivíduos anualmente, em diferentes regiões do planeta. Nos Estados Unidos, por exemplo, isto acarreta um impacto econômico no sistema de saúde que excede 400 milhões de dólares por ano, somente em tratamentos (Drake *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1998). Desse modo, estes fungos são importantes objetos de

estudo, uma vez que a compreensão dos mecanismos regulatórios envolvidos na capacidade de infecção dos dermatófitos em humanos é crucial para o entendimento da patogenicidade desses fungos.

1.1 *Trichophyton rubrum*

Trichophyton rubrum foi inicialmente isolado por Castellani em 1910, um período em que todos os principais dermatófitos já haviam sido identificados. No século dezenove sugeriu-se o envolvimento desses fungos como possíveis agentes causadores da forma crônica de *tinea corporis*. A partir de então, difundiu-se pelo mundo como o agente etiológico de onicomicoses (Rippon, 1988). Evidências genéticas sugerem que a origem deste dermatófito tenha sido na África (Padhye e Summerbell, 2005) e por meio de imigrantes africanos foi disseminado para a Europa e em outros continentes (Brash e Graser, 2005). A utilização de marcadores moleculares, como microssatélites, identificou quatro alelos polimórficos em diferentes linhagens de *T. rubrum* e *Trichophyton violaceum*, outro dermatófito antropofílico. Este estudo comparativo enfatiza a origem do *T. rubrum* no continente africano e que *T. violaceum* mais tarde migrou para a Ásia, onde é o fungo predominante hoje em dia (Hay, 2006). Estes estudos salientam a idéia de que *T. rubrum* seja a espécie ancestral dos outros dermatófitos devido às semelhanças genéticas (Ohst *et al.*, 2004).

T. rubrum é um fungo filamentoso, patogênico, antropofílico, reconhecidamente cosmopolita, e o mais prevalente entre as micoses, causando *tinea corporis*, *tinea pedis* e *tinea unguium* (Gupta & Summerbell, 2000). Este patógeno vem causando infecções em regiões não usuais do corpo (Pielop e Rosen, 2001) e atuando de modo invasivo, principalmente em indivíduos com o sistema imune comprometido (Grosman *et al.*, 1995). Apesar da importância deste dermatófito, principalmente por sua alta incidência, pouco se sabe sobre sua biologia, devido ao fato deste fungo não apresentar ciclos sexual e parassexual descritos. Este organismo pertence ao Reino fungi; divisão Ascomycota; Subdivisão Pezizomycotina; Classe Eurotiomycetes; Ordem Onygenales; Família Arthrodermataceae; Subfamília mitosporic Arthrodermataceae; Gênero *Trichophyton*; Espécie *Trichophyton rubrum*.

Este fungo apresenta colônias brancas, de aspecto macio, fenotipicamente variável quanto à coloração vermelha do reverso da colônia e

ao grau de susceptibilidade à antimicóticos. Os macroconídeos são escassos ou abundantes, variáveis em tamanho e de forma cilíndrica. Os microconídeos se apresentam piriformes ou em forma de chave (Fachin *et al.*, 1996; Graser *et al.*, 2000). No ambiente, *T. rubrum* pode sobreviver (sem propagação) por até 18 meses na forma de artroconídeo (Baer *et al.*, 1955).

Recentemente, a estratégia para se obter informações sobre os vários aspectos da biologia desse fungo, envolve estudos de expressão gênica como a construção e sequenciamento de bibliotecas de cDNA. O sequenciamento e categorização de 11.085 ESTs de *T. rubrum* revelaram genes envolvidos em diferentes processos celulares, permitindo assim um maior conhecimento das atividades fisiológicas referentes ao metabolismo, transdução de sinal, composição da parede celular, entre outros (Wang *et al.*, 2006). Paião *et al.* (2007) revelaram 39 genes expressos em respostas a antifúngicos, que possibilitou um entendimento melhor dos mecanismos de ação dessas drogas no fungo. Ainda a construção de uma biblioteca subtrativa a partir de cDNAs de *T. rubrum* exposto à queratina, revelou vários genes que possivelmente atuam como fatores de virulência, possibilitando uma melhor compreensão da estratégia de infecção desse dermatófito (Maranhão *et al.*, 2007).

O *T. rubrum* é passível de transformação para estudos genéticos. Fachin *et al.* (2006) realizaram o rompimento do gene *TruMDR2*, que codifica uma proteína de membrana da família dos transportadores ABC, por meio de um sistema desenvolvido pelos autores, utilizando-se um cassete de interrupção contendo o gene de resistência a higromicina, como marcador seletivo. Também utilizando a mesma estratégia o fator de transcrição PacC de *T. rubrum* foi rompido (Ferreira-Nozawa *et al.*, 2006).

1.2 Os dermatófitos na interação com o hospedeiro

Os dermatófitos, como o *T. rubrum*, participam de um seleto grupo de fungos que infectam indivíduos saudáveis. Assim, no processo invasivo, esses organismos precisam sobrepor as respostas de defesa do hospedeiro para o estabelecimento da infecção. A capacidade de aderência dos dermatófitos à superfície celular é o primeiro estágio de invasão desses microrganismos a superfície da pele. A capacidade de aderência e conseqüente habilidade invasiva desses fungos são atribuídas à presença de glicoproteínas contendo

mananas na sua parede celular. Entretanto, para os dermatófitos serem bem sucedidos no processo de instalação no tecido hospedeiro, o artroconídeo deve germinar e a hifa penetrar na pele rapidamente, para que o fungo não seja eliminado devido à contínua descamação do epitélio (Ogawa *et al.*, 1998).

Uma vez aderido, os dermatófitos buscam nutrientes para o crescimento. Assim, o uso de macromoléculas como fonte de carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre, uma resposta adaptativa bem conhecida em fungos modelos, esta fundamentada na expressão de permeases, proteínas estruturais e enzimas da parede celular, além da secreção de enzimas hidrolíticas como proteases não específicas, queratinases, lipases, nucleases, fosfatases, fosfolipases, elastase, sialidase e enzimas mucinolíticas (Caddick *et al.*, 1986a; Meunier e Grimont, 1993; Ferreira-Nozawa *et al.*, 2003; Martinez-Rossi *et al.*, 2004; Ferreira-Nozawa *et al.*, 2006). Esta maquinaria metabólica permite o uso, dentro de um amplo espectro de pH ambiente, de proteínas solúveis, substratos queratinosos, ácidos nucleicos, lipídeos e mucinas como fonte de nutrientes essenciais para a completa instalação e manutenção do dermatófito no hospedeiro.

Os dermatófitos proliferam de forma logarítmica nas fases iniciais da infecção, produzindo enzimas proteolíticas não específicas e queratinases com atividade ótima em pH ácido (Tsuboi *et al.*, 1989; Hay, 2006), provavelmente porque a pele humana tem pH ácido (Cutler, 1991). Assim, Tsuboi *et al.* (1989) relataram, que proteases com ótimo de atividade em pH ácido são importantes fatores de virulência para os dermatófitos, e atuam nos substratos queratinizados e não queratinizados liberando peptídeos, os quais são hidrolizados a aminoácidos por peptidases. Os aminoácidos liberados neste processo podem reprimir a síntese de proteases não específicas e induzir a síntese de queratinases com ótimo de atividade em pH alcalino (Apodaca e Mckerrow, 1989). Porém, a utilização pelo fungo de alguns aminoácidos que geram acetyl CoA citoplasmático, promove a alcalinização do meio (Thedei *et al.*, 1994), um ambiente no qual a maioria das proteases queratinolíticas conhecidas tem atividade enzimática ótima (Brouta *et al.*, 2001). A partir desses resultados Martinez-Rossi *et al.* (2004) propuseram um modelo de instalação e manutenção da infecção por dermatófitos, considerando a secreção de enzimas proteolíticas específicas em função do monitoramento do pH

ambiente. Dessa forma, o conhecimento das repostas metabólicas que governam o pH homeostático e o sensoriamento do pH ambiente é importante para o entendimento dos mecanismos envolvidos na instalação, desenvolvimento e sobrevivência dos dermatófitos em humanos (Figura 1).

Figura 1. Modelo proposto para a regulação de enzimas proteolíticas pelo pH, secretadas pelos dermatófitos. O monitoramento do pH ácido da pele nos estágios iniciais da infecção acarreta a desrepressão (+) de proteases e queratinases com atividade ótima em pH ácido, e a repressão (-) de queratinases com atividade ótima em pH alcalino, liberando polipeptídeos. A clivagem destes polipeptídeos em aminoácidos, provavelmente por peptidases, suprirá o dermatófito com fontes de carbono, nitrogênio e enxofre. A utilização de alguns aminoácidos, como glicina, produzirá acetil CoA citoplasmático, induzindo a alcalinização do meio e consequente repressão (-) das proteases e queratinases com atividade ótima em pH ácido, e desrepressão das queratinases com atividade ótima em pH alcalino. A desrepressão das enzimas proteolíticas com atividade ótima em pH alcalino ocasionará a infecção e sua manutenção no tecido hospedeiro (Martinez-Rossi *et al.*, 2004).

1.3 Regulação gênica em resposta ao pH ambiente

As respostas adaptativas em função do pH ambiente afetam o crescimento, fisiologia, diferenciação e a capacidade de infecção de todos os organismos, incluindo os fungos dermatófitos (Martinez-Rossi *et al.*, 2004). A primeira descrição da regulação pelo pH foi realizada por Nahas *et al.* (1982), quando os autores observaram que a secreção, mas não a síntese, das fosfatases ácida e alcalina Pi-repressíveis pelo fungo *Neurospora crassa* eram dependentes do pH do meio de cultivo, ou seja, as fosfatases ácida e alcalina eram preferencialmente secretadas em meios ácido e alcalino, respectivamente.

Caddick *et al.* (1986) descreveram os primeiros genes envolvidos no sensoramento do pH ambiente em *Aspergillus nidulans*. A resposta ao pH é mediada por uma via metabólica constituída por pelo menos sete genes, o gene *pacC* que expressa o fator de transcrição PacC e os genes de sinalização *palA*, B, C, F, H e I (Orejas *et al.*, 1995; Tilburn *et al.*, 1995; Maccheroni Jr. *et al.*, 1997; Denison, 2000). Foi descrito que mutações nos genes *pal* (A, B, etc.) aumentam os níveis de fosfatase ácida e diminuem os de fosfatase alcalina quando o pH extracelular é neutro. Em contraposição, mutações no gene *pacC* diminuem os níveis de fosfatase ácida e aumentam os de fosfatase alcalina nestas mesmas condições de cultivo (Caddick *et al.*, 1986a, 1986b; Arst *et al.*, 1994; Tilburn *et al.*, 1995; Denison, 2000). O gene *pacC* expressa um fator de transcrição do tipo *Zinc Finger* (Tilburn *et al.*, 1995). A proteína PacC é descrita como um ativador de transcrição de genes alcalino-específicos e uma repressora da transcrição de genes ácido-específicos, modulado por um sinal gerado pelos genes *pal*, em resposta ao pH alcalino extracelular. Assim, em pH alcalino, ocorre a expressão elevada de genes cujos produtos têm atividade ótima no pH alcalino e repressão de genes que codificam proteínas com atividade ótima em pH ácido (Figura 2). Portanto, *pacC* é um gene alcalino (expressado em pH alcalino), submetido à ativação transcricional autógena, a qual amplifica o sinal externo de pH alcalino (Tilburn *et al.*, 1995). Nessas condições, a proteína PacC sofre um processamento proteolítico, originando uma forma curta e funcional que ativa a expressão dos genes alcalinos e reprime a expressão de genes ácidos. Esse processo proteolítico e PacC é pH-dependente na regulação da expressão gênica pelo pH alcalino. A proteína

PacC íntegra é mantida inativa em pH ácido por interações intramoleculares com a extremidade C-terminal. Em pH extracelular alcalino os produtos dos genes *pal* (A, etc), componentes da via de transdução do sinal de pH externo, introduz uma modificação estrutural que quebra a interação intramolecular e expõe uma região da proteína à proteólise da extremidade C-terminal. Proteólise converte PacC à uma forma ativa, capaz de ativar a transcrição de genes alcalinos e reprimir a transcrição de genes ácidos (Orejas *et al.*, 1995) (Figura 3A).

Figura 2. Representação esquemática do modelo formal de regulação pelo pH em *A. nidulans*. A proteína PacC ativa positivamente genes cujos produtos agem em pH alcalino (genes alcalinos) e reprime genes expressos cujos produtos tem atividade em pH ácido (genes ácidos). Em condições ácidas de crescimento, PacC é inativo e não existe repressão dos genes ácidos. A transdução do sinal alcalino realizada pelos genes *pal* ativa o fator de transcrição PacC, que reduz a transcrição dos genes ácidos em ambiente alcalino e aumenta a expressão dos genes alcalinos (Arst e Penalva, 2003).

Assim, os produtos dos seis genes, *palA*, *palB*, *palC*, *palF*, *palH* e *pall*, transmitem o sinal de pH externo alcalino para a proteína PacC. As proteínas, PalH e Pall contêm em suas estruturas, respectivamente, sete e quatro prováveis domínios transmembrana e devem ser os sensores do pH ambiente (Denison *et al.*, 1998; Negrete-Urtasun *et al.*, 1999; Arst e Penalva., 2003). A proteína PalA reconhece uma curta sequência de aminoácidos YPXL/I e PacC contém dois desses motivos delimitando o sítio de sinalização para clivagem da protease (Vicent *et al.*, 2003), necessários para a sinalização da clivagem de PacC. Em adição, PalA interage com a proteína VPS32, uma proteína endocitótica da classe E, componente do complexo multiproteico ESCRT (Vicent *et al.*, 2003). Estudos em *Saccharomyces cerevisiae*, indicam que VPS32 atua na sinalização do pH ambiente (Xu W e Mitchell, 2001). PalB é uma calpaína da família das cisteínas proteases, e seria o responsável pelo sinal de reconhecimento de proteólise e portanto da remoção de 180 resíduos da porção C-terminal da proteína PacC. Entretanto, PalB também interage com VPS32 (Ito *et al.*, 2001), formando um complexo com a proteína PalA, exercendo a proteólise sobre PacC. Os papéis de PalC e PalF ainda não estão totalmente esclarecidos (Figura 3B).

Diante da complexidade desse mecanismo molecular, muitas questões básicas ainda permanecem não esclarecidas, como a singularidade do processamento da proteína PacC em pH ambiente alcalino, e o papel transcricional de PacC em ambiente de pH ácido, a ocorrência de processamento em condições ácidas, e o envolvimento de outros genes nas respostas ao pH extracelular.

Em *C. albicans*, a proteína Rim101p, homóloga a proteína PacC de *A. nidulans*, é fundamental para a filamentação e virulência deste organismo (Ramon *et al.*, 1999; Davis *et al.*, 2000; El Barkani *et al.*, 2000). Neste patógeno, esta proteína sofre processamento tanto em pH ácido como em pH alcalino, e a proteólise depende da proteína Rim13p (homóloga a PalB de *A. nidulans*). Em pH alcalino uma versão proteolisada de 74 kDa governa mudanças específicas na expressão gênica. A forma de 65 kDa é funcional e exclusiva do pH ácido. Essas duas versões são proteolisadas a partir da proteína integra que apresenta o tamanho de 85 kDa (Li *et al.*, 2004).

Figura 3. (A) Modelo molecular de ativação do fator de transcrição PacC em resposta ao pH ambiente alcalino em *A. nidulans*. PacC⁷² é o produto primário da tradução contendo 674 aminoácidos e resistente ao processamento devido às interações moleculares. Em ambiente alcalino ocorre a sinalização dos genes *pal* (inclusive PalB) ocorrendo a remoção de 180 aa da região C-terminal através da sinalização de proteólise, o que resulta no produto PacC⁵³, que sofre o processamento pela protease originando a forma ativa PacC²⁷. (B) Modelo hipotético da via de transdução de sinal em resposta ao pH ambiente. PalH e Pall são os sensores na membrana plasmática que transmitem o sinal no lado citosólico da membrana através do endossomo para o complexo multiproteico ESCRT III o qual Vps 32 serve como suporte e interage com PalA e PalB. Assim, ocorre a clivagem do PacC⁷² realizada por PalB (triângulo azul), originando PacC⁵³ (Peñalva e Arst, 2004).

Além disso, o consenso de auto-regulação (GCCARG) pode não ser o único existente na interação do fator de transcrição PacC. Também em *C. albicans*, a proteína Rim101p tem uma fraca ligação ao consenso (GCCARG), reconhecendo especificamente uma outra região consenso 5'CCAAGAAA 3' na sequência promotora do gene PHR1 (gene alcalino). Este resultado, demonstra que Rim101p tem outro sítio de reconhecimento diferente do proposto para PacC em *A. nidulans* e que ambos são necessários para a funcionalidade da proteína (Ramon e Fonzi, 2003).

Em *Neurospora crassa*, uma das respostas metabólicas em função do pH é a glicosilação de enzimas secretadas pH-dependente (Palma *et al.*, 1989). Por exemplo, a fosfatase alcalina Pi-repressível codificada pelo gene *pho-2* e sintetizada em pH alcalino difere da enzima sintetizada em pH ácido somente nos níveis de glicosilação, evidenciando a participação de glicosilações na resposta adaptativa ao pH (Nozawa *et al.*, 2002, 2003a). Além disso, Nozawa *et al.* (2003b) demonstraram em *A. nidulans* a participação da calpaína PalB nas glicosilações pós-traducionais da fosfatase ácida Pi-repressível quando o fungo é cultivado em pH 5,0. Análises de DDRT-PCR mostraram a presença de genes diferencialmente expressos na linhagem selvagem e ausentes no mutante *paB7*, com similaridade com uma manosil transferase e uma NADH-Ubiquinona oxidoredutase. Estes resultados mostram a funcionalidade desta calpaína em pH ácido.

A primeira descrição da ativação da transcrição de genes “alcalinos” pela proteína PacC foi demonstrada experimentalmente para os genes que participam da síntese e secreção de penicilina em *A. nidulans* (Tilburn *et al.*, 1995). Este composto é sintetizado em pH preferencialmente alcalino envolvendo 3 enzimas, codificadas pelos genes *ipnA*, *acyA* e *acvA*. Foi demonstrado que os genes *ipnA*, *ptrA* (protease alcalina) e *pacA* (fosfatase ácida Pi-repressível) respondem às variações do pH extracelular (Espeso *et al.*, 1993; Tilburn *et al.*, 1995; Arst and Peñalva, 2003), e que os genes *ipnA* e *ptrA* possuem nas respectivas regiões promotoras uma sequência de nucleotídeos consenso (GCCARG) reconhecida pela proteína PacC.

Em *A. giganteus*, o gene *afp* que codifica a proteína AFP (*antifungal protein*) (Olson e Goerner, 1965) apresenta elevada expressão em pH alcalino. Na sua região promotora existe duas sequências (GCCARG), afP1 e afP2, provavelmente reconhecidas pela proteína PacC, sugerindo que a transcrição

do gene *afp* está sob o controle de PacC em condições alcalinas (Meyer e Stahl, 2002). Entretanto, Meyer *et al.* (2005) evidenciaram que a elevada expressão do gene *afp* não é mediada pela ativação transcricional de PacC, pois o acúmulo do RNAm de *afp* não reflete o mesmo perfil de expressão do gene *pacC* de *A. giganteus* durante o cultivo sob diferentes condições de pH ambiente. Além disso, mutações pontuais nas seqüências promotoras apP1 e afpP2 não anulam a expressão do gene *afp* em pH alcalino.

Em *S. cerevisiae*, foram identificados 71 genes responsivos ao pH alcalino distribuídos nas seguintes categorias: obtenção de fosfato, captação de cobre e ferro, proteínas secretadas ou componentes da parede e membrana celular, vacúolo, fatores de transcrição, transportadores, biossíntese e metabolismo, resposta a estresse, entre outros (Lamb *et al.*, 2001).

No patógeno humano *C. albicans*, análises por microarrays revelaram 514 genes responsivos ao pH. Desses, vários genes envolvidos na aquisição de ferro são induzidos em pH alcalino, sendo que alguns desses genes são regulados pela proteína Rim101p. O fator de transcrição Rim101p governa a expressão de aproximadamente 70 genes que não são regulados pelo pH (Bensen *et al.*, 2004).

Embora essa via de regulação pelo pH tenha sido identificada em vários fungos, entre os dermatófitos somente em *T. rubrum* o gene *pacC* foi isolado, clonado e seqüenciado apresentando um comprimento de 2.432 pb interrompido por 2 introns. O gene *pacC* foi nocauteado, originando a linhagem mutante *pacC-1*, o que possibilitou sua caracterização funcional. Foi possível verificar que a proteína PacC de alguma forma participa na secreção de queratinases (Ferreira-Nozawa *et al.*, 2006).

A habilidade de adaptação dos fungos em relação às mudanças do pH extracelular é importante para a colonização e a sobrevivência. A secreção de algumas enzimas é fundamental na instalação e permanência de dermatófitos, como o *T. rubrum*, no hospedeiro. O conhecimento dos mecanismos que governam o sensoramento do pH ambiente pode elucidar a estratégia utilizada pelo fungo no estabelecimento e manutenção da infecção. Assim, a utilização da genômica funcional no estudo da expressão gênica em diferentes espectros de pH é fundamental para o entendimento molecular das respostas adaptativas de *T. rubrum*.

OBJETIVOS

2. Objetivos

Tendo em vista a importância do monitoramento do pH ambiente pelo dermatófito *T. rubrum* para a sua instalação no hospedeiro, o presente trabalho teve como objetivo identificar genes que se expressam preferencialmente em pH ácido, uma condição encontrada na pele humana. Pretendeu-se também verificar se a alguns desses genes são regulados pelo fator de transcrição PacC, uma proteína envolvida na resposta adaptativa ao pH em vários fungos. Além disto, a funcionalidade do gene *pacC* foi investigada para auxiliar no entendimento do seu papel em *T. rubrum*.

Para tanto os principais objetivos específicos deste trabalho foram os seguintes:

- ❖ Utilizar a metodologia de Biblioteca Subtrativa Supressiva para isolar, clonar, identificar e sequenciar transcritos de *T. rubrum* que sejam diferencialmente expressos em pH ácido.
- ❖ Verificar, através de *Northern blotting*, se genes diferencialmente expressos em pH ácido sofrem influência do gene *pacC*, utilizando-se como referência a linhagem mutante *pacC-1* de *T. rubrum*.
- ❖ Verificar a expressão do gene *pacC* e o processamento da proteína PacC em função do pH ambiente.
- ❖ Determinar se a atividade queratinolítica de *T. rubrum* depende da proteína PacC, comparando a linhagem selvagem e o mutante *pacC-1*.
- ❖ Realizar testes de patogenicidade *in vitro*, utilizando fragmentos de unha humana.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. Materiais e Métodos

3.1. Linhagens

3.1.2 Linhagem de *Trichophyton rubrum*

A linhagem H6 de *Trichophyton rubrum* (ATCC MYA 3108) foi isolada de um paciente do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, do sexo feminino, portador de *tinea pedis*. Esta linhagem foi identificada segundo McGinnis (1980) e gentilmente cedida pela Prof^a. Dr^a. Cláudia M. Leite Maffei, responsável pelo setor de Micologia do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP. As características morfológicas desta linhagem são: colônia branca de aspecto cottonoso e incorporado, o reverso da colônia não apresenta pigmentação e os conídios são claviformes. A linhagem mutante *pacC-1* foi originada a partir do isolado clínico H6 e possui o gene *pacC* de *T. rubrum* nocauteado, como estabelecido por Ferreira-Nozawa, 2003.

3.1.3 Cepas bacterianas

Para a realização dos experimentos de expressão e transformação foram utilizadas as seguintes cepas de *Escherichia coli*: DH5 α F⁻ e MosBlue. O genótipo de cada cepa se encontra na tabela 1.

Tabela 1. Cepas de *E. coli* e seus respectivos genótipos.

Cepa bacteriana	Genótipo
DH5 α F ⁻	<i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> , (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15), <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi1</i> , <i>relA1</i>
MosBlue	<i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (_{r_{k12}-m_{k12}}) <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F' <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ , <i>lacI</i> ^q <i>Z</i> Δ M15: Tn10(Tc ^R)]

3.1.4 Suspensão de conídios de *T. rubrum*

A superfície micelial de colônias da linhagem H6 e mutante *pacC-1*, cultivadas por 15 dias em meio ágar-Sabouraud, foi removida com o auxílio de uma espátula estéril e misturadas a 10 mL de solução salina 0,9% (m/v). A suspensão foi agitada vigorosamente para desagregar a massa de conídios e filtrada em lã de vidro, centrifugada e ressuspensa em 5 mL de solução salina

0,9% (m/v). A seguir o número de conídios desta suspensão foi estimado através de hematímetro.

3.2 Meios de cultura

3.2.1 Meio mínimo (Cove, 1966)

Solução de sais	20 mL
-----------------	-------

Água destilada q.s.p.	1000 mL
-----------------------	---------

O meio mínimo foi suplementado com glicose (55 mM) e nitrato de sódio (70 mM) e o pH foi ajustado em 6,8, tamponado com 50 mM de ácido cítrico (pH 5,0) ou tamponado com 50 mM de Tris-HCl (pH 8,0).

3.2.2 Solução de sais (Cove, 1966)

Fosfato de potássio monobásico	76 g
--------------------------------	------

Cloreto de potássio	26 g
---------------------	------

Sulfato de magnésio heptahidratado	26 g
------------------------------------	------

Solução de elementos-traço	50 mL
----------------------------	-------

Água destilada esterilizada q.s.p.	1000 mL
------------------------------------	---------

Nos experimentos onde a concentração de fosfato foi de 2 mM ou 200 µM, o fosfato foi omitido desta solução, sendo acrescentado separadamente.

3.2.3 Solução de elementos-traço

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 dihidratado	800 mg
--------------------------------	--------

Sulfato de zinco heptahidratado	2 mg
---------------------------------	------

Água destilada esterilizada q.s.p.	250 mL
------------------------------------	--------

3.2.4 Meio Ágar-Sabouraud (Atlas, 1993)

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

O pH do meio foi ajustado em 5,7. O meio foi autoclavado a 1 atm e 120°C por 20 minutos. Para meio sólido, adicionou-se ágar 1,5% (m/v).

3.2.5 Meio LB

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

O pH do meio foi ajustado em 7,4 e autoclavado a 1 atm e 120°C por 20 minutos. Para meio sólido, adicionou-se ágar 1,5% (m/v) ao meio antes da autoclavagem.

3.2.6 Meio SOB

Triptona	20 g
Extrato de levedura	5 g
Cloreto de sódio	0,5 g
Água destilada q.s.p	1000 mL

O pH do meio foi ajustado em 7,0 e autoclavado.

3.2.7 Solução de casaminoácidos

Caseína hidrolisada	20 g
Água destilada esterilizada q.s.p	100 mL

3.3 Soluções para experimentos de biologia molecular

3.3.1 Solução de hibridização e pré-hibridização (*Southern blotting*)

SSC 20X (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	7,5 mL
EDTA 1 M	0,5 mL
Denhardt's 50X	2,5 mL
SDS 10% (m/v)	1,25 mL
Pirofosfato de sódio 10% (m/v)	0,5 mL
Água destilada	7,75 mL

3.3.2 Denhardt's (50X)

Ficoll	5 g
Polivinilpirrolidona	5 g
BSA (fração V, Sigma)	5 g
Água destilada q.s.p.	500 mL

3.3.3 Solução de hibridização e pré-hibridização (*Northern blotting*)

Dextran 10% (m/v) em formamida	5 mL
Fosfato de sódio monobásico 2 M, pH 6,5	125 µL
Solução de hibridação 2X (SSC 12X, Denhardt's 10X e 200 µg de esperma de salmão denaturado)	5mL

3.3.4 Solução de Church para hibridização e pré-hibridização (*Northern blotting*)

EDTA 0,5 M	1 mL
Ácido fosfórico 85%	1 mL
Fosfato de sódio monobásico	17,75 g
SDS (dodecil sulfato de sódio)	35 g
Caseína hidrolisada	5 g
Água destilada (q.s.p)	500 mL

3.3.5 Solução I de lavagem (*Northern blotting*)

SSC	2X
SDS	0,1%

3.3.6 Solução II de lavagem (*Northern blotting*)

SSC	0,1X
SDS	0,5%

3.3.7 Solução I (Para extração de DNA plasmidial)

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

O pH foi ajustado em 8,0 e a solução foi autoclavada e estocada a 4° C.

3.3.8 Solução II (Para extração de DNA plasmidial)

SDS	1% (m/v)
Hidróxido de sódio	0,2 M

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

3.3.9 Solução III (Para extração de DNA plasmidial)

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

3.3.10 Solução Desnaturante (Para tratamento de gel de agarose e membranas)

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

3.3.11 Solução Neutralizante (Para tratamento de gel de agarose e membranas)

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

3.3.12 Solução de Lavagem I (Southern blotting)

EDTA pH 8,0	1 mM
SDS	5%
Tampão Fosfato de Sódio pH 7,5	40 mM

3.3.13 Solução de Lavagem II (Southern blotting)

SDS	0,1%
Tampão Fosfato de Sódio pH 7,5	40 mM

3.3.14 SSC 20X (Para tratamento de gel de agarose e membranas)

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

O pH foi ajustado para 7,0.

3.3.15 Solução de IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside)

A solução estoque de IPTG consistiu em dissolver IPTG na concentração de 1 M em água destilada e esterilizada. A solução foi aliquotada e mantida a -20° C.

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

A solução estoque de X-gal consistiu em dissolver 20 mg deste composto em 1 mL de N, N-dimetilformamida. Esta solução foi mantida a -20° C sob abrigo da luz.

3.3.17 Ponceau's

Ponceau S (<i>Amersham Biosciences</i>)	0,2 g
Ácido tricloroacético	3 g
Ácido sulfossalicílico	3 g
Água destilada q.s.p	100 mL

3.4 Tampões

3.4.1 Tampão TAE (50X) (Sambrook *et al.*, 1989)

Tris base	242 g
Ácido acético glacial	57,1 mL
EDTA pH 8,0	100 mL
Água destilada q.s.p.	1000 mL

3.4.2 Tampão de migração para RNA (5X)

MOPS pH 7,0	0,1 M
Acetato de sódio	40 mM
EDTA pH 8,0	5mM

3.4.3 Tampão Tris-Glicina

Tris base	3 g
Glicina	14 g
Água destilada q.s.p	1000 mL

3.4.4 Tampão PBS

Cloreto de sódio	8 g
Cloreto de potássio	0,2 g
Fosfato de sódio dibásico	1,4 g
Fosfato de potássio monobásico	0,2 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

3.4.5 TBS (20X)

Tris base	24,2 g
Cloreto de sódio	175,3 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

3.4.6 Tampão TE

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

3.5 Metodologia utilizada nos experimentos de Biologia Molecular e de Bioquímica

3.5.1 Extração de DNA plasmidial (*mini prep*)

Uma colônia de bactéria de interesse foi inoculada em 5 ml de meio LB contendo ampicilina 50 µg/mL e incubada a 37°C por 12-16 horas, sob vigorosa agitação. Após o período de incubação a cultura foi centrifugada a 9.000 x *g* a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e ressuspensionado em 100 µL da solução I gelada. Adicionou-se 200 µL da solução II, misturou-se por inversão, mantendo-se em gelo por 5 minutos. Após este período, adicionou-se 150 µL da solução III gelada, que foi misturada por inversão e a mistura incubada por 3-5 minutos em gelo. A mistura foi centrifugada a 12.000 x *g* por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo, recebeu a adição de RNase (Invitrogen) e foi incubado por 30 minutos a 65°C. Um volume de uma mistura de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) foi adicionado e centrifugado a 12.000 x *g* por 2 minutos para separar as duas fases. O sobrenadante foi precipitado com 2 volumes de etanol e 1/10 do volume de acetato de sódio 3 M, pH 4,5, incubado em banho de gelo por 15 minutos e, em seguida, centrifugado a 12.000 x *g* por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido cuidadosamente e o precipitado foi lavado com etanol 70% (v/v) a 4°C. Posteriormente, o etanol foi removido e o precipitado seco à temperatura ambiente. Em seguida foi dissolvido em TE ou água destilada esterilizada.

3.5.2 Extração de DNA genômico

Após o crescimento das linhagens H6 e mutante *pacC-1* de *T. rubrum* em meio Sabouraud sólido, o micélio foi transferido para 300 mL de meio Sabouraud líquido e cultivado sob agitação (250 rpm) a 28°C por 72 horas. A massa micelial resultante foi filtrada em funil de Büchner, lavada com EDTA 20 mM, pH 8,0 e prensada entre folhas de papel filtro para remoção do excesso de líquido. A extração do DNA genômico foi feita conforme a metodologia descrita por Raeder e Broda (1985). O micélio foi macerado em nitrogênio líquido e, em seguida, homogeneizado com 5 mL de tampão de extração (Tris-HCl 200 mM, pH 8,5 contendo NaCl 250 mM e SDS 0,5% (m/v)) e centrifugado a 13.000 x *g*

a 25°C por 1 hora. O sobrenadante foi coletado e após a adição de 40 µL de RNase (10 mg/ mL) foi mantido a 37°C por 1 hora. Procedeu-se a seguir a extração com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), centrifugando-se por 10 minutos a 13.000 x g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o DNA foi precipitado pela adição de isopropanol (2 volumes), coletado com alça de vidro estéril, lavado com etanol 70% (v/v) e solubilizado em 50 µL de TE.

3.5.3 Extração de bandas de DNA de géis de agarose

A recuperação de bandas a partir de géis de agarose 0,8% (m/v) foi feita utilizando-se o protocolo do kit *GFX Matrix Gel extraction System* (Amersham Biosciences).

3.5.4 Ligação de fragmentos de DNA

Fragmento de DNA	200 ηg
Vetor	50 ηg
Tampão de ligação (fornecido pelo fabricante)	1 µL
Ligase (5 unidades/µL)	1 µL
Água deionizada esterilizada q.s.p.	10 µL

3.5.5 Seqüenciamento

O seqüenciamento automático foi realizado no aparelho ABI Prism 377 (*Applied Biosystems*), utilizando-se o kit *Big Dye Terminator Cycle Sequence Ready Reaction*.

O DNA após quantificação (300-500 ηg), foi utilizado nas reações de seqüenciamento assim constituídas:

DNA	300-500 ηg
Oligonucleotídeo (Universal M-13) <i>forward</i> ou <i>reverse</i> 5,0 pmol	2 µL
Tampão 2,5 X (Tris-HCl 200 mM, pH 9,0, MgCl ₂ 5 mM)	2 µL
Big-dye	2 µL
Água deionizada esterilizada q.s.p	10 µL

Programa de seqüenciamento: 94°C (2 minutos) e 39 ciclos (96°C por 10 segundos, 52°C por 20 segundos e 60°C por 4 minutos).

Precipitação das amostras

Após a ciclagem, as amostras receberam a adição de 80 µL de isopropanol 75% (v/v), foram incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente em câmara escura, centrifugadas por 45 minutos a 4.000 rpm a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e realizaram-se duas lavagens com etanol 70% (v/v) por 10 minutos a 4.000 rpm.

3.5.6 Southern blotting

O gel de agarose com os fragmentos de DNA resolvidos foi incubado em HCl 1 N por 15 minutos, solução desnaturante por 45 minutos, solução neutralizante por 1 hora (2 trocas), segundo Sambrook *et al.*, 1989. O DNA foi transferido para a membrana de *nylon* através do sistema a vácuo (*Vacuum Blotter Amersham Biosciences*) por 1 hora e 30 minutos. Após este período, a membrana foi retirada e o DNA foi fixado por 2 minutos em luz ultravioleta.

3.5.6.1 Hibridização (Southern blotting)

As membranas foram pré-hibridizadas em solução de hibridação (7% SDS e 0,5 M de tampão fosfato de sódio pH 7,5) a 65°C por uma hora. A seguir, foi adicionada a sonda marcada radioativamente (previamente desnaturada) e a hibridização foi realizada com leve agitação a 65°C por 18 horas, na mesma solução. Posteriormente as membranas foram lavadas com solução de lavagem I por 2x 15 minutos e com a solução de lavagem II por 15 minutos, à temperatura ambiente. Após as lavagens, as membranas foram expostas ao filme autorradiográfico.

3.5.7 Northern blotting

3.5.7.1 Cultivo das linhagens utilizadas nos experimentos de *Northern blotting*

Para inóculo dos meios Sabouraud, utilizamos 3 placas da linhagem H6 de *T. rubrum* por erlenmeyer de 750 mL contendo 250 mL do meio de cultura. A linhagem foi cultivada por 72 horas a 28°C. Após este período, o micélio foi filtrado e as hifas lavadas com água deionizada estéril. Para a linhagem *pacC-1* foi realizado o mesmo tratamento apenas adicionado higromicina (450 µg/mL) no meio de cultivo.

As hifas obtidas a partir de cada cultura em meio Sabouraud foram utilizadas como inóculo para 50 mL de meio mínimo (2 mM de fosfato de potásio monobásico, 55 mM de glicose e 70 mM de nitrato de sódio). Utilizou-se meio mínimo pH 5,0 e 8,0 tamponados respectivamente com citrato de sódio 50 mM e Tris-HCl 50 mM. Para cada pH as linhagens foram cultivadas por 30 minutos ou 1 hora. Após este período, as culturas foram filtradas, secas em papel de filtro, congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80° C até o momento da extração de RNA.

3.5.7.2 Extração do RNA total

O RNA foi extraído utilizando o kit *NucleoSpin®* (MACHEREY-NAGEL) conforme instruções do fabricante. Aproximadamente 100 mg de micélio foram macerados em nitrogênio líquido, 350 µL de solução RA1 (contendo tiocianato de guanidina) e 3,5 µL de β-mercaptoetanol foram adicionados e a amostra foi vigorosamente agitada em vortex. O lisado obtido foi filtrado através da coluna *NucleoSpin Filter* e transferido para um novo tubo no qual 350 µL de etanol 70% (v/v) foram adicionados. Em seguida, a amostra foi aplicada na coluna de afinidade *NucleoSpin RNA Plant column* e centrifugada por 30 sec a 9.000 rpm à temperatura ambiente, 350 µL de tampão MDB (*Membrane Desalting Buffer*) foram adicionados e centrifugou-se por 1 min a 12.000 rpm para lavar e secar a coluna.

Com o objetivo de digerir o DNA presente na amostra 90 µL de *DNAse reaction buffer* foram adicionados à coluna e em seguida esta foi lavada duas

vezes (centrifugando por 30 sec a 9 000 rpm) com 200 µl tampão RA2 e 600 µl do tampão RA3 para remoção da DNase. A eluição do RNA foi feita adicionando-se a coluna 60 µl de *RNAse-free-water*. A composição dos tampões não é fornecida pelo fabricante.

A concentração do RNA na amostra foi determinada em espectrofotômetro, pela absorbância das preparações a 260nm, utilizando como valor padrão, 1OD 260= 40 µg/ml de RNA. O grau de pureza foi avaliado pela relação OD 260/280 nm, que deve ser próxima a 2,0 para ácidos nucleicos. A integridade do RNA foi analisada em gel de agarose 1% (Sambrook *et al.*, 1989). A seguir, as amostras foram congeladas a -80°C até a realização dos experimentos seguintes.

3.5.7.3 Preparação das amostras de RNA

Quantidades iguais (15 µg) de cada amostra de RNA foram misturadas, conforme designado abaixo, e aplicadas em gel.

RNA (15 µg)	4,5 µL
Tampão de migração (5X)	2,0 µL
Formaldeído	3,5 µL
Formamida	10 µL
Tampão de amostra	5 µL

Esta mistura foi incubada a 65° C por 15 minutos e resfriada rapidamente em banho de gelo.

3.5.7.4 Gel para RNA (Sambrook *et al.*, 1989).

Para o preparo de gel para RNA, a agarose [(1,5%, m/v) 70ml] foi dissolvida em água tratada com DEPC, e em seguida, fundida. Quando a temperatura atingiu aproximadamente 60°C, os seguintes reagentes foram adicionados:

Formaldeído	20 ml
Tampão MOPS 5X	22 ml
Água tratada com DEPC (q.s.p.)	100 ml

3.5.7.5 Hibridização do *Northern blotting*

As membranas foram pré-hibridizadas durante 6 horas a 65°C em tubos, contendo 20 mL da solução de pré-hibridização/Hibridização, 25 ng de sonda marcada radioativamente (50 µL), foram purificados para remoção dos nucleotídeos não incorporados utilizando uma coluna de Sephadex G-50 e adicionados à solução. A hibridização ocorreu a 65°C, com leve agitação, durante 12-18 horas. Posteriormente as membranas foram lavadas em Solução I 2x por 10 minutos e Solução II 1x por 5 minutos, se necessário foi aquecida a 65°C.

Após as lavagens, as membranas foram expostas e reveladas *Cyclone System* (Perkin Elmer's™).

3.5.7.6 Sonda utilizada na análise de expressão do gene *pacC* de *T. rubrum*

Como sonda para análise de *Northern Blotting*, foi utilizado um fragmento de 398 pb amplificado a partir do gene *pacC* de *T. rubrum*. O produto amplificado está localizado entre a região que codifica os três *zinc fingers* da proteína PacC. Os *primers* que originaram esse fragmento estão especificados na tabela 2.

Tabela 2. Sequência dos *primers* utilizados na amplificação do fragmento utilizado como sonda nos experimentos de *Northern blotting*.

Primer	Sequência
MutPacCF	5'- TCTCCAGCAGCAGCAACCAC – 3'
MutPacCR	5'- GTTGTTGGTGCTCTTGCGTC – 3'

Este fragmento foi clonado no plasmídeo pGEM-T e seqüenciado, para verificação da integridade e homologia com o gene *pacC* de *T. rubrum*.

3.5.8 *Western blotting*

3.5.8.1 Obtenção do extrato bruto de *T. rubrum* cultivado em diferentes pH

Foram utilizadas 4 placas da linhagem H6 e 5 placas da linhagem *pacC*-1, previamente cultivadas em meio ágar-sabouraud, como inóculo para 200 mL de meio sabouraud pH 5,0 e 8,0 tamponados respectivamente com ácido

cítrico 50 mM e Tris 50 mM. As linhagens foram inoculadas em erlenmeyers individuais de 750 mL, contendo um dos meios em cada pH e foram cultivadas por 72 horas a 28°C.

Após este período as culturas foram filtradas em funil de Büchner, o micélio foi lavado com água destilada e seco entre folhas de papel de filtro. Posteriormente, os micélios obtidos foram macerados em graal de porcelana com auxílio de areia tratada. Para os micélios cultivados em pH 5,0 o tampão de extração utilizado foi ácido cítrico 50 mM (pH 5,0) e em pH 8,0 o tampão Tris 50 mM (pH 8,0). Os tampões foram adicionados na proporção de 8 mL para cada grama de micélio, contendo PMSF na concentração final de 20 mM e benzimidina 1mM.

O micélio macerado foi centrifugado por 20 minutos a 12.000 rpm a 4°C, o sobrenadante obtido foi coletado e quantificado para posterior aplicação em gel SDS-PAGE.

3.5.8.2 Quantificação de proteína

A quantidade de proteína foi medida pelo método de Lowry, modificado conforme descrito por Hartree (1972), usando-se albumina de soro cristalizada, como padrão.

3.5.8.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

A eletroforese em condição desnaturante foi efetuada conforme descrito por Weber & Osborn (1969) utilizando-se placas de vidro (11 x 12 cm) separadas por espaçadores de 1 mm. 10 a 30 µg de proteína foram homogeneizadas em um volume final de 15 µL contendo SDS 6% (m/v), glicerol 27,6 % (v/v), azul de bromofenol 0,001% (v/v) e β-mercaptoetanol 1% (v/v). As amostras assim preparadas foram incubadas em banho maria por 5 minutos e depois aplicadas no gel polimerizado. Foi utilizado o seguinte padrão de peso molecular: *Electrophoresis Calibration Kit* (Amersham Biosciences) constituído de Fosforilase b (PM=94 kDa), Soro Albumina Bovina (PM=67 kDa), Ovoalbumina (43 kDa) e Anidrase Carbônica (PM=30 kDa).

Modo de preparo do gel de poliacrilamida:

Soluções	Gel de separação	Gel de concentração
30% Acrilamida 0,2% Bisac.	7,5 mL	0,83 mL
1,875 M Tris pH 8,8	2,25 mL	-
0,6 M Tris pH 6,8	-	0,5 mL
H ₂ O	2,6 mL	3,6 mL
10% SDS	125 µL	50µL
TEMED	5 µL	5 µL
10% AMPS*	62,5 µL	25 µL
Volume final	12,5 mL	5mL

*AMPS: persulfato de amônio.

3.5.8.4 Coloração para proteínas com Coomassie Blue R

O gel de poliacrilamida foi incubado por 30 minutos para coloração com azul de coomassie R 0,25% (m/v) em metanol. O excesso de corante foi removido pela lavagem com uma mistura de ácido acético, etanol e água na proporção de (1:5:14).

3.5.8.5 Detecção imunológica

As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose Hybond-C (Amersham Biosciences) utilizando-se o sistema de eletroforese vertical Hoefer[®] miniVE (Amersham Biosciences). Esta foi corada com Ponceau's por 10 minutos, a seguir foi descorada com água destilada e incubada com uma solução de TBS e 5% (m/v) de leite em pó desnatado por uma hora com agitação à temperatura ambiente, para bloqueio dos sítios de ligação presentes na membrana. Após este período, a membrana foi lavada com TBS por 5 minutos e a solução de bloqueio foi substituída por outra igual, contendo o primeiro anticorpo (soro anti-PacC diluído 1: 2000) e incubada por uma hora com agitação à temperatura ambiente.

A membrana foi lavada por 3 vezes (5 minutos cada) com TBS contendo Triton X-100 0,05% (v/v) e incubada em TBS contendo leite em pó desnatado 5% (m/v) e o segundo anticorpo (anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase

alcalina [Sigma] diluído 1:5000) por uma hora com agitação, à temperatura ambiente. Foram realizadas mais três lavagens de 5 minutos cada com TBS e 0,05% (v/v) de Triton X-100. Após as lavagens a membrana foi seca em papel de filtro. A detecção foi realizada com reagente *Western blotting Luminol* (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) e exposto em filme para autoradiografia.

3.5.8.6 Anticorpo anti-PacC utilizado nos experimentos de *Western blotting*

O anticorpo anti-PacC foi obtido com a expressão da proteína PacC de *A. nidulans* conforme estabelecido por Ferreira-Nozawa (2003). Essa proteína foi utilizada na indução de anticorpos capazes de identificar a proteína PacC em extratos brutos do dermatófito *T. rubrum*.

3.5.9 Marcação de sondas de ácidos nucleicos com radioisótopos

Os fragmentos de DNA utilizados como sonda nos experimentos de *Southern* e *Northern blotting* foram marcados com ^{32}P (α -dCTP) utilizando-se o Kit *Randon Primers DNA Labeling System*[®] (Invitrogen).

Componentes da reação de marcação:

DNA denaturado	25 ng
Radioisótopo ^{32}P (α -dCTP)	3 μL
dATP	2 μL
dTTP	2 μL
dGTP	2 μL
Tampão <i>Primer Mix</i>	15 μL
Enzima Klenow (1 unidade/ μL)	1 μL
Água deionizada esterilizada q.s.p.	50 μL

3.5.10 Marcação de sonda não radioativa

Procedimento de preparação de uma sonda marcada com o Kit *Gene Images Randon Prime Labelling Module* (Amersham Biosciences). Pode-se usar entre 25 ng a 2 μg de DNA, sendo aconselhável o uso entre 25 e 50 ng. O DNA foi diluído para 25-50 ng, em um volume de pelo menos 20 μL (volume Y), denaturado por 5 minutos em água em ebulição e colocado em gelo.

Em um microtubo de 0,5 mL, previamente gelado, foram adicionados os seguintes reagentes, mantendo a ordem a seguir:

Nucleotídeo-mix	10 μ L
Oligonucleotídeo	5 μ L
DNA	Y μ L
Água deionizada esterilizada	X μ L
Klenow 5 U/ μ L	1 μ L
Volume final	50 μ L

X: volume em μ L de água; Y volume em μ L de DNA.

Misturou-se suavemente os componentes da reação e incubou-se por 1 hora a 37°C. A reação foi bloqueada pela adição de 20 mM de EDTA (concentração final) e congelada a -20° C na ausência de luz. A reação pode ser estocada por até 6 meses.

No momento do uso, a mistura de reação (sonda) foi desnaturada por 5 minutos em água fervente, mantida em gelo por 3 minutos e adicionada a solução de pré-hibridação [SSC 5X, SDS 0,1% (m/v) e solução *Blocking* (Amersham Biosciences) diluída 20 vezes], onde se encontra a membrana de *nylon* contendo os DNAs. A membrana ficou durante 16 horas nesta solução para hibridização na temperatura adequada ao experimento, sob agitação suave.

Após este período, a membrana foi lavada com SSC 1X contendo SDS 0,5% (m/v) por 15 minutos na temperatura do experimento e em seguida por mais 15 minutos com SSC 0,5X, contendo SDS 0,5% (m/v).

3.5.10.1 Detecção do sinal

A membrana foi incubada por 1 hora à temperatura ambiente com 0,75-1 mL/cm² em tampão A (Tris-HCl 100 mM, pH 9,5 contendo NaCl 300 mM) adicionado de solução *Blocking* diluída 10 vezes. Em seguida, foi adicionado à membrana a anti-fluoresceína-AP-conjugada diluída 5000 vezes no tampão A, contendo BSA 0,5% (m/v) e esta foi incubada por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação suave.

O excesso foi removido lavando-se a membrana por 3 vezes por 10 minutos com Tween 20 0,3% (v/v) à temperatura ambiente com agitação suave. A seguir, a membrana foi seca rapidamente e o reagente de detecção (30-40 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$) foi colocado sobre ela por 2-5 minutos. Retirou-se com uma pipeta o excesso e um filme de raios-X foi exposto por 30 minutos a 1 hora.

3.5.11 Obtenção de células competentes para *Heat shock*

A cepa de bactéria apropriada foi inoculada em 5 mL de LB, a partir do seu estoque e cultivada por 12-18 horas, a 37°C com agitação (pré-inóculo). Uma alíquota de 2,5 mL desta cultura foi inoculada em 250 mL de meio LB e cultivada por mais 2-3 horas, a 37°C ou até a obtenção de uma absorvância entre 0,5-0,6 a 550 nm. A seguir, a cultura foi mantida em banho de gelo por 30 minutos, as células foram recolhidas por centrifugação a 6.000 x g por 10 minutos a 4°C, e ressuspensas em 125 mL de tampão (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, contendo CaCl_2 50 mM). Esta mistura foi incubada em banho de gelo por 10 minutos, posteriormente as células foram submetidas à nova centrifugação e ressuspensas em 3,5 mL de tampão [Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, contendo CaCl_2 50 mM e glicerol 15% (v/v)]. Alíquotas de 200 μL foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C.

3.5.11.1 Transformação de células competentes por *Heat shock*

Quando necessário uma alíquota de 200 μL de células competentes foi descongelada em banho de gelo e recebeu a adição de DNA transformante (10-50 ng). Esta mistura foi mantida por 30 minutos em gelo e em seguida transferidas para um banho a 42°C por exatamente 40 segundos (MosBlue). Os tubos foram transferidos para o gelo por 1-2 minutos e adicionou-se a cada um 800 μL de meio LB (sem antibiótico) que foram então incubadas a 37°C por 1 hora com agitação. Alíquotas da transformação foram espalhadas sobre placas de meio LB sólido contendo o antibiótico apropriado e incubadas por 14-24 horas a 37°C.

3.5.12 Obtenção de células competentes para eletroporação

Uma colônia isolada da cepa bacteriana apropriada foi inoculada em 5 mL de meio LB líquido e cultivado por 18 horas a 37°C, com agitação. Uma alíquota de 2,5 mL desta cultura foi utilizada como inóculo em 250 mL de meio LB e cultivada por mais 1,5 a 2,5 horas a 37°C, ou até que fosse atingida uma absorvância, a 550 nm, entre 0,4 e 0,5. A seguir a cultura foi mantida em banho de gelo por 10 minutos. Decorrido este tempo as células foram recolhidas por centrifugação 12.000 x *g* a 4°C, por 10 minutos e lavadas por 4 vezes com água destilada esterelizada (gelada). As células obtidas foram ressuspensas em 700 µL de água destilada esterelizada (gelada) e DMSO na concentração final de 7% (v/v), alíquotas de 40 µL foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C.

3.5.12.1 Transformação de células competentes por eletroporação

Quando necessário, uma alíquota de 40 µL de células competentes foi descongelada em banho de gelo e recebeu a adição de DNA (10-50 ng). Esta mistura foi então colocada em uma cubeta de 0,2 cm entre os eletrodos, previamente resfriada. A cubeta contendo as células e o DNA foi colocada no eletroporador (*Gene Pulser Biorad*), e as células foram eletroporadas nos seguintes parâmetros: 2,5 KV, 50 µF e 2,5 milissegundos.

Após o pulso, as células transformadas receberam a adição de 1 mL de meio LB (sem antibiótico) e foram cultivadas por 1 hora a 37°C. Alíquotas da transformação foram espalhadas sobre meio LB sólido contendo antibiótico apropriado e incubadas por 14-18 horas a 37°C.

3.5.13 Nocaute do gene *pacC* de *T. rubrum* (Ferreira-Nozawa, 2003)

Com base na sequência de nucleotídeos do clone genômico de 6 Kb, cujo inserto contém o gene *pacC* e sua região promotora, aproximadamente 20 µg deste clone foram clivados com as enzimas *PvuII* e *EcoRI*. Os fragmentos obtidos foram separados em gel de agarose 0,8% (m/v). O fragmento de interesse representado por uma banda de 2,4 Kb foi excisado do gel e seu DNA recuperado através de extração segundo o protocolo do “kit Concert Matrix extraction gel™” da Gibco Life Science. Este fragmento teve suas

extremidades tratadas com *Klenow*, Quinase, e ligadas ao vetor *pMOS* linearizado com a enzima de restrição *EcoRV* de acordo com as instruções do fabricante do kit *pMOSBlue blunt ended cloning kit* (Amersham Biosciences). O produto desta ligação foi utilizado para transformar por *heat shock* células competentes da linhagem *MosBlue*.

As colônias bacterianas obtidas foram cultivadas em meio líquido e seu DNA foi recuperado através do protocolo de *mini prep* para extração de DNA plasmidial. A seguir este DNA foi clivado para confirmação da presença de inserto e um destes clones, e assim, foi utilizado para a construção do cassete para nocaute gênico (*ppacC-1*). Para tanto, o DNA deste sub-clone foi linearizado com a enzima de restrição *XhoI* permitindo a inserção do gene repórter com extremidades compatíveis (*SalI*) nesta posição, através de ligação com T4 DNA polimerase. Desta forma, houve uma interrupção da sequência de nucleotídeos do gene *pacC*. O produto da ligação do gene repórter produziu o cassete para nocaute denominado *ppacC-1*. O clone com a construção correta foi utilizado para transformar os protoplastos da linhagem H6 de *T. rubrum*.

O gene repórter utilizado para interromper a sequência nucleotídica do gene *pacC* de *T. rubrum* foi o gene *hph* que confere resistência à higromicina B. A higromicina B é um aminoglicosídeo, que inibe a síntese protéica através de erros de leitura na tradução ou pode interferir na translocação de proteína. O gene *hph*, que codifica para uma fosfotransferase, encontra-se clonado em um vetor denominado pCSN 43 e está sob a regulação de um promotor eucarioto, o clone todo (plasmídeo e inserto) possui cerca de 5,3 Kb (Staben, 1989). Para a remoção do gene repórter do vetor, o plasmídeo foi clivado com a enzima de restrição *SalI*. Os fragmentos obtidos foram separados em gel de agarose 0,8% (m/v), o fragmento de interesse, representado por uma banda de 2,4 Kb foi excisado do gel e seu DNA recuperado através de extração, segundo o protocolo do kit *GFX Matrix extraction gel™* (Amersham Biosciences). Aproximadamente 100 µg deste fragmento foram utilizados em reações de ligação ao plasmídeo linearizado com *XhoI*.

3.6 Teste de patogenicidade *in vitro*

O teste de infecção *in vitro*, que verifica a capacidade dos conídios germinarem em fragmentos de unha humana, foi realizado conforme descrito por Takasuka (2000). Este teste foi realizado com as duas linhagens em estudo. Os fragmentos de unha foram recortados no tamanho de aproximadamente 1x1 mm, colocados em placa de petri estéril e mantidos em etanol por 15 minutos. Esses fragmentos foram secos à temperatura ambiente. Em seguida, foram arranjados em placa tipo ELISA de 96 poços e foram inoculados com 5 μ L de uma suspensão de conídios contendo 3×10^6 conídios/mL despejada sobre a unha. Após 1 hora à temperatura ambiente, foi adicionada 200 μ L de água destilada esterilizada e a placa foi mantida a 28°C por 6 dias. Para os experimentos que avaliaram o crescimento das linhagens em diferentes pH, foi adicionado uma solução 5 mM de citrato de sódio para mimetizar condição ácida e solução 5 mM de Hepes para mimetizar a condição alcalina.

Após o tempo de incubação, o material foi analisado sob microscópio óptico e fotografado utilizando o sistema *Axiophot Zeiss* de epifluorescência equipado com o sistema de imagem digital (câmera *Axionvision Zeiss*). Os controles consistiram de unha sem inoculação de conídios e de conídios em água, na ausência do fragmento de unha.

3.7 Atividade Queratinolítica

A atividade queratinolítica foi medida como descrito por Gradisar *et al* (2005) onde queratina foi utilizada como substrato.

Uma solução de conídios de 5×10^5 conídios/mL de cada linhagem (H6 e *pacC-1*) foi inoculada em frascos 250 mL contendo 25 mL de meio mínimo de Cove (1966), pH 5,0 não tamponado, suplementado com 2,5 g/L de queratina, como fonte de carbono e hidrogênio e incubado em orbital shaker a 160 rpm/min por 7 dias a 28°C. O meio foi coletado por filtração para determinação da atividade queratinolítica extracelular. Assim, 1 mL do meio de cultura foi utilizado como enzima e adicionado a 4mL de solução de Tris-HCl 28 mM, pH 8,0, contendo 20 mg de queratina, que foram incubados por 30 minutos a 45°C. Após o período de incubação, a reação foi paralizada com 2 mL de TCA (ácido

triclóro acético) 10% (m/v). A seguir, cada experimento foi colocado em gelo por 30 minutos e então centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos. Nos controles o TCA foi adicionado antes da incubação. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 280 nm. A atividade queratinolítica foi definida como unidade por grama do micélio seco por hora.

3.8 Biblioteca Subtrativa SSH (*Suppression Subtractive Hybridization*)

3.8.1 Condições de cultivo da linhagem H6 para construção da SSH

Após 15 dias de cultivo da linhagem H6 em meio Sabouraud sólido a 28°C, o micélio foi transferido para 250 mL de meio de cultura Sabouraud líquido e cultivado sob agitação de 250 rpm a 28°C por 72 horas. A massa micelial obtida foi filtrada em funil de Büchner e transferida para 50 mL de meio mínimo (2 mM de fosfato de potássio monobásico, 55 mM de glicose e 70 mM de nitrato de sódio). Utilizou-se meio mínimo pH 5,0 e 8,0 tamponados respectivamente com citrato de sódio 50 mM e Tris-HCl 50 mM e para cada pH a linhagem H6 foi cultivada por 30 minutos e 1 hora. Assim foram construídas duas bibliotecas com a linhagem cultivada por 30 minutos, uma *forward* (pH 5,0) e a *reverse* (pH 8,0) e duas bibliotecas com a linhagem cultivada por 1 hora, sendo uma *forward* (pH 5,0) e a *reverse* (pH 8,0). Após estes períodos, as culturas foram filtradas, secas em papel de filtro, congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80° C até o momento da extração de RNA.

3.8.2 Extração de RNA total utilizado na construção da SSH (*Suppression Subtractive Hybridization*)

Todo o material utilizado na extração de RNA total foi previamente tratado solução de NaOH 0,6 N. Para esta metodologia, utilizou-se o kit NucleoSpin® (MACHEREY-NAGEL) conforme instruções do fabricante e descrito no item 3.5.10.2). O RNA obtido, foi quantificado no GeneQuant™ calculator (Amersham Biosciences) e a sua integridade foi analisada em gel como pode ser observado na Figura 4. A seguir, as amostras foram congeladas a -80°C até a realização da biblioteca de subtração de cDNA.

Figura 4. Análise da integridade dos RNAs utilizados nas bibliotecas subtrativas. Os RNAs da linhagem H6, expostos as diferentes condições de pH foram extraídos utilizando o kit NucleoSpin®.

3.8.3 Construção da biblioteca de subtração de cDNAs (SSH)

A SSH permite comparar duas populações de mRNA e obter genes que são expressos preferencialmente em uma delas. O esquema desta metodologia está apresentado na Figura 5.

Os passos principais desta técnica são os seguintes: as populações de mRNA obtidos da linhagem H6 em pH 5,0 e pH 8,0 são convertidos em cDNA. A população de cDNAs contendo os genes diferencialmente expressos é chamada *tester* (pH 5,0) e amostra controle é chamada *driver* (pH 8,0). No caso da biblioteca Forward a amostra *tester* é a população de cDNAs contendo os genes diferencialmente expressos em meio mínimo pH 5,0 e a amostra *driver* é a população de cDNAs obtidos em meio mínimo pH 8,0.

Em seguida, os cDNAs *tester* e *driver* são hibridados e as seqüências hibridadas removidas; assim, os cDNAs restantes não hibridados constituem os genes expressados unicamente na condição que se quer testar. Estes cDNAs são amplificados por PCR (PCR supressivo) enriquecendo a população dos genes diferencialmente expressos na condição *tester*.

A hibridização subtrativa de populações de cDNA seguida de amplificação por PCR dos genes diferencialmente expressos (PCR supressivo) foi realizada utilizando-se o kit *PCR-Select*® (*Clontech*).

Figura 5. Ilustração da metodologia de construção de bibliotecas de subtração pela técnica *Suppression Subtractive Hybridization* (reproduzido de Gurskaya *et al.*, 1996).

3.8.4 Síntese de cDNAs

Os RNAs extraídos das linhagem H6 em condições ácidas e alcalinas, foram utilizadas para síntese de cDNAs, através da metodologia *SMART PCR cDNA Synthesis* (BD Biosciences Clontech), conforme instruções do fabricante.

O kit *SMART PCR cDNA Synthesis* faz uso da atividade transferase terminal da enzima *Transcriptase Reversa* (RT) para ancorar iniciadores na extremidade 5' de todos os cDNAs sintetizados. Esta atividade faz com que, ao chegar à posição 5' do mRNA, a enzima catalisa a adição de uma pequena repetição de citosinas na fita de cDNA sintetizada. Isto se deve ao fato do kit conter um iniciador que possui uma região rica em guanina capaz de se anelar com a região poli-C adicionada, passando a servir como molde para a RT. Desta forma, uma região do iniciador é adicionada ao cDNA. A seguir, usando-

se um iniciador para esta região e para a porção poliA do RNA mensageiro, os cDNAs completos foram sintetizados e amplificados por *long distance PCR*, na fase exponencial de reação (Figura 6). Foram necessários 20 ciclos para a amplificação do cDNA sintetizado a partir do RNA obtido da linhagem H6 no tempo de 30 minutos em pH 5,0 e pH 8,0. Assim como 21 ciclos para a amplificação do cDNA sintetizado a partir do RNA obtido da linhagem H6 no tempo de 1 hora em pH 5,0 e pH 8,0. Os cDNAs incompletos, os RNAs ribossômicos e o DNA genômico não são amplificados, pois não possuem sítios de anelamento para estes iniciadores, garantindo um cDNA completo de alta qualidade.

Para as reações de síntese de cDNA, foram combinados para cada amostra os seguintes reagentes:

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

As amostras foram incubadas a 72°C por 2 min, esfriadas em gelo e centrifugadas brevemente. A seguir adicionou-se a cada amostra os seguintes reagentes:

5X First-Strand Buffer	2 µl
DTT (20 mM)	1 µl
dNTP Mix (10 mM de cada dNTP)	1 µl
BD PowerScript reverse transcriptase	1 µl

As reações foram incubadas a 42°C por 1 hora, colocadas em gelo e diluídas com 40 µl de TE.

Após a síntese e diluição dos cDNAs procedeu-se ao LD-PCR, para o qual foi preparada a seguinte mistura de reação:

10X BD advantage 2 PCR	10 µl
50X dNTP (10 mM de cada dNTP)	2 µl
5' PCR Primer IIA (12 µM)	2 µl
50X BD advantage 2 Polymerase Mix	2 µl
Água deionizada esterilizada (q.s.p.)	74 µl

A seguir esta mistura foi dividida em duas partes iguais e em cada uma delas foi encorpado o cDNAs previamente diluído.

Programa do LD-PCR: 95°C (1 min); 95°C (15 sec); 65°C (30 sec); 68°C (6 min); 4°C (∞).

Figura 6. Representação esquemática do funcionamento do kit *SMART PCR cDNA Synthesis*. Utilização da atividade de terminal transferase presente na *transcriptase reversa*.

3.8.5 Purificação dos cDNAs

Após a PCR, as amostras foram purificadas na coluna *BD CHROMA SPIN 1000*. Para isso, em cada amostra foi adicionado igual volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), os tubos foram vortexados e centrifugados a 14.000 rpm por 10 min. A fase superior foi removida e transferida para um novo tubo contendo 700 µl de n-butanol, os tubos foram invertidos e centrifugados por 1 min a 14.000 rpm. Após a centrifugação, a fase orgânica (fase superior) foi descartada, e a fase inferior foi aplicada à coluna *BD CHROMA SPIN 1000*.

As amostras de cDNAs purificadas foram quantificadas em espectrofotômetro determinando-se a absorbância em 260 nm considerando-se como valor padrão $1\text{DO}_{260} = 50\mu\text{g/ml}$ de cDNA.

3.8.6 Digestão com *Rsa* I.

Os cDNAs purificados de ambas as amostras foram digeridos com a enzima *Rsa*I (Invitrogen), com o objetivo de reduzir a complexidade dos fragmentos e gerar o sítio de ligação para os adaptadores (1 e 2R).

A reação de digestão foi a seguinte:

cDNA fita dupla	350 µl
Tampão de restrição da enzima (10X)	40 µl
<i>Rsa</i> I (10U/µl)	2 µl
Água deionizada esterilizada (q.s.p.)	400 µl

A reação de digestão foi incubada a 37°C por 3 horas. Após este período de incubação, 5 µl da reação foram utilizados para a análise da eficiência da digestão em gel de agarose 1,5% (m/v) e 2,5 µl do Mix EDTA/Glicogênio 20X foram adicionados ao restante da reação. Em seguida, cada amostra digerida foi purificada utilizando-se o Kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (Amersham Biosciences).

3.8.7 Ligação dos adaptadores

A amostra de cDNA *tester* (biblioteca F: cDNAs da linhagem H6 cultivada em meio mínimo pH 5,0, no tempo de 30 minutos e 1 hora e biblioteca R: cDNAs da linhagem H6 cultivada em meio mínimo pH 8,0, no tempo de 30 minutos e 1 hora) foi dividida em duas porções, sendo cada uma ligada a um adaptador diferente (1 ou 2R).

Cada um destes dois adaptadores inclui uma sequência diferente de anelamento de *primer*, e também uma única extremidade fosforilada, a fim de permitir a ligação direcional aos fragmentos de cDNA. A ligação destes adaptadores é essencial para o funcionamento adequado da subtração. Para a ligação dos adaptadores foram preparadas as seguintes misturas de reação:

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

Os tubos foram incubados a 16°C por 18 horas. A ligação foi interrompida com 1µl de EDTA/Glicogênio 20X e a ligase foi inativada por aquecimento a 72°C por 5 min.

3.8.8 Primeira e segunda hibridização.

Após a ligação dos adaptadores foi, realizada a hibridização subtrativa, em duas etapas. Na primeira hibridização os cDNAs foram desnaturados por calor (95°C), após o que adicionou-se o cDNA *driver* em excesso a cada uma das amostras *tester* contendo um dos dois diferentes adaptadores. A temperatura foi, então, reduzida a 68°C e as amostras hibridadas durante 8 horas, ocorrendo uma renaturação parcial. Devido à cinética de hibridação ser de segunda ordem, as moléculas abundantes sofrem reanelamento mais rápido, ocorrendo uma equalização entre as seqüências fita simples. Ao mesmo tempo, as moléculas fita simples de seqüências diferencialmente expressadas são enriquecidas em relação às não diferencialmente expressas, as quais tendem a formar híbridos com o *driver*, pelo fato deste estar super representado.

A segunda hibridação subtrativa (ver abaixo) foi realizada misturando-se as duas amostras da primeira hibridação com a adição de mais *driver* desnaturado, incubando a 68°C por 18 horas. Assim, somente as moléculas fita simples equalizadas e diferencialmente expressas devem reassociar, formando híbridos com adaptadores terminais diferentes (provenientes das duas amostras de *tester*).

Reagentes	Hibridização 1	Hibridização 2R
cDNA <i>driver</i> digerido com <i>RsaI</i> (desnaturado)	1,5 µl	1,5 µl
cDNA <i>tester</i> ligado ao adaptador 1	1,5 µl	—
cDNA <i>tester</i> ligado ao adaptador 2R	—	1,5 µl
Tampão de hibridização 4X	1 µl	1 µl
<i>Volume final</i>	<i>4 µl</i>	<i>4 µl</i>

Decorrido o tempo de incubação, foram acrescentados 200 µl de tampão de diluição e as amostras foram mantidas por mais 7 minutos a 68°C e em seguida estocadas a -20°C até o momento do uso.

3.8.9 Amplificação por PCR

A seguir, foi realizado o preenchimento das pontas dos cDNAs com *Taq* DNA polimerase (*Invitrogen*). O PCR primário, para amplificação inicial dos fragmentos subtraídos, foi realizado utilizando-se um *primer* com seqüência complementar a cada um dos dois diferentes adaptadores. Nesta etapa, as moléculas contendo o mesmo adaptador nas duas pontas não são amplificadas adequadamente, pois devido à sua complementaridade, ocorre uma tendência destas pontas anelarem entre si (efeito supressivo).

O PCR secundário, para amplificação dos fragmentos diferencialmente expressos, foi realizado com uma alíquota diluída (3:100) do PCR primário utilizando *primers* com sítios de anelamento internos aos do PCR primário (*nested primers*), conforme segue:

Reagentes	PCR	Nested PCR
Tampão da Taq 10X	2,5 µl	2,5 µl
MgCl ₂ 50mM	1,5 µl	1,5 µl
DNTP (1,25mM)	4 µl	4 µl
Oligonucleotídeo 1	1 µl	—
Oligonucleotídeo <i>nested</i> 1	—	1 µl
Oligonucleotídeo <i>nested</i> 2	—	1 µl
DNA	3 µl (Hibridação 1:200)	3 µl (produto do PCR 1)
Taq (5U/ µL)	0,5 µl	0,5 µl
Água deionizada	12,5 µl	11,5 µl
Volume final	25 µl	25 µL

O PCR primário foi incubado primeiramente por 5 min para estender os adaptadores seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 sec, de anelamento a 66°C por 30 sec e de extensão a 72°C por 1,5 min. Para *nested* PCR foram adotadas as mesmas condições de amplificação, variando a temperatura de anelamento (68°C) e o número de ciclos de amplificação (30).

Para a visualização do produto do *nested* PCR (bandas correspondentes a genes diferencialmente expressos), as amostras foram aplicadas em gel de agarose 2% (m/v) e submetidas à eletroforese.

3.8.10 Clonagem dos fragmentos de cDNA da biblioteca de subtração

Os fragmentos de cDNA da biblioteca de subtração amplificados no PCR secundário foram aplicados em gel de agarose 2% e recortados, dividindo-os por seus pesos moleculares (100-200pb; 200-500pb; 500-650pb; 650-1Kb). Estes fragmentos, foram purificados em colunas *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (Amersham Biosciences) e eluídos em 50 µl de água estéril.

Aproximadamente 200 ng dos cDNAs purificados das bibliotecas de subtração, foram utilizados em reações de ligação com 50 ng do plasmídeo pGEM-T, 1X tampão de ligação (Promega) e 5U da enzima T4 DNA ligase. As ligações foram realizadas em um volume final de 10 µl a 16 °C por 16 horas.

3.8.11 Transformação por *Heat shock*

Os plasmídios recombinantes foram utilizados para transformação em cepas bacterianas, como descrito a seguir.

Uma alíquota de 200 µl de células competentes foi descongelada em banho de gelo e recebeu a adição de DNA transformante (10-50 ng). Após 30 minutos em gelo, as bactérias foram colocadas por 40 segundos em banho a 42°C e transferidas para o gelo por mais 2 minutos. Imediatamente, as bactérias foram suspensas em 800 µl de meio LB (sem antibiótico) e mantidas por 1 h a 37°C, em *shaker* sob leve agitação. A seguir, foram plaqueadas em LB-agar contendo 50 µg/ml de ampicilina, 50 mg/ml de X-gal e 0,2 mg/ml de IPTG e crescidas *over night* a 37°C.

As colônias bacterianas brancas (transformadas) foram selecionadas e cultivadas por 18 horas em microplacas de 96 poços contendo meio LB mais 50 µg/ml de ampicilina. Posteriormente, uma alíquota das mesmas foi congelada a -80°C, em glicerol 15%.

3.8.12 Validação do processo de subtração.

3.8.12.1 Construção de Macroarranjos de DNA e *Reverse Northern blotting* (Dilks *et al.*, 2003).

Os fragmentos clonados das bibliotecas de subtração foram amplificados por PCR e utilizados para a geração de macroarranjos de DNA, como descrito a seguir. Estes macroarranjos foram utilizados para o rastreamento de clones diferencialmente expressos pela técnica de *Reverse Northern Blot* (Dilks *et al.*, 2003).

3.8.12.2 Amplificação dos clones por PCR

Amostras de 2 µl de clones bacterianos contendo fragmentos de cDNA, crescidos em microplacas de 96 poços, foram transferidos para placas de PCR contendo 23 µl de *mix* de PCR (8,8 µl de água estéril, 2,5 µl de tampão da *Taq* 10X, 1µl de MgCl₂ 50mM, 4 µl de dNTP 1,25mM, 1 µl dos *primers* nested 1 e 2R na concentração de 10 µM cada e 0,3 µl de *Taq* DNA pol 5U/µl). A reação foi submetida a 94°C por 2 min para lise inicial das bactérias, seguido de 32 ciclos de 94°C por 30 sec para desnaturação, 68°C por 45 sec para anelamento, 72°C por 1,5 min para extensão e posteriormente uma extensão

final a 72°C por 10 min. O produto da reação foi fracionado em gel de agarose 1,2%, em tampão TAE 1X.

3.8.12.3 Preparo das membranas com 96 amostras

Para o rastreamento de clones diferencialmente expressos foram preparadas membranas com 96 amostras em duplicada. 4 µl (aproximadamente 500 ng) de cada amostra foram desnaturados acrescentando-se 4 µl de NaOH 0,6N. Após desnaturação, o DNA foi diluído com 92 µl de tampão TE e aplicado sobre membranas de nylon *N-Hybond⁺* (Amersham Biosciences). O cDNA foi fixado nas membranas em forno a 80°C por 15 min e por exposição à luz UV por 2 minutos de cada lado.

3.8.12.4 Preparo das sondas de cDNA e marcação a frio

Utilizou-se o kit *Gene Images Random Prime Labelling Module* (Amersham Biosciences) para a marcação da sonda a frio. Durante a reação de marcação, os *primers* anelam em sítios randômicos no DNA, permitindo que a enzima Klenow sintetize as fitas complementares, incorporando os nucleotídeos marcados. Para isso, o produto da segunda PCR da biblioteca de subtração de cDNA, foram diluídos para 50 ng, desnaturado por 5 min a 95°C, colocado em gelo e utilizados como sonda.

3.8.12.5 Hibridização e lavagem das membranas

As membranas foram pré-hibridizadas em solução de hibridação (5X SSC, 0,1% SDS, 5% dextran sulfato, líquido bloqueador diluído 20 vezes) a 60°C por uma hora. A seguir, foi adicionada a sonda marcada a frio (previamente desnaturada) e a hibridização foi realizada a 60°C por 18 horas, na mesma solução.

Após a hibridização, as membranas foram lavadas com SSC 1X/SDS 0,5% (m/v) por 15 min a 60°C e em seguida por mais 15 min com SSC 0,5X/ SDS 0,5% (m/v), nesta temperatura. Após as lavagens, as membranas foram incubadas em uma solução de líquido bloqueador diluída 10 vezes em tampão A (Tris-HCl 100 mM/ pH 9,5/ NaCl 300 mM) durante 1 hora à temperatura ambiente.

Para revelar a marcação, foi usado o Kit *Gene Image CDP-Star Detection Module* (Amersham Biosciences). O anticorpo anti-fluoresceína

conjugado com fosfatase alcalina (*anti-fluorescein alkaline phosphatase (AP conjugate)*) foi diluído em solução BSA (soro albumina bovina) 0,5% (m/v), preparada com tampão A. As membranas foram incubadas com o anticorpo por 1 hora à temperatura ambiente seguindo-se três lavagens com uma solução 0,3% (v/v) Tween 20 preparada com tampão A, para remover o excesso de conjugado. O reagente de detecção foi colocado sobre as membranas (30-40 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) e as mesmas foram expostas em filme autoradiográfico por cerca de 1 hora à temperatura ambiente.

3.8.12.6 Preparação das sondas para marcação radioativa

Utilizou-se o kit *Randon Primers DNA labeling System* (Amersham Biosciences) para a marcação da sonda radioativa, como descrito no item 3.5.12. O DNA utilizado para marcação foi produto da segunda PCR da biblioteca de subtração de cDNA ou o cDNA total não subtraído que foram diluídos para 50 ng, desnaturado por 5 min a 95°C, colocado em gelo e utilizados como sonda.

3.8.12.7 Hibridização e lavagem das membranas marcadas radioativamente

As membranas foram pré-hibridizadas em solução de hibridação (7% SDS e 0,5 M de tampão fosfato de sódio pH 7,5) a 65°C por uma hora. A seguir, foi adicionada a sonda marcada radioativamente (previamente desnaturada) e a hibridização foi realizada com leve agitação a 65°C por 18 horas, na mesma solução.

Após a hibridização, as membranas foram lavadas com SSC 1X/SDS 0,5% (m/v) por 15 minutos a 60°C e em seguida por mais 30 minutos com SSC 0,5X/SDS 0,5% (m/v), nesta temperatura. Após as lavagens, as membranas foram expostas e reveladas com leitor de ^{32}P do *Cyclone System* (Perkin Elmer's™).

3.8.12.8 Extração de DNA plasmidial em microplaca

Os clones bacterianos transformados, contendo os fragmentos de cDNAs selecionados no rastreamento, foram utilizados para a extração de DNA plasmidial. Para isso, os clones selecionados foram inoculados em 1ml de meio LB com ampicilina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) em microplaca *deep well* contendo 96 poços e cultivados a 37°C por 22 horas sob vigorosa agitação (300 rpm). Após o

crescimento, a microplaca foi centrifugada a 4000 rpm por 6 min. O sobrenadante foi descartado e 240 µl de solução I (Glicose 50mM; Tris-HCl 25mM; EDTA pH 8,0 10mM) foram adicionados a cada poço. A microplaca foi submetida à agitação em vortex por 5 min e novamente centrifugada a 4000 rpm por 6 min. O sobrenadante foi descartado e 85 µl de uma mistura contendo solução I e RNase (17,6 ml de solução I e 1,1 ml de RNase a 10 mg/ml) foram adicionados a cada poço. Após 10 min de incubação, as suspensões foram transferidas para uma placa tipo ELISA, 60µl de solução II (SDS 1%; Hidróxido de sódio 0,2 M) adicionados à cada poço, a placa foi homogeneizada por inversão e mantida à temperatura ambiente por 10 min.

Após este período, 60 µl de acetato de potássio 3 M foram adicionados em cada poço e a placa novamente homogeneizada por inversão e mantida à temperatura ambiente por 10 min. Em seguida, a placa foi incubada a 90°C por 30 min e resfriada em gelo por 5 min. As amostras foram transferidas para uma placa Millipore acoplada a uma placa tipo ELISA e este sistema foi centrifugado por 6 min a 4000 rpm. O sistema foi desmontado e o DNA plasmidial precipitado, adicionando-se 110 µl de isopropanol ao filtrado. A placa foi centrifugada por 45 min a 4000 rpm, o precipitado foi lavado com etanol 70% e centrifugado por 10 min a 4000 rpm. O DNA plasmidial foi seco a 65°C por 15 min e ressuspendido em 25 µl de água estéril.

3.8.12.9 Seqüenciamento de DNA dos clones selecionados como diferencialmente expressos

Aproximadamente 300-500 ng da miniprep foram utilizados como molde na reação de seqüenciamento do kit *Big Dye Terminator Cycle Sequence Ready Reaction* (GE Biosciences). Esta metodologia envolve uma reação de PCR com apenas um “primer”, e terminação da reação através de dideoxinucleotídeos marcados com compostos fluorescentes. O produto desta reação foi analisado no aparelho de seqüenciamento automático *ABI Prism 377 DNA Sequencer* (Perkin Elmer).

As reações de seqüenciamento foram constituídas por: 300 ng de DNA plasmidial, 5 pmol de oligonucleotídeo universal M-13 *forward* e 2 µl do *mix Big Dye*

foram desnaturadas por 2 min a 96°C, seguido de 40 ciclos de 96°C por 30 sec para desnaturação, 52°C por 30 sec para anelamento e 60°C por 4 min para extensão.

Após a ciclagem, as amostras foram precipitadas acrescentando 2 µl de uma solução contendo acetato de sódio 1,5 M e EDTA 250 mM. Foram adicionados 80 µl de etanol absoluto e em seguida, as amostras foram incubadas por 20 min no escuro à temperatura ambiente e centrifugadas por 45 min a 4.000 rpm, a 4°C. O sobrenadante foi descartado, seguindo-se uma lavagem com 150 µl etanol 70% (v/v) gelado, centrifugando por 10 min a 4.000 rpm, a 4°C. Depois de secas, as amostras foram resuspendidas em 2,5 µl de *Loading Color*, aplicando-se 0,7 µl em gel de poliacrilamida no seqüenciador *ABI Prism 377*.

3.8.13 Análises por Bioinformática

A análise da qualidade das seqüências das ESTs obtidas na construção das bibliotecas de subtração, foi realizada através do programa Phred (Ewing *et al.*, 1998; Ewing e Green, 1998), que atribui um valor de qualidade para cada base. A retirada das seqüências pertencentes ao vetor de clonagem e aos adaptadores utilizados nas bibliotecas foi realizada através do programa *cross-match* (Ewing *et al.*, 1998).

Foram escolhidas para serem anotadas somente seqüências contendo mais de 50 bases com qualidade Phred acima de 20. Após o tratamento das seqüências o programa CAP3 (Huang e Madan, 1999), montou os *contigs* e *singlets* com as seqüências, que serviu como contagem dos diferentes fragmentos identificados nas bibliotecas de subtração. A visualização dos da montagem dos *contigs* foi realizada pelo programa Consed (Gordon *et al.*, 1998).

A ferramenta BLASTx (Altschul *et al.*, 1997) foi utilizada para procurar seqüências homologas aos fragmentos de *T. rubrum* gerados a partir das bibliotecas de subtração utilizando-se o banco de dados não redundante do GenBank do NCBI localizado no sítio www.ncbi.nlm.nih.gov. Foram consideradas as ESTs que revelaram um *e-value* menor que 10^{-3} . As seqüências foram também comparadas por BLASTn com as ESTs depositadas no banco de dados dbest (NCBI), sendo que, nesta análise foi considerado um *e-value* menor que 10^{-40} e similaridade acima de 70%. Os clones que não preencheram esses requisitos foram identificados como sem similaridade.

A classificação protéica dos clones encontrados foi baseada nos resultados do BLASTx e no banco de dados MIPS (*Munich Information Center for Protein Sequences*) localizado no sítio <http://mips.gsf.de/>.

3.8.14 Confirmação dos genes diferencialmente expressos

Uma vez validado o processo de subtração, através de *Reverse Northern Blotting*, foi possível selecionar clones de interesse para confirmar a sua expressão diferencial através da técnica *Northern blotting*.

Para a realização deste ensaio foi feita uma nova extração de RNA total nas mesmas condições de crescimento utilizadas anteriormente. Esta extração fez-se necessária devido à degradação do RNA extraído originalmente, mas também para verificar a reprodutibilidade do experimento.

Os RNAs extraídos foram resolvidos em gel de agarose desnaturante com formaldeído até que o corante azul de bromofenol mostrasse uma migração de aproximadamente 8 cm. Foram aplicados 15 µg de cada amostra de RNA por poço, quantificado no *GeneQuant™ calculator* (*Amersham Biosciences*). O gel contendo os RNAs foi fotografado e em seguida tratado com NaOH 50mM por 20 min e 20X SSC por 45 min, e a seguir transferido para membrana de *nylon Hybond N+* (*Amersham Biosciences*).

A normalização da quantidade de RNA aplicado por poço foi realizada por visualização das bandas de RNA ribossomal no gel de acordo com a quantificação por espectometria. O DNA foi marcado com radioisótopo α -CTP³² (> 3000 ci, *Amersham Biosciences*) como descrito no item 3.5.12 e em seguida, a sonda marcada foi purificada para remoção dos nucleotídeos não incorporados utilizando uma coluna de Sephadex G-50. A pré-hibridação e hibridação foram realizadas a 65°C. As lavagens e exposição seguiram o protocolo padrão item 3.5.10.5. As análises densitométricas, para quantificação da expressão dos genes, foram realizadas utilizando o programa Image J. Esse programa calcula o valor integrado de densidade (IDV - *integrated density value*) para cada banda que é definida com a intensidade dos pixels da região delimitada pela banda subtraída da intensidade dos pixels da coloração de fundo da coluna da banda.

Todas as etapas para a construção da biblioteca subtrativa, e da análise e confirmação dos clones obtidos estão sumarizadas na Figura 7.

Figura 7. Representação esquemática do delineamento experimental da Biblioteca Subtrativa Supressiva.

RESULTADOS

4. Resultados

O gene de *T. rubrum* homólogo ao fator de transcrição *pacC/Rim101* da conservada via de transdução de sinal em resposta ao pH ambiente foi clonado, seqüenciado e denominado de *pacC*. A clonagem foi efetuada a partir de oligonucleotídeos degenerados das regiões conservadas dos genes *pacC* de *A. nidulans* (Tilburn *et al.*, 1995), *A. niger* (MacCabe *et al.*, 1996) e *P. chrysogenum* (Suárez e Peñalva, 1996). A região amplificada pelos primers degenerados, de 219 pb foi seqüenciada e a deduzida seqüência dos aminoácidos revelou alta homologia com o *zinc finger motif* presente em vários *pacC* já sequenciados. O fragmento de 219 pb foi utilizado como sonda para triagem do gene completo em duas bibliotecas genômicas de *T. rubrum* construídas a partir do isolado clínico H6 (Fachin *et al.*, 2006). Esta triagem, revelou um clone de aproximadamente 6 Kb com uma fase aberta de leitura de 2432 pb que codifica o gene *pacC* de *T. rubrum*, interrompido por dois putativos introns (número de acesso AF363788). Com a deduzida seqüência do gene *pacC* de *T. rubrum* foi realizada a disrupção deste gene na linhagem H6 (Ferreira-Nozawa *et al.*, 2006).

4.1 Caracterização do gene *pacC* de *T. rubrum*

4.1.1 Alinhamento da proteína PacC

Baseado nos resultados obtidos por Ferreira-Nozawa (2003), foi realizado o alinhamento da seqüência deduzida de aminoácidos com outras proteínas PacC de outros fungos. Assim, o pareamento demonstra a homologia dos principais domínios da proteína PacC de *T. rubrum*, com outros membros da família *PacC/Rim101*. Os domínios representados são os prováveis *zinc fingers* de *T. rubrum* em comparação aos de outros fungos (Figura 8).

Todas as seqüências utilizadas foram retiradas do banco de dados SWISS-PROT e para o alinhamento entre as seqüências foi utilizado o programa CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994).

```

SC  LYCKWDNCGMIFNQPELLYNHLCHDHVGRKSHKNLQLNCHWGDCTTK 192
CA  FKCLWSNCNIIFETPEILYDHLCDHVGKSSNNLSLTCLWENC GTT 254
YL  LVCKWGPCGKTFGSAEKLYAHLCDAHVGRKCTHNL SLVCNWDNCGIV 192
AG  LSCLWQGCSEKCPSEALYEHVCERHVGRKSTNNLNLTCQWGSCRTT 116
AF  LSCLWQGCSEKCPSEALYDHICERHVGRKSTNNLNLTCQWGSCRTT 126
AN  LTCMWQGCSEKLPTESLYEHVCERHVGRKSTNNLNLTCQWGSCRTT 122
PC  LPCQWVGCTEKSPTAESLYEHVCERHVGRKSTNNLNLTCQWGTCNTT 104
TR  LECQWQGCQELCPTPEALYEHVCERHVGRKSTNNLNLTCGWSNCRTT 130
    : * * *      . * * * : * . * * * . : * * * * *

SC  TEKRDHITSHLRVHVPLKPFGCSTCSKKFKRPQDLKKHLKIHLESG 238
CA  TVKRDHITSHLRVHVPLKPFHCDLCPKSFKRPQDLKKH SKTHAEDH 300
YL  TVKRDHITSHIRVHVPLKPKCDFCTKSFKRPQDLKKHV KTHADDN 238
AG  TVKRDHITSHIRVHVPLKPHKCDFCGKAFKRPQDLKKH V KTHADDS 162
AF  TVKRDHITSHIRVHVPLKPHKCEFCGKAFKRPQDLKKH V KTHADDS 172
AN  TVKRDHITSHIRVHVPLKPHKCDFCGKAFKRPQDLKKH V KTHADDS 168
PC  TVKRDHITSHIRVHVPLKPHKCDFCGKAFKRPQDLKKH V KTHADDS 150
TR  TVKRDHITSHIRVHVPLKPHKCDFCGKAFKRPQDLKKH V KTHADDS 176
    * * * * * : * * * * . * . * * * * * * * * : .

```

Figura 8. Alinhamento de regiões conservadas da proteína PacC de *T. rubrum* com outros membros da família PacC/Rim101. Os resíduos de aminoácidos correspondentes às regiões dos três *Zinc Fingers* são marcados em cinza. As seqüências PacC correspondem a: SC, *Saccharomyces cerevisiae* (GenBank P33400); CA, *Candida albicans* (GenBank Q9UW14); YL, *Yarrowia lipolytica* (GenBank CAA67927); AG, *Aspergillus niger* (GenBank CAA67063); AF, *Aspergillus fumigatus* (GenBank EAL92386); AN, *Aspergillus nidulans* (GenBank CAA87390); PC, *Penicillium chrysogenum* (GenBank AAC36492); TR, *Trichophyton rubrum* (GenBank AAK35072).

4.1.2 Expressão do gene *pacC* de *T. rubrum*

Para verificar a expressão do gene *pacC* de *T. rubrum* em resposta ao pH ambiente, a linhagem H6 foi cultivada em meio líquido Sabouraud por 72 horas a 28°C e a massa micelial foi filtrada e cultivada por 1 hora em meio mínimo pH 5,0 ou pH 8,0. O RNA total foi extraído, e sua integridade foi verificada em gel.

Para realização do *northern blotting* cerca de 15 µg do RNA total foi transferido para a membrana de *nylon*, que foi pré-hibridizada como descrito no item 3.5.7.5. Após este período foi adicionada à solução um fragmento de DNA marcado radioativamente com ^{32}P (α -dCTP). Essa sonda foi obtida a partir do do gene *pacC* de *T. rubrum* amplificado com os primers mutPacC F e mutPacC R, originando um fragmento de 398 pb que engloba os três *zinc fingers*.

A hibridização da membrana de *nylon* com a sonda foi realizada por 18 horas a 65°C, sendo que após este período a membrana foi lavada, para remoção do excesso de sonda e exposta para autoradiografia. O resultado mostra a elevada expressão do gene *pacC* em pH alcalino, mas também uma expressão significativa em pH ácido (Figura 9).

Figura 9. Análise de *Northern blotting* do gene *pacC* de *T. rubrum*. O RNA total da linhagem H6 cultivada em pH 5.0 (1) e em pH 8.0 (2) foi hibridizado com um fragmento interno do gene *pacC* marcado radiotivamente. Os RNAr são mostrados para comparação das quantidades dos RNAs carregados no gel.

4.1.3 Linhagem mutante *pacC-1*

O cassete utilizado para o nocaute do gene foi construído através da sub-clonagem do fragmento contendo a sequência total do gene *pacC* de *T. rubrum* de 2,4 Kb clonado no plasmídeo pMOS a partir de um sítio único de *EcoRV*. O plasmídeo resultante foi linearizado com *Xho* I, obtendo após a digestão extremidades coesivas para a ligação do fragmento do gene de resistência a higromicina (*hygromycin B phosphotransferase-hph*) retirado do plasmídeo pCSN43 por digestão com *Sal* I (Figura 10 A). O plasmídeo resultante recebeu o nome de *ppacC-1* e assim foi utilizado para transformações no isolado clínico H6 (Ferreira-Nozawa *et al.*, 2006).

A confirmação da inserção do cassete, contendo o gene *hph*, no genoma do *T. rubrum* foi efetuada através de *Southern blotting*. Foram extraídos o DNA genômico da linhagem selvagem H6 e do mutante *pacC-1*, e clivados com a enzima *Sac* II, que cliva o gene *pacC* na linhagem selvagem H6 originando um fragmento de 1,3 Kb (Figura 10 A-I). Na linhagem mutante *pacC-1*, a clivagem com *Sac* II origina dois fragmentos um maior de 2,2 Kb e um fragmento menor de 1,5 Kb (Figura 10 A-II). O fragmento de 1,3 Kb clivado com *Sac* II a partir do plasmídeo contendo a seqüência total do gene *pacC* foi purificado e utilizado como sonda. O experimento, confirmou o nocaute gênico de *pacC* como demonstrado na Figura 10 B, através dos fragmentos de restrição.

Figura 10. Disrupção do gene *pacC* de *T. rubrum* **(A)** Representação esquemática da inserção do marcador seletivo *hph*, que confere resistência à higromicina. A seta indica o tamanho do gene e a direção da transcrição. Estão indicadas as regiões dos três *zinc fingers* (▼) e a região de sinalização da protease (■). As letras indicam sítios de restrição P: *Pvu* II, Sc: *Sac* II, X: *Xho* I. **(B)** Análise de *Southern blot* do transformante *pacC-1*. O DNA genômico das linhagens H6 (1) e *pacC-1* (2) foram digeridos com *Sac* II e hibridizados com o fragmento II. O cassete disruptor *ppacC-1* digerido com *Sac* II (3) e o fragmento II (4) foram usados como controle.

4.1.4 Análises de *Western blotting*

Com o objetivo de verificar o processamento da proteína PacC do dermatófito *T. rubrum*, em função do pH, foi realizado ensaio de *western blotting*. Através de análises *in silico*, com o auxílio do programa *GeneRunner*, verificou-se que a proteína PacC de *T. rubrum* tem 88,256 kDa.

Foram obtidos os extratos brutos da linhagem selvagem H6 e do mutante *pacC-1* de *T. rubrum*, cultivados em meio Sabouraud pH 5,0 e pH 8,0 e a proteína total foi quantificada como descrito no item 3.5.8.2. Aproximadamente 10 µg do extrato micelial obtido de cada condição foram aplicados em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% (v/v) e a eletroforese foi desenvolvida à temperatura ambiente por 2,5 horas a 20 mA. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, bloqueadas e incubadas com anticorpo anti-PacC como descrito no item 3.5.8 e dessa forma detectadas imunologicamente.

Podemos observar na Figura 11 a presença de uma banda de 88 kDa no extrato bruto da linhagem H6 em pH 5,0 e pH 8,0 que revela a versão íntegra da proteína PacC de *T. rubrum*. Também foi observado um processamento proteolítico em pH 5,0, diferente daquele do pH 8,0 para a linhagem H6. O perfil do processamento proteolítico da proteína PacC apresentado pelo mutante *pacC-1* confirma, por uma outra metodologia, o nocaute do gene *pacC* nesta linhagem.

Figura 11. Análises por *Western blotting* revelaram o processamento da proteína PacC e o efeito do nocaute do gene *pacC* na proteína PacC de *T. rubrum*. Para obtenção do extrato bruto, os micélios das linhagens H6 e mutante *pacC-1* cultivados em meio sólido Sabouraud foram transferidos para meio Sabouraud líquido tamponado em pH 8,0 (1) e pH 5,0 (2 e 3) e incubados por 72 h a 28°C. A detecção imunológica foi realizada com anti-PacC de *A. nidulans*.

4.1.5 Efeito da inativação do gene *pacC* em *T. rubrum*

4.1.5.1 Teste de patogenicidade *in vitro*

Para analisar a funcionalidade do gene *pacC* em *T. rubrum*, foi avaliada a capacidade dos conídios das linhagens selvagem e mutante germinarem em fragmentos de unha humana. Para isto, foi utilizado em todos os testes 5 µl de uma suspensão de conídios de 3×10^6 , que foi exposta nos fragmentos de unha por 1 hora e seguida da adição de 200 µl de água destilada ou de soluções pH específicos, e incubados por 6 dias a 28°C como descrito no item 3.6.

A Figura 12 mostra a diminuição na habilidade de crescimento da linhagem *pacC-1* comparada com a linhagem H6 tendo os fragmentos de unha humana como única fonte de nutriente. A Figura 12 mostra também que as linhagens foram inoculadas em meio Sabouraud na ausência de higromicina por 72 horas a 28°C apresentaram o mesmo fenótipo. Após esse crescimento, ambas as linhagens foram inoculadas em meio sabouraud na presença de higromicina (450 µg/mL) e foi verificado apenas o crescimento da linhagem mutante devido ao marcador de resistência a higromicina, o que indica que a linhagem manteve sua seletividade ao antibiótico (Figura 12).

A Figura 13 mostra o desenvolvimento das linhagens selvagem e mutante *pacC-1* em função do tempo de cultivo na unha humana. Enquanto a linhagem H6 apresenta crescimento a partir de 3 dias de inoculo, na linhagem *pacC-1* ocorre em 6 dias.

Para simular condições ácidas e alcalinas *in vitro* foram realizados experimentos, onde os 5 µL da suspensão de conídios de 3×10^6 das duas linhagens expostas nos fragmentos de unha, foram seguidas da adição de 200 µL de solução de ácido cítrico 5 mM (pH 5,0), ou solução de Hepes 5 mM (pH 8,0) e incubadas por 6 dias a 28°C. Foi observado o crescimento da linhagem H6 em ambas as condições (Figura 14). No mutante *pacC-1*, a capacidade de germinação e crescimento foi diminuída nessas condições (Figura 14). Assim a ausência da proteína PacC, afeta a habilidade de crescimento do dermatófito *T. rubrum* em fragmentos de unha *in vitro* em diferentes faixas de pH.

Figura 12. O efeito da disrupção do gene *pacC* no crescimento de *T. rubrum*. (I) Depois da incubação em unhas humanas por 6 dias a 28°C, o crescimento do fungo foi observado por microscopia. A parte escura de cada foto é a unha. (II) As linhagens foram cultivadas em meio sólido Sabouraud sem higromicina, depois foram transferidas para meio sólido Sabouraud contendo higromicina (450 µg/ml) (III). Em ambos experimentos (II e III) as linhagens foram cultivadas por 72 h a 28°C. A. sem inoculo; B. Linhagem H6; C. mutante *pacC-1*.

Figura 13. Crescimento do dermatófito *T. rubrum* em função do tempo de cultivo na unha humana como única fonte de nutriente. O tempo de incubação foi de 3 (A), 6 (B), 9 (C) e 12 (D) dias.

Figura 14. Efeito do nocaute do gene *pacC* em *T. rubrum* sob condições ácidas e alcalinas. (A) Crescimento das linhagens H6 e *pacC-1* em fragmentos de unha em solução de citrato de sódio 5 mM. (B) Crescimento de ambas as linhagens em fragmentos de unha em solução de Hepes 5 mM. Nos experimentos as linhagens foram incubadas por 6 dias a 28°C. O crescimento do fungo foi observado por microscopia.

4.1.6 Determinação da Atividade Queratinolítica

Como a ausência da proteína PacC afeta o crescimento do dermatófito *T. rubrum*, quando fragmentos de unha humana são utilizados como única fonte de nutriente, determinou-se a atividade queratinolítica extracelular das linhagens selvagem e mutante. Para isto, H6 e *pacC-1* foram cultivadas em meio de mínimo, tendo queratina como a única fonte de carbono e nitrogênio, como descrito no item 3.7. A atividade queratinolítica secretada pela linhagem *pacC-1* revelou-se cerca de 3,7 vezes menor que a da linhagem H6 [78 e 293 U/g de micélio seco/hora respectivamente para as linhagens *pacC-1* e H6 (Figura 15)].

Figura 15. Determinação da atividade queratinolítica. Foi observado a diminuição da secreção de proteases no mutante *pacC-1*, cultivado em queratina como fonte de carbono e nitrogênio, quando comparado com a linhagem H6. Os dados apresentados foram determinados a partir de três repetições paralelas.

4.1.7 Identificação de genes preferencialmente expressos em resposta a condições ácidas

A fim de se obter genes expressos em pH ácido, que supostamente podem estar envolvidos nos passos iniciais da infecção do dermatófito *T. rubrum*, foram construídas Bibliotecas de Subtração (SSH – *Supression Subtractive Hybridization*) conforme descrito por Diatchenko *et al.* (1996) e Gurskaya *et al.* (1996) e patenteada pela *BD Biosciences Clontech*. Para isto, a linhagem H6 foi exposta em condições de meio mínimo em pH 5,0 e pH 8,0 respectivamente. O tempo de exposição foi variável, sendo de 30 minutos e 1 hora nas diferentes faixas de pH, assim foram construídas 4 bibliotecas, 2 denominadas *foward* e duas denominadas de *reverse*. As bibliotecas *foward* foram confeccionadas a partir de RNAs obtidos dos cultivos em pH ácido e as bibliotecas denominadas de *reverse* em pH alcalino, como mostrado nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Descrição dos cDNAs empregados na construção das bibliotecas de subtração *forward* e *reverse*, no tempo de exposição de 30 minutos em pH ácido e alcalino.

Biblioteca <i>Forward</i> (F)		Biblioteca <i>Reverse</i> (R)	
<i>Tester</i>	<i>Driver</i>	<i>Tester</i>	<i>Driver</i>
cDNA da linhagem H6 obtido em pH 5,0 no tempo de 30 minutos	cDNA da linhagem H6 obtido em pH 8,0 no tempo de 30 minutos	cDNA da linhagem H6 obtido em pH 8,0 no tempo de 30 minutos	cDNA da linhagem H6 obtido em pH5,0 no tempo de 30 minutos

Tabela 4. Descrição dos cDNAs empregados na construção das bibliotecas de subtração *forward* e *reverse*, no tempo de exposição de 1 hora em pH ácido e alcalino.

Biblioteca <i>Forward</i> (F)		Biblioteca <i>Reverse</i> (R)	
<i>Tester</i>	<i>Driver</i>	<i>Tester</i>	<i>Driver</i>
cDNA da linhagem H6 obtido em pH 5,0 no tempo de 1 hora	cDNA da linhagem H6 obtido em pH 8,0 no tempo de 1 hora	cDNA da linhagem H6 obtido em pH 8,0 no tempo de 1 hora	cDNA da linhagem H6 obtido em pH5,0 no tempo de 1 hora

Cerca de 1 µg dos RNAs obtidos em todas as condições, foi submetido a síntese de cDNA, através da metodologia *SMART PCR cDNA Synthesis* (BD Biosciences Clontech). A hibridização subtrativa entre as populações de cDNA (*tester* e *driver*) seguida de amplificação por PCR dos genes diferencialmente expressos (PCR supressivo) foi realizada utilizando-se o kit PCR-Select® (BD Biosciences Clontech). As bibliotecas analisadas são as duas *forward*, cujos genes foram diferencialmente expressos em condições ácidas. As bibliotecas *reverse* foram utilizadas no rastreamento dos clones.

4.1.7.1 Identificação de clones diferencialmente expressos pelo *T. rubrum* após exposição de 30 minutos em pH 5,0

288 clones isolados foram distribuídos em placas de 96 poços para o cultivo e posterior amplificação por PCR. A Figura 16 mostra o tamanho do inserto de alguns desses clones. O tamanho médio dos insertos dessa biblioteca variou de 100 a 800 pb. O produto destas reações de PCR foram arranjadas em três membranas, feitas em duplicata (A e B; C e D; E e F), que foram utilizados para o rastreamento dos clones expressos preferencialmente em condições ácidas através do *Reverse Northern blotting* (Figura 17). Assim, as membranas foram hibridizadas com sondas compostas pelo produto do segundo PCR da subtração da linhagem H6 em exposição no tempo de 30 minutos em pH 5,0 (sonda pH 5,0) versus a exposta no mesmo tempo em pH 8,0 (sonda pH 8,0). Os clones que apresentaram sinais de marcação quando hibridados com a sonda pH 5,0 e não com a sonda pH 8,0, foram selecionados para o sequenciamento, os demais que tiveram sinais de marcação com a sonda alcalina foram descartados e classificados como falso positivos.

Figura 16. Amplificação dos clones por PCR. Eletroforese em gel de agarose (1%) mostrando o tamanho molecular dos insertos oriundos da SSH no tempo de 30 minutos em pH ácido. M: Marcador molecular de 1000 pb.

Figura 17. Rastreamento dos clones por *Reverse Northern blotting*. (A, C, E) Membranas fixadas com produtos amplificados por PCR originados das sequências de cDNA da Biblioteca subtrativa da linhagem H6 no tempo de exposição de 30 minutos em pH ácido e marcados com uma sonda subtraída *forward* que é enriquecida com genes expressos em pH ácido. (B, D, F) Membranas fixadas com produtos de PCR originados das seqüências de cDNA da Biblioteca subtrativa no tempo de 30 minutos em pH ácido e marcados com uma sonda subtraída *reverse* que é enriquecida com genes expressos em pH alcalino. As membranas A e B; C e D; E e F são idênticas, sendo que as sondas são diferentes.

4.1.7.2 Sequenciamento dos clones validados por *Reverse Northern blotting* e análises por Bioinformática

Foram identificados como diferencialmente expressos na varredura por *differential screening* 105 clones que foram selecionados e sequenciados. Os cromatogramas foram analisados pelo programa Phred para atribuição de qualidade as bases e o programa crossmatch foi utilizado para mascarar pedaços de vetor e adaptadores. Para o compilamento dos dados, foram realizadas as análises com o programa CAP3, que definiu um total de 30 *contigs* e 11 *singlets*. Análises desses ESTs com o programa BLASTx revelou homologia com seqüências protéicas depositadas no GenBank do NCBI. Para o processo de anotação considerou-se apenas as seqüências que tinham e-value menor que 10^{-3} . Dos 22 tipos de proteínas diferentes encontradas, 11 correspondem a proteínas hipotéticas, preditas e conservadas. Os clones que não apresentaram similaridade no banco de dados não redundante, foram analisados pelo programa BLASTn contra o dbest, na tentativa de se obter homologia com ESTs de *T. rubrum* já depositados neste banco. Como os fragmentos variam no tamanho foi considerado um e-value menor que 10^{-40} , para validação dos fragmentos encontrados. Seis ESTs foram identificadas no dbest (tabela 5).

Tabela 5. ESTs identificados por *Reverse Northern blotting* após exposição do *T. rubrum* por 30 minutos em pH 5,0.

EST	Categoria Funcional MIPS	Tamanho pb	Descrição	Organismo	Número de acesso	e-value	Número de clones
TR0104 ^a	Ciclo Celular	840	NIMA interactive protein (TINA)	<i>Emericella nidulans</i>	AAP23304.1	2e-19	10
TR0105	Elemento de retrotransposição	779	pol protein	<i>Glomerella cingulata</i>	AF264028_2	5e-42	4
TR0106	Energia	193	V-type ATPase, B subunit, putative	<i>Neosartorya fischeri</i>	XP_001260782.1	5e-21	2
TR0107	Transcrição	372	O-antigen polymerase	<i>Caulobacter sp. K31</i>	ZP_01420399.1	4e-17	1
TR0108	Síntese de Proteínas	228	60S ribosomal protein L20, putative	<i>Neosartorya fischeri</i>	XP_001263899.1	5e-11	3
TR0109	Transporte celular/ Facilitação de transporte	785	multidrug resistance protein MDR	<i>Trichophyton rubrum</i>	AF291822_1	2e-14	4
TR0110 ^a	Metabolismo não classificada	371	amino acid permease	<i>Aspergillus fumigatus</i>	XP_001246581.1	2e-26	1
TR0111		176	copper-sulfate regulated protein 1	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	ABF22673.1	7e-18	3
TR0112		583	secretion protein, putative	<i>Burkholderia thailandensis</i>	YP_443455.1	10e-3	3
TR0113		332	GABA permease, putative	<i>Neosartorya fischeri</i>	XP_001264529.1	3e-17	1
TR0114		724	Aldehyde dehydrogenase	<i>Burkholderia sp. 383</i>	YP_371113.1	3e-75	2
TR0115 ^b		853		<i>Trichophyton rubrum</i>	AJ880906	4e-49	3
TR0116 ^b		590		<i>Trichophyton rubrum</i>	DW682251	4e-73	2
TR0117 ^b		576		<i>Trichophyton rubrum</i>	DW682251	6e-72	3
TR0118 ^b		367		<i>Trichophyton rubrum</i>	DW682681	4e-38	2
TR0119 ^b		569		<i>Trichophyton rubrum</i>	DW698189	1e-109	2
TR0120 ^b		603		<i>Trichophyton rubrum</i>	DW700031	1e-100	3
TR0121		441	hypothetical protein CC_0273	<i>Caulobacter crescentus</i>	NP_419092.1	1e-28	3
TR0122		91	hypothetical protein CHGG_06789	<i>Chaetomium globosum</i>	XP_001222884.1	7e-07	3
TR0123		276	hypothetical protein CHGG_08465	<i>Chaetomium globosum</i>	XP_001226392.1	4e-10	4
TR0124		332	hypothetical protein CIMG_00654	<i>Coccidioides immitis</i>	XP_001246883.1	10e-3	3
TR0125		701	hypothetical protein CIMG_03625	<i>Coccidioides immitis</i>	XP_001244184.1	9e-49	3
TR0126		581	hypothetical protein CIMG_04011	<i>Coccidioides immitis</i>	XP_001244570.1	5e-18	3
TR0127 ^a		508	hypothetical protein CIMG_04456	<i>Coccidioides immitis</i>	XP_001245015.1	8e-34	6
TR0128		171	hypothetical protein CIMG_06490	<i>Coccidioides immitis</i>	XP_001242594.1	6e-08	3
TR0129		498	hypothetical protein CIMG_07617	<i>Coccidioides immitis</i>	XP_001240454.1	8e-07	3
TR0130		153	hypothetical protein CIMG_09433	<i>Coccidioides immitis</i>	XP_001239812.1	4e-08	1
TR0131		200	predicted protein	<i>Coccidioides immitis</i>	XP_001248691.1	1e-22	2
TR0132		281	sem similaridade				2
TR0133		148	sem similaridade				2
TR0134		251	sem similaridade				2
TR0135		581	sem similaridade				3

EST	Categoria Funcional MIPS	Tamanho pb	Descrição	Organismo	Número de acesso	e-value	Número de clones
TR0136		583	sem similaridade				2
TR0137		562	sem similaridade				2
TR0138		55	sem similaridade				1
TR0139		192	sem similaridade				1
TR0140		55	sem similaridade				1
TR0141		56	sem similaridade				1
TR0142		55	sem similaridade				1
TR0143		577	sem similaridade				1
TR0144		231	sem similaridade				1
TR0145		242	sem similaridade				1
TR0146		191	sem similaridade				1

^a transcritos validados por *Northern Blotting* (Figure 19)

^b ESTs sem similaridade no banco de dados não redundante do GeneBank, mas com homologia detectada por BLASTn no banco de dados dbest com outros depositados ESTs de *T. rubrum*. Somente os fragmentos que obtiveram um e-value of $< 10^{-40}$ foram considerados nessas análises.

Os produtos gênicos apresentados foram obtidos por análises de Blastx do banco de dados não redundante do GenBank. Somente os e-value menores que 10^{-3} foram considerados e listados na tabela.

Para avaliar a natureza dos fragmentos encontrados em pH ácido no tempo de 30 minutos, os ESTs foram classificados em classes funcionais, como listado na tabela 5 e ilustrado na Figura 18. A partir das similaridades obtidas por meio do programa BLASTx, utilizou-se para categorização funcional o banco de dados MIPS. A classe de proteínas não classificadas que apresenta a maior porcentagem de ESTs, envolve proteínas hipotéticas, conservadas e preditas, como também todos os fragmentos sem similaridade.

Figura 18. Classificação funcional dos cDNAs de *T. rubrum* originados da Biblioteca de subtração no tempo de 30 minutos em pH 5,0. A classificação foi baseada no banco de dados MIPS. As porcentagens foram calculadas de acordo com o número total de ESTs e a assinatura funcional baseou-se nos resultados encontrados no BLASTx no banco de dados não redundante.

4.1.7.3 Validação dos genes diferencialmente expressos por *Northern blotting*

Para validação dos genes encontrados na biblioteca subtrativa supressiva confeccionada a partir de cDNAs em exposição no tempo de 30 minutos em pH 5,0, foram escolhidos alguns genes e submetidos ao *Northern Blotting*. Assim, os transcritos, similares a genes que transcrevem a TINA, uma proteína interativa com NIMA de *Emericella nidulans* (TR0104), um transportador de aminoácidos (*amino acid permease*) de *Aspergillus fumigatus* (TR0110) e a uma proteína hipotética CIMG_04456 de *Coccidioides immitis* (TR0127) foram validados (Figura

19). Além disto, a modulação da expressão desses transcritos depende da proteína PacC. O transcrito TR0110 apresentou-se pouco expresso no mutante *pacC-1* em pH 5,0 comparado ao pH 8,0 e a linhagem selvagem em ambos os pHs. O transcrito TR0104 mostrou-se menos expresso no mutante *pacC-1* que na linhagem selvagem, independentemente do pHs, e o EST TR0127 apresentou-se super expresso no mutante *pacC-1*, principalmente em pH 8,0, o que não ocorreu na linhagem selvagem (Figura 19).

Figura 19. Análises de *Northern blotting* dos cDNA diferencialmente expressos em exposição no tempo de 30 minutos em pH 5,0. O RNA total de *T.rubrum* foi transferido para membranas de *nylon*. O gel corado com brometo de etídio, apresentando os RNAr, foi mostrado para comparação das quantidades do RNA aplicado. 1 e 2 representam a linhagem H6 em pH 5,0 e pH 8,0, respectivamente. 3 e 4 representam o mutante *pacC-1* em pH 5,0 e pH 8,0, respectivamente. Os gráficos mostram a expressão relativa em cada condição. Estes parâmetros foram estabelecidos por análises densitométricas usando o programa image J.

4.1.7.4 Rastreamento de clones diferencialmente expressos pelo *T. rubrum* após 1 hora em pH 5,0

Com a finalidade de analisar os clones preferencialmente expressos no tempo de 1 hora em pH 5,0 oriundos da biblioteca, 480 clones, foram arranjados em placas de 96 poços para o cultivo, em seguida foram amplificados por PCR. A Figura 20 mostra o tamanho do inserto de alguns desses clones. O tamanho médio dos insertos dessa biblioteca variou de 100 a 800 pb. O produto destas reações de PCR foram arranjados em cinco membranas, feitas em duplicata (A e B; C e D; E e F; G e H; I e J), que foram utilizados para o rastreamento dos clones expressos preferencialmente em condições ácidas através do *Reverse Northern blotting* (Figura 21). As membranas foram hibridizadas com as sondas compostas pelo produto do segundo PCR da subtração da linhagem H6 em exposição no tempo de 1 hora em pH 5,0 (sonda pH 5,0) versus a exposta no mesmo tempo em pH 8,0 (sonda pH 8,0). Os clones que apresentaram sinais expressivos de marcação quando hibridados com a sonda pH 5,0 e não com a sonda pH 8,0, foram selecionados para o sequenciamento.

Figura 20. Amplificação dos clones por PCR. Eletroforese em gel de agarose (1%) mostrando o tamanho molecular dos insertos oriundos da SSH no tempo de 1 hora em pH ácido. M: Marcador molecular de 100 pb.

Figura 21. Rastreamento dos clones por *Reverse Northern blotting*. (A, C, E, G e I) Membranas fixadas com produtos amplificados por PCR originados das sequências de cDNA da Biblioteca subtrativa da linhagem H6 no tempo de exposição de 1 hora em pH ácido e marcados com uma sonda subtraída *forward* que é enriquecida com genes expressos em pH ácido. (B, D, F, H e J) Membranas fixadas com produtos de PCR originados das seqüências de cDNA da Biblioteca subtrativa no tempo de 1 hora em pH ácido e marcados com uma sonda subtraída *reverse* que é enriquecida com genes expressados em pH alcalino. As membranas A e B; C e D; E e F; G e H; I e J são idênticas, sendo que as sondas são diferentes.

4.1.7.5 Sequenciamento dos clones e análises por Bioinformática

Foram validados por *reverse Northern Blotting*, 234 clones que foram selecionados e seqüenciados. Os cromatogramas obtidos, através do sequenciamento, foram analisados pelo programa Phred para atribuição de qualidade as bases de cada seqüência e pelo programa Crossmatch para retirada das extremidades de plasmídeo e das seqüências dos adaptadores utilizados na construção da biblioteca. As seqüências obtidas passaram por análises no programa CAP3 que definiu um total de 22 *contigs* e 167 *singlets*. Utilizando o programa BLASTx, 149 fragmentos ou 64,5 % dos ESTs demonstraram similaridades significantes com proteínas depositadas no banco de dados não redundante do GenBank no NCBI. Além disto, 85 fragmentos ou 36,5 % dos ESTs não apresentaram similaridades no banco de dados. Todos os *hits* foram considerados significativos se o *e-value* foi menor que 10^{-3} . Dos 106 tipos diferentes de proteínas encontradas, 26 são hipotéticas, preditas e conservadas. Com o intuito, de caracterizar mais ESTs da biblioteca subtrativa supressiva realizou-se com o programa BLASTn, a procura de homologia no banco de dados dbest do conjunto dos 85 fragmentos sem similaridade. Desses, 17 apresentaram homologias com ESTs de *T. rubrum* depositadas no banco, com *e-value* menor que 10^{-40} (tabela 6).

Tabela 6. ESTs identificados por *Reverse Northern Blotting* após exposição do *T. rubrum* por 1 hora em pH 5,0.

EST	Tamanho (pb)	Categoria funcional (MIPS)	Descrição	Organismo	Número de acesso	e-value	Número de clones
TR0147	147	Ciclo celular e Processamento de DNA	endochitinase 1 precursor (Complement-fixation antigen)	<i>Coccidioides immitis</i>	XP_001249024.1	2e-10	1
TR0148	320		centromere/microtubule binding protein CBF5	<i>Coccidioides immitis</i>	XP_001242479.1	1e-23	1
TR0149	170		benzoate 4-monooxygenase cytochrome P450	<i>Neosartorya fischeri</i>	XP_001257403.1	4e-16	2
TR0150	479	Resgate celular/ Defesa/ Virulência	cytochrome P450 51	<i>Coccidioides immitis</i>	XP_001240306.1	1e-63	1
TR0151	259		glutathione S-transferase	<i>Aspergillus clavatus</i>	EAW06336.1	2e-24	1
TR0152	186		BAP31 domain protein, putative	<i>Aspergillus clavatus</i>	EAW07353.1	1e-14	1
TR0153	259	Comunicação celular/ Mecanismo de transdução de sinal	SNARE protein Ufe1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	XP_755300.1	5e-09	1
TR0154	273		WD repeat protein	<i>Aspergillus clavatus</i>	EAW11296.1	4e-06	1
TR0155	249		MFS monosaccharide transporter, putative	<i>Aspergillus clavatus</i>	EAW14999.1	3e-21	1
TR0156 ^a	311	Transporte celular/ Facilitação de transporte	carboxypeptidase S1	<i>Trichophyton rubrum</i>	AAS76666.1	2e-49	1
TR0157	198		MFS peptide transporter Ptr2, putative	<i>Neosartorya fischeri</i>	XP_001262785.1	4e-16	1
TR0158	380		tubulin alpha-2 chain	<i>Coccidioides immitis</i>	XP_001247651.1	3e-16	1
TR0159	294		isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial precursor	<i>Aspergillus terreus</i>	XP_001215752.1	4e-31	1
TR0160	320		NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit B, putative	<i>Neosartorya fischeri</i>	XP_001267433.1	1e-26	1
TR0161	259		MFS phosphate transporter	<i>Aspergillus fumigatus</i>	XP_755402.1	1e-07	1
TR0162	386		peptide N-myristoyl transferase (Nmt1)	<i>Neosartorya fischeri</i>	XP_001267217.1	1e-22	1
TR0163	756		sugar transporter	<i>Neosartorya fischeri</i>	XP_001261298.1	1e-21	1
TR0164	329		tropomyosin	<i>Aspergillus clavatus</i>	EAW11835.1	9e-36	1
TR0165	712		putative signal transduction protein with Nacht domain	<i>Trichodesmium erythraeum</i>	YP_722300.1	4e-05	1
TR0166	161		DUF1665 domain protein	<i>Aspergillus clavatus</i>	EAW14714.1	7e-06	1
TR0167	270		DUF1713 domain protein	<i>Aspergillus clavatus</i>	EAW09809.1	4e-09	1
TR0168	235	Transporte celular/ Facilitação de transporte	DUF814 domain protein	<i>Aspergillus clavatus</i>	EAW07951.1	2e-08	1
TR0169	274		siderochrome-iron transporter	<i>Aspergillus fumigatus</i>	XP_748904.1	3e-20	1
TR0170	228		succinate-semialdehyde dehydrogenase	<i>Coccidioides immitis</i>	XP_001246583.1	6e-29	3
TR0171	305	Energia	plasma membrane ATPase	<i>Coccidioides immitis</i>	XP_001242392.1	6e-39	1
TR0172	191		outer mitochondrial membrane protein porin	<i>Aspergillus terreus</i>	XP_001214720.1	3e-19	1
TR0173	225		Heat shock protein 60	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	P50142	2e-14	1
TR0174	237		glycerol 3-phosphate dehydrogenase (GfdA)	<i>Aspergillus clavatus</i>	EAW08493.1	1e-19	1

EST	Tamanho (pb)	Categoria funcional (MIPS)	Descrição	Organismo	Número de acesso	e-value	Número de clones
TR0175	157	Transcrição Metabolismo	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	<i>Coccidioides immitis</i>	XP_001247826.1	5e-18	1
TR0176	381		pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit, mitochondrial precursor	<i>Coccidioides immitis</i>	XP_001248676.1	9e-28	1
TR0177	359		fibrillarin	<i>Coccidioides immitis</i>	XP_001243698.1	3e-49	1
TR0178	153		oleate delta-12 desaturase	<i>Aspergillus clavatus</i>	EAW07581.1	3e-15	1
TR0179 ^a	314		Aconitase	<i>Coccidioides posadasii</i>	ABH10644.1	4e-44	1
TR0180	190		mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase	<i>Aspergillus phoenici</i>	pir S63701	4e-15	1
TR0181	371		aspartyl aminopeptidase, putative	<i>Coccidioides immitis</i>	XP_001240451.1	3e-48	1
TR0182 ^a	323		Acetamidase	<i>Coccidioides immitis</i>	XP_001248096.1	1e-34	1
TR0183	251		Enolase	<i>Coccidioides posadasii</i>	ABH10638.1	1e-30	1
TR0184	260		delta-aminolevulinic acid dehydratase	<i>Aspergillus terreus</i>	XP_001217076.1	5e-10	1
TR0185	398	Destino de proteico	mitochondrial genome maintenance protein MGM101	<i>Aspergillus terreus</i>	XP_001213571.1	8e-49	1
TR0186 ^a	236		fatty acid desaturase	<i>Neosartorya fischeri</i>	XP_001265779.1	8e-29	2
TR0187	328		NADH-quinone oxidoreductase, putative	<i>Neosartorya fischeri</i>	XP_001265369.1	7e-30	1
TR0188	176		dihydroxyacetone kinase Daka	<i>Aspergillus fumigatus</i>	XP_753384.1	6e-11	1
TR0189	614		chitin synthase G	<i>Neosartorya fischeri</i>	XP_001263020.1	1e-10	1
TR0190	379		multicopy enhancer of UAS2	<i>Aspergillus terreus</i>	XP_001215797.1	1e-50	1
TR0191	350		acc synthase	<i>Neosartorya fischeri</i>	XP_001257553.1	3e-11	1
TR0192	220		DJ-1/PfpI family protein	<i>Neosartorya fischeri</i>	XP_001259250.1	2e-06	1
TR0193	252		alanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	<i>Coccidioides immitis</i>	XP_001248510.1	1e-18	1
TR0194	171		lysyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	<i>Coccidioides immitis</i>	XP_001247536.1	1e-20	1
TR0195	292	Síntese de proteínas	calmodulin-binding coil-coil protein	<i>Emericella nidulans</i>	AAK52822.1	4e-07	1
TR0196	304		ADP/ATP carrier protein	<i>Aspergillus nidulans</i>	XP_661668.1	4e-41	1
TR0197	206		ubiquitin conjugating enzyme (UbcB)	<i>Neosartorya fischeri</i>	XP_001263178.1	3e-08	1
TR0198	260		putative senescence-associated protein	<i>Pisum sativum</i>	BAB33421.1	4e-11	1
TR0199	290		C2 domain protein	<i>Neosartorya fischeri</i>	XP_001261302.1	1e-30	1
TR0200	152		heat shock protein hsp1	<i>Coccidioides immitis</i>	XP_001245288.1	3e-12	1
TR0201	367		ubiquitin	<i>Aspergillus clavatus</i>	EAW09700.1	3e-24	1
TR0202	270		mitochondrial ribosomal protein DAP3	<i>Aspergillus clavatus</i>	EAW11856.1	2e-13	1
TR0203	280		eukaryotic translation elongation factor 1 subunit Eef1-beta, putative	<i>Aspergillus clavatus</i>	EAW07721.1	3e-14	2
TR0204	212		60S ribosome biogenesis protein Sgt1, putative	<i>Aspergillus clavatus</i>	EAW12640.1	5e-20	1
TR0205 ^a	190		elongation factor 1-alpha	<i>Trichophyton rubrum</i>	AAM54368.1	4e-21	1
TR0206	254		seryl-tRNA synthetase	<i>Neosartorya fischeri</i>	XP_001266080.1	3e-30	1
TR0207	309		40S ribosomal protein S6	<i>Aspergillus terreus</i>	XP_001213167.1	1e-36	1

EST	Tamanho (pb)	Categoria funcional (MIPS)	Descrição	Organismo	Número de acesso	e-value	Número de clones
TR0208	223		60S ribosomal protein L12	<i>Aspergillus terreus</i>	XP_001211720.1	8e-10	6
TR0209	269		40S ribosomal protein S11	<i>Chaetomium globosum</i>	XP_001220066.1	4e-05	1
TR0210	616		60S ribosomal protein L7	<i>Chaetomium globosum</i>	AAAY86760.1	1e-13	2
TR0211	188		60S ribosomal protein L20	<i>Aspergillus terreus</i>	XP_001212923.1	9e-07	2
TR0212	176		Ribosomal L18ae	<i>Neosartorya fischeri</i>	XP_001265211.1	6e-18	1
TR0213	302		ribosomal L10 protein	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	AAO47090.1	4e-10	1
TR0214	319		60S ribosomal protein L2	<i>Talaromyces emersonii</i>	EAT90148.1	4e-23	1
TR0215	236		60S ribosomal protein L28	<i>Coccidioides immitis</i>	EAS36725.1	3e-22	2
TR0216	648		40S ribosomal protein S4, putative	<i>Neosartorya fischeri</i>	XP_001263767.1	1e-13	1
TR0217	298		60S ribosomal protein L38	<i>Neosartorya fischeri</i>	XP_001267237.1	2e-15	4
TR0218	306		60S ribosomal protein L8, putative	<i>Aspergillus clavatus</i>	XP_001242138.1	8e-29	8
TR0219	245		40S ribosomal protein S4-A-like protein	<i>Magnaporthe grisea</i>	XP_366671.1	2e-30	5
TR0220 ^a	386		60S ribosomal protein L10	<i>Neosartorya fischeri</i>	XP_001260419.1	6e-37	1
TR0221	223		60S ribosomal protein L28	<i>Coccidioides immitis</i>	XP_001248308.1	4e-25	1
TR0222	215		40S ribosomal protein S4	<i>Coccidioides immitis</i>	XP_001246620.1	1e-18	2
TR0223	635		60S ribosomal protein L15	<i>Coccidioides immitis</i>	XP_001245521.1	1e-37	1
TR0224	336		eukaryotic translation initiation factor 3 subunit EifCb, putative	<i>Neosartorya fischeri</i>	XP_001265448.1	2e-36	1
TR0225	174	Proteínas com função de ligação	GMP synthase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CAA49847.1	1e-13	1
TR0226	222		ADP-ribose pyrophosphatase	<i>Aspergillus terreus</i>	XP_001216898.1	7e-23	1
TR0227	229	Desenvolvimento	WD repeat protein	<i>Neosartorya fischeri</i>	XP_001259852.1	1e-22	2
TR0228 ^b	201	Não classificada		<i>Trichophyton rubrum</i>	DW678941	4e-73	1
TR0229 ^b	221			<i>Trichophyton rubrum</i>	DW682189	1e-76	1
TR0230 ^b	158			<i>Trichophyton rubrum</i>	DW686667	2e-49	1
TR0231 ^b	708			<i>Trichophyton rubrum</i>	DW692700	5e-63	1
TR0232 ^b	159			<i>Trichophyton rubrum</i>	DW695916	2e-40	1
TR0233 ^b	203			<i>Trichophyton rubrum</i>	DW700026	4e-70	2
TR0234 ^b	274			<i>Trichophyton rubrum</i>	DW701051	1e-55	1
TR0235 ^b	180			<i>Trichophyton rubrum</i>	DW705787	3e-55	2
TR0236 ^b	158			<i>Trichophyton rubrum</i>	DW706515	9e-49	1
TR0237 ^b	144			<i>Trichophyton rubrum</i>	DW706637	7e-43	1
TR0238 ^b	288			<i>Trichophyton rubrum</i>	DW706993	9e-41	1
TR0239 ^b	172			<i>Trichophyton rubrum</i>	DW707181	9e-46	1
TR0240 ^b	197			<i>Trichophyton rubrum</i>	DW707298	2e-53	1

EST	Tamanho (pb)	Categoria funcional (MIPS)	Descrição	Organismo	Número de acesso	e-value	Número de clones
TR0241 ^b	137			<i>Trichophyton rubrum</i>	DW708773	3e-26	2
TR0242 ^b	252			<i>Trichophyton rubrum</i>	DW709633	1e-105	1
TR0243 ^b	212			<i>Trichophyton rubrum</i>	DW710420	8e-56	1
TR0244 ^b	198			<i>Trichophyton rubrum</i>	DW710874	1e-76	2
TR0245	938		hypothetical protein CBG21336	<i>Caenorhabditis briggsae</i>	CAE73786.1	2e-05	1
TR0246	156		hypothetical protein CIMG_02363	<i>Coccidioides immitis</i>	XP_001248592.1	1e-10	1
TR0247	246		hypothetical protein CIMG_03852	<i>Coccidioides immitis</i>	XP_001244411.1	8e-05	4
TR0248	295		hypothetical protein CIMG_05388	<i>Coccidioides immitis</i>	XP_001245947.1	1e-06	1
TR0249	201		hypothetical protein CIMG_05982	<i>Coccidioides immitis</i>	XP_001242086.1	8e-07	1
TR0250	177		hypothetical protein CIMG_06605	<i>Coccidioides immitis</i>	XP_001242709.1	1e-11	1
TR0251	432		hypothetical protein CIMG_06767	<i>Coccidioides immitis</i>	XP_001242871.1	1e-23	2
TR0252	156		hypothetical protein CIMG_06851	<i>Coccidioides immitis</i>	XP_001242955.1	2e-09	1
TR0253	128		hypothetical protein CIMG_06926	<i>Coccidioides immitis</i>	XP_001243030.1	6e-08	1
TR0254	273		hypothetical protein CIMG_07255	<i>Coccidioides immitis</i>	XP_001243359.1	7e-10	1
TR0255	192		hypothetical protein CIMG_07528	<i>Coccidioides immitis</i>	XP_001240365.1	4e-06	1
TR0256	263		hypothetical protein CIMG_08652	<i>Coccidioides immitis</i>	XP_001241489.1	2e-23	1
TR0257	268		hypothetical protein CIMG_09355	<i>Coccidioides immitis</i>	XP_001239734.1	1e-32	1
TR0258	206		hypothetical protein FG03114.1	<i>Gibberella zeae</i>	XP_383290.1	3e-16	1
TR0259	1492		hypothetical protein PF14_0407	<i>Plasmodium falciparum</i>	NP_702296.1	7e-06	1
TR0260	369		predicted protein	<i>Phaeosphaeria nodorum</i>	EAT82743.1	8e-05	1
TR0261	266		predicted protein	<i>Coccidioides immitis</i>	XP_001248200.1	1e-09	1
TR0262	319		predicted protein	<i>Aspergillus terreus</i>	XP_001212323.1	4e-09	1
TR0263	287		predicted protein	<i>Aspergillus terreus</i>	XP_001210262.1	2e-11	1
TR0264	226		predicted protein	<i>Phaeosphaeria nodorum</i>	EAT82743.1	2e-07	1
TR0265	221		predicted protein	<i>Coccidioides immitis</i>	XP_001248200.1	1e - 10	1
TR0266	243		predicted protein	<i>Aspergillus terreus</i>	XP_001212323.1	7e-19	1
TR0267	369		predicted protein	<i>Aspergillus terreus</i>	XP_001210262.1	8e-05	1
TR0268	266		conserved hypothetical protein	<i>Aspergillus clavatus</i>	EAW09099.1	1e-09	1
TR0269	319		conserved hypothetical protein	<i>Coccidioides immitis</i>	XP_001247260.1	4e-09	1
TR0270	287		conserved hypothetical protein	<i>Coccidioides immitis</i>	XP_001245539.1	2e-11	1
TR0271	235		Sem similaridade				
TR0272	314		Sem similaridade				1
TR0273	625		Sem similaridade				1

EST	Tamanho (pb)	Categoria funcional (MIPS)	Descrição	Organismo	Número de acesso	e-value	Número de clones
TR0274	162		Sem similaridade				1
TR0275	195		Sem similaridade				1
TR0276	145		Sem similaridade				1
TR0277	180		Sem similaridade				1
TR0278	184		Sem similaridade				1
TR0279	106		Sem similaridade				1
TR0280	215		Sem similaridade				1
TR0281	158		Sem similaridade				1
TR0282	225		Sem similaridade				1
TR0283	274		Sem similaridade				1
TR0284	277		Sem similaridade				1
TR0285	233		Sem similaridade				1
TR0286	276		Sem similaridade				1
TR0287	191		Sem similaridade				1
TR0288	119		Sem similaridade				1
TR0289	228		Sem similaridade				1
TR0290	167		Sem similaridade				3
TR0291	56		Sem similaridade				1
TR0292	188		Sem similaridade				1
TR0293	141		Sem similaridade				1
TR0294	192		Sem similaridade				1
TR0295	348		Sem similaridade				1
TR0296	257		Sem similaridade				1
TR0297	167		Sem similaridade				1
TR0298	710		Sem similaridade				1
TR0299	135		Sem similaridade				1
TR0300	207		Sem similaridade				1
TR0301	204		Sem similaridade				1
TR0302	363		Sem similaridade				1
TR0303	473		Sem similaridade				1
TR0304	160		Sem similaridade				1
TR0305	169		Sem similaridade				1
TR0306	168		Sem similaridade				1
TR0307	223		Sem similaridade				1
TR0308	151		Sem similaridade				1

EST	Tamanho (pb)	Categoria funcional (MIPS)	Descrição	Organismo	Número de acesso	e-value	Número de clones
TR0309	167		Sem similaridade				1
TR0310	207		Sem similaridade				2
TR0311	198		Sem similaridade				1
TR0312	238		Sem similaridade				1
TR0313	253		Sem similaridade				1
TR0314	384		Sem similaridade				1
TR0315	661		Sem similaridade				1
TR0316	138		Sem similaridade				1
TR0317	201		Sem similaridade				1
TR0318	275		Sem similaridade				1
TR0319	405		Sem similaridade				1
TR0320	207		Sem similaridade				1
TR0321	237		Sem similaridade				1
TR0322	230		Sem similaridade				1
TR0323	175		Sem similaridade				1
TR0324	147		Sem similaridade				1
TR0325	307		Sem similaridade				1
TR0326	204		Sem similaridade				1
TR0327	248		Sem similaridade				1
TR0328	196		Sem similaridade				1
TR0329	729		Sem similaridade				1
TR0330	320		Sem similaridade				1
TR0331	186		Sem similaridade				1
TR0332	372		Sem similaridade				1
TR0333	209		Sem similaridade				1
TR0334	162		Sem similaridade				1
TR0335	161		Sem similaridade				1
TR0336	226		Sem similaridade				1

^a transcritos validados por *Northern Blotting* (Figura 23)

^b ESTs sem similaridade no banco de dados não redundante do GeneBank, mas com homologia detectada por BLASTn no banco de dados dbest com outros depositados ESTs de *T. rubrum*. Somente os fragmentos que obtiveram um e-value < 10^{-40} foram considerados nessas análises.

Os produtos gênicos apresentados foram obtidos por análises de Blastx do banco de dados não redundante do GenBank. Somente os e-value menores que 10^{-3} foram considerados e listados na tabela.

Com o intuito de obter uma visão da natureza dos fragmentos encontrados em pH ambiente ácido, os ESTs foram classificados em classes funcionais, como listado na tabela 6 e ilustrado na Figura 22. Para categorização funcional utilizou-se o banco de dados MIPS, a partir das similaridades obtidas por meio do programa BLASTx. A classe de proteínas não classificadas que apresenta a maior porcentagem de ESTs, envolve proteínas hipotéticas, conservadas e preditas, como também todos os fragmentos sem similaridade.

Figura 22. Classificação funcional dos cDNAs de *T. rubrum* originados da Biblioteca de subtração no tempo de 1 hora em pH 5,0. A classificação foi baseada no banco de dados MIPS. As porcentagens foram calculadas de acordo com o número total de ESTs e a assinatura funcional baseou-se nos resultados encontrados no BLASTx no banco de dados não redundante.

4.1.7.6 Validação da expressão dos genes diferencialmente expressos por *Northern Blotting*

Entre os genes isolados que se mostraram preferencialmente expressos após exposição por 1 hora em pH 5,0, foram selecionados 6, para validação por *Northern Blotting*. Os fragmentos apresentaram seqüências que codificam proteínas similares a *carboxipeptidase S1* (TR0156) de *T. rubrum*, a *acetamidase* (*acetamidase*) de *Coccidioides immitis* (TR0182), a *dessaturase* (*fatty acid desaturase*) de *Neosartorya fischeri* (TR0186), ao fator de alongamento alfa 1 (*elongation factor 1-alpha*) de *T. rubrum* (TR0205), a proteína ribossomal L10 (*60S ribosomal protein L10*) de *Neosartorya fischeri* (TR0220) e *aconitase* (*aconitase*) de *Coccidioides posadasii* (TR0179) (Figura 23). Além disto, a modulação da expressão de pelo menos três desses transcritos depende da proteína PacC. O transcrito TR0186 apresentou elevada expressão em pH 5,0 e pH 8,0 na linhagem mutante, o que não ocorreu no selvagem, o transcrito TR0220 mostrou-se super expresso no mutante *pacC-1* em pH 5,0, comparado com a linhagem selvagem, no mesmo pH e o transcrito TR0205 se mostrou menos expresso no mutante em pH alcalino que a linhagem selvagem (Figura 23).

Figura 23. Análises de *Northern Blotting* dos cDNA diferencialmente expressos em exposição no tempo de 1 hora em pH 5,0. O RNA total de *T.rubrum* foram transferidos para membranas de *nylon*, o gel corado com brometo de etídio, apresentando os RNAr, foi mostrado para comparação das quantidades do RNA aplicado. 1 e 2 representam a linhagem H6 em pH 5,0 e pH 8,0, respectivamente. 3 e 4 representam o mutante *pacC-1* em pH 5,0 e pH 8,0, respectivamente. Os gráficos mostram a expressão relativa em cada condição. Estes parâmetros foram estabelecidos por análises densitométricas usando o programa image J.

DISCUSSÃO

5. Discussão

Os microrganismos respondem às mudanças químicas e físicas do ambiente com alterações em seu padrão de expressão gênica. Essas respostas adaptativas envolvem vias metabólicas intracelulares e a síntese de moléculas que serão secretadas e que poderão modificar o ambiente, além de realizar a captação de nutrientes. Essa adaptabilidade indica a existência de mecanismos regulatórios no monitoramento das condições externas, além da provável presença de mediadores destas respostas, pois os microrganismos podem ser encontrados nos mais diferentes *habitats*, vivendo sob condições adversas de temperatura e pH.

Nos fungos dermatófitos, essa adaptação fisiológica, depende de uma adequação metabólica. Nos estágios iniciais da infecção esses fungos crescem rapidamente desencadeando a expressão de uma maquinaria metabólica e a indução de proteínas estruturais, permeases e enzimas hidrolíticas, como nucleases e queratinases, que atuam na captação de nutrientes essenciais no hospedeiro. Essa maquinaria metabólica, também responde a sinalização do pH ambiente, que permite o uso de macromoléculas pelos dermatófitos dentro de um amplo espectro de pH (Martinez-Rossi *et al.*, 2004). A síntese e secreção de enzimas proteolíticas, entre outras, com atividade ótima em pH ácido, ocorre provavelmente por que a pele humana tem pH ácido (Blank., 1939; Martinez-Rossi *et al.*, 2004).

No dermatófito *T. rubrum* o crescimento *in vitro* é dependente do pH inicial do meio de cultura, sendo ótimo em pH 4,0. Além disso, o pH é alterado durante o cultivo em meio contendo 1% de glicerol e 50 mM de glicina, atingindo valores de pH 8.3-8.9 (Ferreira-Nozawa *et al.*, 2003), o mesmo ocorre na presença de queratina (Maranhão *et al.*, 2007), produzindo um ambiente no qual a maioria das proteases queratinolíticas tem atividade enzimática ótima (Tsuboi *et al.*, 1989; Jousson *et al.*, 2004).

O modelo de Caddick e colaboradores (1986), para a regulação da expressão gênica pelo pH em *A. nidulans* propõe que a transcrição de genes “alcalinos” (genes que se expressam em pH alcalino) seja mediada pelo fator de transcrição PacC e que em pH alcalino essa proteína ativa a transcrição de genes “alcalinos” e reprime a transcrição de genes ácidos.

No fungo *C. albicans*, o fator de transcrição PacC tem relação com a patogenicidade, uma vez que as mudanças morfológicas que levam ao estado leveduriforme, patogênico, estão sob influência do pH extracelular (Buffo *et al.*, 1984; Fonzi, 1999). Outro exemplo que correlaciona este fator de transcrição e patogenicidade foi visto no patógeno de plantas, *Fusarium oxysporum*. No entanto foi proposto para esse fungo que o PacC atua como um regulador negativo de virulência em plantas, possivelmente pela prevenção da transcrição de genes ácidos, importantes para a infecção (Caracuel *et al.*, 2003). Em *Ustilago maydis*, outro patógeno de plantas, o rompimento do gene *pacC*, implicou na deficiência de secreção de proteases extracelulares (Arechiga-Carvajal e Ruiz-Herrera, 2005). Sendo assim, a relação entre a proteína PacC e patogenicidade é intrínseca e portanto o estudo funcional dessa proteína no dermatófito *T. rubrum* pode elucidar mecanismos importantes no estabelecimento da infecção.

Em *T. rubrum*, foi identificado o homólogo do gene *pacC*, que foi clonado utilizando oligonucleotídeos degenerados, desenhados para a região conservada do gene (*zinc-finger*). A região amplificada de *T. rubrum* foi utilizada como sonda para triagem em uma biblioteca de DNA genômico, da sequência completa do gene *pacC*, que codifica uma proteína com alta similaridade com outras PacC já identificadas em *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *Y. lipolytica*, *A. niger*, *A. fumigatus*, como mostrado na Figura 8. A região promotora do gene clonado contém quatro sítios de reconhecimento da proteína PacC, sugerindo que ocorre a auto-regulação deste gene. A expressão do gene *pacC* foi avaliada por *Northern blotting* (Figura 9), e revelou elevado nível transcricional em pH 8,0 comparado ao pH 5,0, resultado semelhante ao obtido com outros fungos como *A. nidulans* (Tilburn *et al.*, 1995), *C. albicans* (Davis *et al.*, 2000), *Y. lipolytica* (Lambert *et al.*, 1997), *A. niger* (MacCabe *et al.*, 1996) e *Sclerotia sclerotiorum* (Rollins, 2003). O RNAm de *pacC* está presente em todos os valores fisiológicos de pH, mas a proteína PacC estimula a própria transcrição em condições alcalinas, o que também deve acontecer no dermatófito *T. rubrum* (Ferreira-Nozawa *et al.*, 2006), explicando a diferença observada em ambos pH (Figura 9).

Para investigar a funcionalidade do gene *pacC* no dermatófito *T. rubrum*, foi realizado o nocaute gênico. A disrupção da linhagem mutante *pacC-1* foi

confirmada por *Southern blotting* (Figura 10) e por *Western blotting*, que mostra a ausência da proteína PacC no extrato bruto da linhagem mutante *pacC-1* de *T. rubrum* (Figura 11). O *Western blotting* também revelou a versão íntegra da proteína PacC de 88 kDa na linhagem H6 e um processamento proteolítico desta proteína em pH 5,0 (Figura 11), o que não ocorre em *A. nidulans*, onde a proteólise na região C-terminal da proteína PacC acontece só em pH alcalino, originando uma forma curta e funcional de 28 kDa que ativa a transcrição de genes expressos em pH alcalino (Orejas *et al.*, 1995).

No entanto, em *C. albicans*, o homólogo do fator de transcrição PacC, o Rim101p, sofre um processamento em pH ácido, ainda não descrito em outros fungos e origina uma forma de 65 kDa, diferente do que ocorre em pH 8,0, onde o peso molecular é de 74 kDa, que é requerida para mudanças na expressão gênica em condições alcalinas. Sendo assim, em *C. albicans* a via de sinalização do pH está envolvida em respostas independentemente do pH alcalino, e também, em outros processos de resistência a higromicina e cloreto de lítio (Li *et al.*, 2004). Além disso, dados obtidos por *microarrays*, demonstraram que o RIM101p governa a expressão de 70 genes que não são regulados pelo pH (Bensen *et al.*, 2004). A forma de 65 kDa pode promover mudanças na expressão gênica que governam essas respostas (Li *et al.*, 2004). Os resultados preliminares demonstrados por *Western blotting* em *T. rubrum* revelaram um processamento diferente em condições ácidas, como em *C. albicans*, o que nos leva a sugerir a existência de uma hipotética função da proteína PacC em pH ácido no dermatófito *T. rubrum*.

A partir da confirmação do nocaute do gene *pacC*, as linhagens H6 e mutante *pacC-1* foram submetidas a testes de patogenicidade *in vitro* para avaliação da capacidade de crescimento das linhagens em fragmentos de unha humana. Vários testes foram realizados e o rompimento do gene *pacC*, culminou com a diminuição da habilidade do mutante *pacC-1* crescer em fragmentos de unha humana como única fonte de carbono e nitrogênio (Figura 12 e 13). Avaliou-se ainda, a capacidade de crescimento das linhagens H6 e mutante *pacC-1* em fragmentos de unha em condições ácidas e alcalinas. Em ambas as condições, o mutante *pacC-1* obteve acentuada diminuição de crescimento, comparada a H6 (Figura 14). Esses resultados revelam que o

nocaute do gene *pacC* afeta a capacidade infectante e sugere a diminuição da secreção de proteases secretadas pelo *T. rubrum*.

Para investigar essa relação, realizou-se um ensaio da atividade queratínolítica, a fim de medir a quantidade de proteases secretadas. Nesses ensaios, o dermatófito *T. rubrum* foi cultivado, em meio líquido suplementado com queratina como única fonte de nutrientes. A linhagem mutante *pacC-1* apresentou diminuição de 3,7 vezes na secreção de proteases queratínolíticas (Figura 15), quando comparada com a linhagem H6, sugerindo que essas proteases secretadas pelo dermatófito *T. rubrum*, são de alguma forma, reguladas pela proteína PacC. De fato, proteases com atividade queratínolítica são indispensáveis para a utilização de queratina como fonte de nutrição, porque *T. rubrum* falhou no crescimento em fragmentos de unha na presença de PMSF, um inibidor de serina-queratinases (Takasuka, 2000). Torna-se clara a indicação de que proteases com atividade queratínolítica, são necessárias para a utilização de fragmentos de unha como fonte de nutrição (Takasuka, 2000).

Além disso, *T. rubrum* é dependente do pH ácido inicial para o crescimento, alcalinizando o pH do meio durante o cultivo (Ferreira-Nozawa *et al.*, 2003). Portanto, a secreção de enzimas queratínolíticas e proteolíticas ocorre em estágios iniciais da infecção provavelmente porque a pele humana tem pH ácido (Blank, 1939; Martinez-Rossi *et al.*, 2004). É importante salientar que proteases com atividade ótima sob condições ácidas são importantes fatores de virulência nos dermatófitos (Tsuboi *et al.*, 1989). Tal evidência sugere, que esse tipo de proteases também podem ser controladas por PacC, devido a incapacidade de crescimento da linhagem mutante *pacC-1* em fragmentos de unha em condições ácidas (Figura 14 A). Segundo Monod *et al.* (2005) essas proteases agem em substratos queratinizados ou não do *stratum corneum*, liberando peptídeos que são hidrolisados em aminoácidos por algumas peptidases. Os aminoácidos liberados nesse processo podem reprimir a síntese de proteases não específicas e induzir a síntese de queratinases (Apodaca e McKerrow, 1989). Além disso, a metabolização de alguns aminoácidos pelos fungos, como glicina, por exemplo, causa a alcalinização do meio de crescimento elevando os valores de pH em torno de 9.0 (Thedei *et al.*, 1994), um ambiente onde a maioria das proteases queratínolíticas conhecidas

tem atividade enzimática ótima (Apodaca e McKerrow, 1989; Jousson *et al.*, 2004). Estes achados sugerem que a secreção de queratinases em pH alcalino é necessária para que os dermatófitos completem a instalação e permaneça no hospedeiro. A linhagem mutante *pacC-1* demonstrou-se incapaz de crescer em fragmentos de unha em condições alcalinas (Figura 14 B), além disso, essa mesma linhagem foi ineficiente na secreção de proteases queratinolíticas em pH alcalino (Figura 15).

A maneira pela qual a proteína PacC age no controle da secreção de proteases queratinolíticas ainda não está esclarecido, podendo acontecer no controle da expressão de genes que codificam essas proteínas. Em *A. nidulans*, por exemplo, o fator de transcrição PacC é relacionado à regulação da expressão de uma protease alcalina em resposta a pH ambiente alcalino, codificada pelo gene *prtA* (Tilburn *et al.*, 1995). Por outro lado, em *N. crassa* uma das respostas metabólicas ao pH extracelular é a glicosilação das enzimas secretadas dependentes do pH ambiente. Por exemplo, a fosfatase alcalina Pho-2 sintetizada em pH alcalino difere da sintetizada em pH ácido somente nos níveis de glicosilação (Nozawa *et al.*, 2002). No entanto em *A. nidulans* a glicosilação das fosfatases secretadas é mediada pela conservada via de sinalização do pH, que é composta pela proteína PacC (Nozawa *et al.*, 2003a). Assim, em *T. rubrum*, a diminuição da secreção de proteases queratinolíticas na ausência da proteína PacC se deve a sua dependência na regulação da expressão dos genes que sintetizam essas proteases ou nas modificações pos-transducionais.

O crescimento das linhagens H6 e *pacC-1*, em meio sólido Sabouraud não revelou diferenças significativas (Figura 12-II). No *basidiomiceto* *U. maydis* a disrupção do *RIM101* também não afetou o crescimento do mutante em condições ácidas ou alcalinas de pH (Arechiga-Carvajal e Ruiz-Herrera, 2005), o que acontece também em outras espécies, como *C. albicans*, *S. cerevisiae*, *A. niger* e *S. sclerotiorum* (Davis *et al.*, 2000; Li e Mitchell, 1997; MacCabe *et al.*, 1996 e Rollins *et al.*, 2001). Isto sugere que o gene *pacC* é dispensável para o crescimento micelial também de *T. rubrum*, nas condições utilizadas. Por outro lado, a capacidade de conidiação do mutante *pacC-1* foi bastante afetada, acarretando uma marcante redução do número de conídios e sugerindo portanto o envolvimento deste gene na conidiação. Também em *C.*

albicans a proteína RIM101 é requerida para filamentação que é dependente do pH; a via de sinalização Pal/RIM está envolvida na capacidade dimórfica desse fungo (Ramon *et al.*, 1999).

Finalmente, com base nos resultados obtidos, podemos concluir que a proteína PacC participa do mecanismo de patogenicidade do dermatófito *T. rubrum*. Além disto, um ortólogo do gene *palA*, que participa da via de sensoramento do pH ambiente em *A. nidulans*, foi detectado em *T. rubrum* (DW99437, e-value 3^{-25}). Este EST se encontra depositado no dbest do NCBI (Wang *et al.*, 2006). O rompimento do gene *pacC* está correlacionado com a alteração na capacidade de secreção de proteases com atividade queratinolítica e na conidiação, e conseqüentemente, na diminuição da habilidade de crescimento em fragmentos de unha humana. Dessa forma a secreção de algumas enzimas proteolíticas dependentes de PacC faz-se necessária para que os dermatófitos completem seu processo de instalação e permaneçam no hospedeiro.

Identificação de genes preferencialmente expressos nos passos iniciais da infecção

Um dos principais fatores de patogenicidade dos dermatófitos é a capacidade de aderir às superfícies celulares. Uma vez estabelecidos, buscam nutrientes para o crescimento, desencadeando uma maquinaria metabólica essencial para a instalação no hospedeiro. Uma das principais barreiras enfrentadas por esses fungos é o pH ácido da pele. A maquinaria metabólica que governa as respostas desses organismos no sensoramento do pH está intrinsecamente relacionada com sua capacidade infectante. O estudo dessas adaptações pode revelar como os dermatófitos conseguem ultrapassar essa barreira, visando sua fixação no hospedeiro. Sendo assim, a identificação da expressão diferencial de genes possibilita o entendimento do mecanismo molecular envolvido neste processo.

Várias metodologias são utilizadas para revelar a modulação do padrão de expressão gênica nas respostas adaptativas. O sequenciamento de ESTs em larga escala, por exemplo, é útil na identificação de genes desconhecidos expressos em uma determinada célula. Uma das principais metodologias utilizadas são cDNA *microarrays* cuja a expressão dos RNAs mensageiros de

milhares de genes pode ser mensurada simultaneamente. O problema para o uso desta tecnologia é o custo e o prévio conhecimento dos genes a serem estudados, ou seja, é necessário que a espécie tenha tido o genoma ou um grande conjunto de ESTs sequenciados. A metodologia de SAGE (Veuculescu *et al.*, 1995) (análise em série da expressão gênica), também quantifica cada gene expresso em determinado tipo celular, ou sob determinada condição ambiental, mas precisa do prévio conhecimento do genoma. Outra importante metodologia é a Hibridização Subtrativa Supressiva (Diatchenko *et al.*, 1996), que permite a comparação de duas populações de RNAm e identifica os transcritos preferencialmente expressos em uma das populações, não necessita do conhecimento prévio dos genes e permite identificar seqüências de maior ou menor abundância.

Experimentos utilizando a metodologia de Bibliotecas de subtração estão sendo utilizados na busca de genes envolvidos na patogenicidade e virulência em fungos. No fitopatógeno *Alternaria brassicicola* foram identificados genes especificamente expressos durante a patogênese em *Arabidopsis thaliana*, o que permitiu revelar a estratégia de infecção desse fungo na planta (Cramer e Lawrence, 2004). No patógeno humano *Paracoccidioides brasiliensis*, Bailão *et al* (2006), identificaram genes candidatos a serem expressos na adaptação da infecção, estabelecendo uma visão transcricional das respostas nas interações patógeno hospedeiro.

Em *T. rubrum*, a construção de uma Biblioteca Subtrativa Supressiva, possibilitou o isolamento de 39 transcritos durante a exposição do fungo às drogas acriflavina, fluconazol, griseofulvina, terbinafina e ácido udecanóico. Este resultado permitiu inferir o papel funcional dos genes e um melhor entendimento nos mecanismos de ação dessas drogas e adaptação do fungo nas respostas a estresses citotóxicos (Paião *et al.*, 2007). Também em *T. rubrum*, foram isolados 28 transcritos únicos diferencialmente expressos a partir do crescimento do fungo em queratina, assim, os genes encontrados codificam proteínas provavelmente relevantes na instalação e permanência da infecção. Os autores verificaram o pH do meio contendo queratina após 72 horas de crescimento, que variou atingindo um valor maior que 8.0, e esta condição foi utilizada como *tester* na confecção da Biblioteca Subtrativa Supressiva (Maranhão *et al.*, 2007).

O pH alcalino é a condição onde a maioria das proteases queratinolíticas tem atividade ótima e a secreção dessas enzimas possibilita a obtenção de nutrientes (Apodaca e McKerrow, 1989; Jousson *et al.*, 2004). O dermatófito *T. rubrum in vitro*, necessita do pH ácido inicial para o crescimento, alcalinizando o pH do meio durante o cultivo (Ferreira-Nozawa *et al.*, 2003), mimetizando o que ocorre no início da infecção, considerando o pH ácido da pele. As respostas metabólicas que governam essas alterações de pH em *T. rubrum*, ainda estão pouco esclarecidas.

A fim de contribuir para desvendar os mecanismos regulatórios envolvidos na capacidade de infecção de *T. rubrum*, supostamente regulados em resposta ao pH ácido, propusemos o estudo da expressão gênica deste fungo em função do pH 5,0. Para isso, construímos bibliotecas subtrativas, com o objetivo de identificar os genes preferencialmente expressos em condição ácida e que podem ser essenciais nos passos iniciais da infecção.

As bibliotecas foram construídas utilizando como *tester* os cDNAs da linhagem H6 exposta em meio mínimo pH 5,0 nos tempos de 30 minutos e 1 hora. Com o objetivo de reduzir a necessidade de sequenciamento realizou-se um rastreamento das bibliotecas através de *Reverse Northern blotting* (Figura 17 e Figura 20). Foram rastreados 105 clones no tempo de 30 minutos e 234 clones no tempo de 1 hora e em seguida seqüenciados.

Dentre os genes encontrados em ambas as bibliotecas, 9 foram escolhidos para validação da expressão diferencial por *Northern blotting*. A fim de investigar a relação da proteína PacC, nas adaptações de *T. rubrum* em pH ácido, utilizou-se também a linhagem mutante *pacC-1* nestas validações.

O transcrito **TR0186** é similar ao gene que codifica uma enzima responsável pela dessaturação de ácidos graxos (*fatty acid dessaturase*) em *Neosartorya fischeri*. Os ácidos graxos poli-insaturados são os maiores componentes das membranas eucarióticas, e são produzidos a partir dos ácidos graxos mono-insaturados pela ação de várias dessaturases em muitos fungos. Vários fatores ambientais, como temperatura e limitação de nutrientes, fazem com que esses organismos modifiquem a composição de ácidos graxos para manutenção da fluidez da membrana, necessária para a adaptação a novos ambientes. Células cultivadas em baixa temperatura contêm grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados em seus lipídeos totais, para

compensar a diminuição na fluidez na membrana resultante da baixa temperatura (Prasad *et al.*, 1996).

Em *A. nidulans* a deleção do gene *odeA*, que codifica a Δ -12 dessaturase que converte ácido oléico para ácido linoléico, originou uma linhagem com falta de ácidos graxos poli-insaturados, acarretando redução da conidiação e do crescimento micelial (Calvo *et al.*, 2001). No patógeno *A. parasiticus*, o rompimento desse mesmo gene também afetou a biossíntese de ácido graxos e resultou na falta de germinação dos esporos, reduzido crescimento, e diminuição da capacidade de colonização do hospedeiro (Wilson *et al.*, 2004). Em *P. brasiliensis* é induzida a expressão de um transcrito que codifica uma dessaturase durante o processo de transição micélio para levedura, sugerindo a ativa modulação da membrana durante esse evento morfogênico (Bastos *et al.*, 2007). Assim, a expressão aumentada do transcrito **TR0186** correspondente a uma dessaturase (Figura 23) em *T. rubrum*, sugere que ocorre um remodelamento da membrana em pH ambiente ácido, que pode estar relacionado na sua adaptação no hospedeiro. A identificação do transcrito **TR0178**, que apresenta similaridade com o gene que codifica uma oleato delta 12 dessaturase de *Aspergillus clavatus* reforça essa hipótese. Além disso, há um descontrole na transcrição desse gene na linhagem mutante *pacC-1*, o que sugere o envolvimento da proteína PacC nesses processos em *T. rubrum*.

O transcrito **TR0110** é similar ao gene que codifica um transportador de aminoácidos (*amino acid permease*) em *A. fumigatus*. Em fungos esses transportadores fazem a controlada e seletiva mediação dos aminoácidos utilizados na biossíntese de proteínas ou usados como fonte de carbono e nitrogênio por esses organismos. Baseado nas suas características funcionais e estruturais, a maioria dos transportadores de aminoácidos de fungos, pode ser classificado em duas famílias; AAP (*amino acid permease*) ou AAP (Amino Acid/Auxin Permease) (Trip *et al.*, 2004). Em *N. crassa* três sistemas de transporte foram identificados, o sistema I (representando a família AAP) transporta aminoácidos neutros e aromáticos, o sistema III (família AAP) é responsável pela mediação de aminoácidos básicos, enquanto o sistema II (família AAP) dá suporte no transporte de todos os aminoácidos exceto prolina (DeBusk e DeBusk, 1980; Pall, 1970). No fungo patógeno *P. brasiliensis* o

gene que codifica uma AAP ácida foi super expresso em células de leveduras incubadas em sangue humano e podem mediar a captação de glutamato e aspartato, resultando na deposição de chitina (Bailão *et al.*, 2006). Em *Fusarium proliferatum*, o gene *Fpmtr1* (AAP) tem elevada expressão durante a germinação dos conídeos. O rompimento do gene diminui a capacidade endofítica interferindo na patogenicidade desse fungo. Além disso, o mutante mostrou menor capacidade de adaptação em ambientes com escassez de nutrientes (Jeney *et al.*, 2007). A indução do transcrito **TR0110** em *T. rubrum* exposto em pH ácido (Figura 19) pode estar relacionada à captação de aminoácidos necessários na síntese de proteases, essenciais para instalação da infecção. Além disso, na linhagem mutante a expressão do **TR0110** é diminuída em pH 5,0 (Figura 19), sugerindo o envolvimento da via de sinalização do pH no controle transcricional da AAP.

O transcrito **TR0104** apresenta homologia a um gene que codifica uma proteína denominada TINA (*NIMA interactive protein*) em *Emmericella nidulans* e que interage com NIMA (*Never in mitosis A*). Essa proteína está envolvida na divisão celular e duplicação do DNA. Em *A. nidulans* a TINA interage com a proteína NIMA, regulando negativamente os microtúbulos astrais durante a metáfase. Esta proteína se desloca para as fibras do fuso do corpúsculo polar durante a mitose e sua inativação provoca um aumento da produção de microtúbulos astrais (Osmani *et al.*, 2003). Em *T. rubrum* a TINA apresentou elevada expressão quando o fungo foi submetido a concentrações sub-inibitórias das drogas fluconazol, griseofulvina e terbinafina, indicando que essa proteína é importante no processo adaptativo a condições de estresses (Paião *et al.*, 2007). Em nosso trabalho, foi verificada a maior expressão do gene similar a TINA, em condições ácidas sugerindo a importância dessa proteína nas respostas adaptativas, em *T. rubrum*. Além disso, na linhagem mutante *pacC-1* esse transcrito apresentou reprimida expressão em ambos pH, o que sugere o envolvimento da proteína PacC em sua transcrição (Figura 19).

O transcrito **TR0179** é similar ao gene que codifica uma aconitase em *Coccidioides posadasii*. Essa enzima catalisa a isomerização reversível do citrato a isocitrato no ciclo do ácido cítrico (Beinert *et al.*, 1996). As aconitases contêm um grupo [4Fe-4S] que não só participa no transporte de elétrons, mas também serve como sensor de ferro e oxigênio na célula. Essa atividade

binária é exercida através da montagem e desmontagem dos grupos de ferro e enxofre (Beinert *et al.*, 1997; Kang *et al.*, 2003). Além disso, em procariotos e eucariotos, as aconitases regulam pos-transcricionalmente genes que codificam proteínas responsivas ao ferro, incluindo ferritina e o receptor transferrina. Em ambientes ácidos o ferro é estabelecido na forma solúvel Fe^{2+} , se acumulando nas células e gerando estresse oxidativo (Bensen *et al.*, 2004). Em *C. Albicans* foi encontrada uma ORF que codifica a aconitase, diferencialmente expressa em pH ácido que pode ser importante nas adaptações ao excesso de ferro (Bensen *et al.*, 2004). Em *T. rubrum*, a elevada expressão do transcrito **TR0179** (Figura 23), em ambiente ácido, considerando o pH da pele, sugere a importância desse gene nas respostas adaptativas no hospedeiro. Não foi detectado o envolvimento da proteína PacC na transcrição deste gene.

O transcrito **TR0205** tem homologia a um gene que codifica um fator de alongamento alfa 1 (*elongation factor 1-alpha*) EF1A do próprio *T. rubrum*. Esse fator, é essencial para transferência do RNA transportador aminoacil (aa-tRNA) durante a fase de alongamento das cadeias polipeptídicas na tradução de proteínas (Riis *et al.*, 1990; Merrick, 1992). O EF1A liga-se no aa-tRNA e GTP para formar um complexo ternário (EF1A/GTP/aa-tRNA) que transfere aa-tRNA no sítio A do ribossomo. Seguindo a hidrólise de GTP, o EF1A-GDP deixa o ribossomo. Este evento permite o correto posicionamento do aa-RNAt no sítio A do ribossomo em resposta ao perfeito reconhecimento códon-anticódon, importante na exatidão da tradução (Lamberti *et al.*, 2004). O EF1A também está envolvido em outros processos celulares como, degradação de proteínas mediada por ubiquitina, ligante de calmodulina e actina, funções essas observadas em eucariotos superiores (Lamberti *et al.*, 2004). Entretanto, em *S. cerevisiae*, o EF1A também exerce o papel de ligante de actina e realiza o empacotamento dessa proteína afetando o citoesqueleto. Em *T. rubrum*, esse fator de alongamento é induzido em pH ácido (Figura 23), sugerindo a síntese de proteínas necessárias nas respostas adaptativas, como as proteases que são essenciais nos passos iniciais da infecção. Aparentemente a expressão deste transcrito não sofre influência da proteína PacC em pH ácido.

A EST **TR0220** tem similaridade a um gene que codifica uma proteína ribossomal L10 (*60S ribossomal protein L10*) em *Neosartorya fischeri*. Na

levedura *S. cerevisiae* essa proteína é componente da subunidade maior do ribossomo e exerce várias funções como regulador traducional (Koller *et al.*, 1996) processamento de RNAr e a junção das subunidades 60S e 40S (Pachler *et al.*, 2004). Em *T. rubrum* foi confirmada a expressão preferencial da EST **TR0220** em pH ácido, além disso, sob condições ácidas, a linhagem mutante *pacC-1* apresenta maior indução da transcrição que o selvagem (Figura 23), sugerindo o controle negativo de PacC na expressão deste transcrito em pH ácido.

Vale salientar a identificação de várias ESTs envolvidas na biossíntese de proteínas, além da **TR0218**. Estes genes codificam proteínas similares as proteínas ribossomais 60S L2 (**TR0214**), L7 (**TR0210**), L10 (**TR0213**), L12 (**TR0208**), L15 (**TR0223**), L20 (**TR0211**), L28 (**TR0215**), L38 (**TR0217**) e também os genes que codificam as ribossomais 40S S4 (**TR0216**), S11 (**TR0209**) e S6 (**TR0207**) mostrados na tabela 6. A indução dessas proteínas em pH ambiente ácido pode ser consequência da necessidade do aumento na biossíntese de proteínas, no recrutamento da maquinaria celular, importante nas respostas adaptativas de *T. rubrum*, essenciais na patogenicidade, na síntese de transportadores e enzimas necessárias na captação de nutrientes.

O transcrito **TR0182** é similar a um gene que codifica a uma acetoamidase em *Coccidioides immitis*. Essa enzima faz parte do metabolismo do acetato e hidrolisa acetoamida, liberando acetato e amônia (Hynes *et al.*, 1977; Marzluf, 1997). Nos fungos, o acetato, é catalizado pela acetil CoA sintase em acetil CoA (Todd *et al.*, 1998), e a geração de acetil CoA citoplasmático promove a alcalinização do meio de crescimento (Teddei *et al.*, 1994). Por outro lado, no fungo *Coccidioides posadasii* a fase micelial, em ambiente ácido, é induzida à liberação de íons amônio e amônia para alcalinização do ambiente extracelular nos locais da infecção fúngica, causando danos no tecido hospedeiro (Mirbod-Donovan *et al.*, 2006). Portanto, a expressão elevada do transcrito **TR0182** sob condições ácidas (Figura 23) em *T. rubrum* pode estar contribuindo na alteração do pH ambiente, necessária para atividade ótima da maioria das proteases queratínolíticas.

O transcrito **TR0156** tem alta similaridade ao gene que codifica uma serina carboxipeptidase (*carboxipeptidase S1*) do próprio *T. rubrum*. Essas enzimas são exopeptidases, amplamente difundida em fungos, que funcionam

na degradação de peptídeos, a fim de fornecer aminoácidos para suprir a falta de nutrientes e também na patogenicidade (Breddan, 1986). Em *Aspergillus spp*, *Penicillium janthillenium* e *Mucor racemosus* essas enzimas tem atividade ótima em pH 5,0 e são conhecidas como carboxipeptidases ácidas, oposto das metalloproteases que hidrolisam peptídeos em pH básico (St Leger *et al.*, 1994). Sendo assim, torna-se clara a elevada expressão desse transcrito **TR0156** em *T. rubrum* sob condição ácida (Figura 23), considerando que essa proteína tem atividade em pH 5,0. Além disso, é evidente seu envolvimento na patogenicidade durante a instalação no hospedeiro, para suprir a falta de aminoácidos na ausência de nutrientes. A transcrição deste gene não é dependente de PacC (Figura 23).

A EST **TR0127** que apresenta alta similaridade com o gene que codifica uma proteína hipotética em *Coccidioides immitis* (*hypothetical protein CIMG_04456*) teve sua super expressão validada em pH ácido. Além disso, na linhagem *pacC-1*, esse transcrito apresenta elevada expressão em pH 8,0, sugerindo que este gene seja controlado pela proteína PacC pelo menos em condições alcalinas (Figura 19). Sendo assim, obtivemos a primeira caracterização dessa EST, ou seja, é um gene que se expressa preferencialmente em pH ácido e é controlado pela proteína PacC.

Também a presença das aminoacil-tRNA synthetases **TR0193** e **TR0194** são importantes componentes da maquinaria de tradução. Essas proteínas são responsáveis por ligarem seus tRNAs cognatos com o aminoácido correto (O'Donoghue & Luthey-Schultlen, 2003). O **TR0205** similar ao fator de alongamento alfa 1 (*elongation factor 1-alpha*) EF1A, já mencionado entre os confirmados, capta e transfere esses aa-tRNAs aos ribossomos, durante o alongamento das cadeias polipeptídicas.

Os transcritos **TR0173** e **TR0200** que são similares a HSPs (proteínas de choque térmico) estão envolvidas na proteção contra diversas condições de estresse, incluindo resistência à drogas (Karababa *et al.*, 2004), e podem estar relacionadas à virulência do dermatófito *T. rubrum*.

Também foram identificados proteínas de transporte, como o **TR0106** e o **TR0171** que são similares a transportadores do tipo H⁺ ATPase localizadas na membrana plasmática das células. Estas proteínas estão envolvidas no bombeamento de prótons para o meio extracelular, mantendo o gradiente

eletroquímico necessário para o transporte de íons e nutrientes e desempenhando um importante papel na regulação do pH intracelular (Perlin *et al.*, 1989). A EST **TR0109** codifica um transportador de resistência a múltipla drogas MDRs (*multidrug resistance protein MDR*) (Fachin *et al.*, 2006) que promove o efluxo de várias drogas em *T. rubrum*. Também foram revelados os transcritos **TR0157** que codifica um transportador de peptídeos e **TR0161** que codifica um transportador de fosfato, pertencentes à superfamília de facilitadores transmembrana MFS. O envolvimento de transportadores na patogenicidade já foi descrito em fungos fitopatogênicos (Urban *et al.*, 1999), e essas proteínas podem desenvolver papel semelhante no *T. rubrum*.

Ainda a EST **TR0113** que codifica um transportador de GABA (*GABA permease*). A captação desse composto metabólico em *A. nidulans* ocorre principalmente por esse transportador, codificado pelo gene *gabA*, que é transcrito predominantemente sob condições ácidas (Caddick *et al.*, 1986). A transcrição do gene *gabA* é reprimida pela proteína PacC em condições alcalinas (Espeso e Arst, 2000). Em *T. rubrum* a expressão desse gene também ocorre em ambiente ácido, e pode sofrer regulação de acordo com o pH.

O transcrito **TR0151** é similar ao gene que codifica uma glutathione-S-transferase em *A. clavatus*. Essas enzimas auxiliam no metabolismo de compostos tóxicos ao catalisar a transferência de toxinas a uma molécula de glutathione. A molécula de glutathione possibilita que a célula possa exportar a toxina conjugada. Em fungos fitopatógenos como *Botrytis cinerea* essa enzima tem sido considerada um possível fator de virulência, pois permite que o fungo tolere a compostos tóxicos produzidos pelas plantas (Prins *et al.*, 2000). Em *T. rubrum* esta proteína pode ser importante no processo de instalação no hospedeiro.

Os dados obtidos através das Bibliotecas de Subtração possibilitaram uma visão “panorâmica” da expressão gênica em pH ambiente ácido nos tempos de 30 minutos e 1 hora, revelando genes envolvidos no metabolismo, transporte celular, síntese e destino proteico, defesa e virulência entre outras. Assim foi possível, desvendar um pouco mais a respeito da maquinaria necessária na adaptação de *T. rubrum* envolvidas na resposta ao pH extracelular. Considerando o pH ácido da pele, os genes encontrados devem

participar na instalação da infecção e, portanto são importantes na capacidade infectante do dermatófito. Revelamos ainda uma grande variedade de transcritos, cujas funções são desconhecidas. É provável que esses RNA mensageiros sejam exclusivos de *T. rubrum*, e também podem desempenhar um importante papel na regulação da expressão em resposta ao pH extracelular.

Ainda foi possível por meio das análises de *Northern blotting* determinar que o regulador transcricional PacC pode estar ativo em condições ácidas em *T. rubrum*.

CONCLUSÕES

6. Conclusões

- ❖ A utilização da Biblioteca Subtrativa Supressiva permitiu a identificação de um perfil de expressão gênica responsivo ao pH ambiente ácido e que possivelmente está envolvido nos passos iniciais da infecção em *T. rubrum*. Esses transcritos codificam proteínas que atuam no metabolismo, ciclo celular, transporte celular, defesa/virulência, síntese e destino protéico. Além disto, vários deles não têm similaridade nos bancos de dados.
- ❖ Os genes de *T. rubrum* que codificam dessaturase, transportador de aminoácidos, a proteína ribossomal L10, um fator de alongamento alfa 1, a proteína TINA e uma proteína hipotética, estão sob a influência direta ou indireta da proteína PacC.
- ❖ O gene *pacC* de *T. rubrum* se expressa preferencialmente em pH alcalino. O padrão de processamento da proteína PacC é dependente do pH e a forma íntegra desta proteína foi detectada tanto em pH ácido como alcalino.
- ❖ A capacidade de infecção do dermatófito *T. rubrum* está correlacionada com a sinalização do pH extracelular, tendo em vista que o rompimento de *pacC* acarreta diminuição da capacidade do fungo crescer em unha humana *in vitro* e deficiência na secreção de queratinases.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. Referências Bibliográficas

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller, W. and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic. Acids. Res.** 25(17): 3389-3402.
- Apodaca, G. and McKerrow, J. H. (1989) Regulation of *Trichophyton rubrum* proteolytic activity. **Infect. Immun.** 57: 3081-3090.
- Arechiga-Carvajal, E. T., Ruiz-Herrera, J. (2005) The RIM101/pacC homologue from the basidiomycete *Ustilago maydis* is functional in multiple pH-sensitive phenomena. **Eukaryot Cell.** 4(6): 999-1008.
- Arst Jr., H. N. and Peñalva, M. A. (2003). pH regulation in *Aspergillus* and parallels with higher eukaryotic regulatory systems. **Trends in Genetics.** 19(4): 224-231.
- Atlas, R.M. (1993) Handbook of microbiological media. Edited by Lawrence C. Parks. Ed. CRC Press, 786.
- Baer, R. L., Rosenthal, S. A., Furnari, D. (1955) Survival of dermatophytes applied on the feet. **J. Investig. Dermatol.** 24 : 619-662.
- Bailao, A. M., Schrank, A., Borges C. L., Dutra, V., Walquiria Ines Molinari-Madlum, E. E., Soares Felipe, M.S., Soares Mendes-Giannini, M. J., Martins, W. S., Pereira, M., Maria de Almeida Soares, C. (2006) Differential gene expression by *Paracoccidioides brasiliensis* in host interaction conditions: representational difference analysis identifies candidate genes associated with fungal pathogenesis. **Microbes Infect.** 8 (12-13): 2686-97.
- Bastos, K. P., Bailão, A. M., Borges, C. L., Faria, F. P., Felipe, M. S., Silva, M. G., Martins, W. S., Fiúza, R. B., Pereira, M., Soares, C. M. (2007) The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. **BMC Microbiol.** (10) 7: 29.
- Beinert, H., Holm, R. H., Munck, E. (1997) Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. **Science.** 277: 653–659.
- Beinert, H., Kennedy, M. C., Stout, C. D. (1996) Aconitase as Iron-Sulfur Protein, Enzyme, and Iron-Regulatory Protein. **Chem. Rev.** 96: 2335-2374.
- Bensen, E. S., Martin, S. J., Li, M., Berman, J., Davis, D. A. (2004) Transcriptional profiling in *Candida albicans* reveals new adaptive responses to extracellular pH and functions for Rim101p. **Molecular Microbiology.** 54 (5), 1335–1351.

- Blank, I. H. (1939) Measurement of pH of the skin surface. **J. Invest. Dermatol.** 2: 75-79.
- Brasch, J., Graser, Y. (2005) The raubitschekii variant of *Trichophyton rubrum* has reached Germany. **Hautarzt.** 56: 473-477.
- Breddam, K. (1986) Serine carboxypeptidases. **Carlsberg Res Commun.** 51: 83-128.
- Brouta, F., Descamps, F., Fett, T., Losson, B., Gerday, C., Mignon, B. (2001) Purification and characterization of a 43.5 kDa keratinolytic metalloprotease from *Microsporum canis*. **Med. Mycol.** 39: 269-275.
- Buffo, J., Herman, M. A., Soll, D. R. (1984) A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*. **Mycophatologia.** 85: 21-30.
- Caddick, M. X., Brownlee, A. G. and Arst, H. N. Jr. (1986a) Phosphatase regulation in *Aspergillus nidulans*: reponses to nutritional starvation. **Genet. Res.** 47: 93-102.
- Caddick, M. X., Brownlee, A. G. and Arst, H. N. Jr. (1986b) Regulation of gene expression by pH of growth medium in *Aspergillus nidulans*. **Mol. Genet. Res.** 203: 346-353.
- Calvo, A. M., Gardner, H. W. & Keller, N. P. (2001) Genetic connection between fatty acid metabolism and sporulation in *Aspergillus nidulans*. **J. Biol. Chem.** 276: 25766–25774.
- Caracuel, Z., Roncero, M. I. G., Espeso, E. A., González-Verdejo, C. I., Garcia-Maceira, F. I. and Di Pietro, A. (2003) The pH signalling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. **Mol. Microbiol.** 48(3): 765-779.
- Castellani, A. (1910) Observation on a new species found in tinea cruris. **Br. J. Dermatol.** 5: 148–150.
- Cove, D. J. (1966) The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. **Biochim. Biophys. Acta.** 113: 51-56.
- Cramer, R. A., Lawrence, C. B. (2004) Identification of *Alternaria brassicicola* genes expressed in planta during pathogenesis of *Arabidopsis thaliana*. **Fungal Gent. Biol.** 41(2): 115–128.
- Cutler, J. E. (1991) Putative virulence factors of *Candida albicans*. **Annu. Rev. Microbiol.** 45: 187-218.
- Davis, D. J., Edwards, E., Mitchell, A. P. and Ibrahim A. S. (2000) *Candida albicans* RIM101 pH response pathway is required for host-pathogen interactions. **Infect. Immun.** 68: 5953–5959.

- Davis, D., Wilson, R. B. and Mitchell, A. P. (2000) RIM101-Dependent and – Independent pathways govern pH responses in *Candida albicans*. **Mol. Cell. Biol.** 20(3): 971-978.
- DeBusk, R. M., Debusk, A. G. (1980) Physiological and regulatory properties of the general amino acid transport system of *Neurospora crassa*. **J. Bacteriol.** 143: 188–197.
- Denison, S. H. (2000) pH regulation of gene expression in fungi. **Fungal Genet. Biol.** 29: 61-71.
- Denison, S. H., Negrete-Urtasun, S., Mingot, J. M., Tilburn, J., Mayer, W. A., Goel, A., Espeso, E. A., Peñalva, M. A., Arst, H. N. (1998) Putative membrane components of signal transduction pathways for ambient pH regulation in *Aspergillus* and meiosis in *Saccharomyces* are homologous. **Mol. Microbiol.** 30: 259–64.
- Diatchenko, L., Lau Y. F., Campbell, A. P et al. (1996) Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proc Natl Acad Sci USA.** 93: 6025–6030.
- Drake, L. A., Dinehart, S. M., Farmer, E. R., Goltz, R. W., Graham, G. F., Hardinsky, M. K., Lewis, C. W., Pariser, D. M., Skouge, J. W., Webster, S. B., Whitaker, D. C., Butler, B., Lowery, B. J., Elewski, B. E., Elgart, M. L., Jacobs, P. H., Leshner, J. L., Jr., Scher, R. K. (1996) Guidelines of care for superficial mycotic infections of the skin: *tinea corporis*, *tinea cruris*, *tinea faciei*, *tinea manuum*, and *tinea pedis*. Guidelines/Outcomes Committee. American Academy of Dermatology. **J Am Acad Dermatol.** 34: 282-6.
- El Barkani, A., Kurzai, O., Fonzi, W. A., Ramon, A., Porta, A., Frosch, M., Muhlschlegel, F. A. (2000) Dominant active alleles of *RIM101* (*PRR2*) bypass the pH restriction on filamentation of *Candida albicans*. **Mol. Cell. Biol.** 20: 4635–4647.
- Emmons, C. W. (1934) Dermatophytes: natural groupings based on the form of the spores and accessory organs. **Arch. Dermatol. Syphilol.** 30: 337–362.
- Espeso, E. A., Arst, H. N. (2000) On the mechanism by which alkaline pH prevents expression of an acid-expressed gene. 20(10): 3355-63.
- Espeso, E. A., Tilburn, J., Arst, H. N. and Peñalva, M. A. (1993) pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene. **EMBO J.** 12: 3947-3956.
- Ewing, B., Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Res.** 8(3): 186-194.

- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M. C., Green, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Res.** 8(3): 175-185.
- 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.
- Fachin, A. L., Ferreira-Nozawa, M. S., Maccheroni, W. Jr., Martinez-Rossi, N. M. (2006) Role of the ABC transporter TruMDR2 in terbinafine, 4-nitroquinoline N-oxide and ethidium bromide susceptibility in *Trichophyton rubrum*. **J Med Microbio.** 55: 1093-9.
- Ferreira-Nozawa M. S., Silveira, H. C., Ono, C. J., Fachin, A. L., Rossi, A., Martinez-Rossi, N. M. (2006) The pH signaling transcription factor PacC mediates the growth of *Trichophyton rubrum* on human nail *in vitro*. **Med Mycol.** 44: 641-5.
- Ferreira-Nozawa, M. S. (2003) Regulação da expressão gênica no dermatófito *Trichophyton rubrum*: análise molecular e funcional do fator de transcrição PacC e construção do SAGE-map deste dermatófito. **Tese de doutorado** apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.
- Ferreira-Nozawa, M. S., Nozawa, S. R., Martinez-Rossi, N. M. and Rossi, A. (2003) The dermatophyte *Trichophyton rubrum* secretes an EDTA-Sensitive alkaline phosphatase on high-phosphate medium. **Braz. J. Microbiol.** 34: 161-164.
- Fonzi, W. A. (1999) *PHR1* and *PHR2* of *Candida albicans* encode putative glycosidases required for proper cross-linking of β -1,3 and β -1,6 glucans. **J. Bacteriol.** 181: 7070-7079.
- Gordon, D., Abajian, C., Green, P. (1998) *Consed*: A Graphical Tool for Sequence Finishing. **Genome Research.** 8: 195-202.
- Gradisar, H., Friedrich, J., Krizaj, I., Jerala, R. (2005) Similarities and specificities of fungal keratinolytic proteases: Comparison of keratinases of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces microsporus* to some known proteases. **Appl. Env. Microbiol.** 71: 3420-3426.
- Graser, Y., Kuijpers, A. F., Presber, W., de Hoog, G. S. (2000) Molecular taxonomy of the *Trichophyton rubrum* complex. **J Clin Microbiol.** 38(9): 3329-36.
- Grosman, M. E., Pappert, A. S., Garzon, M. C., Silvers, D. N. (1995) Invasive *Trichophyton rubrum* infection in the immunocompromised host: report of three cases. **J. AM Acad Dermatol** 33: 315-318.

- Gupta, A. K., Summerbell, R. C. (2000) Tinea capitis. **Med. Mycol.** 38: 255-287.
- Hawksworth DL, Rossman AY. (1997) Where are all the undescribed fungi? **Phytopathol.** 87: 888-891.
- Hay, R. J. (2006) How do dermatophytes survive in the epidermis? **Curr Opin Infect Dis.** 19(2): 125-6.
- Huang, X., Madan, A. (1999) CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Res.** 9: 868-77.
- Hynes, M. J. (1977) Induction of the acetamidase of *Aspergillus nidulans* by acetate metabolism. **J Bacteriol.** 131(3): 770-5.
- Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M., Sakaki, Y. (2001) A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 98: 4569–4574.
- Jeney, A., Beki, E., Keszthelyi, A., Leslie, J. F., Hornok, L. (2007) Cloning and characterization of *Fpmtr1*, an amino acid transporter gene of *Fusarium proliferatum* (*Gibberella intermedia*). **J Basic Microbiol.** 47(1):16-24.
- Jousson, O., Lechenne, B., Bontems, O., Mignon, B., Reichard, U., Barblan, J., Quadroni, M. and Monod, M. (2004) Secreted subtilisin gene family in *Trichophyton rubrum*. **Gene.** 339: 79-88.
- Kang, D. K., J. Jeong, S. K., Drake, N. B., Wehr, T. A., Rouault., R. L., Levine. (2003) Iron regulatory protein 2 as iron sensor. Iron dependent oxidative modification of cysteine. **J. Biol. Chem.** 278:14857-14864.
- Karababa, M., Coste, A. T., Rognon, B., Bille, J., Sanglard, D. (2004) Comparison of gene expression profiles of *Candida albicans* azole-resistant clinical isolates and laboratory strains exposed to drugs inducing multidrug transporters. **Antimicrob Agents Chemother.** 48(8):3064-79.
- Koller, H. T., Klade, T., Ellinger, A., Breitenbach, M. (1996) The yeast growth control gene *GRC5* is highly homologous to the mammalian putative tumour suppressor gene *QM*. **Yeast.** 12: 53–65.
- Lamb, T. M., Xu, W., Diamond, A., Mitchell, A. P. (2001) Alkaline response genes of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to the *RIM101* pathway. **J. Biol. Chem.** 276: 1850-1856.
- Lambert, M., Blanchin-Roland, S., Le Leuedec, F., Le'pingle, A and Gaillardin, C. (1997) Genetic analysis of regulatory mutants affecting synthesis of extracellular proteinases in the yeast *Yarrowia lipolytica*: identification of a *RIM101/pacC* homolog. **Mol. Cell. Biol.** 17: 3966–3976.
- Lamberti, A., Caraglia, M., Longo, O., Marra, M., Abbruzzese, A., Arcari, P. (2004) The translation elongation factor 1A in tumorigenesis, signal transduction and apoptosis. **Amino Acids.** 26: 443–448.

- Li, M., Martin, S. J., Bruno, V. M., Mitchell, A. P., Davis, D. A. (2004) *Candida albicans* Rim13p, a Protease Required for Rim101p Processing at Acidic and Alkaline pHs. **Eukaryotic Cell**. 3(3): 741–751.
- Li, W., Mitchel, A. P. I. (1997) Proteolytic activation of Rim1p, a positive regulator of yeast sporulation and invasive growth. **Genetics**. 145: 63–73.
- MacCabe, A. P., van den Homberg, J. P. T. W., Tilburn, J., Arst Jr., H. N. and Visser, J. (1996) Identification, cloning and analysis of the *Aspergillus niger* gene *pacC*, a wide domain regulatory gene responsive to ambient pH. **Mol. Gen. Genet**. 250: 367-374.
- Maccheroni, W. Jr., May, G. S., Martinez-Rossi, N. M., Rossi, A. (1997) The sequence of *palF*, an environmental pH response gene in *Aspergillus nidulans*. **Gene**. 194: 163-167.
- Maranhão, F. C., Paião, F. G., Martinez-Rossi, N. M. (2007) Isolation of transcripts over-expressed in human pathogen *Trichophyton rubrum* during growth in keratin. **Microb Pathog.** (article in press).
- Martinez-Rossi N. M., Ferreira-Nozawa M. S. and Graminha M. A. S. (2004) Molecular aspects of dermatophyte-host interactions. In: Kushwaha RKS (ed). **Fungi in Human and Animal Health**. Jodhpur, India: Scientific Publishers 143-165.
- Marzluf, G. A. (1997) Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. **Microbiol Mol Biol** 61: 17-32.
- McGinnis, M. R. (1980) Ed Laboratory Handbook of Medical Mycology. Academic Press, New York.
- Merrick, W. C (1992) Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. **Microbiol Rev**. 56: 291–315.
- Meunier, J. R. and Grimont, P. A. D. (1993) Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. **Res. Microbiol**. 144: 373-379.
- Meyer, V., Spielvogel, A., Funk, L., Tilburn, J., Arst, H. N., Stahl, U. (2005) Alkaline pH-induced up-regulation of the *afp* gene encoding the antifungal protein (AFP) of *Aspergillus giganteus* is not mediated by the transcription factor PacC: possible involvement of calcineurin. **Mol. Gen. Genomics** 274: 295–306.
- Meyer, V., Stahl, U. (2002) New insights in the regulation of the *afp* gene encoding the Antifungal Protein of *Aspergillus giganteus*. **Curr. Genet** 42: 36–42.

- Mirbod-Donovan, F., Schaller, R., Hung, C. Y., Xue, J., Reichard, U., Cole, G. T. (2006) Urease produced by *Coccidioides posadasii* contributes to the virulence of this respiratory pathogen. **Infect Immun.** 74(1): 504-15.
- Monod M., Léchenne B., Jousson, O., Grand, D., Zaugg, C., Stöcklin, R., Grouzmann, E. (2005) Aminopeptidases and dipeptidyl-peptidases secreted by the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Microbiology.** 151(1): 145-155.
- Nahas, E., Terenzi, H. F. and Rossi, A. (1982) Effect of carbon source and pH on the production and secretion of acid phosphatase (EC 3.1.3.2) and alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1) in *Neurospora crassa*. **J. Gen. Microbiol.** 128: 2017-2021.
- Negrete-Urtasun, S., Reiter, W., D'íez, E., Denison, S. H., Tilburn, J., Espeso, E. A., Peñalva, M. A., Arst, H. N. (1999) Ambient pH signal transduction in *Aspergillus*: completion of gene characterization. **Mol. Microbiol.** 33: 994–1003.
- Nozawa, S. R., May, G. S., Martinez-Rossi, N. M., Ferreira-Nozawa, M. S., Coutinho-Netto, J., Maccheroni, W. Jr. And Rossi, A. (2003b) Mutation in a calpain-like protease affects the postranslational mannosylation of phosphatases in *Aspergillus nidulans*. **Fungal Genet. Biol.** 38: 220-227.
- Nozawa, S. R., Ferreira-Nozawa, M. S., Martinez-Rossi, N. M., Rossi, A. (2003a) The pH-induced glycosylation of secreted phosphatases is mediated in *Aspergillus nidulans* by the regulatory gene pacC-dependent pathway. **Fungal Genet Biol.** 39(3): 286-95.
- Nozawa, S. R., Thedei, G. Jr., Crott, L. S. P., Barbosa, J. E. and Rossi, A. (2002) The synthesis of Pi-repressible alkaline phosphatase do not appear to be regulated by ambient pH in the filamentous mould *Neurospora crassa*. **Brazilian J. Microbiol.** 33: 92-95.
- O'Donoghue, P. and Luthey-Schulten, Z. (2003) On the evolution of structure in aminoacyl-tRNA synthetases. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 4: 550-573.
- Odom, R. (1993) Pathophysiology of dermatophyte infections. **Journal of the American Academy of Dermatology.** 28: S2-S7.
- Ogawa, H., Summerbell, R. C., Clemons, K. V., Koga, T., Ran, Y. P., Rashid, A., Sohnle, P. G., Stevens, D. A., Tsuboi, R. (1998) Dermatophytes and host defence in cutaneous mycoses. **Med Mycol.** 36: 166-73.
- Ohst, T., de Hoog, S., Presber, W., Stavrakieva, V., Gräser, Y. (2004) Origins of microsatellite diversity in the *Trichophyton rubrum* and *T. violaceum* clade (Dermatophytes). **J Clin Microbiol.** 42 (10): 4444-8.
- Olson, B. H., Goerner, G. L. (1965) Alpha sarcin, a new antitumor agent. Isolation, purification, chemical composition and the identity of a new amino acid. **Appl. Microbiol.** 13: 314-321.

- Orejas, M., Esmassa, E. A., Tilburn, J., Sarkar, S., Arst, H. N. Jr. and Peñalva, M. A. (1995) Activation of the *Aspergillus* PacC transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxy-terminal moiety. **Gene and Development**. 9: 1622-1632.
- Osmani, A. H., Davies, J., Oakley, C. E., Oakley, B. R., Osmani, S. A. (2003) TINA interacts with the NIMA kinase in *Aspergillus nidulans* and negatively regulates astral microtubules during metaphase arrest. **Mol Biol Cell**. 14(8): 3169-79.
- Pachler, K., Karl, T., Kolmann, K., Mehlmer, N., Eder, M., Loeffler, M., Oender, K., Hochleitner, E. O., Lottspeich, F., Bresgen, N., Richter, K., Breitenbach, M., Koller, L. (2004) Functional interaction in establishment of ribosomal integrity between small subunit protein rpS6 and translational regulator rpL10/Grc5p. **FEMS Yeast Res**. 5: 271-80.
- Padhye A. A., Summerbell, R. C. (2005) The dermatophytes. In: Merz W, Hay RJ, editors. **Mycology**: Topley and Wilson's microbiology and microbial infections. Hodder Arnold 5: 220-243.
- Paião, F. G., Segato, F., Cursino-Santos, J. R., Peres, N. T., Martinez-Rossi, N. M. (2007) Analysis of *Trichophyton rubrum* gene expression in response to cytotoxic drugs. **FEMS Microbiol Lett**. 271(2): 180-6.
- Pall, M. L. (1970) Amino acid transport in *Neurospora crassa*. 3. Acidic amino acid transport. **Biochim. Biophys. Acta**. 211: 513-20.
- Palma, M. S., Han, S. W., Rossi, A. (1989) Dissociation and catalytic activity of phosphatase-repressible alkaline phosphatase from *Neurospora crassa*. **Phytochemistry**. 28 (12): 3281-3284.
- Peñalva, M. A., Arst, H. N. (2004) Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts. **Annu Rev Microbiol**. 58: 425-51
- Perlin, D. S., Harris, S. L., Seto-Young, D., Haber J. E. (1989) Defective H⁺ ATPase of hygromycin B resistant *pma1* mutants from *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem**. 264: 21857-21864.
- Pielop J., Rosen T. (2001) Penile dermatophytosis. **J Am Acad Dermatol**. 44(5): 864-7.
- Prasad, R., Koul, A., Mukherjee, P. K. & Ghannoum, M. A. (1996) Lipids of *Candida albicans*. In **Lipids of Pathogenic Fungi**. Edited by R. Prasad & A. M. Ghannoum. Boca Raton, FL: CRC Press. pp.105–138.
- Prins, W. T., Wagemakers, L., Schouten, A., Van Kan J.A. L. (2000) Cloning and characterization of a glutathione S-transferase homologue from the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. **Molecular Plant Pathology**. 3: 169-178.

- Ramon, A. M., Fonzi, W. A. (2003) Divergent binding specificity of RIM101p, the *Candida albicans* ortholog of PacC. **Eukaryot. Cell.** 2(4): 718-728.
- Ramon, A. M., Porta, A., Fonzi, W. A. (1999). Effect of environmental pH on morphological development of *Candida albicans* is mediated via the PacC-related transcription factor encoded by *PRR2*. **J. Bacteriol.** 181: 7524–7530.
- Riis B., Rattan S. I. S., Clark B. F. C., Merrick W. C. (1990) Eukaryotic protein elongation factors. **Trends Biochem Sci** 15: 420–424.
- Rippon, J. W. (1988) **Medical mycology**. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes, 3rd ed. W. B. Saunders, Philadelphia.
- Rollins, J. A. (2003) The *Sclerotinia sclerotiorum* *pac1* gene is required for sclerotial development and virulence. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 16: 785–795.
- Rollins, J. A., M. B. Dickman. (2001) pH signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: identification of a *pacC/RIM1* homolog. **Appl. Environ. Microbiol.** 67: 75–81.
- Sambrook, J., Fritsch E. F. and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: a laboratory manual. New York, USA: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**. Vol. 1, 2 and 3.
- Smith, E. S., Fleischer, A. B., Jr., Feldman, S. R. (1998) Non dermatologists are more likely than dermatologists to prescribe antifungal/corticosteroid products: an analysis of office visits for cutaneous fungal infections, 1990-1994. **J. Am. Acad. Dermatol.** 39: 43-7.
- St Leger, R. J., Bidochka, M. J., Roberts, D. W. (1994) Characterization of a novel carboxypeptidase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Arch Biochem Biophys.** 314 (2): 392-8.
- Suárez, T., Peñalva, M. A. (1996) Characterization of a *Penicillium chrysogenum* gene encoding a PacC transcription factor and its binding sites in the divergent *pcbAB-pcbC* promoter of penicillin biosynthetic cluster. **Mol. Microbiol.** 20: 529-540.
- Takasuka, T. (2000) Amino acid- or protein-dependent growth of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. **FEMS. Immunol. Med. Microbiol.** 29: 241-245.
- 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.
- Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D. A., Esmassa, E. A., Orejas, M., Mungroo, J., Peñalva, M. A. and Arst, H. N. Jr. (1995) The *Aspergillus* PacC zinc finger

- transcription factor mediates regulation of both acid and alkaline expressed genes by ambient pH. **EMBO J.** 14(4): 779-790.
- Todd, R. B., Andrianopoulos, A., Davis, M. A., Hynes, M. J. (1998) FacB, the *Aspergillus nidulans* activator of acetate utilization genes, binds dissimilar DNA sequences. **EMBO J.** 7: 2042-54.
- Trip, H., Evers, M. E., Driessen, A. J. M. (2004) PcMtr, an aromatic and neutral aliphatic amino acid permease of *Penicillium chrysogenum*. **Biochim. Biophys. Acta.** 1667: 167–173.
- Tsuboi, R., Ko, I. K., Takamori, K., Ogawa, H. (1989) Isolation of keratinolytic proteinase from *Trichophyton mentagrophytes* with enzymatic activity at acidic pH. **Infect. Immun.** 57: 3479-3483.
- Urban, M., Bhargava, T., Hamer, J. E. (1999) An ATP-driven efflux pump is a novel pathogenicity factor in rice blast disease. **EMBO J** 18: 512-21.
- Velculesco, V. E., Zhang, L., Zhou, W., Vogelstein, J., Basrai, M., Basset, D., Hieter, D., Vogelstein, B. and Kinzler, K. (1997) Characterization of the yeast transcriptome. **Cell.** 88: 243-251.
- Vincent, O., Rainbow, L., Tilburn, J., Arst, H. N., 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(5): 1647-55.
- 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., Jin, Q. (2006) Analysis of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* expressed sequence tags. **BMC Genomics.** 11(7): 255.
- Weitzman, I., Summerbell, R. C. (1995) The dermatophytes. **Clin. Microbiol. Reviews.** 8: 240-259.
- Wilson, R. A., Calvo, A. M., Chang, P. K., Keller, N. P. (2004) Characterization of the *Aspergillus parasiticus* delta12-desaturase gene: a role for lipid metabolism in the *Aspergillus* - seed interaction. **Microbiology.** 150: 2881-8.
- Xu, W., Mitchell, A. P. (2001) Yeast PalA/AIP1/Alix homolog Rim20p associates with a PEST-like region and is required for its proteolytic cleavage. **J. Bacteriol.** 183(23): 6917-23.

ANEXOS

ANEXO-I

The pH signaling transcription factor PacC mediates the growth of *Trichophyton rubrum* on human nail *in vitro*

MONICA S. FERREIRA-NOZAWA*†, HENRIQUE C. S. SILVEIRA*, CARLOS J. ONO†, ANA L. FACHIN*, ANTONIO ROSSI† & NILCE M. MARTINEZ-ROSSI*

*Departamento de Genética, and †Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

We report here the isolation, molecular cloning and initial characterization of the *Trichophyton rubrum pacC* gene, which encodes a putative protein that is homologous to the PacC/Rim101p family of pH signaling transcription regulators. The promoter region of the *T. rubrum pacC* gene contains four recognition sites 5'-GCCAAG-3' for the PacC protein, suggesting that the transcription of this gene itself could be induced under alkaline growth conditions. The enhanced expression profile of the *T. rubrum pacC* gene in an alkaline environment was confirmed by Northern blotting analysis. We also report that the disruption of *pacC* gene decreased both the secretion of keratinolytic proteases and the ability of the mutant *pacC-1* to grow on human nail fragments as the sole source of nutrition, i.e., growth of the dermatophyte *T. rubrum* appear to be related to molecular events which depend on the action of protein PacC.

Keywords dermatophyte, keratinase secretion, PacC, *Trichophyton rubrum*

Introduction

Although several factors contribute to the pathogenicity of dermatophytes, the successful initiation of infection is related to the capability of the infecting pathogen to adhere to the cell surface. The adherence capability has been attributed to the presence of glycoproteins containing mannans in the cell wall of these microorganisms, which are presumed to correlate with virulence [1, and references herein]. In addition, for dermatophytes to be successful in their installation in the host, the arthroconidia must germinate rapidly and the hyphae must penetrate the body surface; otherwise they will be eliminated by the continuous desquamation of the epithelium [1]. Once installed, the dermatophytes must scavenge nutrients for growth, a process based on the induction of structural proteins, permeases, and enzymes of the cell wall, in addition to the secretion of a variety

of proteins and hydrolytic enzymes such as nucleases and keratinases, which occurs in response to a short supply of essential nutrients in the host. The derepression of this metabolic machinery also responds to environmental pH signaling, which permits the dermatophyte to use macromolecules within a broad environmental pH range [2, and references herein]. Dermatophytes grow logarithmically during the initial stages of infection, derepressing nonspecific proteolytic enzymes, among others, with optimum activity at acidic pH, probably because human skin has an acidic pH [3]. Indeed, growth of the dermatophyte *Trichophyton rubrum in vitro* is dependent on the initial culture pH, with an apparent optimum at pH 4.0. Furthermore, the pH of the medium changes during cultivation, reaching values that range from pH 8.3–8.9 [4], producing an environment in which most of the known keratinolytic proteases have optimal enzymatic activity [5–7].

The first genes involved in sensing the environmental pH in fungi were identified in *Aspergillus nidulans*, and a conserved signal transduction pathway comprising at least seven genes mediates this response. Gene *pacC* codes for a Zn-finger transcription factor that under-

Received 8 November 2005; Accepted 20 February 2006
Correspondence: Nilce M. Martinez-Rossi, Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil. Tel: +55 16 3602 3150; Fax: +55 16 3633 0069; E-mail: nmmrossi@usp.br

goes proteolysis at alkaline pH promoted by the *pal* genes (*palA*, B, C, F, H, and I), yielding a functional protein responsible for the induction of genes expressing products with optimal activity at alkaline pH and repression of those with optimal activity at acidic pH. Also, transcription of the *pacC* gene is induced by PacC protein under alkaline growth conditions [8, and references herein].

We report here the isolation and initial characterization of the *T. rubrum* gene *pacC*. Its disruption was correlated with a decreased ability of the mutant strain to infect human nails *in vitro*, i.e., growth of this dermatophyte appear to be related to molecular events which depend on the action of protein PacC.

Materials and methods

Strains, growth conditions, and molecular biology techniques

The clinical isolate H6 (ATCC MYA-3108) of *T. rubrum* used throughout this study was cultured as previously described [4], except that the final concentration of inorganic phosphate (Pi) was 2.0 mM. The strains LE392 and DH5 α of *E. coli* were used for amplification of the phage library, and for transformation and plasmid amplification, respectively. Plasmid pCSN43, used for disruption of the *pacC* gene, contains the bacterial hygromycin phosphotransferase gene (*hph*) controlled by the promoter and terminator of the *Aspergillus nidulans trpC* gene [9]. Current molecular biology techniques, including restriction and ligation of DNA, and Southern and Northern hybridizations, were carried out as previously described [10]. Total genomic DNA from *T. rubrum* was purified as described by Raeder and Broda [11].

*Cloning, sequencing, and disruption of the *pacC* gene*

The DNA fragment of 219 base pairs (bp) generated by PCR amplification of the genomic DNA of *T. rubrum* with the primers 5'-GGAACATGTSTGCGA-GCGTCAC-3' and 5'-RTCRTCVGCRTGVGTYTT-NACRTG-3', which showed high homology to the zinc finger motif of other PacC transcription factors, was used to screen a phage-library prepared by using genomic DNA from strain H6 partially digested with *Sau3A*I. The resulting fragments of about 15–23 kb were inserted into *Bam*HI sites of λ GEM11 (Promega), and the hybridizing clones from phages were digested, subcloned into the pUC18 plasmid vector, and the complete nucleotide sequence of *pacC* ORF was determined. Genomic DNA was digested with the restriction enzymes *Kpn*I, *Eco*RI

and *Xba*I, which do not cleave the *pacC* gene of *T. rubrum*, and the copy number of *pacC* in the genome of *T. rubrum* was determined by Southern Blot analysis. The Random Primer DNA Labeling System (InVitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used to generate a radioactively gene-specific probe with [α - 32 P]-dCTP.

A 2.4-kb *Pvu*I fragment containing almost the entire *pacC* gene was excised from the pUC18 plasmid vector, and cloned into the unique *Eco*RV site of plasmid pMOS (pMOS Blue blunt-ended cloning kit, Amersham Biosciences). The resulting plasmid was linearized with *Xho*I and used to clone a blunt-end modified hygromycin B phosphotransferase (*hph*) gene cassette prepared from pCSN43 by digestion with *Sal*I. The plasmid thus generated was designed *ppacC-1* and used without further modifications to transform the clinical isolate H6 of *T. rubrum*. Protoplasts were obtained by incubating the mycelium harvested from solid medium in 30 ml of lytic solution consisting of 600 mg of glucanex (Novo Nordisk, Switzerland), 0.7 M KCl and 50 mM phosphate buffer, pH 5.8, for about 3–4 hours at 28°C. The protoplasts were filtered through glass wool, collected by centrifugation, transformed as previously described [12], and the transformants were selected in solid minimal medium [13] supplemented with 1 M sucrose containing 600 μ g/ml hygromycin, at 28°C. DNA from the transformants was analyzed by Southern hybridization using the fragment *Sac*II as probe, to check gene knockout.

Human nail infection in vitro and keratinolytic activity

Human nail fragments of approximately 1 $\times$ 1 mm in size were treated with ethanol for 15 min, and dried at room temperature. Each nail fragment was soaked with 5 μ l of conidia suspension (3×10^6 /ml) of *T. rubrum* strains for 1 h, followed by the addition of 200 μ l of distilled water [14]. The plates were incubated at 28°C for 6 days, and fungal growth was assessed by light microscopy. Nail fragments soaked in 200 μ l of distilled water were used as a control. The keratinolytic activity was examined as described [15] by using keratin as the substrate (buffered at pH 8.0) and 1.0 ml of the culture medium as the enzyme. Conidia (5×10^5) of each strain were inoculated into 250 ml Erlenmeyer flasks containing 25 ml of non-buffered liquid minimal medium of Cove [13], pH 5.0, supplemented with keratin (2.5 g/l) as the sole carbon and nitrogen sources, and incubated in an orbital shaker (160 rpm/min) for 7 days, 25°C. Media were collected by filtration, and the keratinolytic activity promptly estimated. Mycelium-specific activities were expressed as units [15] per gram dry weight

Fig. 1 Alignment of conserved regions of the *Trichophyton rubrum* PacC protein with representative members of the PacC/Rim101p family. The likely zinc-chelant residues of the zinc finger region are shaded. PacC sequences correspond to: SC, *Saccharomyces cerevisiae* (GenBank P33400); CA, *Candida albicans* (GenBank Q9UW14); YL, *Yarrowia lipolytica* (GenBank CAA67927); AG, *Aspergillus niger* (GenBank CAA67063); AF, *Aspergillus fumigatus* (GenBank EAL92386); AN, *Aspergillus nidulans* (GenBank CAA87390); PC, *Penicillium chrysogenum* (GenBank AAC36492); TR, *Trichophyton rubrum* (GenBank AAK35072). Identical residues are marked with asterisks.

SC	LYCKWDNCGMIFNQPELLYNHLCCHDVGRKSHKNLQNLCHWGDCTTK	192
CA	FKCLWSNCNIIIFETPEILYDHLCDHVGKSSNNLSLTCLWENCGTT	254
YL	LVCKWGPCGKTFGSAEKLYAHLCDAHVGRKCTHNLSLVCNWDNCGIV	192
AG	LSCLWQGCSEKCPSEALYEHVGERHVGRKSTNNLNLTCQWGSCRTT	116
AF	LSCLWQGCSEKCPSEALYDHICERHVGRKSTNNLNLTCQWGSCRTT	126
AN	LTCMWQGCSEKLPTPESLYEHVGERHVGRKSTNNLNLTCQWGSCRTT	122
PC	LPCQWVGCTEKSPTAESLYEHVGERHVGRKSTNNLNLTCQWGTCNTT	104
TR	LECQWQGCQELCPTPEALYEHVGERHVGRKSTNNLNLTCGWSNCRTT	130
	: * * * * . * * * * : * . * * * * . : * * * * * *	
SC	TEKRDHITSHLRVHVPLKPFPGCSTCSKKFKRPQDLKKHLKIHLESG	238
CA	TVKRDHITSHLRVHVPLKPFHCDLCPKSFKRPQDLKKHKTTHAEDH	300
YL	TVKRDHITSHIRVHVPLKPYKCFCTKSFKRPQDLKKHVKTTHADDN	238
AG	TVKRDHITSHIRVHVPLKPHKCDFCGKAFKRPQDLKKHVKTTHADDS	162
AF	TVKRDHITSHIRVHVPLKPHKCEFCGKAFKRPQDLKKHVKTTHADDS	172
AN	TVKRDHITSHIRVHVPLKPHKCDFCGKAFKRPQDLKKHVKTTHADDS	168
PC	TVKRDHITSHIRVHVPLKPHKCDFCGKAFKRPQDLKKHVKTTHADDS	150
TR	TVKRDHITSHIRVHVPLKPHKCDFCGKAFKRPQDLKKHVKTTHADDS	176
	* * * * * : * * * * * . * . * * * * * * * * * . :	

mycelium. The data presented are mean values of three parallel determinations.

Results

We cloned a gene from *T. rubrum* (named *pacC*) that is homologous to the conserved *pacC/RIM101* gene from other eukaryotic microorganisms. DNA sequence analysis of the positive clones revealed the presence of an open reading frame (ORF) of 2,432 bp for the *pacC* gene, interrupted by 2 putative introns (GenBank accession number AF363788). Significant similarity to members of the PacC/Rim101p family was observed (Fig. 1), with a deduced molecular weight of 88,256 kDa. The promoter region of the *pacC* gene contains four recognition sites 5'-GCCAAG-3' for PacC, and its enhanced expression profile in an alkaline environment was confirmed by Northern blotting analysis (data not shown). Also, Southern analysis indicated that the *pacC* gene is present as a single copy in the genome of *T. rubrum*, thus being suitable for targeted gene disruption experiments. The disruption of *pacC* gene, checked by Southern analysis for the predicted disruption restriction fragments (Fig. 2), was correlated with a decreased ability of the *pacC-1* mutant to grow on human nail fragments as the only source of nutrition, whereas both the H6 and *pacC-1* strains showed the same phenotype when grown on Sabouraud solid medium (Fig. 3). A marked decrease in the conidiation (at least three times) was observed for the *pacC-1* mutant strain grown on Sabouraud solid medium as

Fig. 2 Disruption of the *Trichophyton rubrum* *pacC* gene. (A) Schematic representation of the disruption construct, and the *hph* disrupting selective marker. The position of the 219 bp fragment obtained by PCR (I), and the probe used in Southern blot analysis (II) are indicated by black horizontal bars. The arrow indicates the size of the *pacC* gene and the direction of transcription. The region of the three zinc fingers (▼) and the signaling protease box (■) are shown. P: *PvuII*, Sc: *SacII*, X: *XhoI*. (B) Southern analysis of the *pacC-1* transformant. The genomic DNA from H6 (lane 1) and *pacC-1* mutant (lane 2) strains were digested with *SacII* restriction enzyme and hybridized with fragment II. The disruptor cassette *ppacC-1* digested with *SacII* (lane 3) and fragment II (lane 4) were stained with ethidium bromide and used as control.

Fig. 3 Effect of disruption of *pacC* gene on the growth of *Trichophyton rubrum*. (I) After incubation on human nail for 6 days at 28°C, fungal growth was observed by light microscopy. The black objects seen on the left side are nail fragments. (II) After the strains were grown on Sabouraud solid medium without hygromycin, they were transferred to Sabouraud solid medium containing hygromycin (450 µg/ml) (III). In both experiments (II and III), the strains were cultivated for 72 h at 28°C. (A) No inoculum (control). (B) Clinical isolate H6. (C) *pacC-1* mutant.

compared to the H6 strain. Furthermore, the secretion of keratinolytic proteases was decreased in the *pacC-1* mutant when both strains were grown on keratin as the sole carbon and nitrogen sources (293 and 78 Units/g dry wt.h of the enzyme were secreted respectively by the H6 and *pacC-1* mutant strains).

Discussion

The disruption of *pacC* gene, which correlated with a decreased growth of the *pacC-1* mutant strain on human nails and a decreased secretion of keratinolytic proteases (at least 3.7 times) when the dermatophyte was grown on liquid medium supplemented with keratin, suggests that the keratinolytic proteases secreted by *T. rubrum* are somehow regulated by the PacC protein. In fact, proteases having keratinolytic activity are indispensable for the utilization of keratin as the sole source of nutrition because *T. rubrum* failed to grow on nail fragments in the presence of PMSF, an inhibitor of serine-keratinases. Conversely, there was only a limited effect of PMSF on its growth in Sabouraud's dextrose broth [14]. We observed no considerable difference in the growth of the H6 and *pacC-1* mutant strains on Sabouraud solid medium, except that conidiation was markedly affected by the disruption of the *pacC* gene, suggesting its involvement also in the development of the dermatophyte. In conclusion, we are proposing that the secretion of keratinases with optimal activity at alkaline pH and conidiation are required for the dermatophyte to properly complete its installation and to remain in the host, events that appear to be depending on the action of PacC protein.

Acknowledgements

This work was supported by grants from FAPESP, CNPq, CAPES and FAEPA. We thank R. A. Ferreira and M. Mazucato for technical assistance, and N.T.A. Peres for helping with the keratinase assays.

References

- Ogawa H, Summerbell RC, Clemons KV, et al. Dermatophytes and host defense in cutaneous mycoses. *Med Mycol* 1998; **36**: 166–173.
- Martinez-Rossi NM, Ferreira-Nozawa MS, Graminha MAS, et al. Molecular aspects of dermatophyte-host interactions. In: Kushwaha RKS (ed.). *Fungi in Human and Animal Health*. Jodhpur, India: Scientific Publishers, 2004: 143–165.
- Blank IH. Measurement of pH of the skin surface. *J Invest Dermatol* 1939; **2**: 75–79.
- Ferreira-Nozawa MS, Nozawa SR, Martinez-Rossi NM, Rossi A. The dermatophyte *Trichophyton rubrum* secretes an EDTA-sensitive alkaline phosphatase on high-phosphate medium. *Braz J Microbiol* 2003; **34**: 161–164.
- Tsuboi R, Ko IJ, Takamori K, Ogawa H. Isolation of a keratinolytic proteinase from *Trichophyton mentagrophytes* with enzymatic activity at acidic pH. *Infect Immun* 1989; **57**: 3479–3483.
- Apodaca G, McKerrow JH. Regulation of *Trichophyton rubrum* proteolytic activity. *Infect Immun* 1989; **57**: 3081–3090.
- Jousson O, Lechenne B, Bontems O, et al. Secreted subtilisin gene family in *Trichophyton rubrum*. *Gene* 2004; **339**: 79–88.
- Peñalva MA, Arst HN, Jr. Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts. *Annu Rev Microbiol* 2004; **58**: 425–451.
- Staben C, Jensen B, Singer M, et al. Use of a bacterial Hygromycin B resistance gene as a dominant selectable marker in *Neurospora crassa* transformation. *Fungal Genet Newslett* 1989; **36**: 79–81.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

- 11 Raeder U, Broda P. Rapid Preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett Appl Microbiol* 1985; **1**: 17–20.
- 12 May GS. Fungal technology. In: Kinghorn JRT, Turner G (eds). *Applied Molecular Genetics of Filamentous Fungi*. USA: Blackie Academic & Professional, 1992: 1–27.
- 13 Cove DJ. The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim Biophys Acta* 1966; **113**: 51–56.
- 14 Takasuka T. Amino acid- or protein-dependent growth of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000; **29**: 241–245.
- 15 Gradisar H, Friedrich J, Krizaj I, Jerala R. Similarities and specificities of fungal keratinolytic proteases: comparison of keratinases of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces microsporus* to some known proteases. *Appl Env Microbiol* 2005; **71**: 3420–3426.

ANEXO-II

Identification of genes displaying differential expression in the *nuc-2* mutant strain of the mold *Neurospora crassa* grown under phosphate starvation

Diana E. Gras¹, Henrique C.S. Silveira¹, Nilce M. Martinez-Rossi¹ & Antonio Rossi²

¹Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brazil; and ²Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brazil

Correspondence: Antonio Rossi,
Departamento de Bioquímica e Imunologia,
Faculdade de Medicina Ribeirão Preto,
Universidade de São Paulo, Av Bandeirantes
3900, Ribeirão Preto 14049-900, Brazil. Tel.:
+55 16 3602 3112; fax: +55 16 3633 6840;
e-mail: anrossi@usp.br

Received 2 November 2006; revised 7
December 2006; accepted 11 December 2006.
First published online 11 January 2007.

DOI:10.1111/j.1574-6968.2006.00613.x

Editor: Michel Jacquet

Keywords

Neurospora crassa; ankyrin repeat; *nuc-2*
gene; Pi regulation; eIF3; translational control.

Abstract

Subtractive hybridization was used to isolate transcripts up-regulated in the *nuc-2* mutant strain of *Neurospora crassa* grown under phosphate starvation. Following differential screening, 66 cDNA clones of the total enriched were screened in a second round by reverse Northern hybridization. The 17 cDNA candidates displaying visual positive differential expression were sequenced, and functional grouping identified putative proteins possibly involved in diverse cellular processes as, for example, protein synthesis, signal transduction mechanisms, and transport facilitation. Four of them, confirmed by both virtual and Northern blot analyses, revealed genes involved in the initiation of mRNA translation that are significantly up-regulated in the *nuc-2* mutant strain, which may be relevant to a further understanding of the molecular events involved in the phosphorus sensing in *N. crassa*.

Introduction

Inorganic phosphate (Pi) is an essential growth-limiting nutrient in nature, required for the biosynthesis of nucleic acids and many other phosphorylated metabolites, including those involved in energy transduction and metabolic signaling responses. All living organisms have evolved complex signal transduction networks that enable them to sense the availability of nutrients and modulate metabolic activities for their acquisition. The filamentous mold *Neurospora crassa* synthesizes a number of Pi-repressible phosphatases and permeases that have the function of making more Pi available to the cell, i.e., these enzymes are synthesized and secreted in response to the signaling of phosphorus starvation (Metzenberg, 1979; Han & Rossi, 1989). The genetic and molecular mechanisms controlling this response in *N. crassa* include four regulatory genes, *nuc-2*, *preg*, *pgov*, and *nuc-1*, involved in a hierarchical relationship (Metzenberg, 1979). The availability of Pi is sensed by the *nuc-2* gene, whose transcription is regulated in response to the levels of Pi (Peleg *et al.*, 1996a). The NUC-2 protein transmits the metabolic signal downstream the regulatory pathway, inhibiting the functioning of the PREG-PGOV

complex under limiting Pi, which allows the activation of the wide domain transcription regulator NUC-1, i.e., its translocation into the nucleus (Kang & Metzenberg, 1990, 1993; Peleg *et al.*, 1996b). NUC-2 is an ankyrin-like repeat protein that carries one of the most common protein sequence motifs (Peleg *et al.*, 1996a). The ankyrin repeat proteins have been detected in organisms ranging from viruses to humans and constitute a class of proteins that regulate, for example, important biological functions of the cell cycle and of the cytoskeleton organization (Michaely & Bennett, 1992; Cai & Zhang, 2006). The NUC-2, PREG, PGOV, and NUC-1 proteins have homology, respectively, to PHO81, PHO80, PHO85, and PHO4 from *Saccharomyces cerevisiae*. PHO80 and PHO85 form a cyclin-CDK complex, which phosphorylates PHO4 (Knight *et al.*, 2004; Waters *et al.*, 2004).

In an attempt to identify genes involved in metabolic responses to exogenous Pi sensing, a suppression subtractive hybridization (SSH) was used between RNA isolated from the wild type and *nuc-2* mutant strains of *N. crassa* grown under Pi starvation, pH 5.4. This study revealed genes involved in the initiation of mRNA translation that are significantly up-regulated in the *nuc-2* mutant strain, which

may be relevant to a further understanding of the functioning of gene *nuc-2* in *N. crassa*.

Materials and methods

Strains, culture conditions, and cDNA synthesis

The strains St.L.74A (wild type) and the *nuc-2A* mutant (FGSC#1996) of *N. crassa* were obtained from the Fungal Genetic Stock Center, School of Biological Sciences, University of Missouri, Kansas City, Missouri, and maintained on slants of Vogel's (1956) medium (1.5% agar). The *nuc-2* mutation was induced in the St.L. 74A strain by UV light, and the mutant strain was selected for its inability to utilize RNA or DNA as its sole phosphorus source (Ishikawa *et al.*, 1969; Peleg *et al.*, 1996a).

Conidia from each strain (about 10^6 cells mL⁻¹) were grown for 5 h at 30 °C, in an orbital shaker (200 rpm), in both low- and high-Pi medium (respectively, 10 µM or 15 mM Pi, final concentrations) adjusted to pH 5.4 (buffered with 50 mM sodium citrate), supplemented with 44 mM sucrose as the carbon source, and prepared as previously described (Nyc *et al.*, 1966; Rodrigues & Rossi, 1985). One microgram of total RNA, extracted from mycelia with the NucleoSpin[®] RNA Plant Kit (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA), was used for the synthesis of double-stranded cDNAs with the BD SMART[™] PCR cDNA Synthesis Kit (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA). The manufacturer's recommendations were used throughout the cDNA synthesis procedure.

SSH and screening of subtracted cDNA clones

The SSH (Diatchenko *et al.*, 1996) was performed between the driver and the tester cDNAs obtained, respectively, from mycelium of the wild type and *nuc-2* mutant strains, using the Clontech PCR-Select[™] cDNA Subtraction Kit as recommended (BD Biosciences Clontech, Palo Alto). The PCR product of subtraction was cloned into pGEM-T Easy Vector Systems (Promega), and the plasmids were transformed into competent cells of *Escherichia coli* grown on Luria–Bertani (LB)-agar medium supplemented with ampicillin (50 µg mL⁻¹) under X-gal and isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) selection. The white colonies of *E. coli* containing individual inserts of the differentially expressed sequences in the tester population were picked up, grown in ampicillin-LB medium for 12 h at 37 °C, and amplified by PCR using the nested primers 1 and 2R from the SSH kit and 2 µL of the *E. coli* culture as a template. Cycling was as follows: 94 °C for 2 min, and then 30 cycles of 95 °C for 30 s, 65 °C for 30 s, and 72 °C for 1.5 min. After checking in a 2% agarose gel, the rest of the PCR products were denatured with equal amounts of 0.6 N NaOH and

used for differential screening. Four microliter of this mixture, for each clone, was blotted in duplicate onto nylon membranes (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech) using a vacuum blotter. To bypass the loss of low-abundance-expressed sequences, the subtracted library was hybridized with both forward- and reverse-subtracted cDNA probes, which were labeled with fluorescein using the Gene Images Random Prime Labelling Module (Amersham Biosciences). Hybridizations were performed overnight at 60 °C under continuous agitation, the membranes washed as recommended (Amersham Biosciences), and then exposed to an X-ray film (Kodak Biomax MR film).

DNA sequencing and analysis

The plasmid from arrayed clones showing visual positive differential expression was purified and sequenced using the M13 Forward primer. Sequencing reactions were performed with the ABI Prism[®] BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit and analyzed using the ABI Prism[®] 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA). The expressed sequence tag (EST) sequences showing high nucleotide quality were processed using the software CAP3 for contig assembly, and the corresponding ORFs were identified in the *N. crassa* Genome database (Galagan *et al.*, 2003) (<http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/neurospora/Home.html>), and subjected to BLASTN and BLASTX search against GenBank database (Altschul *et al.*, 1997). The sequences were grouped into functional categories (Munich Information Center for Protein Sequences) (<http://mips.gsf.de>) according to their putative BLASTX identification (Mewes *et al.*, 1997, 2002).

Northern analysis

To perform virtual Northern blots (Franz *et al.*, 1999), the driver and the tester population of cDNAs generated by the SMART procedure were electrophoresed in a 1.2% agarose gel, denatured, and blotted (3 µg) onto Hybond-N+ nylon membranes (Amersham Biosciences). Subtracted clones were amplified by PCR, purified with the GFX PCR DNA and Gel Band purification kit, and used as probes labeled with fluorescein using the Gene Images Random Prime Labelling Module (Amersham Biosciences). The β-tubulin gene (*BmlR*) obtained from the Fungal Genetic Stock Center (plasmid pBT6) was used as the control. Hybridizations were performed overnight at 60 °C under continuous agitation, the membranes washed as recommended (Amersham Biosciences), and then exposed to an X-ray film (Kodak Biomax MR film).

For validation of differential gene expression by Northern blot, the strains wild type and *nuc-2* were cultivated as described for the construction of the subtractive suppressive cDNA library. The total RNA from each strain was extracted with TRIzol[®] reagent (Invitrogen), and c. 15 µg was

Fig. 1. Comparison of differential screening of subtracted cDNAs from *Neurospora crassa* *nuc-2A* mutant and wild type strains. Equal amounts of amplified cDNAs were arrayed onto two membranes and hybridized with two different probes. (a) Blot hybridized with forward (*nuc-2A* mutant strain) subtracted cDNA probe. (b) Blot hybridized with reverse (wild type strain) subtracted cDNA probe.

Table 1. Genes with elevated expression in *nuc-2A* mutant screened by reverse Northern hybridization

EST*	Predicted ORF†	Putative gene products/MIPS functional category
A3	NCU02571.3	Acetyl-CoA acetyltransferase/Amino acid metabolism
A4	NCU08964.3	Probable 60S ribosomal protein L10, cytosolic/Protein synthesis
A7/F6	NCU04553.3	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a fusion protein/Protein fate
A9	NCU07857.3	60S ribosomal protein L34/Protein synthesis
A10	NCU08389.3	60S ribosomal protein L20/Protein synthesis
A11	NCU00957.3	Related to extracellular matrix protein precursor/Biogenesis of cellular components
A12	NCU09477.3	ADP, ATP Carrier protein (ADP/ATP translocase)/Cellular transport, transport facilitation and transport routes
C3	NCU04736.3	Hypothetical protein similar to P-type calcium ATPase/Cellular transport, transport facilitation and transport routes
C4	NCU08620.3	40S ribosomal protein S16/Protein synthesis
C5	NCU02393.3	Mitogen-activated kinase-2/Signal transduction mechanism
C6	NCU03038.3	40S ribosomal protein S13/Protein synthesis
C7	NCU02003.3	Elongation factor-1 alpha/Protein synthesis
C8	NCU00413.3	60S ribosomal protein L2/Protein synthesis
C12	NCU03806.3	60S ribosomal protein L28 (L27A)/Protein synthesis
D3	NCU07380.3	Eukaryotic translation initiation factor 3d (eIF3d)/Cell cycle and DNA processing
E6	NCU02853.3	Unclassified/Hypothetical protein

*The identification and differential screening of the clones are shown in Fig. 1.

†Genes names in database (Broad Institute).

electrophoresed on 1% agarose gel containing formaldehyde, transferred onto a Hybond-N+ membrane, and hybridized with subtracted clones amplified by PCR radioactively labeled with [α - 32 P]-dCTP, as described previously (Sambrook *et al.*, 1989).

Results and discussion

SSH constructed to isolate transcripts specific to or up-regulated in the *nuc-2A* mutant strain generated a population of 362 cDNA clones. Following differential screening of these clones using both the forward- and reverse-subtracted probes, 66 cDNA candidates displaying visible positive differential expression were selected for further analysis. In order to reduce the possibility of isolating false-positive clones, these 66 candidates were screened in a second round by reverse Northern hybridization. Seventeen candidates with elevated expression in *nuc-2A* mutant

were identified (Fig. 1), sequenced, and the results of similarity searches against the *N. crassa* database are summarized in Table 1.

The differential expression of four of these cDNA clones was confirmed by both virtual and Northern blot analyses (Fig. 2). The translation initiation factor transcript (EST D3; Table 1, Fig. 2) encodes a subunit protein of the multimeric eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF3d; Bandyopadhyay *et al.*, 2002), one of the largest and most complex of the eIFs for global eukaryotic mRNA translations (Hershey *et al.*, 1996; Dong & Zhang, 2006; Hinnebusch, 2006). In *Schizosaccharomyces pombe*, eIF3 has a core complex consisting of five protein subunits and several noncore subunits, including the eIF3d. Furthermore, two eIF3 subcomplexes containing different noncore proteins were also found in addition to the five core subunits each, what may confer different functions to the core complex of eIF3 and, therefore, affect the initiation of translation of more restricted mRNA species (Zhou *et al.*, 2005). Furthermore, evidence

Fig. 2. Gene expression analysis. (a) Virtual Northern analyses of cDNA clones up-regulated in the *nuc-2A* mutant strain. Control: β -tubulin revealing equal loading of the lanes. (b) Northern blot analyses of genes using total RNA from *Neurospora crassa*. Ethidium bromide-stained rRNA bands are shown for comparison of the quantities of loaded RNA. Lanes 1 and 2 represent, respectively, the wild type and *nuc-2A* mutant strains grown in low-Pi. Lane 3 represents the wild type strain grown in high-Pi. The identification and functional description of the clones are shown in Table 1.

now indicates that eIF3 complex influences a wide range of functions, including interactions with other eIFs and the proteasome (Chang & Schwechheimer, 2004), assembly of the eIF2-GTP-Met-tRNA^{Met} ternary complex (TC), and binding of TC to the 40S ribosomal subunit (Hinnebusch, 2006). The concomitant up-regulation of the 40S ribosomal proteins S13, S16, and the ubiquitin-ribosomal protein S27a fusion protein (Tarawneh *et al.*, 1994; Catic & Ploegh, 2005) (ESTs C6, C4, and A7/F6, respectively; Table 1, Fig. 2) reinforces the proposed specificity of the interaction between the eIF3 complexes with the 40S ribosomal subunit, which may result in the recruitment of the cellular translation machinery responsible for the translation initiation of a subpopulation of mRNAs. Therefore, the differential expression of these transcripts that occurs in the *nuc-2A* mutant or in the wild-type strains of *N. crassa*, respectively, grown in low- or high-Pi medium (Fig. 2) could account for the regulation of the Pi-repressible phosphatases (Metzenberg, 1979). In fact, these ESTs were expressed when the *nuc-2* gene is nonfunctional, as it occurs in this gene when the wild-type strain is grown in sufficient Pi (Fig. 2).

It can also be observed that among these ESTs enriched in the *nuc-2* mutant strain grown under Pi starvation, functional grouping identified putative proteins possibly

involved in other cellular processes related or not to the regulation of protein synthesis (Table 1). Furthermore, some of these genes are now known to play essential roles in signaling transduction mechanisms controlling specific aspects of cellular differentiation in eukaryotic organisms (Wei & Deng, 2003; Harari-Steinberg & Chamovitz, 2004). Hence, their characterization may be relevant to a further understanding of the molecular events involved in phosphorus sensing in *N. crassa*.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Brazilian funding agencies FAPESP, CNPq, CAPES, and FAEPA. We thank A. Borghi for the English manuscript review, and P.R. Sanches, R.A. Ferreira, and M. Mazucato for technical assistance.

Authors contribution

D.E.G. and H.C.S.S. contributed equally to this work.

References

- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W & Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389–3402.
- Bandyopadhyay A, Lakshmanan V, Matsumoto T, Chang EC & Maitra U (2002) Moe1 and spInt6, the fission yeast homologues of mammalian translation initiation factor 3 subunits p66 (eIF3d) and p48 (eIF3e), respectively, are required for stable association of eIF3 subunits. *J Biol Chem* **277**: 2360–2367.
- Cai X & Zhang Y (2006) Molecular evolution of the ankyrin gene family. *Mol Biol Evol* **23**: 550–558.
- Catic A & Ploegh HL (2005) Ubiquitin – conserved protein or selfish gene? *Trends Biochem Sci* **30**: 600–604.
- Chang EC & Schwechheimer C (2004) ZOMES III: the interface between signalling and proteolysis. *EMBO Rep* **5**: 1041–1045.
- Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP *et al.* (1996) Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 6025–6030.
- Dong Z & Zhang JT (2006) Initiation factor eIF3 and regulation of mRNA translation, cell growth, and cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* **59**: 169–180.
- Franz O, Bruchhaus I & Roeder T (1999) Verification of differential gene transcription using virtual Northern blotting. *Nucleic Acids Res* **27**: e3.
- Galagan JE, Calvo SE, Borkovich KA *et al.* (2003) The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature* **422**: 859–868.

- Han SW & Rossi A (1989) Acid phosphatase (EC 3.1.3.2) synthesis by phosphorus regulatory mutant strains of *Neurospora crassa*. *Braz J Med Biol Res* **22**: 423–431.
- Harari-Steinberg O & Chamovitz DA (2004) The COP9 signalosome: mediating between kinase signaling and protein degradation. *Curr Protein Pept Sci* **5**: 185–189.
- Hershey JW, Asano K, Naranda T, Vornlocher HP, Hanachi P & Merrick WC (1996) Conservation and diversity in the structure of translation initiation factor eIF3 from humans and yeast. *Biochimie* **78**: 903–907.
- Hinnebusch AG (2006) eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes. *Trends Biochem Sci* **31**: 553–562.
- Ishikawa T, Toh EA, Uno I & Hasunuma K (1969) Isolation and characterization of nuclease mutants in *Neurospora crassa*. *Genetics* **63**: 75–92.
- Kang S & Metzenberg RL (1990) Molecular analysis of *nuc-1⁺*, a gene controlling phosphorus acquisition in *Neurospora crassa*. *Mol Cell Biol* **10**: 5839–5848.
- Kang S & Metzenberg RL (1993) Insertional mutagenesis in *Neurospora crassa*: cloning and molecular analysis of the *preg⁺* gene controlling the activity of the transcriptional activator NUC-1. *Genetics* **133**: 193–202.
- Knight JP, Daly TM & Bergman LW (2004) Regulation by phosphorylation of Pho81p, a cyclin-dependent kinase inhibitor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **46**: 10–19.
- Metzenberg RL (1979) Implications of some genetic control mechanisms in *Neurospora*. *Microbiol Rev* **43**: 361–383.
- Mewes HW, Albermann K, Heumann K, Liebl S & Pfeiffer F (1997) MIPS: a database for protein sequences, homology data and yeast genome information. *Nucleic Acids Res* **25**: 28–30.
- Mewes HW, Frishman D, Guldener U, Mannhaupt G, Mayer K, Mokrejs M, Morgenstern B, Munsterkotter M, Rudd S & Weil B (2002) MIPS: a database for genomes and protein sequences. *Nucleic Acids Res* **30**: 31–34.
- Michaely P & Bennett V (1992) The ANK repeat: a ubiquitous motif involved in macromolecular recognition. *Trends Cell Biol* **2**: 127–129.
- Nyc JF, Kadner RJ & Crocken BJ (1966) A repressible alkaline phosphatase in *Neurospora crassa*. *J Biol Chem* **241**: 1468–1472.
- Peleg Y, Aramayo R, Kang S, Hall JG & Metzenberg RL (1996a) NUC-2, a component of the phosphate-regulated signal transduction pathway in *Neurospora crassa*, is an ankyrin repeat protein. *Mol Gen Genet* **252**: 709–716.
- Peleg Y, Addison R, Aramayo R & Metzenberg RL (1996b) Translocation of *Neurospora crassa* transcription factor NUC-1 into the nucleus is induced by phosphorus limitation. *Fungal Genet Biol* **20**: 185–191.
- Rodrigues SA & Rossi A (1985) Effect of phosphate levels on the synthesis of acid phosphatases (EC 3.1.3.2) in *Neurospora crassa*. *Genet Res* **45**: 239–249.
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Tarawneh KA, Anumula KR & Free SJ (1994) The isolation and characterization of a *Neurospora crassa* gene (*ubi::crp-6*) encoding a ubiquitin-40S ribosomal protein fusion protein. *Gene* **147**: 137–140.
- Vogel HJ (1956) A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. *Microbial Genet Bull* **13**: 42–43.
- Waters NC, Knight JP, Creasy CL & Bergman LW (2004) The yeast Pho80–Pho85 cyclin–CDK complex has multiple substrates. *Curr Genet* **46**: 1–9.
- Wei N & Deng XW (2003) The COP9 signalosome. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**: 261–286.
- Zhou C, Arslan F, Wee S, Krishnan S, Ivanov AR, Oliva A, Leatherwood J & Wolf DA (2005) PCI proteins eIF3e and eIF3 m define distinct translation initiation factor 3 complexes. *BMC Biology* **3**: 14.

DADOS CURRICULARES

CURRICULUM VITAE

Henrique César Santejo Silveira

E-mail: hcass@usp.br

DADOS PESSOAIS

Nome: Henrique César Santejo Silveira

Endereço: R Campos Salles, 183 apto. 73 Centro

Ribeirão Preto-S.P CEP: 14015-110

Fone: (16) 3632-6940/97702319

Nacionalidade: Brasileiro

Data de Nascimento: 03/11/75, Ribeirão Preto-SP, Brasil.

Estado Civil: casado

ESCOLARIDADE

- **Doutor em Ciências** (em andamento) pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Área de concentração **Genética**; sub-área: Genética e Biologia Molecular de Microorganismos– Projeto de Tese: A Capacidade de Infecção do dermatófito *Trichophyton rubrum* está correlacionada com a sinalização do pH extracelular. Orientadora: Profa Dra. Nilce M Martinez Rossi.
- **Mestre em Ciências** (2000-2003) pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR). Área de concentração **Genética e Evolução** – Projeto de Dissertação. Estudo das proteínas Ligantes a DCRA e DSCR1 (Envolvidas com a Síndrome de Down), utilizando a metodologia do Duplo Híbrido. Dissertação concluída em 2003. orientador: Prof. Dr. Flávio Henrique Silva.
- **Bacharel em Ciências Biológicas - Modalidade Médica** (1995-1999) pelo Centro Universitário Barão de Mauá de Ribeirão Preto.

PRÊMIOS E TÍTULOS

- ❖ **Silveira, HCS**, Gras, DE, Peres, NTA, Ono, C., Aquino-Ferreira, R., Rossi, A. e Martinez-Rossi, NM. A Capacidade de infecção do dermatófito *Trichophyton rubrum* é correlacionada com a sinalização do pH extracelular. Prêmio concedido pela Sociedade Brasileira de Genética de melhor trabalho na área de Genética de Microorganismos apresentado durante o 52º Congresso Brasileiro de Genética.
- ❖ Seleção do trabalho para apresentação oral "*The sensing of acid pH by the dermatophyte rubrum correlates with its infecting capacity*" na XXXV SBBq, Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular.
- ❖ ANDRADE, A.S, PAIÃO, FG, **SILVEIRA, HCS**, FACHIN, AL, MARTINEZ-ROSSI, NM. Análise da Expressão Diferencial de genes do mutante *AtrD* de *Trichophyton rubrum* em Resposta ao Antifúngico Terbinafina, menção honrosa no, 51º Congresso Brasileiro de Genética, Sociedade Brasileira de Genética.
- ❖ ANDRADE, A.S, **SILVEIRA, HCS**, PAIÃO, FG, FACHIN, AL, MARTINEZ-ROSSI, NM. Perfil de expressão gênica das linhagens selvagem e mutante *AtrD*-inativado do fungo patogênico *Trichophyton rubrum* expostas a terbinafina, menção honrosa, 13º Simpósio Internacional de Iniciação Científica – USP.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

A) ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

1. GRAS, DE., **SILVEIRA, HCS.**, MARTINEZ-ROSSI, NM., ROSSI, A. Identification of genes displaying differential expression in the nuc-2 mutant strain of the mold *Neurospora crassa* grown under phosphate starvation. FEMS Microbiology Letters, v. 269, p. 196-200, 2007.
2. FERREIRA-NOZAWA, MS., **SILVEIRA, HCS.**, Ono, CJ., FACHIN, A L. ; ROSSI, A., MARTINEZ-ROSSI, N M. The pH signaling transcription factor PacC mediates the growth of *Trichophyton rubrum* on human nail in vitro. Medical Mycology (Oxford), v. 44, p. 1-5, 2006.
3. MALAGÓ-JUNIOR, W., SOMMER, CA., ANDRADE, CC., COSTA, AS., POSSIK, P., CASSAGO, A., **SILVEIRA, HCS.**, HENRIQUE-SILVA, F. Gene Expression Profile of Human Down Syndrome. Croatia Medical Journal C M J., v.46, p.647 - 656, 2005.
4. **SILVEIRA, HCS.**, SOMMER, CA., HENRIQUE-SILVA, F. A calcineurin inhibitory protein overexpressed in Down Syndrome, interacts with the product of ubiquitously expressed transcript (UXT). Brazilian Journal of Medical and Biological Research. , v.37, p.785 - 789, 2004.
5. VETTORE, AL., DA SILVA, FR., KEMPER, EL., HENRIQUE-SILVA, F., **SILVEIRA, HCS.**, e outros autores. Analysis and Functional Annotation of an Expressed Sequence Tag Collection for Tropical Crop Sugarcane. Genome Research. , v.13, p.2725 - 2735, 2003.

B) COMUNICAÇÕES E RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS OU PERIÓDICOS (RESUMO)

1. FREITAS, J. S., SILVA, E. M., LEAL, J., SQUINA, F. M., GRAS, D. E., **SILVEIRA, H. C. S.**, MARTINEZ-ROSSI, N. M., ROSSI, A. Suppression subtractive analyses revealed genes down-regulated in the palA1 mutant strain of *Aspergillus nidulans* grown in acid pH.. In: XXXVI Reunião Anual da SBBq e 10th IUBMB Conference., 2007, Salvador. BA. Book of Abstracts G-17.
2. LEAL, J., SQUINA, FM., FREITAS, JS., SILVA, EM., **SILVEIRA, HCS.** ; GRAS, DE. ; MARTINEZ-ROSSI, N M., ROSSI, A. Identification of new *Neurospora crassa* genes under regulation of the transcription factor nuc-1 in response to Pi starvation. In: XXXVI Reunião Anual da SBBq e 10th IUBMB Conference., 2007, Salvador. BA.. Book of Abstracts G13.
3. SILVA, EM., FREITAS, JS., GRAS, DE., **SILVEIRA, HCS.**, LEAL, J., SQUINA, FM., MARTINEZ-ROSSI, N M., ROSSI, A. Supression subtractive hybridization analyses identified gene up-regulated in the palA1 mutant strain of *Aspergillus nidulans*.. In: XXXVI Reunião Anual da SBBq e 10th IUBMB Conference., 2007, Salvador. BA.. Book of Abstracts G-119.
4. GRAS, D. E., **SILVEIRA, HCS.**, MARTINEZ-ROSSI, NM., ROSSI, A. Gene regulation in the nuc-2 mutant strain of *Neurospora crassa* grown under phosphate starvation. In: XXXVI Reunião Anual da SBBq e 10th IUBMB Conference., 2007, Salvador. BA. Book of Abstracts G-84.
5. GRAS, DE., **SILVEIRA, HCS.**, MARTINEZ-ROSSI, NM., ROSSI, A. Identification of genes up- and down-regulated in the nuc-2A mutant strain of *Neurospora crassa*. In: XXIV Fungal Genetics Conference., 2007, Asilomar. CA. Poster Session Abstracts. Gene Regulation. 311.
6. SILVA, EM., FREITAS, SJ., LEAL, J., SQUINA, FM., GRAS, DE., **SILVEIRA, HCS.**, SANCHES, PR., MARTINEZ-ROSSI, NM., ROSSI, A. Identification of genes up regulated in the palA1 mutant strain of *Aspergillus nidulans*. In: XXIV Fungal Genetics Conference., 2007, Asilomar. CA. Poster Session Abstracts, 316.
7. PERES, NTA., **SILVEIRA, HCS.**, MARTINEZ-ROSSI' NM., PRADE, RA. Antifungal Targeting of Signaling in dermatophytes *Trichophyton rubrum*. In: XXIV Fungal Genetics Conference.,

2007, Asilomar. CA. Poster Session Abstracts, 513.

8. **SILVEIRA, HCS.**, GRAS, DE., PERES, NTA., ONO, CJ., AQUINO-FERREIRA, R., ROSSI, A.; MARTINEZ-ROSSI, NM. A Capacidade de infecção do dermatófito *Trichophyton rubrum* é correlacionada com a sinalização do pH extracelular. 52º Congresso Brasileiro de Genética., 2006.

9. GRAS, DE., **SILVEIRA, HCS.**, SANCHES, PR., CRESCÊNCIO DE SOUZA, NA., MARTINEZ-ROSSI, NM., ROSSI, A. Identificação de genes regulados positivamente pela proteína NUC-2 do fungo *Neurospora crassa*. 52º Congresso Brasileiro de Genética., 2006.

10. LEAL, J., SQUINA, FM., SILVA, EM., FREITAS, JS., **SILVEIRA, HCS.**, GRAS, DE., SANCHES, PR., MARTINEZ-ROSSI, NM., ROSSI, A. Regulação da expressão gênica no fungo *Neurospora crassa* em resposta ao nível de fosfato sob controle do gene *nuc*-. 52º Congresso Brasileiro de Genética., 2006.

11. SILVA, EM., FREITAS, SJ., LEAL, J., SQUINA, FM., GRAS, DE., **SILVEIRA, HCS.**, SANCHES, PR., MARTINEZ-ROSSI, NM., ROSSI, A. Identificação de genes diferencialmente expressos no mutante *palA1* de *Aspergillus nidulans* através de uma biblioteca de subtração de cDNA. 52º Congresso Brasileiro de Genética., 2006.

12. COELHO, LM, SEGATO, F, PAIÃO, FG; GRAS, DE, **SILVEIRA, HCS.**, MARTINEZ-ROSSI, NM. Genes diferencialmente expressos em *Trichophyton rubrum* na presença do antifúngico itraconazol
52º Congresso Brasileiro de Genética., 2006.

13. FREITAS, JS., SILVA, EM., LEAL, J., SQUINA, FM., GRAS, DE., **SILVEIRA, HCS.**, SANCHES, PR., MARTINEZ-ROSSI, NM., ROSSI, A. Expressão diferencial de genes em *Aspergillus nidulans* em resposta ao pH ambiente. 52º Congresso Brasileiro de Genética., 2006.

14. **SILVEIRA, HCS.**, GRAS, DE., FERREIRA-NOZAWA, MS., ONO, CJ., ROSSI, A., Martinez-Rossi, NM. The sensing of acid pH by the dermatophyte *Trichophyton rubrum* correlates with its infecting capacity.
XXXV Reunião Anual da SBBq, 2006.

15. GRAS, DE., **SILVEIRA, HCS.**, MARTINEZ-ROSSI., NM AND ROSSI, A. Suppression subtractive hybridization analyses identify genes central to phosphate sensing functions in *Neurospora crassa*.
XXXV Reunião Anual da SBBq, 2006.

16. **SILVEIRA, HCS.**, FERREIRA-NOZAWA, MS., ONO, CJ., GRAS, DE., ROSSI, A., MARTINEZ-ROSSI, N M. Full virulence of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* is dependent on transcription factor PacC. 8th European Conference on Fungal Genetics, Viena -Austria, 2006.

17. GRAS, DE, **SILVEIRA, HCS.**, MARTINEZ-ROSSI, NM., ROSSI, A. Identification of differentially expressed genes in the *nuc-2* mutant strain of *Neurospora crassa*. 8th European Conference on Fungal Genetics, Viena – Austria, 2006.

18. MARANHÃO, FCA., PAIÃO, FG., PERES, NTA., CURSINO-SANTOS, JR., GRAS, DE., **SILVEIRA, HCS.**, MARTINEZ-ROSSI, NM. Análise da expressão gênica no dermatófito *Trichophyton rubrum* cultivado em queratina por hibridização subtrativa seguida de PCR supressivo. XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005.

19. ANDRADE, A., PAIÃO, FG., **SILVEIRA, HCS.**, FACHIN, AL., MARTINEZ-ROSSI, NM. Expressão diferencial de genes no dermatófito *Trichophyton rubrum* em resposta a terbinafina. 51º Congresso Brasileiro de Genética, 2005.

20. **SILVEIRA, HCS.**, FERREIRA-NOZAWA, MS., ROSSI, A, MARTINEZ-ROSSI, NM.

Identification of genes differentially expressed in response to acidic induction in *Trichophyton rubrum*. 23rd Fungal Genetics Conference at Asilomar, 2005.

21. **SILVEIRA, HCS**, FERREIRA-NOZAWA, MS., SANCHES, PR, ROSSI, A., MARTINEZ-ROSSI, NM.

O fator de transcrição PacC media a patogenicidade e a expressão de genes em pH ácido no dermatófito *Trichophyton rubrum*. 51º Congresso Brasileiro de Genética, 2005.

22. ANDRADE, A., **SILVEIRA, HCS.**, FERREIRA-NOZAWA, MS., ROSSI, A., MARTINEZ-ROSSI, NM.

Análise da expressão gênica diferencial no dermatófito *Trichophyton rubrum* utilizando a metodologia de differential display. Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo - SIICUSP, 2004.

23. **SILVEIRA, HCS.**, NOZAWA, MSF., NOZAWA, S., ROSSI, A., MARTINEZ-ROSSI, NM.

Efeito do pH ambiente na expressão diferencial de genes no dermatófito *Trichophyton rubrum*. 50º Congresso Brasileiro de Genética da Sociedade Brasileira de Genética, 2004.

24. **SILVEIRA, HCS.**, NOZAWA, SR., MARTINEZ-ROSSI, NM. Análise de genes

diferencialmente expressos no dermatófito *Trichophyton rubrum*, em condição de estresse com cloranfenicol utilizando DDRT-PCR. 49º Congresso Nacional de Genética da Sociedade Brasileira de Genética, 2003.

25. **SILVEIRA, HCS.**, SOMMER, CA., HENRIQUE-SILVA, F. DSCR1, a calcineurin interacting

protein, also interacts with two other proteins APLP1 (amyloid precursor-like protein 1) and UXT (ubiquitously expressed transcript). XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2003.

26. **SILVEIRA, HCS.**, CASSAGO, AI., COSTA, AS., SOMMER, CA., PANEPUCCI, RA,

MALAGÓ-JUNIOR, W., HENRIQUE-SILVA, F. Human leukocyte transcriptome profile of a down syndrome patient. 48º Congresso Nacional de Genética da Sociedade Brasileira de Genética, 2002.

27. MALAGÓ JUNIOR, W., PANEPUCCI, R A., **SILVEIRA, HCS.**, CASSAGO, A., COSTA, AS.,

SOMMER, CA., HENRIQUE-SILVA, F. Sage Transcriptome Profiling of Human Leucocytes from 28 Years Old Down Syndrome Individual . XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2002.

28. **SILVEIRA, HCS.**, PANEPUCCI, RA., HENRIQUE-SILVA, F. Down Syndrome Candidate

Region Gene A interacts with a Phosphatase Protein including many cellular processes. XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2001.