FACULDADE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Caracterização molecular do gene *ncsA* de *Aspergillus fumigatus.*

Tese de Doutorado

Aluno: André Oliveira Mota Júnior
Orientador: Prof. Dr. Gustavo H. Goldman

Novembro 2008

FACULDADE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Caracterização molecular do gene *ncsA* de *Aspergillus fumigatus.*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP para obtenção do Título de Doutor em Biociências.

Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientado: André Oliveira Mota Júnior

Orientador: Gustavo Henrique Goldman

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Mota Jr, A O

Caracterização molecular do gene *ncsA* de *Aspergillus fumigatus*. Ribeirão Preto, 2008. 122 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP - Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Goldman, Gustavo Henrique.

1. NCS (neuronal caucium sensor). 2. *Aspergillus fumingatus*. 3. proteína ligante de cálcio.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Candidato: André Oliveira Mota Júnior

Título da Tese: Caracterização molecular do gene *ncsA* de *Aspergillus fumigatus.*

Orientador: **Gustavo Henrique Goldman**

Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP para obtenção do Título de Doutor em

A Comissão Julgadora dos Trabalhos de Defesa de Tese de Doutora em sessão pública realizada em ...../...../..... considerou, ( )APROVADO ( )REPROVADO

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____Assinatura:_____

DEDICO

Aos meus queridos pais André e Antonia, que me deram à vida.

A Letícia, minha companheira amada, mulher forte e que admiro.

Aos meus irmãos Veranilda, Vera Lúcia, Verlânia, Vânia e Evandro.

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman pela orientação constante e por ter me concedido à oportunidade de vicejar no aprendizado científico e amadurecimento pessoal. Meus sinceros agradecimentos pelo exemplo e por ter me ensinado muito mais que experimentações científicas.

A Prof.ª Maria Helena, que nos irradia com seu entusiasmo, pelo empréstimo dos aparelhos e reagentes sempre que foram necessários.

Aos meus amigos e companheiros de jornada desses últimos anos: Iran Malavarzi, que sempre solícito, teve imensa paciência em ensinar-me técnicas de biologia molecular e mais que isso, por ser referência de conduta mesmo nas situações mais delicadas. Marcela Savoldi, pelo prestimoso auxílio de todas as horas e por relevar as brincadeiras e tribulações comuns do cotidiano. Sou grato a Márcia Ferreira, Zé Luiz Capelaro, Frederico Soriani, Paula Gouvêia, Luciano Ângelo Bernardes, Márcia Kress, Joel Fernandes Lima, Patrícia Alves, Bárbara Pimentel, Ana Cristina Colabardini, Sara Raquel de Carvalho, Camila Matsumoto, Carol Guerreiro Morgon, Andréia Quiapin e Viviane, Washington Luis de Lima e Alvaro, Carlo, Rodrigo Blades, Fábio Galleti, Trança, Sandro, Mirela: estou em dívida com todos, quer pelas contribuições neste trabalho, quanto pelos ensinamentos que me trouxeram durante o convívio.

Aos meus pais e familiares: André e Antonia, Veranilda, Júlio, Jônata, Ananda, Davi, Vera Lúcia, Rodrigo, Arcelino, Verlânia, Aurimar, Diego, João Pedro, Vânia, Edivaldo, Emanuel, Samuel, Evandro, Vanessa, Igor, Nicole e Estefani, pelo apoio terno e incentivo.

Aos meus novos familiares: Letícia, Sr. Melo, Jaqueline, Leandro, Ana, Isabela, D. Maria, Tia Judite, Sinomar, Luciano e Tio Alfredo, pela amizade e incentivo.

As secretárias Ana Cristine e Rosângela, pela amizade constante, e conselhos valiosos.

Agradeço particularmente aos meus amigos Elpídio e Cassandra pelo carinho e incentivo, minha eterna gratidão.

A todos os amigos que torceram por mim e em mim acrescentaram ao longo desta senda de aprendizagens.

A todas as pessoas, que mesmo não mencionadas, contribuíram de alguma forma na realização deste trabalho, muito obrigado.

A FAPESP, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro ao longo desse trabalho e pela bolsa de doutoramento concedida.

Alguns poucos homens são bem sucedidos por serem predestinados,

a maioria por serem determinados.

desconhecido

RESUMO

MOTA JR, A O. **Caracterização molecular do gene *ncsA* de *Aspergillus fumigatus.*** 2008. 122f. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

O foco do trabalho está direcionado para a construção da linhagem "knock-out" do gene *ncsA* de *A. fumigatus*, bem como a caracterização do fenótipo da linhagem Δ*ncsA* e a investigação de interações deste gene com vias de sinalização importantes para o desenvolvimento do fungo. A linhagem mutante *ΔncsA* foi construída através da transformação do WT (Δ*ku80*) com o gene marcador *pyrG* de *A. fumigatus*. Foi confirmada a deleção por Southern blot e as alterações fenotípicas da linhagem foram analisadas. O gene *ncsA* em *A. fumigatus* não é essencial e a linhagem Δ*ncsA* apresentou-se sensível EGTA e SDS, alé, de tolerante a altas concentrações de íons cálcio. Na linhagem NcsA:mRFP foi localizado a proteína NcsA no citoplasma das células e sua localização não é alterada pela em resposta ao aumento da concentração de cálcio. A linhagem Δ*ncsA* foi sensível a drogas que afetam a biossíntese e a manutenção da membrana plasmática, tais como voriconazole, anfotericina e itraconazole. O crescimento polarizado em presença de lovastatina nessa linhagem foi consideravelmente mais afetado que no tipo selvagem. O Spitzenkörper não foi visualizado no mutante *ΔncsA*, e existe uma significante diminuição de estruturas vacuolares e endossomos. Os resultados obtidos em ensaios de TRPCR em tempo real sugerem que NcsA modula a expressão dos genes *pmcA* e *pmcB*, que codificam proteínas ATPases transportadoras de íons cálcio. Os ensaios de virulência no modelo animal revelaram que a mutação do gene *ncsA* não causa perda de virulência no *A. fumigatus*.

Palavras Chave: 1. NCS (neuronal caucium sensor). 2. *Aspergillus fumingatus*. 3. proteína ligante de cálcio.

ABSTRACT

MOTA JR, A O **MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THE *ASPERGILLUS FUMIGATUS NCS-1* HOMOLOGUE, *NCSA*.**. 2008. 90f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Medicine de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Here, we characterize the *A. fumigatus* Neuronal Calcium Sensor, *ncsA* homologue. We showed that *ncsA* is not an essential gene and Δ*ncsA* growth was decreased in the presence of EGTA and SDS. Furthermore, the Δ*ncsA* mutant is more resistant to calcium chloride. NcsA:mRFP localizes to the cytoplasm that its cellular localization is not affected by the cellular response to calcium chloride. The Δ*ncsA* mutant strain is more sensitive to voriconazole, itraconazole, and the ergosterol intercalating agent, amphotericin. Polar growth in the *ΔncsA* mutant strain was also considerably more affected by lovastatin than in the wild type mutant strain. The Spitzenkörper cannot be visualized in the *ΔncsA* mutant, and there is a significant decrease of the endosome/vacuole structures. NcsA supports *pmcA* and *pmcB* expression therefore reduced expression of these ion pumps, and also of other genes involved in the response to calcium in *A. fumigatus*. The *ncsA* inactivation mutation is not causing loss of virulence in a low dose murine infection when compared to the corresponding wild type strain.

Key words: NCS, *A.fumigatus*, calcium ligands proteins

ÍNDICE

RESUMO.....i
ABSTRACT.....ii
ÍNDICE.....iii
LISTA DE FIGURAS.....iv
LISTA DE TABELAS.....v
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....vi
1.INTRODUÇÃO.....1
1.1. A proteínas NCS.....2
1.2. *Aspergillus fumigatus*.....5
2.OBJETIVO..... 9
3-MATERIAIS E MÉTODOS.....10
3.1 Meios de Cultura para o *A. fumigatus*.....11
Meio mínimo (MM).....11
Meio completo (YAG, YUU, YG e YG+UU).....11
3.2-Meio de cultura para *E. coli*.....12
Meio Luria Bertani (LB).....12
3.3- Soluções e Tampões.....12
Solução de elementos traços.....12
Solução de sais 20X concentrada para MM.....13
Soluções de protoplastização para transformação em *A. fumigatus*
Solução 1 de protoplastização.....13
Solução 2 de protoplastização.....13
Solução 3 de protoplastização.....14
Solução 4 de protoplastização.....14
Solução 5 de protoplastização.....14
Solução de lise para mini prep.....15
Solução de neutralização para mini prep.....15
Solução de Denhardt.....15
Solução depurinizante.....16

Solução salina citrato (SSC).....16
Solução SDS 10%.....16
Solução de fixação para microscopia I.....16
Solução estoque de DAPI.....17
Solução estoque de calcoflúor.....17
Solução estoque de lovastatina.....17
Solução estoque de miriocina.....17
Solução estoque de filipina.....17
Solução estoque de "nitro blue tetrazolium".....18
Solução estoque de FM4-64.....18
Soluções estoque de drogas mutagênicas utilizadas.....19
Tampão PBS.....19
Tampão MOPS.....19
Tampão de amostra para eletroforese de RNA.....20
Tampão TRIS-Acetato-EDTA (TAE).....20
Tampão GET para "mini prep".....20
Tampão de extração de DNA.....21
3.4-Protocolos adotados.....21
Preparo de células eletrocompetentes de *E. coli*.....21
Eletrotransformação de *E. coli*.....22
Mini preparação do DNA plasmidial.....23
Transformação em *A. fumigatus*.....24
Deleção do gene *ncsA* em *A. fumigatus*.....26
Complementação do mutante *ΔncsA*.....27
Preparo de células competentes de *S. cerevisiae* e transformação.....28
Produção de cassetes de deleção pela técnica de recombinação "in vivo" em *S.cerevisiae*.....29
Extração de DNA genômico de *A. fumigatus*.....34
Extração de DNA de *Saccharomyces cerevisiae*.....34
Southern blot alcalino.....35
Marcação de Sonda Radioativa.....35

Hibridização das membranas de Southern blot e hibridização de colônia.....36
Reação de sequenciamento do DNA.....37
Extração e manipulação de RNA.....38
Reação de PCR quantitativo em tempo real ("Real time RT- PCR").....40
Experimentos de microscopia de fluorescência.....42
Determinação da polarização do crescimento em conídeos após liberação do bloqueio com HU.....44
Determinação da sensibilidade a agentes mutagênicos.....46
Estoque de linhagens.....45
Construção da árvore filogenética.....46
Ensaios de Virulência.....46
Análise estatística.....47
4-RESULTADOS.....48
4.1. A mutação *ΔncsA* provoca resistência ao cálcio e sensibilidade ao EGTA em *A. fumigatus*.....49
4.2. O NcsA é importante para a distribuição de esterois na extremidade da hifa e estabilização do crescimento polarizado.....63
4.3. A linhagem mutante *ΔncsA* tem diminuidos os níveis de mRNA para genes moduladores de cálcio.....72
4.4. Ensaios de virulência.....77
5.DISCUSSÃO.....80
6-CONCLUSÃO.....88
7-REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....89
8-ANEXO- Artigo publicado intitulado:.....95
MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THE *ASPERGILLUS FUMIGATUS NCS-1* HOMOLOGUE, *NCSA*.
Mota Júnior AO, Malavazi I, Soriani FM, Heinekamp T, Jacobsen I, Brakhage AA, Savoldi M, Goldman MH, da Silva Ferreira ME, Goldman GH.
Mol Genet Genomics. 2008 Oct 2.

LISTA DE FIGURAS

3-MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 1: Representação esquemática do vetor pRS426 utilizado na recombinação homóloga em leveduras para a construção de cassetes de deleção.....31

Figura 2: Representação esquemática do mecanismo de recombinação homóloga em *S. cerevisiae*.....33

4-RESULTADOS

Figura 1: Árvore filogenética da proteína Ncs.....51

Figura 2: Construção da linhagem ΔncsA.....54

Figura 3: Análise por Southern blot da linhagem selvagem (Δku80) e mutante *ΔncsA*.....55

Figura 4: Perfil do crescimento radial da linhagem selvagem e mutante *ΔncsA*.....57

Figura 5: Crescimento radial das linhagens selvagem (del *ku80*) e mutante *ncsA* (del *ncsA*) na presença de EGTA e Cálcio.....58

Figura 6: Efeito do estresse osmótico sobre o crescimento da linhagem selvagem e *ΔncsA*.....59

Figure 7: Análise por Southern blot da integração homóloga do inserto *mRFP::pyrG* no DNA genômico do *A. fumigatus*.....61

Figure 8: NcsA::mRFP localiza-se no citoplasma.....62

Figura 9: Fotografias de culturas das linhagens selvagem e mutante *ncsA* (*ΔncsA*) crescidas em presença de drogas inibidoras de síntese de membrana plasmática.....67

Figura 10: Polarização do ergosterol de membrana durante o crescimento polarizado nas linhagens selvagem e mutante *ΔncsA* de *A. fumigatus*.....68

Figura 11: Influência da lovastatina durante o crescimento polarizado nas linhagens selvagem e mutante *ΔncsA* de *A. fumigatus*.....69

Figura 12: Mutação *ΔncsA* em *A fumigatus* pode alterar tráfego endocítico.....70

Figura 13: O mutação *ΔncsA* afeta a expressão de genes que codificam bombas de íons.....73

Figura 14: Níveis de mRNA apresentados por genes moduladores de cálcio quando submetidos a tratamento com CaCl 200mM por 10 e 30 minutos.....76

Figura 15: Mutação no gene *ncsA* não tem influência na virulência *A. fumigatus*.....78

Figura 16. Genes codificantes de proteínas com domínio EF-hands em *A. fumigatus*.....79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Soluções estoque das drogas mutagênicas.....19

Tabela 2: Primers utilizados para a construção do cassete de deleção do gene *ncsA*.....27

Tabela 3: Seqüência dos primes utilizados para a produção dos cassetes de deleção e substituição gênica pela técnica de recombinação "in vivo" em *S. cerevisiae*(pRS426) e clonagem unidirecional no vetor pMCB17apx.....32

Tabela 4*:* Descrição dos primers e sondas fluorescentes utilizados nas reações de RT-PCR em Tempo Real.....40

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.

BSA	albumina de soro bovino
cDNA	DNA complementar
CPT	camptothecin
DAPI	4, 6-diamino-2-fenilindol
DMSO	dimetilsulfóxido
dNTP	desoxirinucleotídeos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DTT	ditiotreitol
EGTA	ácido etileno glicol-bis(2-aminoetil éter)-N,N,N',N' tetraacético
FM4-64	(N-(3-thiethylammoniumpropyl)-4-(p-diethylaminophenylhexatrienyl) pyridinium dibromide
g	gravidade
gfp	gene da proteína fluorescente verde ("green fluorescent protein")
HU	hidroxiuréia
Kb	kilo bases
KDa	kilo Daltons
M	molar
MENA	menadiona
mRNA	RNA mensageiro
nm	nanômetros
ORF	fase aberta de leitura ("open reading frame")
p/p	peso/peso
p/v	peso/volume
pyrG	gene orotidina-5'-fosfato descarboxilase de *A. fumigatus*
rpm	rotação por minuto
RT-PCR	transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
SDS	dodecil sulfato de sódio
TIGR	"The Institute for Genomic Research"
UV	luz ultravioleta
wt	linhagem selvagem ("wild type")

1-INTRODUÇÃO

1.1. A proteína NCS

A concentração intracelular de cálcio tem papel central no metabolismo dos muitos tipos celulares, principalmente em neurônios (BERRIDGE, 1998). A concentração do íon cálcio regula diversos fenômenos no interior da célula, como atividades que englobam desde a rápida modulação de canais iônicos, liberação e ativação de neurotransmissores, até lentas mudanças de expressão gênica. Essas várias atividades podem ser intermediadas por proteínas ligantes de cálcio (BERRIDGE, 1998).

As proteínas NCS (do inglês "Neuronal Calcium Sensor") são uma família de proteínas ligantes de cálcio, pertencente à superfamília de proteínas "EF-hands", que nos organismos eucariotos superiores são expressas predominantemente em neurônios e células fotoreceptoras (BRAUNEWELL, GUNDELFINGER, 1999). Os "EF-hands" são motivos protéicos ligantes de cálcio que foram primeiramente caracterizados em parvalbumina e são um dos domínios mais comuns codificados no genoma humano, estando presente em 122 classes de proteínas. Este motivo tem estrutura em "helix-loop-helix", consistindo de 29 aminoácidos, os quais se ligam a íons cálcio (JOHNSON et al, 1996). As proteínas NCS também são relatadas como miristoil-"switch"-Cálcio ligantes, apesar da presença de gurpos miristoil não alterar a estrutura da molécula se Ca^{++} está ligado ou não (BOURNE et al, 2001; POLANS et al, 1996).

As proteínas NCS estão expressas desde células fúngicas unicelulares até seres humanos (BURGOYNE et al, 2004). Estudos em células de mamíferos têm atribuído a NCS-1 inúmeras funções (BURGOYNE et al, 2004), embora os dados sobre essa proteína tenham sido obtidos na maior parte de organismos inferiores, os quais revelaram fenótipos variados. O ortólogo da frequenina em *S. cerevisiae* é essencial para a sobrevivência porque está envolvido na ativação da fosfatidilinositol-4-quinase (HENDRICKS et al, 1999). A inativação de homólogos de NCS em outros organismos não apresentou letalidade, todavia foram observados fenótipos diferenciais,

incluindo mudanças nas taxas de desenvolvimento em *Dictyostelium discoideum* (COUKELL, 2004). O mutante "knockdown" do *ncs*-1a, um dos dois ortólogos relatados em "zebrafish", não desenvolveu canais semicirculares interno dos ouvidos (BLASIOLE et al, 2005). Mudanças em funções neuronais foram observadas no mutante em *D. melanogaster*, sendo que neste trabalho a superexpressão do gene ortólogo *ncs* resultou no aumento da liberação de neurotransmissores (PONGS et al*,* 1993). Em *C. elegans*, o mutante deletado do gene *ncs* apresentou defeitos de aprendizado e memória (GÓMEZ et al, 2001). O *ncs-1* é altamente expresso em regiões do cérebro e também em muitos tipos celulares não neuronais (GIERKE et al*,* 2004). É atribuida a proteína Ncs a função sensor cálcio responsivo na modulação da atividade sináptica secretora (PONGS et al, 1993; MCFERRAN et al, 1999; HENDRICKS et al, 1999). Ncs de *Drosophila* está implicado em facilitar a liberação de neurotransmissores em junções musculares (PONGS et al*,* 1993). Resultados similares foram observados com o homólogo Ncs de rato em células PC12, onde ela provoca mudanças nas concentrações citoplasmáticas de cálcio, o que desencadeia o processo de exocitose pela modulação dos canais de membrana. Esses resultados são consistentes com a idéia que a regulação da secreção e a atividade Ncs estão acopladas (BOURNE et al, 2001).

Estudos do mecanismo miristoil-"switch" na proteina Ncs revelaram que a associação Ncs:membrana é inteiramente dependente de miristoilação, e ainda que os motivos "EF-hands" fucionais não participam desse processo (O'CALLAGHAN et al,2002). A miristoilação é uma modificação protéica irreversível que consiste na adição covalente de um grupo miristoil em resíduos de glicina, principalmente via ligação amino-alfa em substituição a metionina N-terminal no polipeptídeo nascente, ou ainda a resíduos de glicina expostos por clivagens provocadas por caspases durante o processo apoptótico (ZHA et al, 2000). O miristoil é formado a partir do ácido graxo mirístico, e é principalmente um sinal de endereçamento a proteínas que

devem ser ancoradas a bicamada da membrana plasmática. As principais proteinas conhecidas que sofrem esse processo incluem proteínas quinases e fosfatases, além de proteínas cálcio ligantes contendo motivos "EF-hands" (ZHA et al, 2000; PODELL and GRIBSKOV, 2004; RESH et al, 1999).

O estudo do papel fisiológico do cálcio no mutante *Δncs-1* no fungo *S. pombe* revelou que o gene *ncs-1* não é essencial para o crescimento vegetativo. No entanto esse mutante exibe um desenvolvimento defectivo quando cultivado em meio com alta concentração de cálcio e ainda um desenvolvimento sexual independente de carência nutricional do meio em comparação com o tipo selvagem (SAITOH, 2003; HAMASAKI, 2004). Ainda em *S. pombe*, o NCS-1 está relacionado à regulação da esporulação (WELTON and HOFFMAN, 2000). Sob condições de crescimento normal o desenvolvimento asexual do *S. pombe* é reprimido por sinais nutricionais através de ativações seqüenciais da cascata conhecida como via da Adenilato Ciclase **[**envolvendo as proteínas: receptor de glicose (*git3*), proteínas G (*gpa2*), adenilato ciclase (*cyr1*), e proteínas kinase A (*pka*)**]**, que mantém o nível de cAMP intracelular. Sob condições ambientais hostis ou de carência nutricional-induzida, essa via é desligada e o decaimento dos níveis de cAMP causa o efeito biológico de indução da esporulação do fungo (KAWAMUKAI et al., 1999; MOCHIZUKI & YAMAMOTO, 1992)**.** HAMASAKI e colaboradores (2004), observaram que o mutante *Δncs-1* apresentou marcadamente maior esporulação, em comparação ao tipo selvagem, independentemente da indução de carências nutricionais, e que essa esporulação foi efetivamente bloqueada pela adição de cAMP exógeno, o que sugere que NCS-1 desempenha um papel na via da Adenilato Ciclase.

A proteína NCS-1 é encontrada em todos os compartimentos do sistema nervoso central de organismos eucariotos superiores e tem função puramente pré-sinaptica, mas não é restrita a

terminais sinápticos (MARTONE, 1999). McFerran e colaboradores (1999) mostraram que o NCS-1 atua no processo de exocitose, provocando alterações nas concentrações citoplasmáticas de cálcio o que desencadeia o processo de exocitose através da modulação dos canais de membrana.

Em mamíferos, NCS-1 regula o ortólogo Pik1, fosfatidilinositol-4-quinase IIIβ, o que explica alguns dos papeis funcionais dessa proteína. Entretanto o aspecto chave do NCS1 é a habilidade de ligar e regular muitas proteínas alvo que por sua vez promovem a regulação de outras proteínas (HAYNES et al, 2006). A interação do NCS1 com diferentes proteínas pode envolver diferentes regiões da molécula e algumas interações podem ser independentes de interações com cálcio (KABBANI, 2002; HAYNES et al, 2006). Contudo, embora se tenham compreensões parciais do envolvimento da proteína Ncs com as moléculas alvos, a variedade de papeis fisiológicos do Ncs ainda permanece completamente obscuro.

1.2. *Aspergillus fumigatus*

A. fumigatus é um fungo filamentoso, saprófita e de distribuição universal. O seu nicho ecológico natural é o solo e as áreas rurais representam a maior fonte deste microrganismo (DENNING, 1998; BRAKHAGE & LANGFELDER, 2002). As colônias de *A. fumigatus* se desenvolvem rapidamente em ágar glicose-peptona a 37°C. Nestas condições, as colônias possuem coloração verde-acinzentada, geralmente são granulares e formam abundantes conídios. A micromorfologia desta espécie apresenta hifas hialinas e septadas com paredes paralelas; as cabeças conidiais apresentam, ao microscópio ótico, aspecto de vesículas em forma de frasco, com uma série de fiálides uniseriadas, recobrindo dois terços superiores de sua superfície. Os

conídios, de coloração verde, possuem 2,5 – 3,0 µm de diâmetro e são produzidos em cadeias paralelas. *A. fumigatus* é uma espécie termófila e pode crescer em temperaturas superiores a 55 °C (HAINES, 1995).

A sua importância clínica se deve ao fato de se tratar de um patógeno oportunista, que acomete uma larga faixa de grupos de pacientes susceptíveis, particularmente aqueles com neutropenia, tais como os que fazem tratamento com corticoesteróides (situação comum em pacientes transplantados) e aqueles que fazem quimioterapias agressivas contra câncer (DENNING, 1998). A virulência do *A. fumigatus* está influenciada pelo estado de imunodeficiência do hospedeiro e a rápida capacidade de crescimento desse fungo (TEKAIA and LATGE, 2005). Em pacientes imunocompetentes, as formas clínicas que se desenvolvem durante a infecção pelo gênero *Aspergillus* incluem as doenças alérgicas como asma, sinusite alérgica e alveolite, devido à exposição aos conídios ou antígenos do *Aspergillus sp*. Nestes pacientes, a colonização pelo micélio é ausente e a manifestação clínica é facilmente revertida pela remoção do agente causal. Nas formas mais graves, como a aspergilose alérgica bronco-pulmonar, aspergiloma e aspergilose invasiva envolvem o crescimento e colonização pelo micélio e geralmente requerem intervenção terapêutica (BODEY & VARTIVARIAN, 1989, SHIBUYA et al., 2004).

A. fumigatus possui vantagens únicas que o favorecem em termos de aquisição de nutrientes essenciais. Essas adaptações incluem um grande número de genes que codificam proteínas histidinas–kinases (HK), as que estão relacionadas ao sensoriamento ambiental e quebra da latência no ambiente hospedeiro (TEKAIA and LATGE, 2005; CATLETT, YODER, TURGEON, 2003). Por outro lado, *A. fumigatus* possui sete genes relacionados à síntese de pigmento melanina que é um importante fator de virulência em animais e fungos patogênicos no

estabelecimento da infecção. A melanina recobre a superfície dos conídios protegendo-os contra reativos intermediários do oxigênio liberados pelos fagócitos do hospedeiro (TSAI et al, 1999). Além dessas características, possui um eficiente sistema de efluxo de moléculas tóxicas (TEKAIA and LATGE, 2005), e pode promover assimilação redutiva de ferro e ainda expressar enzimas que removem íons ferro da transferrina, que é considerada uma molécula fungistática presente no soro sanguíneo (SCHRETTL et al, 2004). *A. fumigatus* adquire minerais essenciais para o seu desenvolvimento de forma bastante eficaz, como no caso do íon magnésio que é captado pela proteína de membrana MgtC (TEKAIA and LATGE, 2005), de radicais fosfato, através de fosfatases e fosfolipases liberadas no meio extracelular (BERNARD et al, 2002) e íons zinco através de transportadores específicos (VICENTEFRANQUEIRA et al, 2005). Todas essas características aliadas à capacidade de crescimento desse fungo em altas temperaturas fazem do *A. fumigatus* um patógeno agressivo em comparação com outros fungos.

2-OBJETIVO

2-OBJETIVO

Os objetivos específicos deste projeto são:

- Deletar o gene *ncsA* de *A. fumigatu* e investigar as possíveis alterações fenotípicas associadas a essa deleção.
- Observar a expressão do mRNA do *ncsA* da linhagem selvagem em diferentes condições experimentais.

3-MATERIAL E MÉTODO

3.1 Meios de Cultura para o *A. fumigatus*

Meio mínimo (MM)

20X solução de sais (Kafer, 1997)	1x
Elementos traços	0,1%
Glicose	1% (p/v)
Agar (Difco)	2% (p/v)

O pH foi ajustado para 6,5. Esterilizou-se em autoclave. Para MM+Glicerol, a glicose foi substituída por 2% de glicerol (v/v).

Meio completo (YAG, YUU, YG e YG+UU)

Extrato de levedura	0,5%
Glicose	2% (p/v)
Agar	2% (p/v)
Solução de elementos Traços	0,1%

O volume final foi ajustado com água destilada. Esterilizou-se em autoclave. YUU indica o meio de cultura completo YAG suplementado com uridina 4 mM e uracila 10 mM. O meio de regeneração dos protoplastos, utilizado na transformação de *A. fumigatus* consistiu de meio completo + KCl, ou seja, acrescido de 0,6 M de KCl; Os meios YG e YG+UU são iguais em composição, respectivamente, aos meios YAG e YUU, entretanto sem a adição de ágar 2% (p/v). Para meio Top Agar de regeneração dos protoplastos foi adicionado 1% (p/v) de ágar. Em experimentos onde se necessitava de repressão do promotor *alcA*, foi utilizado meio contendo glicose 4%.

3.2-Meio de cultura para *E. coli*

Meio Luria Bertani (LB)

Extrato de Levedura	0,5% (p/v)
Cloreto de Sódio	0,17 M
Triptona	1% (p/v)

Os componentes foram dissolvidos em água destilada e o meio foi esterilizado em autoclave. Para meio sólido foi adicionado 2% (p/v) ágar.

3.3- Soluções e Tampões

Solução de elementos traços

Sulfato de zinco heptahidratado - $ZnSO_4.7H_2O$	75 mM
Ácido bórico - H_3BO_3	180 mM
Cloreto de manganês tetrahidratado - $MnCl_2.4H_2O$	25 mM
Sulfato de ferro heptahidratado - $FeSO_4.7H_2O$	18 mM
Cloreto de cobalto pentahidratado - $CoCl_2.5H_2O$	6 mM
Sulfato de cobre pentahidratado - $Cu(SO_4).5H_2O$	6 mM
Molibdato de amônio tetrahidratado - $(NH_4)_6MO_7O_{24}.4.H_2O$	1 mM
Ácido etileno diamino tetraacético - EDTA	140 mM

Os componentes foram adicionados na ordem listada em 1/8 do volume final de água destilada. Cada componente era dissolvido completamente antes de adição do próximo. A

solução foi aquecida até 100°C e então resfriada para 60°C. Ajustou-se o pH entre 6,5 e 6,8 com solução de NaOH 10 M. Deixou-se resfriar até atingir a temperatura ambiente para acerto do volume final.

Solução de sais 20X concentrada para MM (Kaffer, 1977)

Nitrato de Sódio ($NaNO_3$)	3,2 M
Cloreto de Potássio (KCl)	0,14 M
Dihidrogenofosfato de Potássio (KH_2PO_4)	0,2 M
Sulfato de Magnésio heptahidratado ($MgSO_4.7H_2O$)	0,04 M

Os componentes foram dissolvidos em água destilada e utilizados na composição do Meio Mínimo.

Soluções de protoplastização para transformação em *A. fumigatus*

Solução 1 de protoplastização

Sulfato de amônio	0,8 M
Ácido cítrico pH 6	100 mM

Dissolveu-se o sulfato de amônio em água destilada e adicionou-se o volume adequado de solução de ácido cítrico 1 M, pH 6 previamente preparada. Ajustou-se o volume e esterilizou-se em autoclave.

Solução 2 de protoplastização

Extrato de levedura	1% (p/v)

Sacarose	2% (p/v)

Os componentes foram dissolvidos em água destilada. Esterilizou-se em autoclave.

Solução 3 de protoplastização

Sulfato de amônio	0,4 M
Sacarose	1% (p/v)
Ácido cítrico pH 6	50 mM

Sulfato de amônio e sacarose foram dissolvidos em água destilada. Adicionou-se o volume necessário de uma solução de ácido cítrico 1 M, pH 6 previamente preparada. Esterilizou-se em autoclave.

Solução 4 de protoplastização

Polietilenoglicol (PEG) PM 6000 g/mol	25% (p/v)
$CaCl_2.2H_2O$	100 mM
KCl (Sigma)	0,6 M
Tris HCl pH 7,5	10 mM

Dissolveram-se os componentes em água destilada e acrescentou-se o volume necessário de solução Tris HCl, pH 7,5 (1 M) previamente preparada. Esterilizou-se em autoclave.

Solução 5 de protoplastização

$CaCl_2.2H_2O$	50 mM

KCl	0,6 M
β-Morpholino-ethansulfonsaeure (MES) pH 6,0	10 mM

Os componentes foram dissolvidos em água destilada. Esterilizou-se em autoclave.

Solução de lise para mini prep

NaOH	0,2 M
SDS	1%

Preparou-se no momento do uso a partir de soluções estoque de NaOH 4 M e SDS 10%.

Solução de neutralização para mini prep

Acetato de Potássio	3 M
Ácido acético glacial	7,5 mL

Dissolveu-se o acetato de potássio em água destilada e acrescentou-se o ácido acético. Ajustou-se o volume com água destilada para 500 mL e esterilizou em autoclave. Armazenou-se à 4°C.

Solução de Denhardt (100X concentrada)

Soro albumina bovina (BSA) (Fração V, Sigma)	2% (p/v)
Ficoll tipo 400	2% (p/v)
Polivinilpirrolidona	2% (p/v)

Dissolveu-se o Ficoll e a PVP em água destilada com calor suave. Foi então adicionada a BSA na solução resfriada e ajustou-se o volume adequado. Estocou-se a -20°C.

Solução depurinizante

HCl	0,2 M

O volume necesário de ácido foi diluído em água destilado e o volume final acertado.

Solução salina citrato (SSC) 20X concentrada

Cloreto de Sódio (NaCl)	3 M
Citrato de Sódio($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$)	300 mM

Dissolveu-se em água destilada, ajustou-se em pH 7,0 com NaOH (4 M) e completou-se o volume com água destilada.

Solução SDS 10%

SDS	10 g
Água destilada q.s.p.	100 mL

Dissolveu-se em água destilada e acertou-se o volume.

Solução de fixação para microscopia I

Formaldeido	3,7% (v/v)
NaH_2PO_4	50 mM pH 7,0
Tween 80	0,2% (v/v)

Dissolveu-se em água destilada. Os germinantes foram tratados por 30 minutos para fixação.

Solução estoque de DAPI (4,6-diamino-2-phenilindol)

DAPI 100 µg/mL

Esta solução foi mantida fora do alcance da luz, -20°C.

Solução estoque de calcoflúor

Dissolveu-se o equivalente a 100 µg/mL de calcoflúor (Blankophor BBH, Standard SV-2460, Miles Organic Products Division), em uma gota de KOH 1 M e a seguir adicionou-se o volume adequado de água destilada. A solução foi mantida fora do alcance da luz a -20°C.

Solução estoque de lovastatina

A solução estoque de lovastatina foi preparada pela hidrólise de uma solução na concentração de 85 mg/mL em etanol/NaOH 0,2 M a 65°C por 40 minutos. A solução obtida foi duída para a concentração de 25 mg/mL com Tris-HCl 25 mM, pH 8. As alíquotas foram mantidas a -20°C.

Solução estoque de miriocina

Miriocina obtida de *Micelia sterilia* foi obtida (Sigma número de catálogo M1177) e reconstituída em etanol 100% na concentração de 5 mg/mL.

Solução estoque de filipina

A filipina obtida da Sigma (número de catálogo F9765) foi reconstituída na concentração de 25 mg/mL em DMSO. Para coloração foi usado meio de cultura adequado pré-aquecido na temperatura necessária para cada experimento na concentração final de 25 µg/mL.

Solução estoque de "nitro blue tetrazolium" (NBT)

Foi utilizada solução estoque de NBT na concentração de 1% em água destilada estéril. Para coloração dos germinantes foi utilizado NBT na concentração final de 0,05% em água destilada.

Solução estoque de FM4-64

Foi utilizado o corante FM4-64 (N-(3-thiethylammoniumpropyl)-4-(p-diethylaminophenylhexatrienyl) pyridinium dibromide) análogo fixável (Invitrogen Molecular Probes, número de catálogo F34653) comercializado em alíquotas dissecadas de 100 µg cada. Cada alíquota foi reconstituída para a concentração final de 200 µM em água destilada estéril. A solução de uso (fresca) foi de 10 µM diluída a partir do estoque em meio de cultura adequado pré aquecido na temperatura de incubação.

Soluções estoque de drogas mutagênicas utilizadas

Tabela 1: Soluções estoque das drogas mutagênicas

Drogas	Mecanismo de ação	Estoque
hidroxiuréia (HU)	inibidor da síntese de DNA por depleção de nucleotídeos (inibe a enzima ribonucleotídeo redutase)	3 M (em DMSO)

Tampão PBS ("Phospahte buffered saline") 10X concentrado

NaCl	350 mM
KCl	180 mM
Na_2HPO_4	25 mM
KH_2PO_4	18 mM

Dissolveu-se em água destilada, acertou-se para pH 7,4 e completou-se o volume final para 1L. Esterilizou-se em autoclave.

Tampão MOPS 10X concentrado

3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS)	0,2 M
Acetato de sódio	0,5 M
EDTA	0,01 M

Dissolveu-se os componentes em água deionizada tratada com dietil pirocarbonato (DEPC) 0,1% e o pH foi ajustado para 7.

Tampão de amostra para eletroforese de RNA

Azul de Bromofenol	0,1 mg/mL
Glicerol	50% (v/v)
Tampão MOPS	1x

Dissolveu-se os componentes no volume necessário.

Tampão TRIS-Acetato-EDTA (TAE) 50X concentrado

Tris Base	242 g
Ácido Acético Glacial	57,1 mL
EDTA 0,5M pH 8,0	100 mL
Água destilada q.s.p.	1 L

Acertou-se para pH 8 e esterilizou-se em autoclave. Para uso na eletroforese de DNA, o tampão foi diluído 1X.

Tampão GET para "mini prep"

Glicose anidra	0,92% (p/v)
EDTA	10 mM
Tris-HCl	26 mM

Dissolveu-se a glicose em água destilada e adicionou-se volume necessário de solução estoque de EDTA (0,5 M, pH 8) e Tris-HCl (1 M, pH 7,4). A solução foi esterilizada em autoclave e as alíquotas estocadas -20°C.

Tampão de extração de DNA

Tris-HCl pH 8,5	200 mM
Cloreto de sódio	250 mM
EDTA	25 mM
SDS	0,5% (p/v)

Dissolveu-se em água destilada.

3.4-Protocolos adotados

Preparo de células eletrocompetentes de *E. coli*

Uma colônia isolada da linhagem de *E. coli* DH10B foi inoculada em 10 mL de meio de cultura LB, a 37°C e 200 rpm (Innova 4000 - New Brunswick Scientific) por 16 horas. Uma alíquota de 10 mL deste pré-inóculo foi adicionada a 1 L de LB e cultivada a 37°C sob agitação de 250 rpm (Innova 4000 - New Brunswick Scientific), até que a densidae óptica da cultura a 600 nm atingisse 0,4 a 0,5. O frasco da cultura foi resfriado em banho de gelo por 30 minutos e as células foram recuperadas por centrifugação a 4000 g a 4°C por 15 minutos. As células precipitadas foram cuidadosamente ressuspendidas em 500 mL de água destilada estéril resfriada a 0°C. As células foram precipitadas por centrifugação e novamente lavadas como descrito anteriormente. Tais lavagens com água promovem a diminuição da força iônica da suspensão de células, o que facilita a entrada do DNA a ser transformado na bactéria. Em seguida, as células são equilibradas em 10 mL de solução de glicerol 10% (v/v) resfriada a 0°C e centrifugadas nas

mesmas condições descritas anteriormente. O precipitado foi ressuspendido em glicerol 10% (v/v) com volume necessário para atingir uma concentração de 1 a $3x10^{10}$ células/mL (aproximadamente 40 µl de suspensão de células). A suspensão de células eletrocompetentes foi aliquotada em microtubos e estocada a -80°C até o momento do uso.

Eletrotransformação de *E. coli*

O DNA plasmidial dialisado por 1 hora em membrana com poros de 45 µm (PVDF, Millipore) foi acrescentado a 1 a $3x10^{10}$ células eletrocompetentes da linhagem DH10BF', misturando-se gentilmente. A mistura foi transferida para cubetas de eletroporação (Biorad) previamente resfriadas a 0°C e submetida a 25 µF, 200 ω e 2,5 kV no aparelho Gene Pulser (Biorad, USA). A seguir, 1 mL de meio LB foi adicionado à mistura, transferindo-se para tubos de ensaio estéreis e incubando-se a 37°C e 200 rpm de agitação. Após uma hora, a cultura foi semeada em LB sólido acrescido da concentração adequada de antibiótico apropriado e incubada a 37°C por aproximadamente 16 horas.

Mini preparação do DNA plasmidial

O protocolo abaixo descrito foi utilizado para a extração do DNA plasmidial dos clones de interesse. Para estabelecimento da cultura pura, os clones de interesse foram inoculados em 1,5 mL de meio LB para cada poço da placa de cultura, adicionado do antibiótico ampicilina (50 µg/mL, concentração final) para a seleção do plasmídeo. A placa era selada com adesivo e cada poço perfurado com uma agulha para prover aeração. As placas eram incubadas em um agitador orbital (300 rpm) a 37°C a por 22 a 24 horas. Depois do crescimento as placas eram centrifugadas a 3220 g por 6 min para precipitar as células. O adesivo era removido e o sobrenadante

descartado. As placas eram colocadas viradas para baixo para permitir a secagem por 10 minutos. Ao "pellet" resultante era adicionado 240 µL de tampão GTE em cada poço. As placas foram novamente seladas e agitadas em agitador de placas para a ressupensão. Esse homogeneizado foi centrifugado por 6 minutos a 3220 g, o sobrenadante desprezado e as placas viradas por mais 5 minutos para secagem. A cada poço foi adicionado 80 µL de tampão GET e 5 µL de RNAse A (Quiagem, Alemanha) a partir de um estoque na concentração de 10 mg/mL. A seguir as células foram ressupensas em agitador de placas, brevemente centrifugadas até a velocidade de 2415 g e imediatamente submetidas ao agitador de placas. Desta suspensão, 60 µL foram transferidos para uma nova placa receptora resistente ao calor. A lise alcalina foi efetuada pela adição de 60 µL da solução de lise fresca em cada poço. A placa era selada e misturada por inversão. A seguir incubada a temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugadas até 2415 g. Para neutralização foram adicionados 60 µL de acetato de potássio 3 M a cada poço da placa receptora homogeneizando-se novamente por inversão, seguindo-se incubação a temperatura ambiente por 10 minutos. Depois de breve centrifugação, o adesivo era retirado e a placa incubada a 90°C por 30 minutos. Após esse tempo, as placas eram resfriadas em banho de gelo por 10 minutos e submetidas a centrifugação por 5 minutos a 3220 g (20°C). Todo o sobrenadante resultante era transferido para um sistema de filtragem que consistia de uma placa filtro de PVDF (0,2 µm, Corning, USA) colocada sobre uma nova placa de 96 poços fixada com fita adesiva. A filtração retirava os debris celulares do lisado. O sistema era centrifugado por 5 minutos a 3220 g (20°C). Ao filtrado em cada poço era adicionado 110 µL de isopropanol absoluto. A placa era novamente selada com um novo adesivo e homogeneizada por inversão. Para precipitação do DNA plasmidial as placas eram centrifugadas por 45-60 minutos a 3220 g (20°C). O sobrenadante era descartado e 200 µL de etanol 70% gelado adicionado a cada poço. As placas eram seladas e centrifugadas por 5 minutos a 3220 g (20°C) e o sobrenadante descartado. Para acelerar a

secagem, as placas eram centrifugadas invertidas sob papel absorvente por 2 minutos a 163 g. A seguir as placas eram secas à temperatura ambiente por 1 hora. Depois disso, o DNA era eluído adicionando-se 40 µL de água milliQ por poço durante 16 horas. A qualidade do DNA plasmidial foi verificada em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X corado com brometo de etídeo (10 µg/µL) para assegurar a quantidade necessária para as aplicações posteriores.

Transformação em *A. fumigatus*

Esferoplastos de *A. fumigatus* foram produzidos de acordo com TILBURN et al. (1983) com modificações.

Cerca de $1x10^7$ conídios foram inoculados em 50 mL de meio YG líquido e incubados por 16 horas a 30ºC sob agitação constante de 200 rpm. Após este período, os conídios, contendo tubo germinativo, foram coletados por centrifugação a 2000 *g* por 5 minutos e ressuspendidos em 20 mL de Solução 1 e 6,5 mL de solução de $MgSO_4$ 1 mol/L. Separadamente, 400 mg de BSA e 300 mg de Glucanex (Novo Nordisk) foram solubilizadas em 20 mL de Solução 2 e esta nova solução foi esterilizada por filtração em membrana de 0,45 µm. Em seguida, esta solução estéril foi adicionada à suspensão de conídios. Os conídios foram incubados por 5 horas a 30ºC sob agitação constante de 70 rpm. Após este período, os esferoplastos foram recuperados por filtração em seringa contendo lã de vidro estéril. A suspensão de esferoplastos foi centrifugada a 3000 *g* por 10 minutos e as células foram lavadas duas vezes com Solução 3 gelada. Os esferoplastos recuperados foram utilizados para transformações.

Os esferoplastos foram ressuspendidos em 1 mL de Solução 5 e incubados no gelo por 10 minutos. Após este período, cerca de 100 µL da suspensão de células foram adicionados de 4-20 µg de DNA (máximo 20 µL) e misturados gentilmente. Cerca de 50 µL de Solução 4 foram

adicionados à suspensão de esferoplastos e a mistura foi incubada no gelo por 10 minutos. Após este período, 1 mL da mesma Solução 4 foi adicionado e homogeneizado na suspensão, que foi incubada à temperatura ambiente por 20 minutos. Toda a suspensão foi diluída em 40 mL de YAG TOP ÁGAR [ágar 1% (w/v)] contendo KCl 0,6 mol/L. Os 40 mL da suspensão de conídios diluída foram distribuídos sobre 3 placas de Petri contendo YAG [ágar 2% (w/v)] adicionado KCl 0,6 mol/L. As placas foram incubadas por 4 a 5 dias a 37ºC para se verificar o crescimento dos clones transformados.

A transformação de diferentes linhagens de *A. fumigatus* seguiu metodologia descrita po Osmani et al., (1987). Além das linhagens selvagens UI224 e GR5 comumente utilizadas no laboratório foi também utilizada a linhagem TNO2A3. Esta linhagem foi gentilmente cedida ao laboratório pelo Dr. B. R. Oakley e se trata de um mutante cujo gene *ku70* de *A. fumigatus* (*nkuA*) está inativado (NAYAK et al., 2006) e se tornou uma ferramenta vantajosa para facilitar a obtenção de linhagens "knock out" em *A. fumigatus*. Como se sabe os produtos dos genes *ku70* e *ku80* são essenciais para o processo de "non homologous end joining" (NHEJ) no reparo do material genético. A exemplo do que foi verificado inicialmente em *N. crassa* (NINOMIYA et al., 2004), a inativação do gene *ku70* leva a ruptura do sistema de NHEJ e todo o DNA exógeno introduzido na célula durante o processo de transformação é direcionado para a via de recombinação homóloga, o que aumenta consideravelmente a eficiência da transformação e a inserção do cassete de deleção no lócus do gene de interesse (NINOMIYA et al., 2004). Da mesma forma a taxa de recombinação homóloga é aumentada em *A. fumigatus* chegando ate 100% na linhagem TNO2A3 (NAYAK et al., 2006). Os mutantes obtidos a partir da transformação na linhagem TNO2A3 (*pyroA4 pyrG89; chaA1;* Δn*KuA::argB*) foram retrocruzados com a linhagem selvagem UI224 (*pyr*G89; *y*A2; *argB*) para o isolamento de

segregantes sem o "background" genético do gene *nkuA* para as futuras análises e caracterizações fenotípicas dos genes inativados por esse sistema.

Deleção do gene *ncsA* em *A. fumigatus*

Para a deleção do gene *ncsA* no *A. fumigatus* foi usado a técnica "PCR-mediated" (KUWAYAMA et al., 2002), que consiste na substituição do gene por um cassete construído de fragmentos do DNA genômico, de aproximadamente 2000pb anteriores ("upstream") e posteriores ("downstream"), que flanqueiam o gene de interesse na linhagem CEA17, ligados "in frame" com um gene marcador que é inserido exatamente na sua posição no DNA. O cassete de deleção *ncsA* foi construído com os genes marcadores *zeo-pyrG*, que conferem respectivamente resistência ao antibiótico zeocina e prototrofia a uridina e uracila causada pela mutação *pyrG89* do Δ*ku80* (FERREIRA, 2006). A construção do cassete foi procedida por reações de PCR em que os fragmentos e o marcador *zeo*-pyrG, que foram usados como "template". Dessa maneira o cassete foi constituído com os genes *zeo-pyrG* intercalados pelos fragmentos.

As condições de termociclagem serão: pré-desnaturação a 94°C por 2 minutos seguido de 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos; 60 °C por 30 segundos; 68 °C por 6,5 minuto e extensão final de 30 minutos a 68°C. O produto de PCR da reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE para checagem do sucesso da amplificação e em seguida o cassete foi purificado.

A seleção da linhagem mutante na qual ocorreu a inserção desse cassete na posição do gene *ncsA* na linhagem selvagem de *Aspergillus fumigatus* CEA17 auxotrófica para uracila–uridina ocorreu pelo crescimento em meio de cultura adequado.

Tabela 2: **Primers utilizados para a construção do cassete de deleção do gene *ncsA*.**

Nome do primer	Seqüência
P1	**5'- TTAAGTGTGGCAGGCAGCTG-3'**
P2	**5'-**GGAGCAGGACTGAGAATTCC**AAGACGGAAGCAAGGAAGAC-3'**
5´**Zeo**	**5'-GTCTTCCTTGCTTCCGTCTT**GGAATTCTCAGTCCTGCTCC **-3'**
3´**Pyr**	5'-**AATACCGACAGAAGACCAA**GAATTCGCCTCAAACAATGCT-3'
P3	5'-AGCATTGTTTGAGGCGAATTC**TTGGTCTTCTGTCGGTATTC**-3'
P4	**5'- GCAGTTTTGCACCTCGAAGC -3'**

Complementação do mutante *ΔncsA*

A partir do DNA selvagem da linhagem CEA 17 (tipo selvagem) de *A. fumigatus* o gene *ncs-A* foi amplificado por PCR utilizando-se dos mesmos primers que foram usados na preparação do cassete de fusão. Uma reação de PCR com os primers "P1" e "P4", que foram usados para amplificação dos fragmentos anteriores e posteriores ao gene *ncs-A*, e usando como "template" o DNA da linhagem de *A. fumigatus* selvagem (CEA17) foi amplificado um fragmento contínuo contendo o gene *ncs-A* flanqueado por aproximadamente 2000 pares de bases de ambos lados e denominado de fragmento 1-4. Esse fragmento foi clonado em vetor pCR2.1

(Invitrogen) e transformado e em bactérias. Para a complementação do mutante *ΔncsA*, o fragmento 1-4 clonado foi extraido e submetido a uma cotransformação com um vetor plasmidial que veicula o gene *pyr-4* de *N. crassa* (vetor pRG3), que reconstitui a auxotrofia da mutação *pyrG89* do Δ*ku80*. Assim, com o protocolo de transformação de fungo (item acima) e pela recombinação homóloga do fragmento 1-4 ocorreu à inserção ao DNA constitutivo do mutante concomitante a reversão da auxotrofia.

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

Uma colônia isolada de *S. cerevisiae* da cepa FGSC 9721, gentilmente cedida pelo Fungal Genetic Stock Center foi inoculada em 10 mL de meio YPD e incubada a 30°C sob agitação constante por 12 horas.

Após este período, uma alíquota de aproximadamente 500 μL foi semeada em 50 mL de YPD e a cultura permaneceu a 30°C, sob agitação constante até alcançar uma DO_{600nm} entre 0,4 e 0,6. As células foram centrifugadas a 600 *g* por 2 minutos e lavadas com 10 mL de tampão TE 1x. Em seguida foram novamente centrifugadas por 2 minutos, ressuspendidas em 1,5 mL de solução TE 1x/LiAc 1x e incubadas à 30°C por 60 minutos, sob leve agitação.

Para cada reação de transformação foram misturados 200 μL de suspensão de células, cerca de 1-5 μg de DNA plasmidial (pRS426) linearizado com *Eco*R I e *Bam*H I, diferentes concentrações dos DNAs purificados, provenientes dos PCRs, para a construção dos cassetes de deleção e 200 μg de DNA de esperma de salmão desnaturado. A mistura foi incubada a 30°C por 30 minutos com leve agitação e posteriormente foi adicionado 1,2 mL de solução contendo LiAc 1x/PEG-3350 40% (w/v)/TE 1x. Após homogeneização, a mistura foi incubada por 30 minutos a 42°C. Após a incubação, as células foram centrifugadas a 2.500*g* por 1 minuto, lavadas com 1

mL de TE 1x, precipitadas novamente e ressuspendidas em 50-100 μL de TE 1x. Finalmente, as células transformadas foram semeadas em placas contendo meio de cultura seletivo SC-URA$^-$.

Produção de cassetes de deleção pela técnica de recombinação "in vivo" em *S.cerevisiae*

Algumas deleções de genes nesse trabalho foram realizadas pelo método descrito por Colot e colaboradores (2006) em Neurospora crassa. A Figura 1 mostra um esquema da recombinação homóloga que acontece em *S. cerevisiae* e que foi utilizada na construção dos cassetes de deleção clonados em vetor pRS426.

Para a construção de cassetes de deleção, todas as reações de amplificação por PCR foram realizadas em um volume final de 50 μl utilizando uma DNA polimerase de alta fidelidade (Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity, (Invitrogen). O DNA genômico da linhagem CEA17 *ΔakuB*^{ku80} de *A. fumigatus* foi utilizado como molde para a amplificação de fragmentos de aproximadamente 2 kb das regiões 5' e 3' que flanqueiam a região aberta de leitura (ORF) dos genes de interesse. O vetor pCDA21 (CAHVEROCHE et al., 2000), foi utilizado para amplificar o fragmento contendo o marcador genético de auxotrofia, gene *pyrG* (*A. fumigatus*), com tamanho de 1,9 kb. O DNA genômico da linhagem Afu293 foi usado como "template" para a amplificação do marcador aouxotrófico *pyro* (1958 pb) utilizado nas construção do mutante *alcA::ncsA* de *A. fumigatus*. O vetor pMCB17apx foi usado para amplificar o promotor *alcA* de *A. nidulans* e o gene *pyr4* de *N. crassa.*

A amplificação das regiões flanqueadoras das ORFs dos genes alvo foi realizada com 500 ng de DNA genômico e com 20 μM dos primers específicos para a região 5' e para a região 3'. A amplificação do fragmento contendo o gene *pyrG, pyrG::*NiiA, *pyr4::alcA::gfp, mRFP::pyrG* foi

realizada com 200 ng dos plasmídeo pCDA21, pAB4-Arp, pMCB17apx e pCR-Blunt II-TOPO (kindly donated by Dr. Berl Oakley) respectivamente, e 20 μM de primers específicos (Tabela 1). Os fragmentos amplificados apresentam extremidades homólogas entre si para permitir a recombinação homóloga entre si e com o vetor pRS426 "in vivo" em *S. cerevisiae* (Figura 2).

Após a comprovação de que houve a recombinação dos fragmentos de DNA pela levedura no plasmideo pRS426 (por PCR e/ou análise de restrição), o clone positivo escolhido foi submetido a PCR utilizando-se os primers distais 5F e 3R para a amplificação do cassete completo de deleção ou substituição gênica (Figura 2). Esse material foi fracionado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e a banda específica foi purificada do gel para ser usada nas reações de transformação em *Aspergilli*. A comprovação da integração do cassete de deleção ou substituição gênica no lócus de interesse foi realizada por Southern blot, em que a discriminção do lócus selvagem daquele obtido nas linhagens mutantes é observada pela diferença de tamanho das bandas, obtidas por restrição enzimática, marcada por sonda radioativa em filme auto-radiográfico (ver protocolo Southern blot).

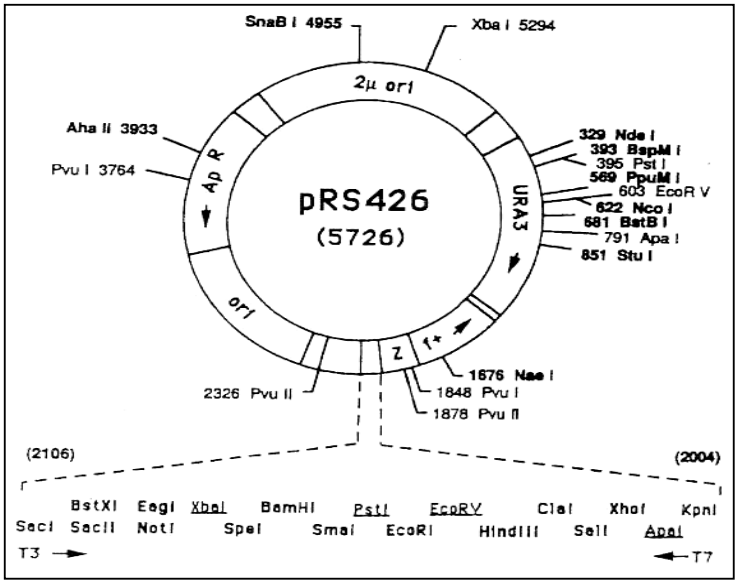

Figura 1: Representação esquemática do vetor pRS426 utilizado na recombinação homóloga em leveduras para a construção de cassetes de deleção.

Tabela 3: Seqüência dos primes utilizados para a produção dos cassetes de deleção e substituição gênica pela técnica de recombinação "in vivo" em *S. cerevisiae*(pRS426) e clonagem unidirecional no vetor pMCB17apx.

Nome do primer	**Seqüência**
PYR G(pAB4-Arp)	GCAGGGAAAAATACGAGCTCC
NiiA(pAB4-Arp)	CGTGACGAAGTCTCAACGCC
5'UTR pikA 1(pAB4-Arp)	GTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGCTTCCGCCTTGGAGAAACTCGC
5'UTR pikA 2(pAB4-Arp)	GGAGCTCGTATTTTTCCCTGCGAACAATATTCGGAACGTTGTCCG
ORF pikA 1(pAB4-Arp)	GGCGTTGAGACTTCGTCACGATGAAGGGTTCTAGAGAATTGG
ORF pikA 2(pAB4-Arp)	GCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCGCATCCACTGCAATGTTGAC
pRS426/5'UTR-ncs-A(pCR-Blunt II-TOPO)	GTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGACGCATCTACGGCTCGATCAAG
ncs-A/Spacer(pCR-Blunt II-TOPO)	GGCTCCAGCGCCTGCACCAGCTCCTACCAATCCATCATAGAGG
3'Pyr G/3'UTR-ncs-A(pCR-Blunt II-TOPO)	GCATCAGTGCCTCCTCTCAGACAGGTGCGCGCGGACGACATGTC
3'UTR-ncs-A/pRS426(pCR-Blunt II-TOPO)	GCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCCATGGCCCTCCCGAATCCGT
ncs-A AscI (pMCB17apx)	GGCGCGCCAATGGGTAAATCGTGAGTACT
ncs-A PacI(pMCB17apx)	CCTTAATTAATTATACCAATCCATCATAGA

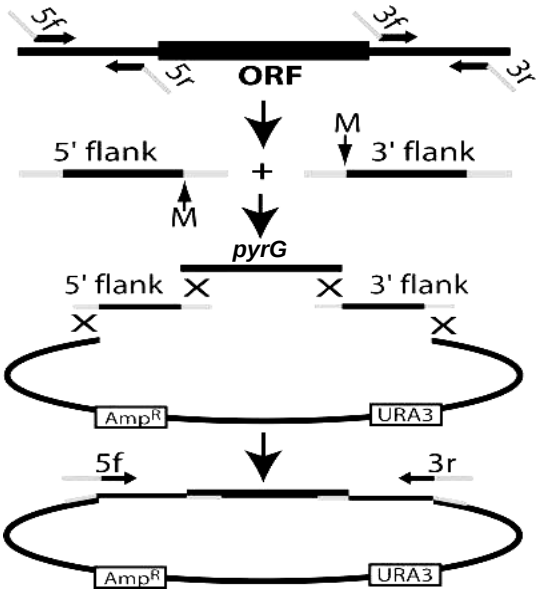

Figura 2: Representação esquemática do mecanismo de recombinação homóloga em *S. cerevisiae* para o obtenção dos cassetes de deleção e substituição gênica no vetor pRS426. Os fragmentos 3' e 5' UTR das ORFs de interesse são amplificados por PCR com primers contendo regiões complementares aos fragmentos adjacentes (primers 5F e 3R com complementaridade ao vetor pRS426 e os *primers* 5R e 3F com complementaridade ao marcador auxotrófico *pyrG*). Além disto, o marcador auxotrófico também é amplificado por PCR. Desta forma, os 3 fragmentos amplificados e purificados são transformados em leveduras (URA^-), juntamente com o vetor pRS426 linearizado, que apresenta marca *URA3* e confere prototrofia para uracila. A levedura é responsável pela recombinação "in vivo" dos fragmentos de DNA oferecidos e ligação do vetor contendo o cassete de deleção.(Extaído e modificado de COLOT *et al*, 2006).

Extração de DNA genômico de *A. fumigatus*

Para a produção de biomassa de micélio, esporos de linhagens de *A. fumigatus* foram inoculados em meio de cultura completo e incubados por aproximadamente 16 horas a 37°C e 250 rpm. Os micélios foram coletados por filtração a vácuo e congelados imediatamente em nitrogênio líquido para serem triturados com pistilo e cadinho. Para cada cerca de 40 mg de micélio foram acrescentados 500 µL de Tampão de Extração de DNA. Foi adicionado em cada amostra, um volume igual de fenol:clorofórmio (1:1) e agitado mecanicamente em agitador de tubos por 10 minutos. Para sedimentar as proteínas precipitadas e debris celulares as amostras foram centrifugadas a 20800 g por 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga onde foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio para a retirada de resíduos de fenol ou clorofórmio. As amostras foram centrifugadas a 20800 g por 5 minutos e a fase aquosa superior foi novamente transferida para outro tubo de microcentrífuga onde foi adicionado 540 µL de isopropanol para precipitar o DNA. A amostra foi centrifugada a 20800 g por 1 minuto, o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi lavado com etanol 70% e centrifugado novamente a 20800 g por 1 minuto. O sobrenadante foi novamente descartado e o resíduo de etanol evaporado a temperatura ambiente por 30 minutos. O sedimento foi ressuspendido em água milliQ estéril e estocado a 4°C e quantificado por espectrofotometria quando necessário (260/280 nm).

Extração de DNA de *Saccharomyces cerevisiae*

Cerca de 10 transformantes de *S. cerevisieae* selecionados em meio SC-URA$^-$ foram semeados em 10 mL do mesmo meio de cultivo e incubados a 30°C por 48 horas sob agitação constante. Após este período, as células foram recuperadas por centrifugação a 2.500 *g* por 5 minutos e ressuspendidas em 1 mL de tampão de extração de DNA de leveduras. À esta

suspensão foi adicionado o mesmo volume de pérolas de vidro tratadas com ácido para a retirada de impurezas. Os tubos contendo as células, o tampão e as pérolas de vidro foram acoplados em agitador mecânico e o destroçamento das células foi procedido por 10 minutos. Em seguida todo o sobrenadante foi misturado a fenol:clorofórmio (1:1) e novamente agitado por 10 minutos. Em sequência a mistura foi centrifugada a 20.800 *g* por 20 minutos e a fase aquosa, contendo o DNA genômico, foi recuperada. O DNA foi obtido por precipitação promovida pela adição de 0,6 volumes de isopropanol e centrifugação por 20 minutos a 20.800 *g*. O DNA foi lavado com etanol 70% (v/v) gelado e secado à temperatura ambiente. Por fim o DNA foi ressuspendido em 50 μL de água deionizada estéril. Foi adicionado 1 μL de solução de RNAse A (10 mg/mL) e a solução foi incubada a 37°C por 5 horas. A concentração e pureza do DNA foram determinadas por espectrofometria, de acordo com SAMBROOK et al. (1989).

Southern blot alcalino

O gel de agarose que foi submetido a eletroforese para o fracionamento do DNA foi tratado com solução depurinizante por 15 minutos. Após este tratamento, o gel foi colocado sobre papel 3MM previamente embebido em NaOH 0,4 M. Sobre o gel foi colocada a membrana de nylon (Hybond-N^+, Armesham-Pharmacia, USA) e 3 papéis 3MM do tamanho do gel que foram também previamente umedecidos em NaOH 0,4 M. O papel 3MM abaixo do gel estava conectado a um reservatório contendo NaOH 0,4 M. Acima desse bloco foram colocadas várias folhas de papel absorvente e um peso de aproximadamente 0,5Kg (400 cm^3/Kg). Um plástico filme foi colocado entre as bordas do gel e do papel 3MM para evitar contato entre o reservatório de NaOH e os papéis acima do gel. Após aproximadamente 12 horas de transferência, o sistema foi desmontado e o filtro de nylon foi lavado em SSC 2X. O DNA foi fixado à membrana

utilizando-se a função "autocrosslink" do aparelho Stratalinker (UV Stratalinker 1800 Stratagene, USA).

Marcação de Sonda Radioativa

As sondas de DNA que seriam utilizadas nos experimentos de Southern blotting e hibridização de colônia foram marcadas pelo método de "randon primer extension" utilizando-se o kit comercial Randon Primer DNA Labeling System (Invitrogen, USA) com [α-^{32}P]dCTP seguindo-se o protocolo do fabricante. Os nucleotídeos não incorporados na reação da Klenow foram retirados pela passagem da mistura de reação em coluna de Sephadex G50 previamente hidratada em TE. Antes de serem adicionadas à solução de hibridização as sondas foram desnaturadas por fervura (100°C) por 5 minutos e resfriadas em banho de gelo para evitar renaturação.

Hibridização das membranas de Southern blot e hibridização de colônia

As membranas de nylon utilizadas (Hybond N^+, GE) foram pré-hibridizadas por 3 horas a 65°C em solução de hibridização adicionada de 5 mg de DNA de esperma de salmão fragmentado e desnaturado. A sonda foi marcada radioativamente sendo acrescentada diretamente à solução de hibridização após sua desnaturação. As membranas foram incubadas com a sonda a 65°C por aproximadamente 16 horas, sendo então lavadas com SSC 2X 0,1% SDS a 65°C por 15 minutos, SSC 1X 0,1% SDS a 65°C por 15 minutos e, em seguida, com SSC 0,2X 0,1% SDS. As membranas foram finalmente expostas a filmes autoradiográficos (XAR-5 X-Ray, Kodak) em intensificadores e mantidas a -80°C até a obtenção do sinal. O filme de raios-X contém cristais de haletos de prata, os quais são excitados pelas partículas β-radioativas e passam

a emitir elétrons. Íons Ag^+ se ligam aos elétrons emitidos, gerando precipitados de átomos de prata, permitindo a visualização do sinal.

Reação de sequenciamento do DNA

O sequenciamento das amostras foi feito pelo método automático através do "Kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction" (Applied Biosystems, USA). A reação foi executada em volume final de 10 µL com uma mistura de reação contendo: 2 µL de uma mistura do "Kit Big Dye" contendo os quatro nucleotídeos terminadores com diferentes fluoróforos; 1 ou 2 µL de mini prep (ou cerca de 500 ng do DNA dupla fita no caso de sequenciamento direto de produto de PCR); 2 µL do oligonucleotídeo adequado (estoque 5 pmol/µL); 2 µL de tampão "Big Dye" (Abi Prism) e 3 µL água milliQ. A reação foi amplificada em termociclador nas seguintes condições: pré PCR por 2 minutos a 96°C, seguidos de 36 ciclos de 96°C por 45 segundos; 50°C por 30 segundos; 60°C por 4 minutos. Para a precipitação do material, foram adicionados 80 µL de isopropanol 75% em cada poço e selou-se a placa, agitando-se levemente em agitador de tubos. As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos. O material foi centrifugado a 3220 g por 45 minutos (20°C). O sobrenadante descartado e a placa centrifugada sob papel absorvente por 1 minuto a 163 g. Foram adicionados em cada poço 200 µL de etanol (Merck, Alemanha) 70% e selou-se a placa para centrifugação (2415 g por 10 minutos a 20°C). Esse ciclo de lavagem com etanol 70% e centrifugação foi repetido e as placas deixadas secar a temperatura ambiente por 1 hora. A placa foi protegida da luz. O sedimento foi ressuspendido em 4 µL de tampão de ressuspensão (5:1 de formamida, 25 mM de EDTA e 50 mg/mL de Dextran blue). A amostra foi desnaturada por 3 minutos a 94°C, centrifugada brevemente e estocada no gelo. Aplicou-se 1 µL de cada amostra no gel de sequenciamento do aparelho ABI Prism 377-36 Sequencer. As seqüências geradas foram enviadas ao computador PowerMac (Macintosh)

conectado ao aparelho seqüenciador. Estes cromatogramas foram interpretados pelo software Sequencing Analysis 3.3 e convertidos em seqüências de DNA. Após o sequenciamento, cada amostra foi analisada e as seqüências foram então submetidas, pela Internet para o "pipeline" de análise e armazenamento destas <http://143.107.203.68>. Quando necessário, seqüências gênicas contínuas foram obtidas através do alinhamento de fragmentos adjacentes utilizando-se o software Sequencher 3.1. para Macintosh.

Extração e manipulação de RNA

Micélios das linhagens que teriam RNA extraído foram crescidos sob agitação e obtidos conforme descrito em cada experimento. O micélio foi filtrado a vácuo e imediatamente congelado em nitrogênio líquido para se evitar a degradação do RNA. Com a finalidade de romper a parede celular do fungo, os micélios congelados foram triturados em nitrogênio líquido com auxilio de cadinho e pistilo esterilizados. O RNA foi extraído utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen, USA), segundo as recomendações do fabricante. A integridade do RNA total foi verificada em gel de agarose 1,2% sob condições desnaturantes corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz UV de acordo com Sambrook e Russel (2001), tendo como critério a presença das bandas intactas correspondentes ao RNA ribossomal 28S e 18S, sendo a intensidade da primeira banda cerca de duas vezes maior que a da segunda. Os RNAs que seriam utilizados nas reações de RT-PCR em tempo real foram tratados com DNAse livre de RNAse. O tratamento foi realizado num volume final de 50 µL, contendo: 1X Buffer DNAse (40 mM Tris-HCl pH 7,5 e 6 mM $MgCl_2$); 2,5 µL de ditiotreitol (100 mM, Invitrogen, USA); 1µL of RNAse Out (40 U/µL, Invitrogen, USA), 10 µL de DNAse (1 U/µL, Promega, Madison, USA), e 20 µg de RNA alvo. A reação foi incubada a 37°C por 60 minutos, seguindo-se a etapa de purificação pelo método de fenol clorofórmio (1:1) e precipitação do RNA com acetato de sódio 0,3 M por 16 horas a -80°C

para aumentar o rendimento. A ausência de DNA após tratamento foi verificada por reação de RT-PCR na qual era utilizada sonda fluorescente do gene constitutivo tubC de *A. fumigatus*. Amostras com detecção de sinal negativo foram utilizadas para a síntese do cDNA.

Para a produção do cDNA usados nas reações de RT-PCR em tempo real, foram utilizados 20 µg de RNA total contido num volume de 6µL e 1,5 µL de Oligo dTV (100 µM estoque). A mistura foi aquecida a 75°C por 10 minutos, rapidamente centrifugada e acondicionada em gelo. A seguir foram adicionados 5 µL de First Strand Buffer (5X, Invitrogen); 2,5 µL de DTT (100 mM, Invitrogen); 2 µL de RNAse Out (40 U/µL, Invitrogen); 2,5µL de dNTP (10 mM cada). O tubo foi aquecido a 42°C por 5 minutos para termostatizar a reação e a seguir 1 µL da enzima transcriptase reversa (Superscript II, Invitrogen USA; 200U/µl) foi adicionado. A reação foi incubada a 42°C por uma hora e trinta minutos para síntese.

Reação de PCR quantitativo em tempo real ("Real time RT- PCR")

O Kit Taq-Man® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) e o Kit Taq-Man® EZ RT-PCR (Applied Biosystems) foram utilizados nas reações de PCR e RT-PCR em tempo real respectivamente, segundo as instruções do fabricante. Os primers e sondas fluorescentes usados no trabalho utilizando a tecnologia Taq-Man® foram desenhados através do software Primer Express 1.5 (Applied Biosystems) e estão descritos na Tabela 2. Os fluoróforos usados na construção das sondas fluorescentes também estão indicados na mesma Tabela. Os primers e sondas fluorescentes usados utilizando-se a tecnologia LUX® (Invitrogen) foram desenhados do fabricante através do endereço eletrônico do fabricante de acordo com as suas instruções (<http://www.invitrogen.com>). As condições de termociclagem para reações de PCR em tempo real compreendem um passo inicial a 50°C por 2', seguido de 10' a 95°C e 40 ciclos de 15'' a 95°C e 1' a 60°C. Para reações de RT-PCR, um passo para a transcrição reversa (60°C por 30

minutos) foi acrescentado entre os tempos de 2' a 50°C e 10' a 95°C. A quantidade inicial do número de cópias dos genes de interesse utilizada na construção das curvas padrões foi determinada através de duas considerações: (i) o *A. fumigatus* é um organismo haplóide e, portanto os genes investigados são representados uma única vez em seu genoma e (ii) considerando-se o tamanho do genoma de *A. fumigatus* igual a 30 Mb, um genoma corresponde à aproximadamente $30x10^{-15}$ g. Teoricamente, cada 30 fg de DNA genômico de *A. fumigatus* apresenta uma cópia de cada um dos genes desse fungo. Diluições seriadas de 1 a 10^7 cópias do genoma da linhagem selvagem R21 foram utilizadas para construir as curvas padrões para cada gene investigado. A equação da reta obtida para cada curva padrão, bem como seu respectivo coeficiente de correlação (r^2) foram obtidos em cada experimento. A análise da expressão dos genes de interesse foi feita a partir do RNA total tratado com DNAse obtido nas condições indicadas em cada experimento. As possíveis variações na concentração inicial de mRNA entre as amostras foram calculadas através da normalização com um gene constitutivamente expresso, neste caso, o gene da β-tubulina (Afu 2G04760) (β-*tub*) de acordo com Semighini et al. (2002). O aparelho para detecção imediata da fluorescência utilizado nos experimentos de PCR e RT-PCR em Tempo Real foi o ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

Tabela 4*:* Descrição dos primers e sondas fluorescentes utilizados nas reações de RT-PCR em Tempo Real

Identificação	Seqüência
Afu *β-tub* 634FL	5'-CGAGCCCTCTCCGTTCACCAGCT[FAM]G-3'
Afu *β-tub* 634FL/663RU	5'-GTCGTACAGAGCCTCGTTGTCG-3'
Afu *ncsA* FL	5'- CGGAACTCGTCGTAGGTAATCTTTC[FAM]G -3'
Afu *ncsA* RU	5'- ATGGAGGACAAGCTGGACTGG -3'

Identificação	Seqüência
Afu *pikA* FL	5`-CGGCACCCAACTTCTACACAGC[FAM]G-3`
Afu *pikA* RU	5`-GGATGCGAGGAAAGCCTTTATTA-3`
Afu *pmr 1* FL	5'- CGGACCCTCTGCCGGTGTAAGTC[FAM]G -3'
Afu *pmr 1* RU	5'- GTCCACATCGGCATACTCCCTA -3'
Afu *pmca 1A* FL	5'- CGGACCCTGGAAACGAACTCGTC[FAM]G -3'
Afu *pmca 1A* RU	5'- GGCGTGATTTCTCTGCCTGTC -3'
Afu *pmca1B* FL	5'- CGGAACTGTCGTGGAGTCGTCTTC[FAM]G -3'
Afu *pmca 1B* RU	5'- TCGTCTATGATGTGGCCTGTCA -3'

[b] Sondas LUX® (Invitrogen); FAM: 6-carboxifluoresceína

Experimentos de microscopia de fluoróforos

Coloração dos germinantes com os corantes fluorescentes utilizados (DAPI, calcoflúor, filipina e FM4-64).

Incubou-se cerca de 10^6 conídios sobre lamínulas esterilizadas dispostas no fundo de placas de Petri contendo o meio de cultura líquido e temperatura apropriados para cada experimento. As amostras usadas na determinação da cinética de divisão nuclear foram crescidas por 2, 4, 6 e 8 horas a 37°C.

Após os tempos de incubação necessários, as lamínulas foram retiradas das placas e fixadas por 30 minutos com solução de fixação I. As lamínulas foram lavadas em tampão PBS 1X e, em seguida, coradas por 5 minutos com 1,2 µg/mL de calcoflúor e 0,1 µg/mL de DAPI. O calcoflúor (Fluorescent brightener, Sigma Chemical Co.) se liga às β-glucanas e à quitina, corando tanto a parede celular quanto os septos. O DAPI apresenta especificidade para o DNA, evidenciando os núcleos que se coram de azul brilhante. Os núcleos interfásicos apresentam uma cromatina característica, localizada em torno de um único nucléolo representado por um ponto escuro. Durante a mitose estas regiões não podem ser distinguidas, já que a cromatina se condensa e o nucléolo desaparece. Portanto, o núcleo passa a ser visualizado como um ponto azul brilhante durante a mitose. Após o tempo de coloração, as lamínulas foram incubadas em tampão PBS 1X por 5 a 10 minutos para descoloração, lavadas com água destilada e então montadas em lâminas contendo uma gota de glicerol 50% para a análise.

A fim de se verificar o padrão de distribuição de esteróis no mutante *ΔncsA*, conídeos dessa linhagem e da linhagem selvagem (*Δku80*) foram crescidos por 14 horas a 30°C em MM e imediatamente incubados com filipina na concentração final de 25 µg/mL em meio de cultura

YG previamente aquecido a 37°C por 5 minutos. Após esse tempo as lamínulas foram lavadas com o meio de cultura YG aquecido, montadas como descrito anteriormente e analisadas.

As lâminas foram visualizadas utilizando-se um microscópio Carl Zeiss (Jena, Germany), em objetiva de imersão em óleo 100X (EC Plan-Neofluar, abertura numérica 1.3) equipado com módulo de epifluorescência e lâmpada de mercúrio HBO 100W. As imagens em campo claro com contraste de fase e em campo escuro de fluorescência foram capturadas com câmera AxioCan (Carl Zeiss), visualizadas e processadas pelo programa AxioVision versão 3.1. Imagens no formato .TIFF foram salvas para modificações adicionais e montagem dos painéis com o auxílio do programa Adobe Photoshop 7.0.

Para a coloração das membranas e visualização do tráfico endocítico no mutante *Δncs-A*, foi utilizado o marcador vital esteril lipofílico FM4-64 (N-(3-thiethylammoniumpropyl)-4-(p-diethylaminophenylhexatrienyl) pyridinium dibromide (Invitrogen Molecular Probes) para verificar a sua internalização pela membrana e o transporte vacuolar (VIDA; EMR, 1995). Conídeos da linhagem selvagem (*Δku80*) e mutante foram crescidos por 14 horas a 30°C em 2 mL de MM em placas de cultivo do tipo "glass botton dishes" (Mattek Corporation, USA) e corados com FM4-64 baseado no protocolo previamente descrito por Peñalva (2005). Foram utilizados 10 μM de FM4-64 em meio de cultura pré-aquecido a 37°C por 2 minutos. Após esse tempo as lamínulas foram lavadas e incubadas em meio de cultura YG pré-aquecido isento de FM4-64 à 37°C por 3 horas para a intenalização do corante. As células vivas foram visualizadas em temperatura ambiente em microscópio confocal Leica TCS SP5 Laser Scanning Confocal Microscope (Leica Microsystems, Heidelberg, (Germany) no Laboratório de Microscopia Confocal, Faculdade de Medicina da Ribeirão Preto, USP usando objetiva de 63X com imersão em água e utilizando o canal de laser de 514 nm. As imagens foram capturadas pela aquisição

direta com "Z step" variando de 0,5 a 2 µm através do programa LAS AF (Leica Microsystems). Processamentos adicionais nas imagens e a montagem dos painéis foram realizadas com auxílio do programa Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Incorporated, CA).

Determinação da polarização do crescimento em conídeos após liberação do bloqueio com HU

Incubou-se cerca de 10^6 conídios das linhagens pertinentes a 37°C por 5 horas em meio de cultura YG contendo 50 mM de hidroxiuréia (HU) em lamínulas no fundo de placas de Petri. Após o tempo de sincronização dos germinantes na fase S, as lamínulas contendo os germinantes aderidos foram extensivamente lavadas com o meio de cultura fresco pré-aquecidos a 37°C isento de HU para a retirada da droga. Após a lavagem as lamínulas foram novamente incubadas em meio de cultura líquido completo e amostras foram retiradas nos tempos de 0, 30, 60, 90, 120 e 150 minutos após liberação do bloqueio com HU. Os germinantes foram fixados (solução de fixação I), corados com DAPI e calcoflúor e observados em microscópio de fluorescência sob luz ultravioleta e em campo claro com contraste de fase como descrito anteriormente. Foram considerados conídios que apresentaram crescimento polarizado aqueles que mostravam protuberância (HARRIS, 1999) na superfície do esporo que o retirava da sua forma redonda característica. Foram analisados 100 germinantes em cada experimento independente e os resultados apresentados indicam médias e desvios padrões de pelo menos três experimentos independentes.

Para verificação do crescimento polarizado no mutante *ΔncsA* na presença de lovastatina, concentrações crescentes dessa droga foram adicionas ao meio de cultura logo após a lavagem e liberação do bloqueio com HU em cada experimento. Para estes experimentos os conídeos foram

incubados por 150 minutos e o percentual de polarização verificado. Foram utilizadas as seguintes concentrações de drogas: miriocina: 20; 40 e 80 µg/mL; lovastatina: 0, 0,01, 0,1, 0,5 e 1,0 mg/mL.

Os ensaios de polarização sem HU foram realizados de maneira semelhante, exceto pelo uso de HU e pelos tempos analisados. Nestes ensaios lamínulas com os conídios foram preparadas e os tempos de incubação deliberados dentro do intervalo de 2 a 8 horas.

Determinação da sensibilidade a agentes mutagênicos

Diferentes concentrações das drogas indicadas nos experimentos foram adicionadas ao meio completo acrescido de suplementos. Colônias jovens das linhagens a serem testadas foram inoculadas pontualmente com auxílio de palitos esterilizados, bem como as linhagens selvagens adequadas usadas como controle. As placas foram incubadas a 37°C e os fenótipos das linhagens testadas foram confirmados em aproximadamente 60 horas. Para os experimentos quantitativos, o diâmetro radial das colônias em cada concentração de droga utilizada era medido e o valor expresso nos gráficos como valor percentual de redução em relação a linhagem selvagem controle. A fim de se eliminar a possibilidade de inibição do crescimento devido ao solvente DMSO, um controle com DMSO foi realizado para cada experimento. Este controle consiste em uma placa contendo o solvente DMSO acrescentado na mesma proporção que o maior volume de solução estoque de droga usado. As imagens foram obtidas pela captura da imagem por câmera CCD e os painéis foram montados usando os recursos do programa Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Incorporated, CA).

Estoque de linhagens

As linhagens de *A. fumigatus* utilizadas neste trabalho foram estocadas em sílica estéril a temperatura ambiente, de acordo com a metodologia descrita pelo Fungal Genetics Stock Center (< http://www.fgsc.net/methods/fgscpres.htmL >). As linhagens de bactérias foram estocadas em glicerol 35% a -80°C, de acordo com Sambrook; Russel (2001).

Construção da árvore filogenética

As seqüências primárias das proteínas Ncs de diferentes espécies foram comparadas com a seqüência peptídica da proteína NcsA relacionadas e disponíveis no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank). Alinhamentos múltiplos foram obtidos utilizando o programa Clustal W (www.ebi.ac.uk/clustalw) e a árvore filogenética foi preparada utilizando o programa MEGA (KUMAR *et al*, 2001; www.megasoftware.net) utilizando o método de neigbour-joing com correção Poisson (THOMPSON et al, 1997). Os ramos da árvore foram testados por bootstrap cm 1000 repetições (FELSENSTEIN, 1985).

Ensaios de Virulência

A virulência de diferentes linhagens de *A. fumigatus* foi determinada em camundongos pelo modelo murino de baixa dose para aspergilose invasiva descrito previamente por Liebmann et al (2004) e Ferreira et al (2006). Fêmeas de camundongos BALB/c (Harlan Winkelmann, Borchen, Germany) foram infectadas com conídios de *A. fumigatus* das linhagens tipo selvagem (*Δ ku80*), *ΔncsA* e Δ*ncsA::nc-A*. Os camundongos foram imunossuprimidos com injeção intraperitoneal de ciclofosfamida (150mg/Kg peso corpóreo) a cada três dias, a partir do quarto dias antes da infecção. Adicionalmente uma dose única de acetato de cortisona (200mg/Kg peso corpóreo) foi injetado subcutaneamente no dia da infecção. Os camundongos foram infectados

com 3 x 10^4 conídio viáveis e frescos das linhagens de *A. fumigatus*. Os animais foram testados em bando de cinco em ambientes estéreis e arejados. Os sobreviventes foram monitorados pelo menos duas vezes ao dia na quadra de 14 dias. Os animais sobreviventes foram sacrificados.

Análise estatística

As análises estatísticas utilizadas nos experimentos foram realizadas pelo programa GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., versão 3.11, 2003). As comparações entre grupos experimentais teste e controle foram realizadas através de "teste *t*" não pareado e para as comparações entre vários grupos experimentais testes e seus respectivos grupos controle foram realizadas análises de variância (ANOVA) de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls. Foram considerados estatisticamente diferentes os grupos experimentais com valor de $P<0,05$.

4-RESULTADOS

4.1. A mutação *ΔncsA* provoca resistência ao cálcio e sensibilidade ao EGTA em *A. fumigatus*

Baseado na análise de BLASTp do banco de dados do *A. fumigatus* (http://www.tigr.org/tdb/e2kl/afu1/) usando a FRQ1 (que codifica uma frequenina de levedura/ NCS homólogo) como seqüência de comparação, foi identificada uma única ORF com significante similaridade. Esse potencial homólogo, Afu6g14240 (aqui denominado NcsA), é uma proteína de 190 aminoácidos que possui similaridade com os homólogos de *FRQ1* de *S. cerevisiae* e *Homo sapiens* (61e 65 % de identidade, respectivamente). NcsA de *A. fumigatus* possui 4 domínios EF-hands ligantes de cálcio (aminoácidos 40-58, 60-95, 96-131 e 144-179 Prosite entry PS50222; http://www.expasy.org/prosite/). O número de posições desses domínios de EF-hands são compatíveis em *A. fumigatus*, *S. cerevisiae e Homo sapiens* (dados não mostrados). A relação filogenética da proteina NcsA com os homólogos FRQ1 de diferentes organismos foi realizada através da análise recíproca de BLASTp e representadas numa árvore filogenética (Figura 1). Esta revelou que os NcsA de fungos se encontram num clado em separado, sugerindo que possam estar envolvidos numa diferente função ainda não descrita para NCS1. Contudo, não temos uma explicação adequada para a grande proximidade entre *A. terreus* e *Candida albicans* na árvore filogenética dos NCSs (Figura 1).

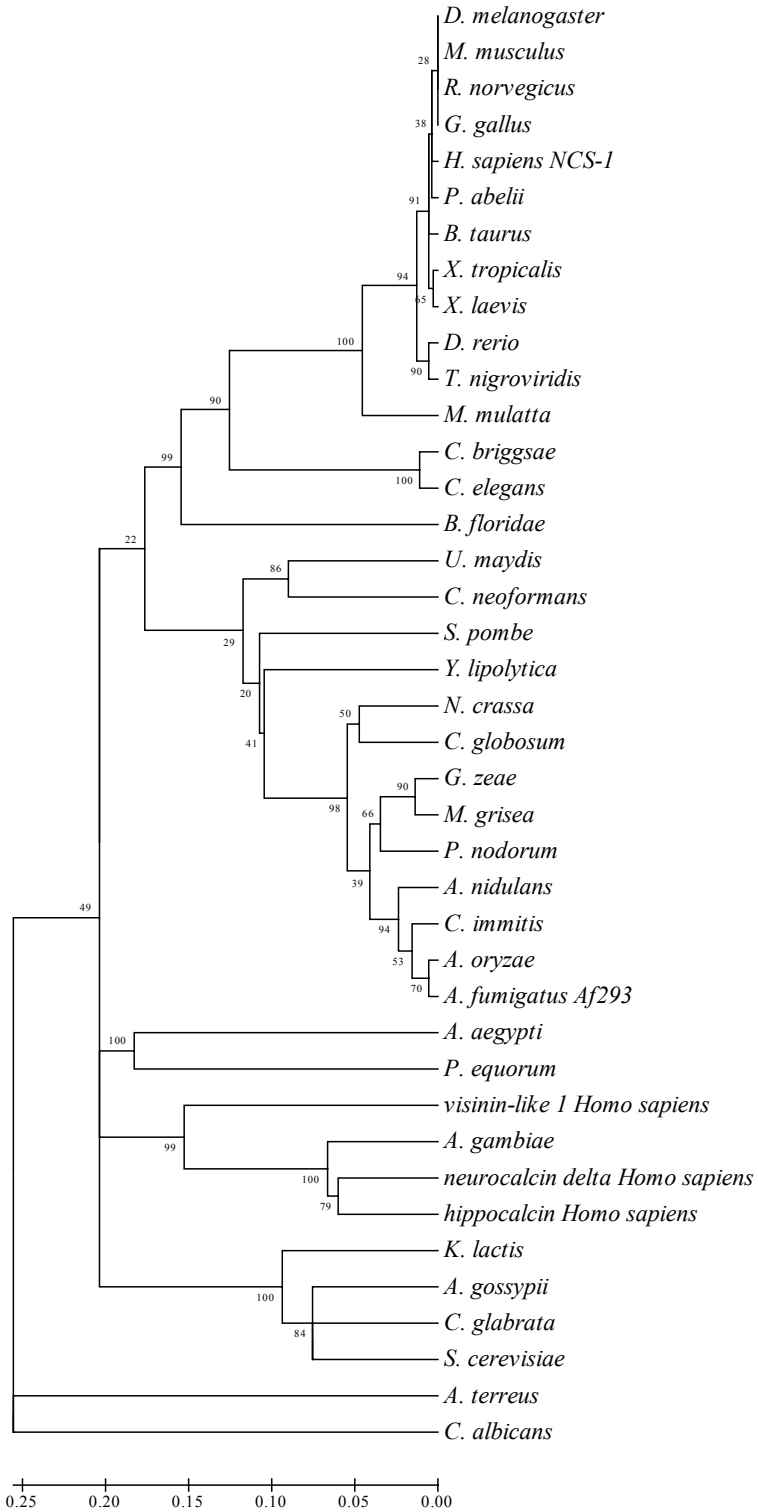
D. melanogaster
M. musculus
R. norvegicus
G. gallus
H. sapiens NCS-1
P. abelii
B. taurus
X. tropicalis
X. laevis
D. rerio
T. nigroviridis
M. mulatta
C. briggsae
C. elegans
B. floridae
U. maydis
C. neoformans
S. pombe
Y. lipolytica
N. crassa
C. globosum
G. zeae
M. grisea
P. nodorum
A. nidulans
C. immitis
A. oryzae
A. fumigatus Af293
A. aegypti
P. equorum
visinin-like 1 Homo sapiens
A. gambiae
neurocalcin delta Homo sapiens
hippocalcin Homo sapiens
K. lactis
A. gossypii
C. glabrata
S. cerevisiae
A. terreus
C. albicans
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00

Figura 1. Árvore filogenética da proteína Ncs-1. A Árvore filogenética preparada com as seqüências primárias da proteína Ncs de diversas espécies mostra as proteínas fúngicas agrupadas em um grupo separado. A análise filogenética foi construída usando o programa MEGA-4 software. O alinhamento das seqüências e o dendograma foram obtidos usando os programas Clustal W e o Neighbor-Joining method, respectivamente. A análise de bootstrap foi realizada para avaliar a topologia filogenética da árvore. As seguintes proteínas foram usadas na arvore: *Aspergillus oryzae* XP_001826975; *A. fumigatus* EAL89260.1; *Coccidioides immitis* EAS37509.1; *A. nidulans* XP_662945.1; *Phaeosphaeria nodorum* EAT89306; *Gibberella zeae* XP_389767.1; *Magnaporthe grisea* BAB88922.1; *Neurospora crassa* XP_957456.1; *Chaetomium globosum* EAQ88269.1; *A. terreus* EAU39579.1; *Yarrowia lipolytica* XP_503971.1; *Candida albicans* XP_723413; *Kluyveromyces lactis* XP_454056.1; *Ashbya gossypii* NP_983241.1; *Candida glabrata* XP_444894.1; *S. cerevisiae* NP_010661; *Schizosaccharomyces pombe* AAP48992.1; *Ustilago maydis* XP_756667.1; *Cryptococcus neoformans* EAL19637.1; *Branchiostoma Xoridae* AAP78742.1; *Caenorhabditis briggsae* CAE63591.1; *Caenorhabditis elegans* NP_508186; *Danio rerio* NP_001018350; *Macaca mulatta* XP_001118646.1; *Tetraodon nigroviridis* CAG05167.1; *Xenopus tropicalis* NP_988973.1; *X. laevis* NP_001084088; *Bos taurus* ABB88851; *Pongo abelli* CAH90617.1; *Drosophila melanogaster* AAV38890; *Rattus norvegicus* AAA88510.1; *Homo sapiens* AAF01804; *Gallus gallus* NP_990708.1; *Mus musculus* Q8BNY6; neurocalcin delta [*H. sapiens*] NP_001035720; hippocalcin [*H. sapiens*] NP_002134; *Anopheles gambiae* XP_308553; Visinin-like 1 [*H. sapiens*] NP_003376; *Aedes aegypti* EAT44358.1; *P. equorum* AAV32835.1

Como um passo inicial na caracterização do gene *ncsA*, foi gerada a sua deleção através da integração do cassete de deleção, construído pela técnica "PCR-mediated" (KUWAYAMA et al, 2002), contendo o gene *pyr G,* que reconstitui a auxotrofia do tipo selvagem. Foram amplificados 1628 pb na região 5' "upstream" do códon de iniciação do gene (seqüência genômica) e 1780 pb na região 3' "downstream" (seqüência genômica). O cassete *zeo-pyrG* de *A. fumigatus* (amplificado a partir do plasmídeo pCDA21) foi utilizado como marca de seleção. O fragmento resultante da PCR de fusão dos três fragmentos isolados (5825 pb) foi transformado na linhagem que carrega a mutação *pyrG89* e os transformantes foram testados para a independência de uridina e uracila. O DNA genômico dos candidatos a deleção do gene *ncsA*, que cresceram em meio YAG, foi extraído para a comprovação da substituição alélica do gene *ncsA* através de análise por Southern blot.

A figura 2 demonstra a estratégia utilizada no Southern blot para a confirmação da deleção do gene *ncsA*. Os DNAs genômicos das cepas selvagem e deletada foram digeridos com a enzima de restrição *Sal*I e hibridizados com uma sonda marcada radioativamente produzida com o fragmento 5'UTR do gene *ncsA*. As restrições dos DNAs produziram um fragmento comum de 3 Kb. Devido a um sítio de restrição para esta enzima dentro do gene *zeo,* inserido com o cassete de deleção, foi observada na linhagem mutada uma banda de aproximadamente 1,5 Kb. A linhagem selvagem, que não possui este sítio, gerou um fragmento próximo de 6,9 Kb, A figura 2 mostra uma autoradiografia evidenciando a banda comum de 3-Kb e as bandas de 1,5 e 6,9-Kb referentes às linhagens mutante (*ΔncsA*) e selvagem (wt), respectivamente.

As estratégias utilizadas para a confirmação das deleções permitem demonstrar em uma única hibridação se a deleção ocorreu no locus correto ou se houve também concomitantemente uma outra integração heteróloga, uma vez que pelo menos um sítio de restrição utilizado nas análises encontra-se fora do cassete de deleção. Uma vez confirmadas as deleções, os mutantes

foram armazenados na micoteca do laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e foram iniciadas as caracterizações fenotípicas macroscópicas e microscópicas.

A integração homóloga do cassete de deleção unicamente no locus *ncsA* aconteceu em cinco candidatos, como é mostrado na Figura 3. Esse resultado indica que *ncsA* não é um gene essencial em *A fumigatus*, em contraste com o que foi observado para o gene FRQ1 de *S. cerevisiae*.

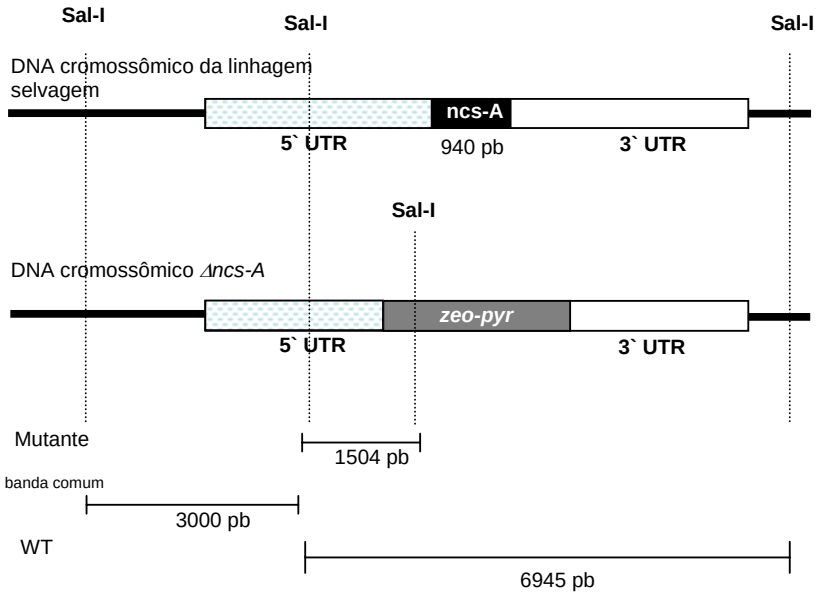

Figura 2: Construção da linhagem ΔncsA. Representação esquemática da estratégia de deleção na qual o gene ncsA (940 pb) foi substituído, por recombinação homóloga do cassete construido pela técnica "PCR-mediated" contendo o marcador auxotrófico pyrG. Os sítios de Sal-I estão assinalados na figura.

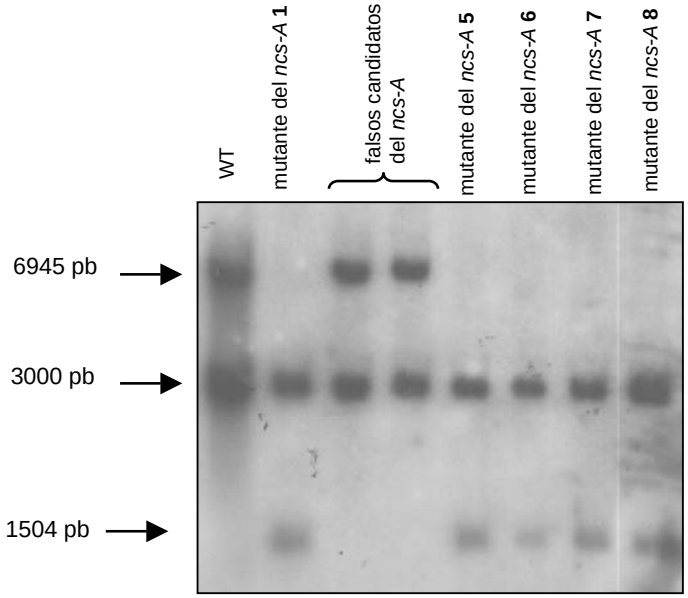

Figura 3. Análise por Southern blot da linhagem selvagem (Δku80) e mutante *ΔncsA*. O DNA genômico foi extraído e clivado com a enzima *Sal-I*; o fragmento 5` UTR que foi utilizado para a construção do cassete de deleção foi utilizada como sonda. Esse fragmento reconhece uma banda de aproximadamente 6,9 Kb na linhagem selvagem. Na linhagem *ΔncsA*, a presença de um sítio de *Sal-I* na posição 648 do gene *zeo-pyrG* leva ao reconhecimento de uma banda de 1,5 Kb indicando a integração homóloga do cassete de deleção. Em todos os indivíduos é reconhecida uma banda em comum de aproximadamente 3 Kb.

Os mutantes *ΔncsA* apresentaram taxas de crescimento radial e conidiação comparáveis as do tipo selvagem, tanto em meio mínimo quanto em meio rico, quando incubadas a 37°C (Figura 4). A linhagem mutante foi ainda submetida a desafios de crescimento sob várias condições, tais como: presença de metais, estresse osmótico e oxidativo, diferentes pHs dos meios de cultivo, agentes imunossupressores, além de drogas que causam dano ao DNA ou afetam o ciclo celular. No entanto, não houve diferença de crescimento das linhagens mutantes em relação ao crescimento apresentado pela cepa selvagem (dados não apresentados), exceto nos desafios de crescimento em presença de altas concentrações de cálcio, onde essa linhagem mostrou-se menos sensível, e de maneira inversa, mais sensível em pequenas concentrações de cálcio, o que obtido com o uso de quelante de cálcio, EGTA. A linhagem mutante *ΔncsA* foi ainda fortemente inibida em presença de SDS (Figura 5).

Esses efeitos não se devem a resistência a estresse osmótico, pois quando submetidas a crescimento sob 1,2 M KCl ou Sorbitol as linhagens mutante e selvagem se desenvolvem com taxa de crescimento similar (Figura 6).

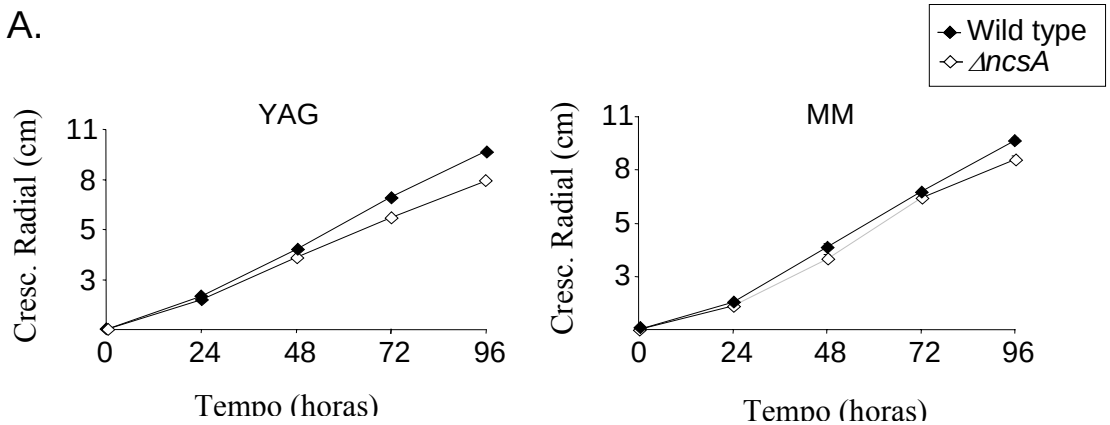

Figura 4: Perfil do crescimento radial da linhagem selvagem e mutante *ΔncsA*. As linhagens foram cultivadas em meio completo (YAG) assim como em meio mínimo (MM) a 37°C e avaliadas por até 96 horas.

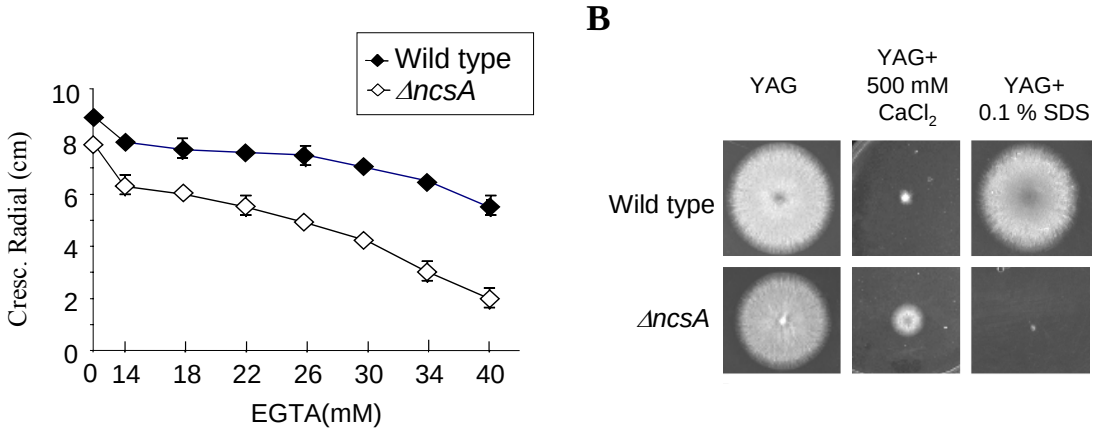

Figura 5: Crescimento radial das linhagens selvagem (del *ku80*) e mutante *ncsA* (del *ncsA*) na presença de EGTA e Cálcio. A Perfil do crescimento radial das linhagens selvagem (Wild type) e mutante *ncsA* (*ΔncsA*) na presença de EGTA. As linhagens foram semeadas pontualmente em meio sólido contendo as concentrações de EGTA indicadas e em seqüência incubadas a 37°C por 96 horas. **B.** Fotografias de culturas das linhagens selvagem e mutante *ncsA* (*ΔncsA).* As linhagens indicadas foram cultivadas em meio rico YAG a 37ºC por aproximadamente 60 horas na ausência e presença de 500 mM de Ca^{++}. Para melhor visualização os controles com apenas YAG apresentados na figura à esquerda, foram incubados somente por 48 horas.

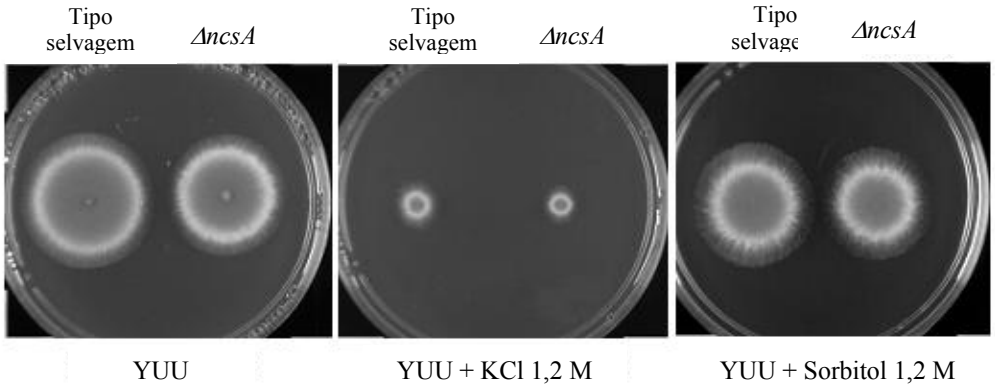

Figura 6: Efeito do estresse osmótico sobre o crescimento da linhagem selvagem e *ΔncsA*. Conídios do tipo selvagem e linhagem *ΔncsA* foram inoculados em YUU, YUU + 1,2 M KCl e YUU + sorbitol e submetidas a incubação por 48 horas a 37ºC.

Para determinar a localização subcelular da proteína NcsA, a linhagem selvagem de *A. fumigatus* foi transformada com o cassete *ncsA::mRFP*. Essa linhagem, cuja proteína NcsA está fusionada a proteína fluorescente monomérica vermelha (mRFP)(BAIRD et al,2002), foi gerada pela técnica de recombinação "in vivo" em *S. cerevisiae* (COLOT et al., 2006). Vários transformantes foram obtidos e a integração homóloga dos cassetes foi comprovada por Southern blot (Figura 7).

A figura 8 apresenta um germinante que foi crescido por 24 horas em MM+ 2% glicerol a 30 ^{o}C e incubado ou não na presença de cloreto de cálcio 50mM por 15 minutos. Em ambas condições, presença e ausência de cálcio e ainda em meio cuja glucose é fonte de carbono, o NcsA foi detectado difusamente pelo citoplasma da hifa germinante, e independente da resposta celular ao cálcio não se concentrou no núcleo ou organela específica. (Figura 8). Esse resultado indica que a localização do NcsA não é afetada pela resposta celular ao cloreto de cálcio.

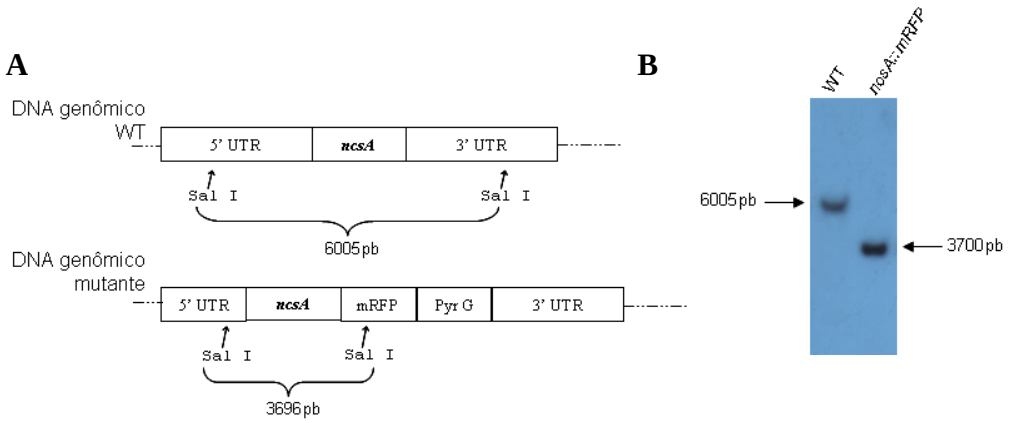

Figure 7 – Análise por Southern blot da integração homóloga do inserto *mRFP::pyrG* no DNA genômico do *A. fumigatus*. A - Representação esquemática dos sítios de restrição da enzima Sal I nos DNAs da preparação do Southern blot. Foi utilizado o próprio gene *ncsA* como sonda. **B-** Autoradiografia do Southern blot mostrando as bandas radiomarcadas da cepa selvagem (6 kb) e mutante (3,7 kb).

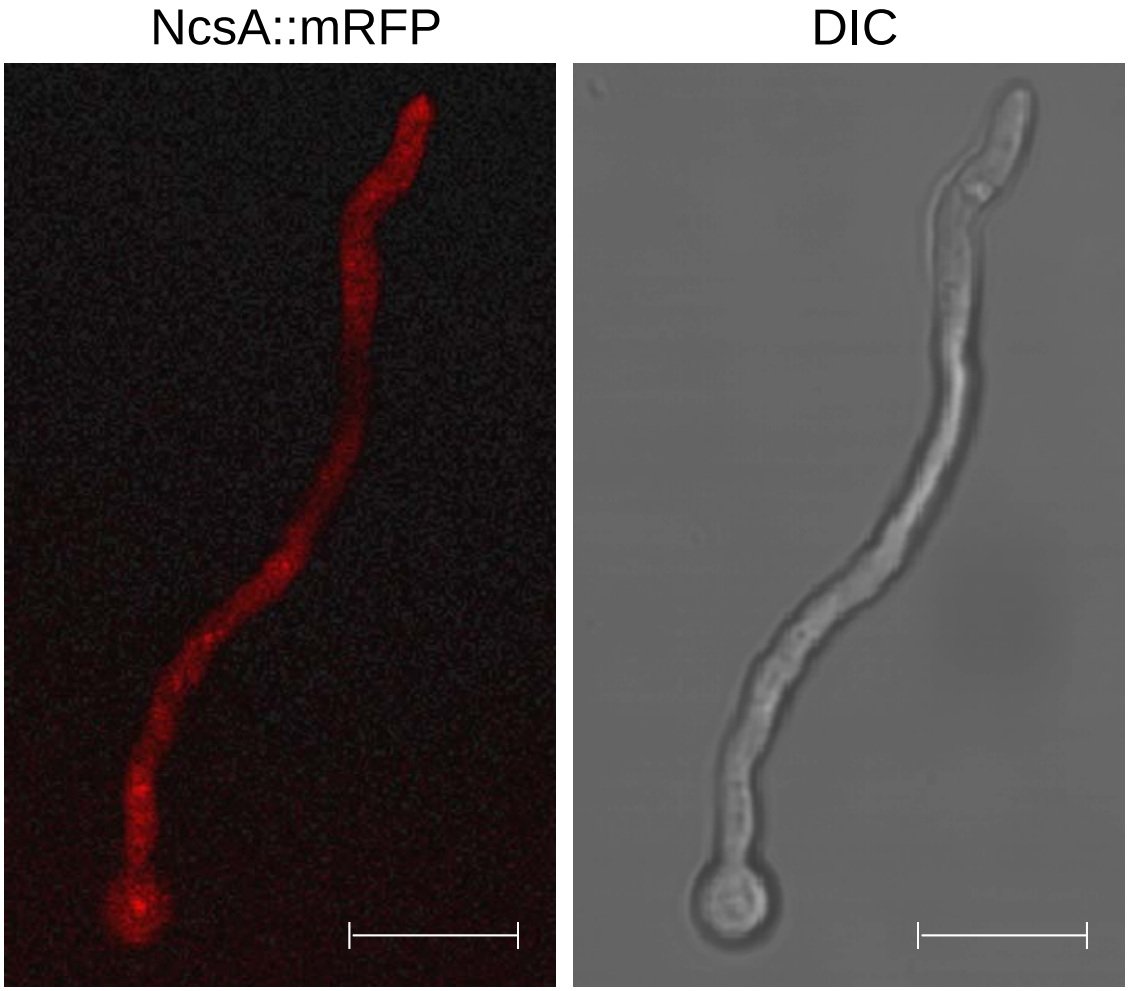

Figure 8 - NcsA::mRFP localiza-se no citoplasma. Germinantes da linhagem NcsA::mRFP foram submetidos a crescimento em MM- glicerol 2% por 24 horas a 30ºC e então tratados com e sem CaCl 50mM por 15 minutos. Após o tratamento os germinantes foram analisados em microscopia confocal a laser. A figura apresenta um germinante exposto ao cálcio, entretanto quando sem cálcio é observado essencialmente o mesmo efeito. As imagens foram capturadas pela aquisição direta em dois passos variando de 0.5 a 2μm. Barra 10μm.

4.2. O NcsA é importante para a distribuição de esterois na extremidade da hifa e estabilização do crescimento polarizado

A forte inibição de crescimento apresentada pela linhagem mutante *ΔncsA* ao SDS sugeriu a possibilidade da ocorrência de alterações em nível de membrana nessas células. Para investigar o envolvimento na biossíntese de ergosterol e no tráfego intracelular, assim como na secreção e transporte vesicular, foram realizados ensaios com drogas que afetam a biossíntese de ergosterol e a manutenção da membrana plasmática, tais como voriconazole, itraconazole (ambos bloqueiam a biossíntese de ergosterol através da inibição da enzima 14-α-demetilase, produto do gene CYP51/erg11- Ferreira et al, 2005), anfotericina B, com a sonda fluorescente Filipina, que detecta depósitos do principal esterol de membrana o ergosterol (MARTIN and KONOPKA 2004), Lovastatina, agente inibidor de uma enzima chave na síntese de ergosterol, hidroxi-3-metilglutaril coenzima-A redutase (hidroximetilglutaril Coa redutases ou HMG-CoA redutase) (Charlton-Menys and Durrington 2007), e ainda com o FM4-64, um marcador de tráfego de vesículas endocíticas e sistema vacuolar. (PEÑALVA, 2005).

A linhagem mutante *ΔncsA* sofreu forte inibição de crescimento quando na presença de drogas que afetam a biossíntese de ergosterol e manutenção da membrana plasmática (Figura 9), porém não foi inibida em presença de terbinafina e caspofungin (dados não mostrados). Com o intuito de investigar acerca da polarização de domínios ricos em esterol na membrana do *A fumigatus*, germinantes das linhagens tipo selvagem e mutante *ΔncsA* foram marcados com filipina. A filipin é um antibiótico polieno que é similar em estrutura a anfotericina B, intercalando-se entre as moléculas de esteróis e formando na membrana complexos 3-β hidroxil esterol livre. A filipina é usada para visualizar esteróis de membrana (incluindo aqui os "*lipids rafts"*), numa larga faixa de tipos celulares. Devido a sua propriedade fluorescente, é possível a

observação em microscópio no mesmo espectro de emissão do DAPI (GHANNOUM, RICE, 1999; ALVAREZ; DOUGLAS; KONOPKA, 2007). Durante o crescimento polarizado os germinantes da linhagem selvagem exibiram intensa marcação de filipina bem localizada na extremidade da hifa, o que não foi visualizado em cerca de 70% das células de linhagem mutante, onde a distribuição apareceu de forma aleatória no corpo da célula (Figura 10). Esses resultados indicam que NcsA influencia a deposição de domínios de esterol na membrana plasmática.

A germinação dos conídios em fungos filamentosos é caracterizada por um breve período de expansão isotrópica, em que ocorre deposição de parede celular em todas as direções, o que ocasiona o intumescimento da célula. Posteriormente segue-se um estado de formação de um eixo estável de crescimento polarizado e a emissão do tubo germinativo. Estes eventos levam a formação das hifas, células multinucleadas que crescem unicamente por extensão apical (MOMANY, 2002). O crescimento polarizado é uma das características mais peculiares do crescimento das células fúngicas, tanto em células de levedura ou de fungos filamentosos (HARRIS, 1999). A forma mais conveniente de se verificar o crescimento polarizado do esporo é a presença do tubo germinativo. Dessa forma, um esporo é classificado como polarizado microscopicamente pela presença do tubo germinativo. Na fase de expansão isotrópica os esporos apresentam uma morfologia esférica, assim o tubo germinativo pode ser facilmente detectado pela presença de pequenas protuberâncias na superfície do conídio corado com DAPI e calcoflúor (HARRIS, 1999). A polarização, isto é a emissão do tubo germinativo, não ocorre se a progressão do ciclo de celular for bloqueada pelo inibidor hidroxiurea (HU), um inibidor da enzima ribonucleotídeo redutase, que causa a parada do ciclo celular na fase S e consequentemente promove a sincronização do ciclo celular. Assim, visando avaliar possíveis defeitos de polarização no mutante *ΔncsA* foram realizados experimentos de bloqueio e liberação com HU.

Desta forma, conídios das linhagens selvagem e mutante foram incubados em YG com HU 50mM por 5 horas, para estabelecer a sincronização da emissão dos tubos germinativos, então os germinantes intumescidos foram lavados para retirar o HU e submetidos a crescimento por mais 150 minutos na presença de diferentes concentrações de lovastatina.

O estabelecimento do eixo de crescimento polarizado na linhagem mutante *ΔncsA* foi mais afetado pela lovastatina que a linhagem selvagem ($P<0,05$ para cada concentração, exceto para o tratamento sem lovastatina que não foi estatisticamente significativo) (Figura 11A). Esse resultado se deve a atividade de inibição da droga e não se deve a possibilidade de a lovastatina estar causando morte, pois ambos tipo selvagem e linhagem mutante *ΔncsA* apresentam o mesmo grau de sensibilidade a lovastatina no meio sólido (Figura 11B).

Com o intuito de investigar o papel da proteína NcsA na regulação do sistema de tráfego de compartimentos vesiculares, foi avaliado o funcionamento do transporte endocítico, através de ensaios com a sonda fluorescente FM4-64, nas linhagens tipo selvagem e mutante *Δncs* de *A fumigatus*. Assim conídios dessas linhagens foram incubados para crescimento e o tráfico vesicular foi avaliado. A marcação com FM4-64 revelou que o Spitzenkörpers está presente na extremidade da hifa tipo selvagem (ver seta Figura 12A), e são ainda observadas nessa linhagem estruturas que provavelmente correspondem a compartimentos endossomais maduros (PEÑALVA 2005; Figura 12A a esquerda do painel). O Spitzenkörper também é visualizado em hifas da linhagem mutante, e apesar do sistema vacuolar não parecer muito diferente do observado no tipo selvagem, possui uma diminuição de pelo menos duas vezes na intensidade de marcação na superfície dos germinantes (Figura 12A à direita do painel). Essa observação foi validada pela quantificação do número de "pixels" em faixas perpendiculares ao eixo de crescimento das hifas (Figura 12B).

Em conjunto esses resultados sugerem que o NcsA desempenha um papel na organização de domínios de membrana e crescimento polarizado em *A. fumigatus*. Além do mais, esses dados sugerem que a mutação no gene *ncsA* pode afetar a endocitose em *A.fumigatus*. É importante ressaltar que não foi observada qualquer diferença entre o tipo selvagem e a linhagem *ΔncsA* quando comparadas as taxas de extensão de hifa, número de extremidades e morfologia na presença de concentrações sub-inibitórias de EGTA (dados não mostrados).

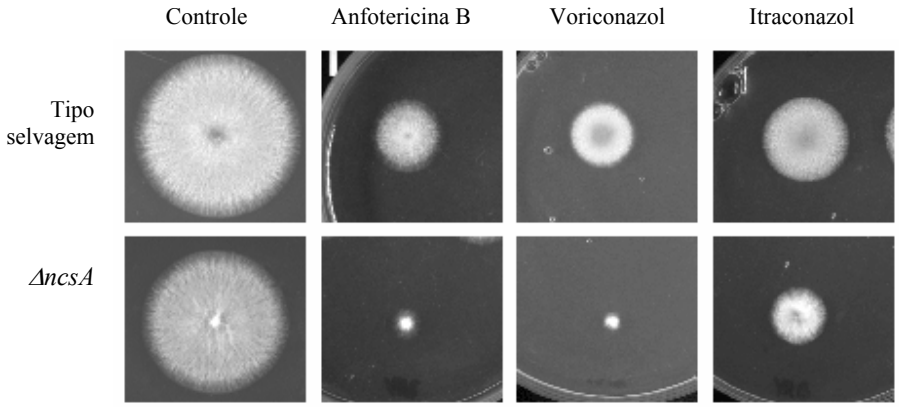

Figura 9: Fotografias de culturas das linhagens selvagem e mutante *ncsA* (*ΔncsA*) crescidas em presença de drogas inibidoras de síntese de membrana plasmática. As linhagens foram semeadas pontualmente em meio rico sólido (YAG) contendo as drogas Anfotericina B; Voriconazole, Itraconazole nas concentrações de 500; 50; 50ng/mL respectivamente. Para melhor visualização os controles com apenas YAG apresentados na figura à esquerda, foram incubados a 37°C somente por 48 horas e os outros cultivos por 60 horas.

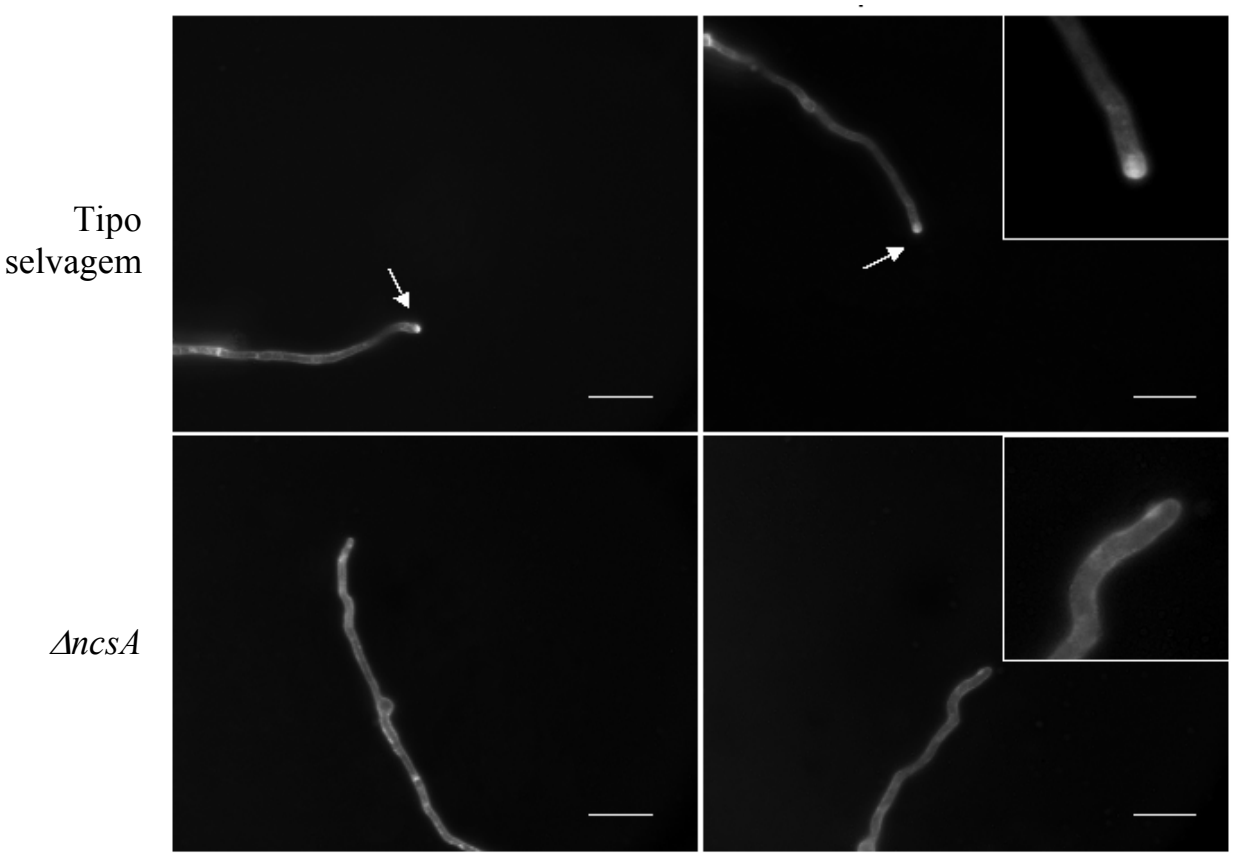

Figura 10: Polarização do ergosterol de membrana durante o crescimento polarizado nas linhagens selvagem e mutante *ΔncsA* de *A. fumigatus*. Esporos foram crescidos em MM a 30°C por 16 horas e imediatamente corados com filipina para visualização da fluorescência. Na linhagem selvagem é observado aglomeração apical de ergosterol nas hifas, o que não ocorre para a maior parte da população mutante *ncsA*. As setas indicam pontos de intensidade maior de fluorescência distribuída aleatóriamente e visualizados pela marcação com filipina.

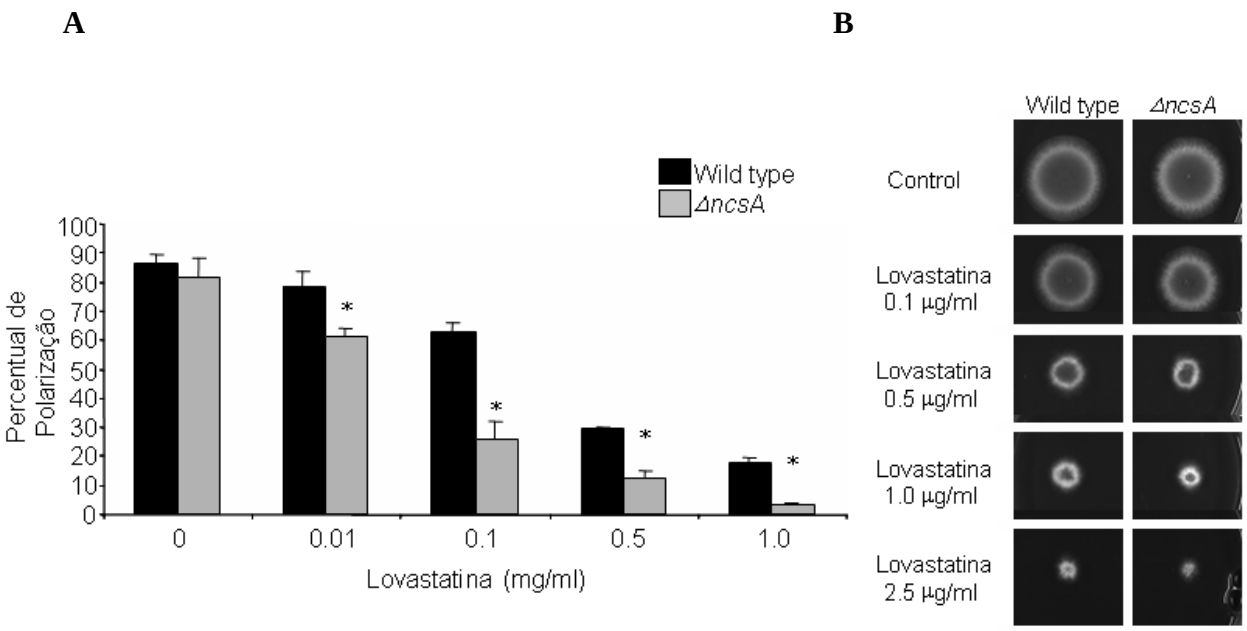

Figura 11: Influência da lovastatina durante o crescimento polarizado nas linhagens selvagem e mutante *ΔncsA* de *A. fumigatus*. A. Conídio de A. Fumigatus das linhagens selvagem e mutante *ΔncsA* foram cultivadas em meio líquido na presença de 50mM HU por 5 horas e as células foram lavadas, para retirar o bloqueio, saírem da fase S, e crescerem em diferentes concentrações de lovastatina por 150 minutos. Depois deste período foi determinado as porcentagens de polarização. O gráfico mostra as médias e os desvios padrões de três experimentos diferentes com avaliação de 100 germinantes em cada. **B.** Crescimento do tipo selvagem e *ΔncsA* em meio sólido YAG com diferentes concentrações de lovastatina apresentando o mesmo grau de sensibilidade. O símbolo "*" representa diferença estatisticamente significativa, com valor de $P < 0,050$ quando comparado ao grupo controle selvagem.

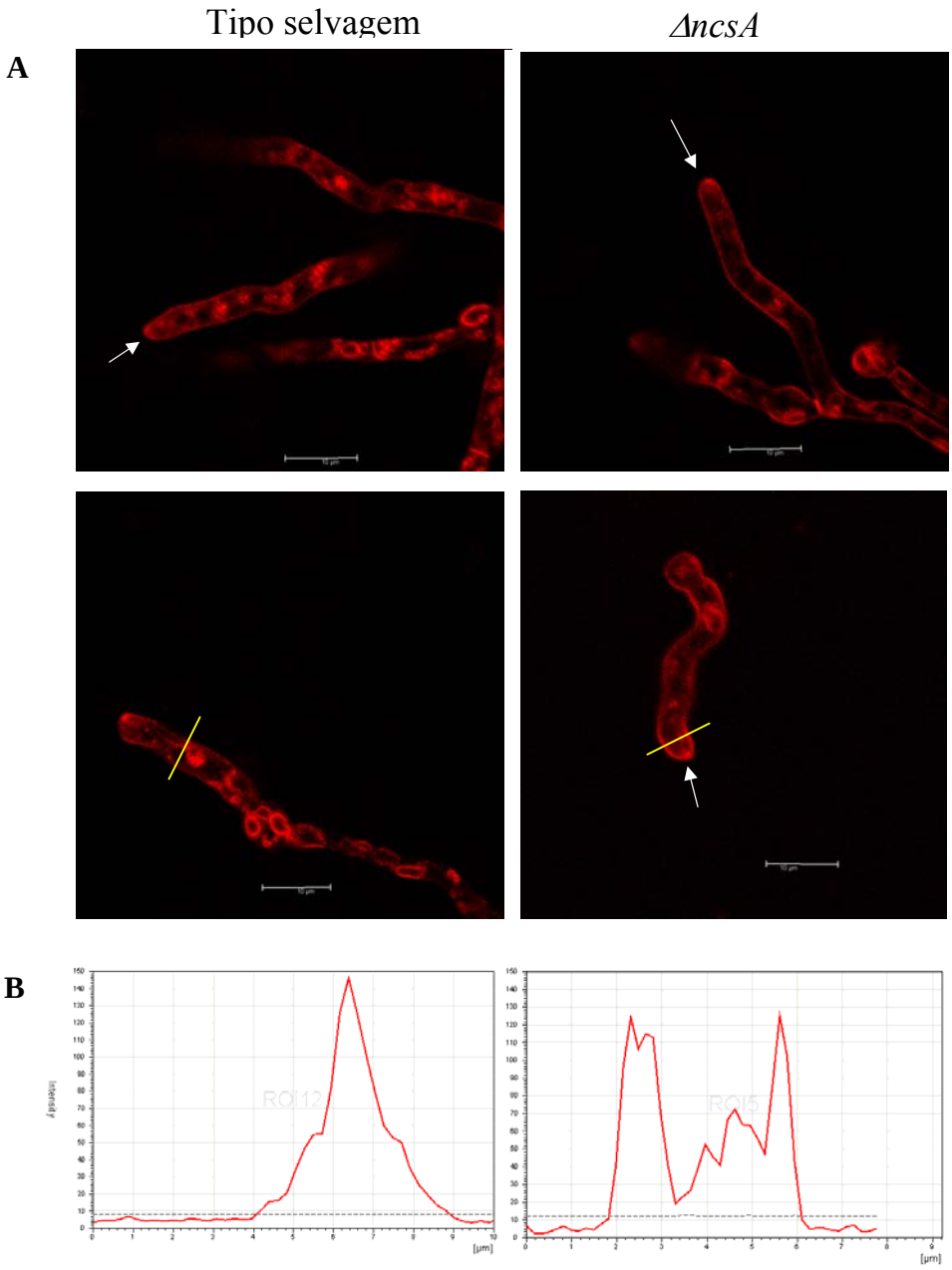

Figura 12: Mutação *ΔncsA* em *A fumigatus* pode alterar tráfego endocítico. **A.** Conídiosporos foram submetidos à crescimento em "glass botton dishes" por 16 horas a 30°C em MM. Os germinantes foram corados com FM4-64 por cinco minutos e incubados a 37°C por 3 horas para a internalização do corante. Os germinantes foram analisados a temperatura ambiente em microscópio confocal. As setas mostram os Spitzenkörper nas extremidades das hifas de ambas linhagens. As imagens foram capturadas por aquisição direta com passo Z variando de 0.5- 2 µm num microscópio confocal Leica LAS AF software (Leica Microsystems). Barra

10μm. **B.** A marcação com FM4-64 é mais proeminente nas membranas celulares dos germinantes da linhagem mutante *ΔncsA* que no tipo selvagem. Os germinantes foram submetidos à quantificação de pixels em inúmeras faixas perpendiculares ao eixo de crescimento. A quantificação foi procedida usando um software Leica LAS AF Lite desenvolvido por Leica TCS SP5 Confocal Microscope (Leica Germany). Essas medições foram realizadas em inúmeros germinantes obtidos de diferentes experimentos e as figuras representadas aqui retratam germinantes representativos.

4.3. A linhagem mutante *ΔncsA* tem diminuidos os níveis de mRNA para genes moduladores de cálcio

Visando verificar se a tolerância ao cálcio e a sensibilidade ao EGTA mostradas pelo mutante *ΔncsA* poderiam estar relacionadas ao controle da expressão dos transportadores de cálcio, , foram realizadas reações de "real-time" RT-PCR utilizando-se sondas fluorescentes para os genes que codificam os transportadores de cálcio *pmcA* (Afu1g10880) e *pmcB* (Afu3g10690). Soriani (2008) demostrou que esses genes foram os transportadores de cálcio mais responsivos a expressão de mRNA aferidas por RT-PCR ao tratamento com cálcio, dentre os homólogos de transportadores de cálcio já caracterizados em *A. fumigatus*. As amplificações desses genes foram obtidas usando como "template" o cDNA oriundo do cultivo das linhagens selvagem e mutante *ΔncsA* em resposta a pulsos rápidos de cloreto de cálcio 200mM por 10 e 30 minutos (Figura 13). No tipo selvagem os níveis de mRNA de *pmcA* aumentaram 7 e 2 vezes, respectivamente, enquanto que *pmcB* acumulou 13 e 6 vezes, respectivamente, após a exposição a cálcio por 10 e 30 minutos. Ao contrário, a linhagem mutante *ΔncsA* apresentou essas expressões relativamente suprimidas com redução de mais de 50%. Esses resultados sugerem que NcsA induz a expressão de *pmcA* e *pmcB* e por isso foi observada a redução da expressão dessas bombas de íons no mutante *ΔncsA*.

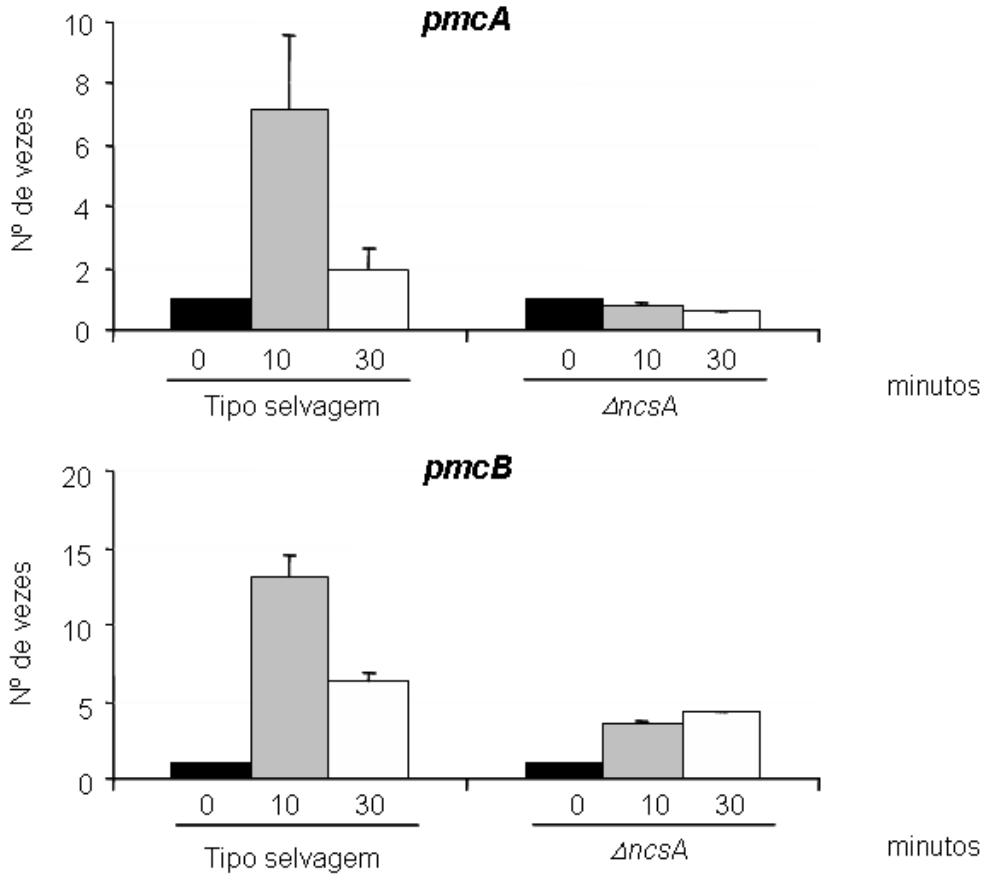

Figura 13. O mutação *ΔncsA* afeta a expressão de genes que codificam bombas de íons. A quantificação foi realizada pelo método de RT-PCR em tempo Real. As medições das quantidades de mRNA do gene *pmcA* (Afu1g10910) e do gene *pmcB* (Afu3g10690), obtidas com tratamento de cada amostra, foram normalizadas com o valor de CT apresentado pela amplificação do mRNA de *β-tubulina* (Afu1g10910) obtido em corrida com a mesma amostra. A relativa quantificação da expressão de todos os genes, incluindo a *β-tubulina*, foram determinados por uma curva padrão, na qual o logaritmo do valor de CT é o número de cópias de DNA. Os valores resultantes são a média de quatro grupos de experimentos com os devidos desvios padrões (±). O valor representa o número de vezes de genes que são expressos comparados com o apresentado pela linhagem controle correspondente, crescida em condições semelhantes até antes do tratamento com cloreto de cálcio 200mM (representada absolutamente como 1.00). Os níveis de mRNA foram medidos depois das incubações com cloreto de cálcio 200mM por 10 e 30 minutos.

Recentemente, nós avaliamos o efeito do cálcio na expressão gênica global em *A. fumigatus* através da realização de hibridizações competitivas em lâminas de microarrays usando RNAs obtidos da linhagem tipo selvagem antes e depois de um curto pulso de cloreto de cálcio 200mM (SORIANI et al, 2008). Através de ensaios de "real-time" RT-PCR, Soriani et al. 2008) avaliaram a confiabilidade destas hibridizações através da análise da expressão de oito genes. Alguns foram mais expressos no microarray (MEM) incluindo Afu8g05010 (C2H2 finger domain protein), Afu1g17460 (C6 transcription factor), Afu2g16520 (phospholipase D), Afu2g07630 (vacuolar H+/Ca2+ exchanger) e Afu2g13060 (calcineurin binding protein). Foram escolhidos ainda alguns genes definidos como menos expressos no microarray (LEM) como: Afu3g05760 (C6 transcription factor), Afu4g03460 (HLH DNA binding domain protein) e Afu2g11460 (C6 finger domain).

Comparando a expressão gênica desses genes na linhagem selvagem com a expressa no mutante *ΔncsA* após o tratamento do cloreto de cálcio 200mM por 10 e 30 minutos, foi observado a regulação inversa para Afu8g05010, Afu1g17460, e Afu2g13060. Os níveis de expressão de mRNA foram mais altos no mutante *ΔncsA* para os seguintes genes Afu2g07630 e Afu2g11460, quando expostos ao cálcio. E não houve diferença de expressão entre o tipo selvagem e o mutante *ΔncsA* nessas condições para os genes Afu2g16520, Afu3g05760, and Afu4g03460 (Figura 14). Em conjunto, esses resultados sugerem que o NcsA pode influenciar os níveis de mRNA de genes envolvidos na resposta ao cálcio em *A. fumigatus.*

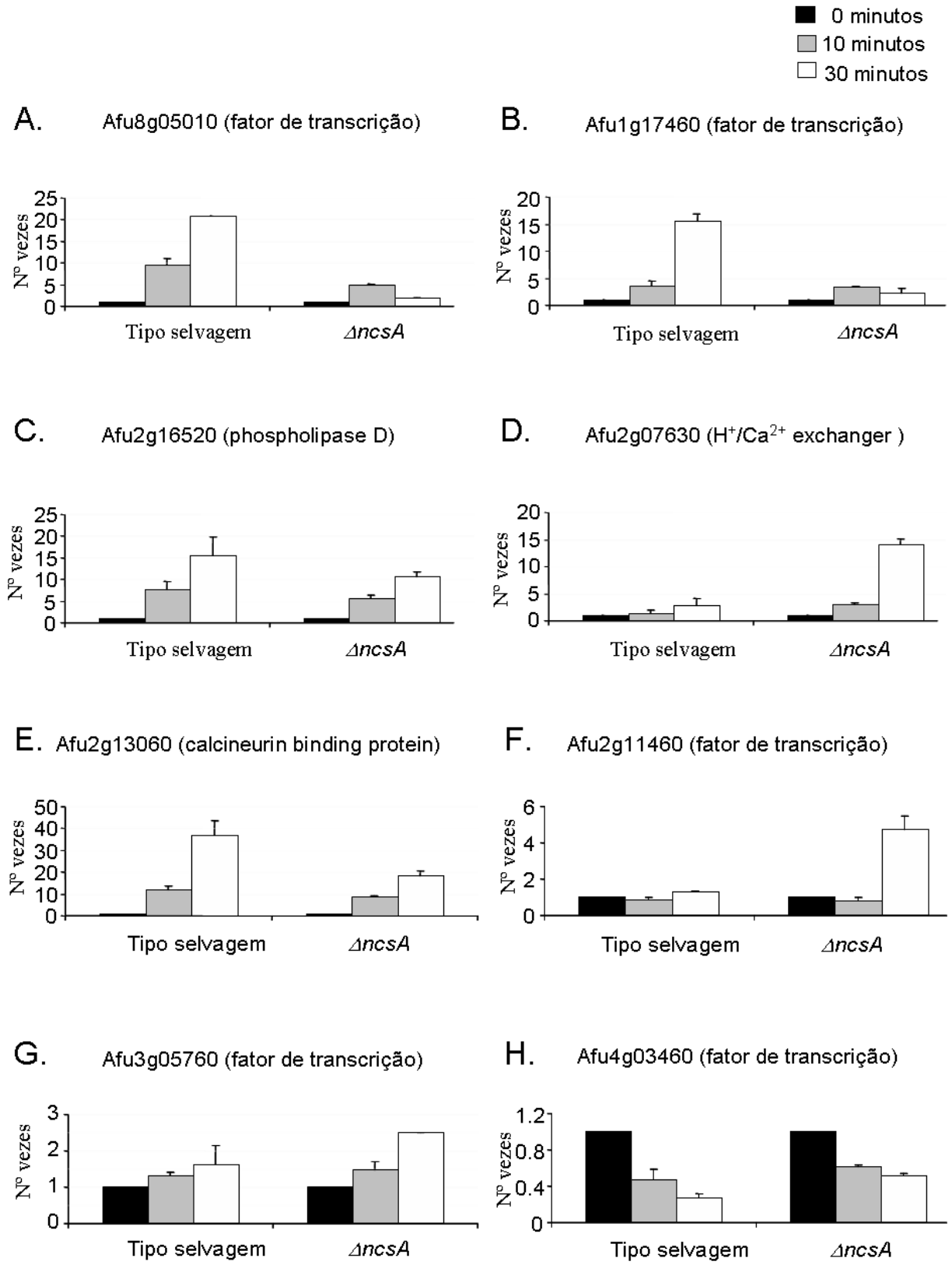
0 minutos
10 minutos
30 minutos
A. Afu8g05010 (fator de transcrição)
B. Afu1g17460 (fator de transcrição)
C. Afu2g16520 (phospholipase D)
D. Afu2g07630 (H+/Ca2+ exchanger)
E. Afu2g13060 (calcineurin binding protein)
F. Afu2g11460 (fator de transcrição)
G. Afu3g05760 (fator de transcrição)
H. Afu4g03460 (fator de transcrição)
Nº vezes
Tipo selvagem
ΔncsA

Figura 14. Níveis de mRNA apresentados por genes moduladores de cálcio quando submetidos a tratamento com CaCl 200mM por 10 e 30 minutos. A quatificação foi realizada pelo método de RT-PCR em tempo Real. A medição dos mRNA expressadas pelos genes (A) Afu8g05010 (C2H2 finger domain protein), (B) Afu1g17460 (C6 fator de transcrição), (C) Afu2g16520 (phospholipase D), (D) Afu2g07630 (vacuolar H^{+}/Ca^{+2} exchanger), (E) Afu2g13060 (calcineurin binding protein), (F) Afu2g11460 (C6 finger domain protein), (G) Afu3g05760 (C6 fator de transcrição), e (H) Afu4g03460 (HLH DNA binding domain protein) obtidas com tratamento de cada amostra, foram normalizadas com o valor de CT apresentado pela amplificação do mRNA de *β-tubulina* (Afu1g10910) obtido em corrida com a mesma amostra. A mesma metodologia descrita na figura 13 foi usada para calcular a acumulação de mRNA.

4.4. Ensaios de virulência

Considerando os defeitos fenotípicos apresentados pela linhagem *ΔncsA* foi avaliada a influência dessa mutação na patogenia causada pelo fungo através do teste de virulência em modelo animal. A virulência apresentada pela linhagem mutante Δ*ncsA* de *A. fumigatus* em comparação com a linhagem selvagem (Δ*ku80*) e a linhagem complementada (Δ*ncsA::ncsA*$^{+}$) foram determinadas segundo o modelo murino de baixa dose para aspergilose invasiva como otimizado por Liebmann *et al*, (2004). Os camundongos foram expostos aos mesmos números de conídios viáveis de cada linhagem (3 x 10^4 conídios viáveis). As infecções com o tipo selvagem e a linhagem mutante resultaram em taxa de mortalidade de 50% no oitavo dia posterior a inoculação intranasal de conídios da infecção. Embora a linhagem reconstituída pareça mais virulenta que a selvagem e mutante, a diferença não foi estatisticamente significante ($P>0.05$) (Figura 15). Esses resultados indicam que a mutação no gene *ncsA* não tem qualquer influência na virulência do fungo.

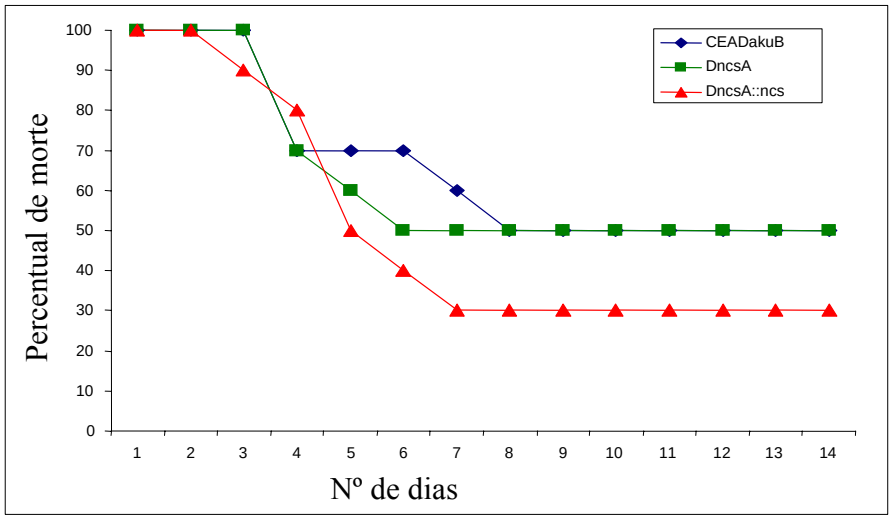

Figura 15. Mutação no gene *ncsA* não tem influência na virulência *A. fumigatus*. A virulência foi determinada em camundongos pelo modelo murino de baixa dose para aspergilose invasiva. Fêmeas de camundongos foram infectadas com 25µL de suspensão de conidiósporos na concentração de 3 x 10^4 das linhagens selvagem, Δ*ncsA* e a linhagem reconstituída (Δ*ncsA::ncsA*$^+$) de *A. fumigatus*. Os camundongos foram imunossuprimidos e testados em bando de 10 em ambientes estéreis e arejados. A sobrevivência foi monitorada num período de 14 dias e os animais remanescentes foram sacrificados.

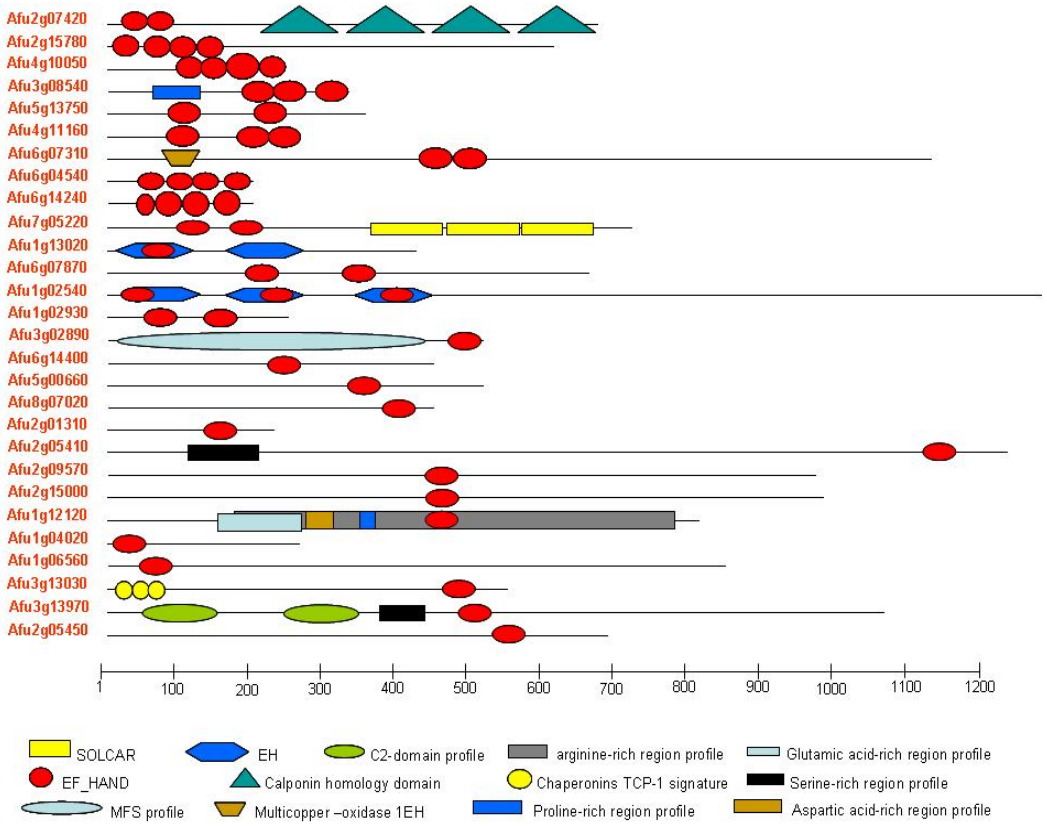

Figura 16. Genes codificantes de proteínas com domínio EF-hands em *A. fumigatus.*

5-DISCUSSÃO

5- DISCUSSÃO

Os membros da família NCS estão entre as proteínas ligantes de cálcio mais expressas em neurônios e estão envolvidos com a modulação da transmissão, bem como na plasticidade sináptica (McFERRAN et al, 1998; CHEN et al, 2002; SIPPY et al, 2003). A proteína NCS-1 foi descoberta originalmente em *Drosophila melanogaster* e denominada frequenina, mais tarde foi designada como NCS-1 devido ao fato de ser expressa em grandes quantidades em neurônios. Entretanto, estudos posteriores revelaram que ela está amplamente presente entre as espécies, inclusive o ortólogo em *S. cerevisiae*, com 60% de identidade, que é essencial para a sobrevivência deste organismo (HENDRICKS et al, 1999). A proteína NCS-1 humana possui 65 % de identidade (e-value= 6e-64) com a proteína ortóloga de *A. fumigatus* em questão neste trabalho.

As proteínas Ncs possuem quatro domínios EF-hands, todavia apenas três ou dois podem se ligar ao cálcio (BURGOYNE, 2007). Algumas proteínas Ncs são N-terminal miristioladas, o que as permitem se tornar associadas à membrana (BURGOYNE, 2001). As funções biológicas dos membros dessa família de proteínas não são bem conhecidas, entretanto os dados disponíveis sugerem funções que variam desde o papel na localização do mRNA a apoptose, e ainda no tráfego intracelular (MERCER et al, 2000; HILFIKER, 2003).

Os homólogos Ncs apresentam considerável divergência entre os ramos das distribuições filogenéticas (Figura 1), todavia existem somente três homólogos fúngicos caracterizados atualmente. Hendricks et al. (1999) reportou que em *S. cerevisiae* o homólogo Ncs, Frq1p, é uma proteina essencial, se liga a cálcio e é N-miristoilada. Saitoh et al. (2003) avaliou o fenótipo do mutante nulo do gene Ncs-1/frequenina-like *Mg-NCS-1*, de *Magnaporthe grisea,* e revelou que o mutante nulo tem crescimento normal e patogenia similar a provocada pela linhagem parental, entretanto o crescimento foi suprimido na presença de alta concentrações de cálcio e condições

ácidas. O homólogo Ncs de *S. pombe*, Ncs1p, se liga a cálcio e também é N-miristiolado (HAMASAKI-KATAGIRI et al, 2004). O mutante deletado apresentou dois distintos fenótipos: crescimento defectivo na presença de altos níveis de cálcio extracelular e desenvolvimento sexual insensível à disponibilidade de nutrientes. Surpreendentemente, a adição de cAMP suprimiu a conjugação e a esporulação nesse mutante, sugerindo o envolvimento do Ncs1p na via da adenilato ciclase acionada pela proteína G acoplada ao receptor Git3p sensível a glicose. Nós identificamos um homólogo NCS de *A. fumigatus*, NcsA. Inúmeras evidências apóiam o pressuposto de que o NcsA é o homólogo de NCS: (i) a análise recíproca de BLAST tanto para humano quanto para *S. cerevisiae* NCS1/FRQ1, ou outras proteinas homólogas NCS, que consistentemente se identificam com a única proteína de *A fumigatus* codificada pela ORF Afu6g14240; (ii) o fato da linhagem *ΔncsA* apresentar fenótipo diferencial relacionado ao metabolismo do cálcio, fato observado pelo desafio de crescimento dessa linhagem em presença de altas concentrações de cálcio, onde se mostrou mais resistente e de maneira inversa, mais sensível em pequena concentração de cálcio (EGTA 25mM). Esses resultados evidenciam o envolvimento do NcsA no metabolismo do cálcio. Não foi abordado neste trabalho se NcsA se liga a cálcio ou é N-miristiolada.

A análise de fenótipos revelou que em *A fumigatus* a distribuição de esterol na extremidade da hifa e o crescimento polarizado são dependentes de NcsA, bem como foi observado a diminuição dos níveis de expressão de mRNA de genes modulados por cálcio. Esses resultado contrastam com a análise fenotípica dos homólogos NCS em *M. grisea e S. pombe* que se apresentaram cálcio sensíveis ao invés de cálcio resistentes, sugerindo um diferente papel para o NcsA de *A fumigatus* no que tange a regulação ao cálcio.

Foi identificado através da construção da linhagem *NcsA::mRFP* que essa proteína encontra-se distribuída no citoplasma e não muda a localização caso os germinantes sejam expostos a altas concentrações de cálcio. Segundo Bourne et al (2000), proteínas NcsA podem realizar mudança conformacional envolvendo o mecanismo cálcio-miristoil de alteração tridimencional de molécula, como o que acontece com a estrutura da recoverina, onde o grupo miristoil da molécula é internalizado num sítio hidrofóbico quando não ligada a Ca^{++}, e ejetado para o solvente quando ligada, afim de induzir a interação dessa proteína com a bicamada lipídica da membrana (TANAKA *et al*, 1995). Entretanto, estudos sugerem que a presença de grupos N-miristoil na proteína Ncs de levedura não alteram a estrutura independentemente de cálcio, embora ambos fatores, presença de grupo N-miristoil e ligação com Ca^{++}, contribuírem para a associação da proteína NcsA com a membrana (AMES et al 2000). Outros estudos acerca da localização subcelular do NCS indicam que o NCS-1 é tanto citosólico quanto associado à membrana de estruturas perinucleares como o Golgi e *trans*-Golgi (CHEN et al, 2001; O'CALLAGHAN et al, 2002; TAVERNA et al, 2002). Neste trabalho foi observado que, independente da disponibilidade de Ca^{++}, a marcação mRFP::NcsA é distribuida de maneira difusa no citoplasma.

McFerran e colaboradores (1999) mostraram que a proteína NCS também atua no processo de exocitose, porém não regula diretamente a maquinaria envolvida nesse processo. Ao invés disso, provoca mudanças nas concentrações citoplasmáticas de cálcio, o que desencadeia o processo de exocitose pela modulação dos canais de membrana. Em *S. cerevisiae*, a molécula FRQ1 tem como molécula alvo o Pik1, fosfatidilinositol-4-OH quinase, que promove estimulação de sua atividade (HENDRICKS et al, 1999). Todavia, NCS-1 de mamífero também interage e pode estimular a atividade do homólogo PIK1 (HILFIKER, 2003). Foi reportado que PIK1 está localizado no citoplasma e na membrana *trans*-Golgi (WALCH-SOLIMENA and NOVICK,

1999). Além do mais, foi demonstrado que no mutante PIK1 ocorre acumulação de compartimentos do Golgi e defeitos no tráfico de vesículas do Golgi para a membrana plasmática (AUDHYA et al, 2000). Esses dados sugerem que através da estimulação de PIK1, e consequentemente a modulação dos níveis de fosfoinositídios, NCS-1 pode interferir em eventos de tráfego.

Nossos resultados sugerem que NcsA desempenha um papel na organização de domínios de membrana e no estabelecimento da polarização do crescimento da hifa em *A. fumigatus*. O prolongamento apical na extremidade da hifa exige um apropriado suprimento de precursores além de um efetivo mecanismo de remoção de excesso de material através da vias de reciclagem. A via endocítica desempenha um papel chave na aquisição de nutrientes, regulação dos receptores de membrana, dos transportadores e canais de íons, bem como na reciclagem de membrana (PEÑALVA, 2005). Existem evidências sugerindo que o ápice da hifa não é somente um sítio de exocitose, mas também participa em processos de reciclagem de membrana que é mantido na extremidade da hifa (STEINBERG, 2007). A marcação da linhagem *ΔncsA* com FM4-64 revelou uma significante diminuição de vacúolos endossômicos .

A composição de esteróis nas membranas animal e de leveduras influencia na localização polar de proteínas. Os "*lipids rafts"* são domínios ricos em esfingolipídios e esgosterol que se organizam como uma estrutura onde ancoram proteínas de membrana plasmática para mediarem o transporte endocítico para a biosíntese (ALVAREZ et al, 2007). Os "*lipids rafts"* são conhecidos pelo importante papel em processos dinâmicos como endereçamento de proteínas, polirização celular e transdução de sinal (ALVAREZ et al, 2007). Foi observado que a linhagem mutante *ΔncsA* foi mais afetada em termos de estabelecimento da polarização quando promovida a inibição da biosíntese de ergosterol através da HMG-CoA redutase pela lovastatina. Além do

mais, os "*lipids rafts*" – que pode ser visualizados quando conjugados com filipina, um antibiótico polieno- não se encontraram organizados na extremidade da hifa tal como o do tipo selvagem, o que fortemente indica que NcsA influencia a produção de deposição de domínios de esterol na membrana plasmática. Esses resultados sugerem fortemente uma interação entre NcsA e a maquinaria envolvida no Spitzenkörper assim como na reunião do polarissomo, e que essas diferenças refletem o desbalanço no tráfico endocítico e exocítico de vesículas nesta linhagem.

Previamente, foi demonstrado que os genes *pmcA* e *pmcB* são os mais responsivos homólogos transportadoras de cálcio em *A. fumigatus,* dentre os genes transportadores já testados, quanto ao nível de expressão de mRNA por RT-PCR (Soriani et al, 2008). Foi ainda demonstrada a influência do NcsA nos níveis de expressão de mRNA de alguns genes previamente identificados em experimentos de microarrays como mais ou menos expressos. Foi observado que não somente os genes *pmcA* e *pmcB* apresentaram as transcrições comprometidas na ausência do NcsA, porém genes os modulados pelo cálcio também tiveram os níveis de mRNA alterados na linhagem mutante *ΔncsA*. Esses dados refletem a influência de diferentes sensores ou proteína cálcio ligantes na modulação da expressão de genes. Essa dependência também foi observada para tratamento similares realizados com linhagens inativadas dos genes *calA* e *crzA*, o que sugere um certo grau de interação entre NcsA e essas proteínas no que se refere a tolerância a cálcio

No modelo de aspergilose pulmunar em murino a linhagem *ΔncsA* mostrou virulência comparável a apresentada pelo tipo selvagem e a da linhagem complementada. O fato de que NCS-1 ser um gene essencial em *S. cerevisiae* (Hendricks et al, 1999), mas não em *S. pombe*, *M. grisea*, e *A fumigatus* sugerem que existem outras proteínas em adição ao NCS-1 de levedura que colaboram de maneira redundante no sensoriamento nesses organismos. Isto explicaria porque a

linhagem *ΔncsA* de *A. fumigatus* ter mantido a virulência no modelo murino de aspergilose pulmonar. Na verdade foram identificados 34 genes que codificam proteínas com motivos EF-hand em *A fumigatus* (Figura 16). Essas proteínas preditas têm diferentes números de domínios EF-hand (de um a quatro) e 28 delas tem diferentes domínios tais como C2. Além do NcsA foram reconhecidos 8 genes que codificam proteínas preditas (que tem de 1 a 3 domínios EF-hand) que poderiam funcionar como sensores ou proteínas cálcio ligantes. Futuros trabalhos com esses genes auxiliarão a elucidar o papel deles na mediação do cálcio na transdução de sinal em *A fumigatus.*

6-CONCLUSÃO

6-CONCLUSÕES

1- O gene *ncsA* em *A. fumigatus* não é essencial.

2- A linhagem mutante Δ*ncsA* é sensível a alterações nas concentrações exógenas de íons cálcio.

3- O gene *ncsA* em *A. fumigatus* é importante para a distribuição de esteróis de membrana na extremidade da hifa e para o estabelecimento do crescimento polarizado

4- NcsA influencia na expressão de genes envolvidos na resposta ao cálcio.

5- O gene *ncsA* de *A. fumigatus* não influencia na virulência em modelo murino.

3-REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

7-REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALVAREZ FJ, DOUGLAS LM, KONOPKA JBSterol-rich plasma membrane domains in fungi. **Eukaryot Cell.** May;6(5):755-63. Epub Mar 16, 2007.

BERNARD M, MOUYNA I, DUBREUCQ G, DEBEAUPUIS JP, FONTAINE T, VORGIAS C, FUGLSANG C, LATGE JP. Characterization of a cell-wall acid phosphatase (PhoAp) in Aspergillus fumigatus. **Microbiology**. v. 148, n. 9, p. 2819-29, 2002.

BERRIDGE, M. J. Neuronal calcium signalling. **Neuron** n. 21, p. 13–26,1998.

BLASIOLE, B. *et al.* Neuronal calcium sensor-1 gene *ncs-1* is essential for semicircular canal formation in zebrafish inner ear. **J. Neurobiol**. **64**, 285–297, 2005.

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

BOURNE, Y., DANNENBERG, J., POLLMANN, V., MARCHOT, P. & PONGS, O. Immunocytochemical localisation and crystal structure of human frequenin (neuronal calcium sensor 1). **J. Biol. Chem**. **276**, 11949–11955, 2001.

BRAKHAGE, AA & LANGFELDER, K. Menacing mold: the molecular biology of Aspergillus fumigatus. **Annu Rev Microbiol,** v.56, p.433-455, 2002.

BRAUNEWELL K.-H. and GUNDELFINGER E. D. Intracellular neuronal calcium sensor proteins: a family of EF-hand calcium-binding proteins in search of a function. **Cell Tissue Res.** v. 295, p. 1–12, 1999.

Burgoyne RD.Neuronal calcium sensor proteins: generating diversity in neuronal Ca2+ signalling. **Nat Rev Neurosci**. Mar;8(3):182-93, 2007.

BURGOYNE, R. D., O'CALLAGHAN, D. W., HASDEMIR, B., HAYNES, L. P. & TEPIKIN, A. V. Neuronal calcium sensor proteins: multitalented regulators of neuronal function. **Trends Neurosci**. **27**, 203–209, 2004.

CARAFOLI, E. Calcium signaling: a tale for all seasons. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.99, p.1115-1122, 2002.

CARAFOLI, E; SANTELLA, L; BRANCA, D; BRINI, M. Generation, control, and processing of cellular calcium signals. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v.36, p.107-260, 2001.

CATLETT NL, YODER OC, TURGEON BG. Whole-genome analysis of two-component signal transduction genes in fungal pathogens. **Eukaryot Cell**. v.2, n. 6, p. 1151-61, 2003.

CHARLTON-MENYS, V.; DURRINGTON, P. N. Squalene synthase inhibitors: clinical pharmacology and cholesterol-lowering potential. **Drugs**, v. 67, p. 11-16, 2007.

COUKELL, B., CAMERON, A., PERUSINI, S. & SHIM, K. Disruption of the NCS-1/frequenin-related *ncsA* gene in *Dictyostelium discoideum* accelerates development. **Dev. Growth Differ**. **46**, 449–458, 2004.

CUNNINGHAM KW, FINK GR.Ca2+ transport in Saccharomyces cerevisiae. **J Exp Biol**. Nov;196:157-66, 1994.

DENIS, V & CYERT, MS. Internal Ca(2+) release in yeast is triggered by hypertonic shock and mediated by a TRP channel homologue. **J Cell Biol**, v.156, p.29-34, 2002.

DENNING, DW. Invasive Aspergilosis. **Clin Infect Dis**, v.26, p.781-805, 1998.

FELDENTEEIN, J.. Confidence limits on phylogenies: na approach using the bootstrap. Evolution. v. 39, p. 783-791, 1985.

FERREIRA M.E.S., KRESS M.R.V.Z., SAVOLDI M., GOLDMAN M.H.S., H.A¨RTL A., HEINEKAMP T., BRAKHAGE A.A. and GOLDMAN G.H.. The *akuB*KU80 Mutant Deficient for Nonhomologous End Joining Is a Powerful Tool for Analyzing Pathogenicity in *Aspergillus fumigatus.* **Eukaryotic Cell**, Jan, p. 207–211, 2006.

GEHRMANN T, HEILMEYER LM JR.Phosphatidylinositol 4-kinases.**Eur J Biochem**. Apr 15;253(2):357-70, 1998.

GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechan isms with bacterial resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, p. 501-517, 1999.

GIERKE, P. *et al.* Expression analysis of members of the neuronal calcium sensor protein family: combining bioinformatics and Western Blot analysis. **Biochem. Biophys. Res. Comm. 323**, 38–43, 2004.

GOMEZ M, DE CASTRO E, GUARIN E, SASAKURA H, KUHARA A, MORI I, BARTFAI T, BARGMANN CI, NEF P. Ca2+ signaling via the neuronal calcium sensor-1 regulates associative learning and memory in *C. elegans*. **Neuron.** v. 30, n.1, p.241-8, 2001.

HAINES, J. *Aspergillus* in compost: Straw man or fatal flaw. **Biocycle**, v.6, p.32-35, 1995.

HAMASAKI-K.N., MOLCHANOVA T., TAKEDA K., AMES J.B. Fission yeast homologue of neuronal calcium sensor-1 (Ncs1p) regulates sporulation and confers calcium tolerance. **J Biol Chem.** v. 279, n. 13, p. 12744-54, 2004.

HARRIS, S. D.; MOMANY, M. Polarity in filamentous fungi: moving beyond the yeast paradigm. **Fungal Genet. Biol.;** v. 41, p. 391-400, 2004.

HARRIS, S., D. Morphogenesis is coordinated with nuclear division in germinating *Aspergillus nidulans* conidiospores. **Microbiology**, v. 145, p. 2747-2756, 1999.

HAYNES K, HAAS H. Siderophore biosynthesis but not reductive iron assimilation is essential for Aspergillus fumigatus virulence. **J Exp Med.** v. 200, n. 9, p. 1213-9, 2004.

HAYNES, L. P. *et al.* Analysis of the interacting partners of the neuronal calcium-binding proteins L-CaBP1, hippocalcin, NCS-1 and neurocalcin. **Proteomics 6**, 1822–1832 (2006).

HENDRICKS, K. B., WANG, B. Q., SCHNIEDERS, E. A. & THORNER, J. Yeast homologue of neuronal frequenin is a regulator of phosphatidylinositol-4-OH kinase. **Nature Cell Biol**. **1**, 234–241, 1999.

HILFIKER S (2003) Neuronal calcium sensor-1: a multifunctional regulator of secretion. Biochem Soc Trans 31: 828-832

JOHNSON, J. D., SNYDER, C., WALSH, M. & FLYNN, M. Effects of myosin light chain kinase and peptides in Ca2+ exchange with the N- and C-terminal Ca2+ binding sites of calmodulin. **J. Biol. Chem**. **271**, 761–767, 1996.

KABBANI, N., NEGYESSY, L., LIN, R., GOLDMAN-RAKIC, P. & LEVENSON, R. Interaction with the neuronal calcium sensor NCS-1 mediates desensitization of the D2 dopamine receptor. **J. Neurosci**. **22**, 8476–8486, 2002.

KAWAMUKAI M, FERGUSON K, WIGLER M, YOUNG D. Genetic and biochemical analysis of the adenylyl cyclase of Schizosaccharomyces pombe**. Cell Regul.** v. 2, n. 2, p. 155-64, 1991.

KUWAYAMA, H; OBARA, S; MORIO, T; KATOH, M; URUSHIHARA, H; TANAKA, Y. PCR-mediated generation of a gene disruption construct without the use of DNA ligase and plasmid vectors. **Nucleic Acids Res**, v.30, p.E2, 2002.

LIEBMANN B., MUHLEISEN T.W.,. MULLER M, HECHT M., WEIDNER G., BRAUN A., BROCK M., and BRAKHAGE A.A. Deletion of the *Aspergillus fumigatus* lysine biosynthesis gene *lysF* encoding homoaconitase leads to attenuated virulence in a low-dose mouse infection model of invasive aspergillosis. **Arch. Microbiol**. **181:**378–383. 11, 2004.

MALLART A., ANGAUT-PETIT D., BOURRET-POULAIN C. and FERRUS A. Nerve terminal excitability and neuromuscular transmission in *T(X:Y)V7* and *Shaker* mutants of *Drosophila melanogaster*. **J. Neurogenet**. v. 7, p. 75–84, 1991.

MARTIN, S. W.; KONOPKA, J. B. Lipid raft polarization contributes to hyphal growth in *Candida albicans*. **Eukaryotic Cell**, v. 3, p. 675-684, 2004.

MARTONE M.E., EDELMANN V.M., ELLISMAN M.H. and NEF P. Cellular and subcellular distribution of the calcium-binding protein NCS-1 in the central nervous system of the rat. **Cell Tissue Res**. v. 295, p. 395–407, 1999.

MERCER EA, KORHONEN L, SKOGLÖSA Y, OLSSON PA, KUKKONEN JP, LINDHOLM D. NAIP interacts with hippocalcin and protects neurons against calcium-induced cell death

through caspase-3-dependent and -independent pathways. **EMBO J**. Jul 17;19(14):3597-607, 2000.

MOCHIZUKI N, YAMAMOTO M. Reduction in the intracellular cAMP level triggers initiation of sexual development in fission yeast. **Mol Gen Genet.** v. 233, n.1-2, p.17-24, 1992.

MOMANY, M. Polarity in filamentous fungi: establishment, maintenance and new axes. **Curr. Opin. Microbiol.;** v. 5, p. 580-585, 2002.

NAYAK, T.; SZEWCZYK, E.; OAKLEY, C. E.; OSMANI, A.; UKIL, L.; MURRAY, S. L.; HYNES, M. J.; OSMANI, S. A.; OAKLEY, B. R. A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. **Genetics**, v. 172, p. 1557-1566, 2006.

NICHOLLS DG.Intracellular calcium homeostasis. **Br Med Bull.** Oct;42(4):353-8, 1986.

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

OSMANI, S. A.; MAY, G. S.; MORRIS, N. R. Regulation of the mRNA levels of *nim*A, a gene required for the G2-M transitionin *Aspergillus nidulans*. **J. Cell Biol.**, v. 104, p. 1495–1504, 1987.

PATERLINI M., REVILLA V., GRANT A. L. & WISDEN W. Expression of the neuronal calcium sensor protein family in the rat brain. **Neuroscience.** v. 99, p. 205-216, 2000.

PEARSON, C. L.; XU, X.; SHARPLESS, K. E.; HARRIS, S. D. MesA, a novel fungal protein required for the stabilization of polarity axes in *Aspergillus nidulans*. **Mol. Biol. Cell**, v. 15, p. 3658-3672, 2004.

PEDERSEN PL, WILLIAMS N, HULLIHEN J. Mitochondrial ATP synthase: dramatic Mg2+-induced alterations in the structure and function of the F1-ATPase moiety. **Biochemistry**. Dec 29;26(26):8631-7, 1987.

PEÑALVA, M. Tracing the endocytic pathway of *Aspergillus nidulans* with FM4-64. **Fungal Genet. Biol.**, v. 42, p. 963-975, 2005.

PONGS, O. *et al.* Frequenin — A novel calcium-binding protein that modulates synaptic efficacy in the *Drosophila* nervous system. **Neuron 11**, 15–28, 1993.

SAITOH K., AIR T., TERAOKA, T., YAMAGUCHI I., and KAMAKURA T. Targeted gene disruption of the neuronal calcium sensor 1 homologue in rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. **Biosci. Biotechnol. Biochem**. v. 67**,** p. 651-653, 2003.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001.

SARIS, NEL & CARAFOLI, E. A historical review of cellular calcium handling, with emphasis on mitochondria. **Biochemistry (Moscow)**, v.70, p. 187-194, 2005.

SCHRETTL M, BIGNELL E, KRAGL C, JOECHL C, ROGERS T, ARST HN JR, SEMIGHINI, C. P.; MARINS, M.; GOLDMAN, M. H. S.; GOLDMAN, G. H. Quantitative analysis of the relative transcript levels of ABC transporter Atr genes in *Aspergillus nidulans* by real-time reverse transcription-PCR assay. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 1351-1357, 2002.

STRAHL T, GRAFELMANN B, DANNENBERG J, THORNER J, PONGS O.Conservation of regulatory function in calcium-binding proteins: human frequenin (neuronal calcium sensor-1) associates productively with yeast phosphatidylinositol 4-kinase isoform, Pik1.**J Biol Chem**. 2003 Dec 5;278(49):49589-99. Epub Sep 25, 2003.

TAMURA K, DUDLEY J, NEI M & KUMAR S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0**. Molecular Biology and Evolution** 10.1093/molbev/msm092. 2007.

TEKAIA, F & LATGÉ, J. *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? **Cur Opin Microbiol,** v.8, p.1-8, 2005.

THOMPSON JD, GIBSON TJ, PLEWNIAK F, JEANMOUGIN F, HIGGINS DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Dec 15; 25(24): 4876-82. 1997.

TSAI HF, WHEELER MH, CHANG YC, KWON-CHUNG KJ. A developmentally regulated gene cluster involved in conidial pigment biosynthesis in Aspergillus fumigatus. **J Bacteriol**. v. 181, n. 20, p. 6469-77, 1999.

VICENTEFRANQUEIRA R, MORENO MA, LEAL F, CALERA JA. The zrfA and zrfB genes of Aspergillus fumigatus encode the zinc transporter proteins of a zinc uptake system induced in an acid, zinc-depleted environment. **Eukaryot Cell.** v. 4, n. 5, p. 837-48, 2005.

WELTON R. M., and HOFFMAN C. S. Glucose Monitoring in Fission Yeast via the gpa2 Gα, the git5 Gß and the git3 Putative Glucose Receptor **Genetics** v. 156, p. 513-521, 2000.

ZHENG Q, BOBICH JA, VIDUGIRIENE J, MCFADDEN SC, THOMAS F, RODER J, JEROMIN A. Neuronal calcium sensor-1 facilitates neuronal exocytosis through phosphatidylinositol 4-kinase. **J Neurochem.** Feb;92(3):442-51, 2005.

ANEXO A