

SIMONE CRISTINA BORGES BANDEIRA

**IDENTIFICAÇÃO FUNCIONAL E ESTRUTURA GENÔMICA
DE GENES NUCLEARES ASSOCIADOS À ATIVIDADE DA
CITOCROMO C OXIDASE DE *Paracoccidioides brasiliensis***

Tese de doutorado apresentada ao
Instituto De Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências (Microbiologia).

São Paulo

2009

SIMONE CRISTINA BORGES BANDEIRA

**IDENTIFICAÇÃO FUNCIONAL E ESTRUTURA GENÔMICA
DE GENES NUCLEARES ASSOCIADOS À ATIVIDADE DA
CITOCROMO C OXIDASE DE *Paracoccidioides brasiliensis***

Tese de doutorado apresentada ao
Instituto De Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Profa. Marina Pasetto
Nóbrega

São Paulo

2009

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Bandeira, Simone Cristina Borges.

Identificação funcional e estrutura genômica de genes nucleares associados à atividade da citocromo e oxidase de *Paracoccidioides brasiliensis* / Simone Cristina Borges Bandeira. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Maria Pasetto Nóbrega.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Genética Molecular e Genomas.

Versão do título para o inglês: Functional identification and genomic structure of *Paracoccidioides brasiliensis* nuclear genes associated to cytochrome oxidase activity.

Descritores: 1. Microbiologia 2. Fungos 3. *Saccharomyces*
4. Respiração celular 5. Genética Molecular 6. *Paracoccidioides*
I. Nóbrega, Marina Pasetto II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Microbiologia
III. Título.

ICB/SBIB071/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Simone Cristina Borges Bandeira.

Título da Tese: Identificação funcional e estrutura genômica de genes nucleares associados à atividade da citocromo e oxidase de *Paracoccidioides brasiliensis*.

Orientador(a): Maria Pasetto Nóbrega.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 072, referente ao projeto intitulado *“Identificação funcional e estrutura genômica de 20 genes nucleares associados à atividade da citocromo oxidase em paracoccidioides brasiliensis”* sob a responsabilidade de **Simone Cristina Borges Bandeira**, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEP SH - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 28 de setembro de 2004.

Prof. Dra. MARÍLIA C.L. SEELAENDER
Coordenadora da CEEA - ICB/USP

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da CEP SH - ICB/USP

AGRADECIMENTOS

A todos que participaram dos projetos de sequenciamento de ESTs e RSTs do *P. brasiliensis*, portanto, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram.

Agradeço a colaboração da Dra. Maria Sueli S. Felipe e do Dr. Gustavo Goldman pela disponibilização dos clones de ESTs com os quais trabalhei e apresento os resultados neste trabalho.

À Dra. Marina P. Nobrega pela orientação e pela confiança depositada em mim para a realização deste trabalho e também proporcionar as condições adequadas para a realização do mesmo.

Ao professor Dr. Francisco G. Nobrega pela valiosa contribuição, gentileza e disposição sempre que foi solicitado.

À Leila Maria Toffoli, Cynthia L. Le Bourlegat, Priscila M.S.M. Leite, Aline A. Guimara e Adolfo José Mota pelo suporte técnico no sequenciamento e pelo carinho dispensado às minhas amostras e por suas valiosas amizades.

À Dra. Márcia C. Sampaio, amiga e irmãzinha de todas as horas, por toda sua contribuição científica e pessoal que sem dúvidas foram e continuam sendo muito significantes.

À Dra. Cláudia Barbosa Ladeira de Campos, por toda sua contribuição, sem dúvidas fundamentais para a concretização de alguns resultados obtidos aqui e por toda amizade.

À Dra. Flavia V. Moraes, também pela contribuição e amizade.

Às amigas e colaboradoras Aline C. F. Barbosa, Ana Paula Santos e Carla S. Dias pela dedicação dispensadas na realização de parte das rotinas deste trabalho e também por suas amizades.

Aos todos os colegas do LGMG (Mota, Sara, Priscila, que de alguma maneira deu a sua colaboração para a concretização deste trabalho, principalmente à Maria e Maria Alice que sempre estavam dispostas a colaborar.

Também gostaria de agradecer a nossa secretária da Pós-Graduação em Microbiologia da USP, Alice Mitsue Shimabuku por toda delicadeza dispensada sempre que precisei de orientações.

Aos meus pais e ao meu namorado Werner, familiares e amigos que torcem muito por mim e sem dúvida foram a grande razão para nunca pensar em desistir.

A FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

Bandeira Simone Cristina Borges. Identificação funcional e estrutura genômica de genes nucleares associados à atividade da citocromo c oxidase de *Paracoccidioides brasiliensis* [Tese (Doutorado)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

O *Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo patogênico, é o agente etiológico da paracoccidioidomicose, uma micose sistêmica prevalente na América Latina. *P. brasiliensis* é um fungo termodimórfico que vive na forma de micélio em temperatura ambiente (~25 °C) e sob a forma de levedura entre 35 e 37 °C. Por comparação de seqüências e ensaios de complementação heteróloga em mutantes de *S. cerevisiae* identificamos e estudamos 15 novos genes de *P. brasiliensis* envolvidos na expressão do complexo da citocromo c oxidase mitocondrial (COX). Os genes *PbCOX6*, *PbCOX17*, *PbCOX19* e *PbOXAI* são capazes de substituir a função de seus homólogos nos respectivos mutantes de *S. cerevisiae*. Os genes analisados são modulados durante o processo de transição morfológica tanto de micélio para levedura quanto de levedura para micélio evidenciando a importância dos genes relacionados à respiração celular para o estabelecimento da patogenicidade do fungo. Acessamos a estrutura genômica dos genes identificados verificando a presença de introns e evidência de processamento alternativo dos genes. Além da função respiratória os genes *COX11* e *SCO1* de *S. cerevisiae* estão relacionados à função de resistência ao peróxido de hidrogênio e os homólogos de *P. brasiliensis* embora não sejam capazes de complementar funcionalmente a deficiência respiratória são equivalentes aos genes *COX11* e *SCO1* de *S. cerevisiae* na função quanto à resistência ao peróxido. Mostramos que os mutantes *Cox17*, *Cox19* e *Cox23* de *S. cerevisiae* também são em diferentes níveis, sensíveis a peróxido de hidrogênio e que os homólogos de *P. brasiliensis* *PbCOX19* e *PbCOX17* também são capazes de substituir esta função em *S. cerevisiae*. Demonstramos que em *P. brasiliensis* ocorre a produção de compostos bioativos sideróforos, sendo detectado sua secreção em meio de cultura sólido e líquido.

Palavras-chave: Paracoccidioides brasiliensis. Citocromo c Oxidase. Fungos. *Saccharomyces cerevisiae*. Respiração mitocondrial. Sideróforo.

ABSTRACT

Bandeira Simone Cristina Borges. Functional identification and genomic structure of *Paracoccidioides brasiliensis* nuclear genes associated to cytochrome c oxidase activity [Ph.D. Thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

Paracoccidioides brasiliensis is a pathogenic fungus, the aethologic agent of the paracoccidioidomycose, a systemic mycose prevalent in Lantin American. *P. brasiliensis* is a thermodimorphic fungus which lives in the mycelium form at room teperature (~ 25 °C) and in the yeast form between 35 °C e 37 °C. By sequence comparisson and heterologous functional complementation assays in *S. cerevisiae* we were able to identify and study fifteen (15) new *P. brasiliensis* genes involved in the mitochondrial cytochrome c oxidase expression (COX). Of which, *PbCOX6*, *PbCOX17*, *PbCOX19* e *PbOXAI* genes were able to fuctionally replace its homologues in the *S. cerevisiae* null mutant. All *P. brasiliensis* genes analysed have their expression modulated during the morphologic transition from mycelium to yeast as well as from yeast to mycelium. This observation highlighted the importance of the respiration related genes in the fungus pathogenicity stablishment. Genomic structure of the identified genes were acessed confirming introns presence as well as evidenced the alternative splicing occurrence. Besides respiration function, *COX11* and *SCO1* genes from *S. cerevisiae* were related to be involved in the hydrogen peroxide resistance and although *P. brasiliensis* homologues genes are not able to functionally replace its homologues in the respiratory deficiency they are able to restore the resistance to hydrogen peroxide in the *S. cerevisiae* null mutant strains. We showed that *Cox17*, *Cox19* and *Cox23* *S. cerevisiae* mutants are also, at different levels, sensitive to hydrogen peroxide and that *P. brasiliensis* homologues *PbCOX17* and *PbCOX19* are also able to replace this function in *S. cerevisiae*. It was demonstrated that there is bioactive compounds siderofore production in the fungus *P. brasiliensis*, and it was detected siderofore secretion in the solid and liquid culture medium.

Key words: *Paracoccidioides brasiliensis*. Cytochrome c Oxidase. Fungi. *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrial Respiration. Siderofore.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 A Respiração Celular e o Complexo da Citocromo c Oxidase	20
1.2 Genes Envolvidos Na Montagem Do Complexo Da Citocromo C Oxidase mitocondrial	21
1.3 O Fungo <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	24
1.4 A Paracoccidioidomicose	25
1.5 Sequenciamento De ESTs De <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	27
1.5 Sideróferos	29
1.7 A Biosíntese De Sideróferos	30
2 OBJETIVOS	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Linhagens De Leveduras E Bactérias	33
3.2 Meios De Cultura Para Bactéria	35
3.3 Meio de Cultura para Levedura	35
3.4 Oligo-Incidores Utilizados Para Sequenciamento	35
3.5 Reação de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) de Sequenciamento	36
3.6 Sequenciamento	36
3.6.1 Análise dos Cromatogramas de Sequenciamento	37
3.7 Identificação da Fase Aberta de Leitura (“ORF - Open Reading Frame”)	37
3.8 Análises das Sequências das Proteínas de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	37
3.9 Excisão das ORFs	38
3.10 Preparação do Vetor de Expressão	38
3.11 Ligação do Fragmento de DNA ao vetor	39
3.12 Reação de Inserção de Transposon	39
3.13 Preparo de Célula Competente de <i>E.coli</i> pelo método químico	39
3.14 Transformação Bacteriana por choque térmico	40
3.15 Extração de pDNA de Bactéria [método alcalino]	40
3.16 Gel de Agarose para Eletroforese	41
3.17 Transformação de Levedura pelo método de LiOAc	41
3.18 Extração de pDNA de Levedura [modificado por Alex Tzagoloff Columbia University]	42

3.19 Extração de RNA total de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> [método adaptado por Nobrega, M]	43
3.20 Reação de PCR em tempo real (RT-qPCR)	43
3.20.2 Lista de Oligos iniciadores Utilizados Nos Experimentos de PCR em Tempo Real (Real Time - RTqPCR) pela Tecnologia SYBR Green.....	46
3.21 Síntese de cDNA POLI(T) Para Clonagem do mRNA de Gene PbSCO1	49
3.22 Hibridização em Membrana	49
3.23 Extração Alcalina do DNA fosmidial (pCC1DNA) [adaptado por Nóbrega M]50	
3.24 Quebra do DNA fosmidial (pCC1DNA) por Nebulização [adaptado Nóbrega M]	51
3.25 Construção de Biblioteca de DNA fosmidial (pCC1DNA) em Vetor de clonagem pUC18 [Nobrega M et al.].....	52
3.26 Ensaio de Sensibilidade ao Peróxido de Hidrogênio [adaptado por Bandeira S]	52
3.27 Meio Sólido Para Detecção De Siderófero Em <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> [adaptado por Bandeira S]	53
3.28 Meio Líquido Para Detecção De Siderófero Em <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> [adaptado por Bandeira S]	53
4 RESULTADOS	55
4.1 Estudo dos Genes de <i>P. brasiliensis</i>	57
4.2 Resistência à Peróxido de Oxigênio (H₂O₂).....	122
4.4 Expressão Relativa De Genes Nucleares De <i>P. brasiliensis</i> Durante O Período De Transição Morfológica Induzida Pela Mudança Da Temperatura.....	138
5 DISCUSSÃO	159
6 CONCLUSÃO	165
REFERÊNCIAS.....	167

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Cepas de Escherichia coli.....	33
TABELA 2: Linhagens De Saccharomyces cerevisiae.....	34
TABELA 3: Lista de Primers e Probes para PCR em Tempo Real (RTqPCR) pela Tecnologia TaqMan	45
TABELA 4: Genes de <i>P. brasiliensis</i> Completos com Sequências Depositadas No GenBank/NCBI.....	56
TABELA 5: Distribuição de íntrons dos genes estudados no isolados Pb01, Pb03 e Pb18 de <i>P. brasiliensis</i>.....	131

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Alinhamento da <i>PbCox5Ap</i> de <i>P. brasiliensis</i> (Pb) com as proteínas homólogas.....	59
FIGURA 2: Vetores de expressão em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	60
FIGURA 3: Análise de resíduos característicos de hélices de transmembrana na <i>PbCox5Ap</i>	61
FIGURA 4: Complementação funcional heteróloga do gene <i>PbCOX6</i> no mutante de <i>S. cerevisiae</i>	63
FIGURA 5: Alinhamento da <i>PbCox6p</i> de <i>P. brasiliensis</i> (Pb) com as proteínas homólogas.....	64
FIGURA 6: Análise de resíduos característicos de hélices de transmembrana na <i>PbCox6p</i>	65
FIGURA 7: Análise da seqüência consenso da RST-VP1-Pb30003-012G11.	66
FIGURA 8: Análise de resíduos característicos de hélices de transmembrana na <i>PbCox8p</i>	67
FIGURA 9: Múltiplo alinhamento das seqüências das proteínas <i>Cox8p</i> de do isolado Pb18 com as homólogas.	69
FIGURA 10: Análise da seqüência consenso da RST-RC2-Pb30004-018D01.	70
FIGURA 11: Análise de resíduos característicos de hélices de transmembrana na <i>PbCox11p</i>	72
FIGURA 12: Alinhamento da <i>PbCox11p</i> de <i>P. brasiliensis</i> (Pb) com as proteínas homólogas.....	74
FIGURA 13: Alinhamento da <i>PbCox13p</i> de <i>P. brasiliensis</i> (Pb) com as proteínas homólogas.....	75
FIGURA 14A: Análise de resíduos característicos de hélices de transmembrana na <i>PbCox13p</i>	76
FIGURA 15: Alinhamento da <i>PbCox15p</i> de <i>P. brasiliensis</i> (Pb) com as proteínas homólogas.....	80
FIGURA 16A: Análise de resíduos característicos de hélices transmembrana na <i>PbCox15p</i>	81
FIGURA 17- Complementação Funcional da <i>PbCox17p</i>	84
FIGURA 18: Alinhamento da <i>PbCox17p</i> de <i>P. brasiliensis</i> (Pb) com as proteínas homólogas.....	84
FIGURA 19: Complementação Funcional da <i>PbCox19p</i>	87
FIGURA 20: Alinhamento da <i>PbCox19p</i> de <i>P. brasiliensis</i> (Pb) com as proteínas homólogas.....	87

FIGURA 21: Comparação entre a PbCox23p e a seqüência da proteína ScCox23...	89
FIGURA 22: Alinhamento da <i>Cox23p</i> de <i>P. brasiliensis</i> (Pb) com as proteínas homólogas.....	89
FIGURA 23: Comparação das seqüências das ESTs RC2-Pb30001-125H07-Pb18 e EST002126-Pb01.....	92
FIGURA 24: Comparação das seqüências das ESTs RC2-Pb30001-125H07-Pb18 e EST002126-Pb01	93
FIGURA 25: Alinhamento das proteínas <i>PbPet100</i> dos dois isolados (Pb01 e Pb18) de <i>P. brasiliensis</i>	94
FIGURA 26A: Análise de resíduos característicos de hélices transmembrana na <i>PbPet100p</i>.	95
FIGURA 27: Alinhamento por BLASTp da ORF referente a proteína <i>Pet112p</i> de <i>P. brasiliensis</i>.	97
FIGURA 28: Alinhamento da <i>PbPet112p</i> de <i>P. brasiliensis</i> (Pb) com as proteínas homólogas (continua).....	99
FIGURA 28: Alinhamento da <i>PbPet112p</i> de <i>P. brasiliensis</i> (Pb) com as proteínas homólogas (continuação).	100
FIGURA 29: Análise da seqüência consenso do inserto da construção pMGL3/PbPET191.	102
FIGURA 30: Múltiplo alinhamento das seqüências das proteínas <i>Pet191p</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>.....	103
FIGURA 31: Alinhamento da <i>Mss51p</i> de <i>P. brasiliensis</i> (Pb) com as proteínas homólogas.....	106
FIGURA 31: Alinhamento da <i>Mss51p</i> de <i>P. brasiliensis</i> (Pb) com as proteínas homólogas.....	107
FIGURA 32: Comparação das ORFs do Clones EST003371, EST001174 e RST-VP1-Pb00003-038F06.....	108
FIGURA 33: Análise da seqüência consenso do clone 5'RACE-PbSCO1.	109
FIGURA 34: Seqüência consenso da RST-VP1-Pb00003-038F06 do gene <i>PbSCO1</i> de <i>P. brasiliensis</i>.	110
FIGURA 35: Análise de resíduos característicos de hélices transmembrana na <i>PbScolp</i>.	112
FIGURA 36: Alinhamento da <i>Scolp</i> de <i>P. brasiliensis</i> (Pb) com as proteínas homólogas.....	113
FIGURA 37: Alinhamento por BLASTp ORF da proteína <i>PbOxa1p</i>.....	116
FIGURA 38- Complementação funcional da proteína <i>PbOxa1</i>.....	117

FIGURA 39: Alinhamento da proteína <i>Oxa1p</i> de <i>P. brasiliensis</i> (Pb) com as proteínas homólogas.	118
FIGURA 40A: Análise de resíduos característicos de hélices transmembrana na proteína <i>Oxa1p</i> de <i>S. cerevisiae</i>.	121
FIGURA 41A: Teste à sensibilidade por peróxido de hidrogênio.	124
FIGURA 41B: Sensibilidade por peróxido de hidrogênio.	124
FIGURA 42: Hipersensibilidade do mutante <i>aW303Δsco1</i> ao peróxido de hidrogênio.	125
FIGURA 43: Sensibilidade dos mutantes <i>aW303Δcox17</i> e <i>aW303Δcox19</i> e <i>BY4741Δcox23</i>	126
FIGURA 44: A resistência ao peróxido de hidrogênio é restabelecida pelos homólogos de <i>P. brasiliensis</i>.	127
FIGURA 45: Fragmentos utilizados com sonda de hibridização.	129
FIGURA 46: A-L: Identificação dos clones da biblioteca genômica (Fosmid) de <i>P. brasiliensis</i>.	130
FIGURA 47: <i>PbCox23p</i> predita no genoma do isolado Pb18.	135
FIGURA 48: Expressão do gene <i>PbCOX2</i> durante a transição morfológica de <i>P. brasiliensis</i>.	141
FIGURA 49: Expressão do gene <i>PbCOX4</i> durante a transição morfológica de <i>P. brasiliensis</i>.	142
FIGURA 50: Expressão do gene <i>PbCOX5A</i> durante a transição morfológica de <i>P. brasiliensis</i>.	142
FIGURA 51: Expressão do gene <i>PbCOX6</i> durante a transição morfológica de <i>P. brasiliensis</i>.	143
FIGURA 52: Expressão do gene <i>PbCOX8</i> durante a transição morfológica de <i>P. brasiliensis</i>.	143
FIGURA 53: Expressão do gene <i>PbCOX9</i> durante a transição morfológica de <i>P. brasiliensis</i>.	144
FIGURA 54: Expressão do gene <i>PbCOX11</i> durante a transição morfológica de <i>P. brasiliensis</i>.	144
FIGURA 55: Expressão do gene <i>PbCOX12</i> durante a transição morfológica de <i>P. brasiliensis</i>.	145
FIGURA 56: Expressão do gene <i>PbCOX13</i> durante a transição morfológica de <i>P. brasiliensis</i>.	145
FIGURA 57: Expressão do gene <i>PbCOX15</i> durante a transição morfológica de <i>P. brasiliensis</i>.	146

FIGURA 58: Expressão do gene <i>PbCOX16</i> durante a transição morfológica de <i>P. brasiliensis</i>	146
FIGURA 59: Expressão do gene <i>PbCOX11</i> durante a transição morfológica de <i>P. brasiliensis</i>	147
FIGURA 60: Expressão do gene <i>PbCOX19</i> durante a transição morfológica de <i>P. brasiliensis</i>	147
FIGURA 61: Expressão do gene <i>PbCOX11</i> durante a transição morfológica de <i>P. brasiliensis</i>	148
FIGURA 62: Expressão do gene <i>PbOXAI</i> durante a transição morfológica de <i>P. brasiliensis</i>	148
FIGURA 63: Expressão do gene <i>PbPET100</i> durante a transição morfológica de <i>P. brasiliensis</i>	149
FIGURA 64: Expressão do gene <i>PbPET112</i> durante a transição morfológica de <i>P. brasiliensis</i>	149
FIGURA 65: Expressão do gene <i>PbMSS51</i> durante a transição morfológica de <i>P. brasiliensis</i>	150
FIGURA 66: Expressão do gene <i>PbSCO1</i> durante a transição morfológica de <i>P. brasiliensis</i>	150
FIGURA 67: Expressão do gene <i>PbNDII</i> durante a transição morfológica de <i>P. brasiliensis</i>	151
FIGURA 68: Expressão do gene <i>PbRIP1</i> durante a transição morfológica de <i>P. brasiliensis</i>	151
FIGURA 69: Expressão do gene <i>PbQCR7</i> durante a transição morfológica de <i>P. brasiliensis</i>	152
FIGURA 70: Expressão do gene <i>PbATP4</i> durante a transição morfológica de <i>P. brasiliensis</i>	152
FIGURA 71: Expressão do gene <i>PbATP7</i> durante a transição morfológica de <i>P. brasiliensis</i>	153
FIGURA 73: Detecção da produção de sideróferos em cinco isolados de <i>P. brasiliensis</i>	155
FIGURA 74: Alinhamento por BLASTp da proteína L-ornithine-N5-oxygenase de <i>P. brasiliensis</i>	157

LISTA DE ABREVIATURAS

Δ	deleção parcial ou total de um gene específico
ρ^-	linhagem de levedura como deleção parcial do mtDNA
ρ^0	linhagem de levedura como deleção total do mtDNA
μg	micrograma
μL	microlitro
“Null mutant”	mutante por deleção parcial ou total de um gene
aa.	aminoácidos
Å	ângstroms (0,1 mM)
ADP	adenosina difosfato
ATP	adenosina trifosfato
<i>ADH1</i>	Gene que codifica para a enzima álcool desidrogenase em leveduras
CaCl ₂	cloreto de cálcio
cDNA	DNA complementar
Chr	cromossomo
DMSO	dimetilsulfoxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTPs	deoxinucleotídeos trifosfatos para as quatro bases de DNA
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
EG	meio de cultura contendo etanol e glicerol como fontes de carbono
EST	“Expressed Sequence Tag”
H ₂ O _{dd}	água destilada e deionizada
HCl	ácido clorídrico
hCOX16	Gene <i>COX16</i> humano (<i>Homo sapiens</i>)
Hsp	“Heat Shock Protein”
Kb	kilobase
LA	meio de cultura de Luria e Bertani com Ampicilina
LB	meio de cultura de Luria e Bertani
M	molar
Mb	Megabase
mg	miligrama
MgSO ₄	sulfato de magnésio
mL	mililitro
mM	milimolar
mRNA	RNA-mensageiro
mtDNA	DNA mitocondrial
NaCl	cloreto de sódio
NaOAc	acetato de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NH ₄ OAc	acetato de amônia
ORF	fase aberta de leitura (“open reading frame”)
Pb	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
pb	pares de base
<i>PbCOX2</i>	Gene <i>COX2</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>PbCOX4</i>	Gene <i>COX4</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>

<i>PbCox4p</i>	Proteína <i>Cox4</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>ScCOX4</i>	Gene <i>COX4</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>ScCox4p</i>	Proteína <i>Cox4</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>PbCOX5A</i>	Gene <i>COX5A</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>PbCox5p</i>	Proteína <i>Cox4A</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>ScCOX5A</i>	Gene <i>COX5A</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>ScCox5p</i>	Proteína <i>Cox4A</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>PbCOX6</i>	Gene <i>COX6</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>PbCox6p</i>	Proteína <i>Cox6</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>ScCOX6</i>	Gene <i>COX6</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>ScCox6p</i>	Proteína <i>Cox6</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>PbCOX8</i>	Gene <i>COX8</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>PbCox8p</i>	Proteína <i>Cox8</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>ScCOX8</i>	Gene <i>COX8</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>ScCox8p</i>	Proteína <i>Cox8</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>PbCOX9</i>	Gene <i>COX9</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>PbCox9p</i>	Proteína <i>Cox9</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>ScCOX9</i>	Gene <i>COX9</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>ScCox9p</i>	Proteína <i>Cox9</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>PbCOX11</i>	Gene <i>COX11</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>PbCox11p</i>	Proteína <i>Cox11</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>ScCOX11</i>	Gene <i>COX11</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>ScCox11p</i>	Proteína <i>Cox11</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>PbCOX12</i>	Gene <i>COX12</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>PbCox12p</i>	Proteína <i>Cox12</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>ScCOX12</i>	Gene <i>COX12</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>ScCox12p</i>	Proteína <i>Cox12</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>PbCOX13</i>	Gene <i>COX13</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>PbCox13p</i>	Proteína <i>Cox13</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>ScCOX13</i>	Gene <i>COX13</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>ScCox13p</i>	Proteína <i>Cox13</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>PbCOX15</i>	Gene <i>COX15</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>PbCox15p</i>	Proteína <i>Cox15</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>ScCOX15</i>	Gene <i>COX15</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>ScCox15p</i>	Proteína <i>Cox15</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>PbCOX16</i>	Gene <i>COX16</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>PbCox16p</i>	Proteína <i>Cox16</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>ScCOX16</i>	Gene <i>COX16</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>ScCox16p</i>	Proteína <i>Cox16</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>PbCOX17</i>	Gene <i>COX17</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>PbCox17p</i>	Proteína <i>Cox17</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>ScCOX17</i>	Gene <i>COX17</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>ScCox17p</i>	Proteína <i>Cox17</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>PbCOX19</i>	Gene <i>COX19</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>PbCox19p</i>	Proteína <i>Cox19</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>ScCOX19</i>	Gene <i>COX19</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>ScCox19p</i>	Proteína <i>Cox19</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>PbCOX23</i>	Gene <i>COX23</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>PbCox23p</i>	Proteína <i>Cox23</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>ScCOX23</i>	Gene <i>COX23</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

<i>ScCox23p</i>	Proteína <i>Cox23</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>PbPET100</i>	Gene <i>PET100</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>PbPet100p</i>	Proteína <i>Pet100</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>ScPET100</i>	Gene <i>PET100</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>ScPet100p</i>	Proteína <i>Pet100</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>PbPET112</i>	Gene <i>PET112</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>PbPet112p</i>	Proteína <i>Pet112</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>ScPET112</i>	Gene <i>PET112</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>ScPet112p</i>	Proteína <i>Pet112</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>PbPET191</i>	Gene <i>PET191</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>PbPet191p</i>	Proteína <i>Pet191</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>ScPET191</i>	Gene <i>PET191</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>ScPet191p</i>	Proteína <i>Pet191</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>PbOXA1</i>	Gene <i>OXA1</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>PbOxa1p</i>	Proteína <i>Oxa1</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>ScOXA1</i>	Gene <i>OXA1</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>ScOxa1p</i>	Proteína <i>Oxa1</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>PbMSS51</i>	Gene <i>MSS51</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>PbMss51p</i>	Proteína <i>Mss51</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>ScMSS51</i>	Gene <i>MSS51</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>ScMss51p</i>	Proteína <i>Mss51</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>PbSCO1</i>	Gene <i>SCO1</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>PbSco1p</i>	Proteína <i>Sco1</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>ScSCO1</i>	Gene <i>SCO1</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>ScSco1p</i>	Proteína <i>Sco1</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>PbATP4</i>	Gene <i>ATP4</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>PbATP7</i>	Gene <i>ATP7</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>PbQCR7</i>	Gene <i>QCR7</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>PbRIP1</i>	Gene <i>RIP1</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>PbNDII</i>	Gene <i>NDII</i> de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PCR	reação de polimerização em cadeia da DNApolimerase
pDNA	DNA plasmidial
PEG	polietileno glicol
PET	Classe de genes nucleares de leveduras que condificam para alguma das subunidades dos complexos da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial.
Pet	Mutantes de genes nucleares de leveduras que condificam para alguma das subunidades dos complexos da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial.
RNA	ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
RST	“Random Sequence Tag”
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	dodecil sulfato de sódio
TBE	Tampão de Tris borato EDTA
TE	Tris-Cl e EDTA
Tris	tris hidroximetil – aminometano
UV	luz ultravioleta
V	volts
v/v	volume/volume

w/v	peso/volume
WO	meio mínimo para cultura seletiva de linhagem sem aminoácidos
X-gal	5-Bromo-4-cloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside
LiOAc	Acetato de lítio

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Respiração Celular e o Complexo da Citocromo c Oxidase

Em eucariotos a produção da maior parte de energia consiste na oxidação de moléculas NADH e FADH₂ geradas a partir das reações de metabolismo dos nutrientes ingeridos. A oxidação de NADH e FADH₂ ocorre na cadeia transportadora de elétrons localizada na membrana interna da mitocôndria. A cadeia transportadora de elétrons mitocondrial é constituída por quatro complexos enzimáticos distintos, o complexo da NADH-Coenzima Q-reductase (complexo I), da Succinato-Coenzima Q reductase (complexo II), da ubiquinol citocromo c reductase (complexo III) e da citocromo c oxidase (complexo IV), além do complexo da ATP-sintase. Parte da energia gerada no processo de oxidação das moléculas de NADH e FADH₂ é utilizada para o bombeamento de prótons (H⁺) da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar durante a transferência de elétrons na cadeia respiratória. Através desses complexos, a mitocôndria exerce sua principal função que é a produção da energia utilizada pelas células via respiração aeróbica, processo este denominado fosforilação oxidativa (Hatefi, 1985).

A citocromo c oxidase é o complexo terminal da cadeia transportadora de elétrons em eucariotos. Este complexo que é formado por onze subunidades estruturais em *S. cerevisiae*, atua na transferência de elétrons do citocromo c para o oxigênio molecular reduzindo-o para a formação de moléculas de água. Esta função central na produção de energia celular faz da citocromo c oxidase um componente de fundamental importância para os organismos aeróbicos (Herrmann e Funes 2005).

Com a estrutura tridimensional de raios-X da citocromo c oxidase bovina definida ao nível de 2,8Å de resolução por Tsukihara et al. em 1995 foi possível identificar os sítios de ligação dos metais que atuam como cofatores neste complexo, bem como as subunidades associadas a estes íons e o mecanismo de transporte dos elétrons. São encontrados dois centros detentores de íons cobre na citocromo c oxidase. Um na subunidade II, chamado centro binuclear CuA, que requer dois átomos de cobre e é o primeiro acceptor de elétrons do citocromo c e o outro está associado à subunidade I, chamado centro de CuB.

Os elétrons provenientes do centro binuclear CuA são transferidos para o grupo heme do citocromo a, que então os entrega ao grupo heme do citocromo a₃. Os elétrons do grupo heme a₃ são doados ao centro de cobre CuB onde são utilizados na redução do oxigênio molecular para a formação da molécula de água (Michel et al., 1998; Tsukihara et al., 1996).

1.2 Genes Envolvidos Na Montagem Do Complexo Da Citocromo C Oxidase mitocondrial

A biogênese do complexo da citocromo c oxidase mitocondrial é um dos processos mais elegantes e sofisticados já visto em biologia molecular. A complexidade reside no fato de que a expressão da citocromo c oxidase depende da expressão coordenada de genes nucleares e mitocondriais. A grande massa de conhecimentos obtidos sobre a biogênese deste complexo vem dos estudos em levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Neste organismo este complexo é composto por onze subunidades estruturais. As três maiores subunidades (*Cox1p*, *Cox2p* e *Cox3p*) que formam o centro catalítico da enzima, são codificados pelo DNA mitocondrial (mtDNA) e processadas dentro da organela. As oito subunidades estruturais restantes são codificadas no genoma nuclear, traduzidas no citoplasma e importadas para a mitocôndria (Taanman e Capaldi, 1992; Glerum et al., 1995). Apenas duas das onze subunidades estruturais (*Cox1p* e *Cox2p*) estão ligadas aos grupos prostéticos hemes a e heme a₃ e aos centros de cobre (CuA) e (CuB) que participam da transferência de elétrons do citocromo c reduzido para a molécula de oxigênio (Tzagoloff et al., 1974). Outros íons como zinco, magnésio e sódio também são encontrados na citocromo c oxidase entretanto, ainda quase não existem dados sobre as funções destes íons no complexo.

Além das subunidades estruturais outras dezenas de produtos gênicos nucleares são necessárias para a biogênese funcional do complexo (McEwen et al., 1986; Tzagoloff et al., 1986; Tzagoloff e Dieckmann, 1990; Barrientos et al., 2002). Estas proteínas acessórias estão atuando na estabilização dos transcritos e das subunidades recém sintetizadas, regulação da expressão, integração na membrana interna mitocondrial e interações físicas entre as subunidades estruturais e com outros complexos (Herrmann e Funes 2005), muitas outras ainda são necessária para a entrega, formação e inserção dos cofatores como os íons metálicos.

Entre as subunidades **nucleares estruturais** do complexo da COX em *S. cerevisiae* está o gene **COX4** que codifica para a subunidade IV (Poyton e Schatz, 1975; Maarse et al., 1984; Dowhan et al., 1985). *Cox4p* é essencial para o funcionamento do complexo desde que células mutantes não completam a montagem do complexo funcional. Esta proteína atua com ligante de zinco e é a única subunidade contendo cofator (está ligada a um único íon de Zn(II) através de quatro resíduos de cisteína) que não faz parte do corpo catalítico da enzima. A

função biológica na ligação de zinco com esta subunidade do complexo da COX ainda não foi elucidada (Coyne 3rd et al., 2007).

O gene *COX5A* (Waterland et al., 1991; Koemer et al., 1985) e o gene *COX5B* que codificam para duas formas distintas de subunidade V de citocromo c oxidase, as subunidades *Cox5a* e *Cox5b*, respectivamente. O nível da taxa de respiração em células carregando alelos nulos de *cox5a* ou *cox5b* ou ambos indica que de alguma forma a subunidade V é necessária para a atividade citocromo c oxidase e que a função de *Cox5a* é muito mais eficaz do que *Cox5b* (Trueblood e Poyton, 1987).

O gene *COX6* para a subunidade VI (Wright et al., 1984; Wright et al., 1989; Grant et al., 1997), *COX13* para a subunidade VIa (Taanman e Capaldi, 1993; Beauvoit et al., 1999) e *COX12* para a subunidade VIb (Lamarche et al., 1992). O gene *COX7* codificando para a subunidade VII (Aggeler e Capaldi, 1990; Nobrega et al., 1998) e o gene *COX9* para a subunidade VIIa (Wright et al., 1986) e o gene *COX8* que codifica para a subunidade VIII (Patterson e Poyton, 1986).

Entre as **proteínas acessórias** codificadas pelos genes nucleares, que atuam na montagem do complexo da citocromo c oxidase funcional está a *Cox10p* que é uma farnesiltransferase que adiciona o radical farnesil ao grupo prostético heme A (Nobrega, 1990; Glerum e Tzagoloff et al., 1994). A *Cox11p* que insere os íons de cobre (CuB) e magnésio durante a montagem do complexo da COX (Tzagoloff et al., 1990; Tzagoloff et al., 1993, Pungartnik et al., 1999). A *Cox14p* que foi recentemente identificada e caracterizada (Glerum et al., 1995) tendo sido comprovado a sua interação com a proteína *Mss51p* para garantir a estabilidade da proteína *Cox1p* (Barrientos et al., 2004). A *Cox15p* que faz a hidroxilação do grupo prostético heme O, uma etapa intermediária na via de síntese do heme A (Glerum et al., 1997; Barros et al., 2002). A *Cox16p* (Carlson et al., 2003) com função ainda não definida.

Já a gene *Cox17p* é uma metalchaperona envolvida no transporte de íons Cu para dentro da mitocôndria (Glerum et al., 1996; Beers et al., 1997; Amaravadi et al., 1997; Maxfield et al., 2004). A proteína *Cox18p* que interage com as proteínas *Pnt1p* (He e Fox, 1999; Souza et al., 2000; Saracco e Fox, 2002; Ludewig e Staben, 1994) e *Mss2p* (Simon et al., 1995; Saracco e Fox, 2002; Broadley et al., 2001) para exportar a porção carboxi terminal da subunidade *Cox2p* da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar (Souza et al., 2000; Saracco et Fox. 2002). Também já identificada e caracterizada a proteína *Cox19p* (Nobrega, M et al., 2002) que apresenta consistente evidencias de ser homóloga a proteína *Cox17p*. A *Cox20p* uma chaperona específica que atua no processamento e montagem da subunidade *Cox2p* no complexo da citocromo c oxidase (Hell et al., 2000). A *Cox23p* (Barros

et al., 2004) também homóloga da *Cox17p* (Barros et al., 2004). A proteína *Cox24p* atuando no processamento do gene *COX1* (Barros et al., 2006). A proteína *Mrs1p* ou *Pet157p* (Johnson e McEwen, 1997) também envolvida no processamento de introns do gene *COX1* e neste processo tem se conhecimento do envolvimento do produto de mais três genes nucleares *PET54* (Costanzo et al., 1986a; Costanzo et al., 1989; Valencik et al., 1989), *SUV3* ou *LPB2* (Conrad-Webb et al., 1990) e *MSS18* (Seraphin et al., 1988). A *Mss1p* ou *Pet53* que é uma GTPase que também age no processamento dos introns do gene *COX1* (Decoster et al., 1993; Colby et al., 1998). Enquanto a proteína *Mrs2p* atua no transporte de magnésio para mitocôndria similar ao gene *CorA* de bactéria e também é essencial no processamento de introns mitocondriais (Weisenberger et al., 1992; Zsurka et al., 2001). A proteína *Mss51p* que é uma proteína requerida para a regulação da expressão, tradução e maturação do mRNA do gene *COX1*. Além de promover a síntese da proteína *Cox1p* mitocondrial, a proteína *Mss51p* também interage com a subunidade recém sintetizada (Decoster et al., 1990; Faye e Simon, 1983; Barrientos et al., 2002; Perez-Martinez et al., 2003; Barrientos et al., 2004). A proteína *Mss116p*, uma helicase envolvida no processamento de introns dos genes apocitocromo b e *COX1* (Niemer et al., 1995; Minczuk et al., 2002). Já a *Nam1p* ou *Mtf2p* está envolvida no processamento dos mRNAs dos genes *COB/COX1* e *ATP6* (Rodeheffer et al., 2001; Bryan et al., 2002; Rodeheffer et al., 2003) e a proteína *Nam2p* que é uma Leucina tRNA sintetase mitocondrial com função diretamente relacionada ao processamento de introns mitocondriais do grupo I sendo portanto, indiretamente requerida para a estabilidade do genoma mitocondrial (Rho e Martinis, S.A., 2000; Herbert et al., 1988a; 1988b). A proteína *Oxa1p*, uma insertase que atua na exportação de proteínas da matriz para a membrana interna mitocondrial e para o espaço intermembranar (Bonnefoy et al., 1994a; Bonnefoy et al., 1994b; He e Fox, 1997; Sylvestre et al., 2003). A proteína *Pet100p* que é uma chaperonina que faz a inserção do subcomplexo *Cox7p-Cox8p-Cox9p* na holoenzima COX (Church et al., 1996; Forsha et al., 2001; Church et al., 2005). A proteína *Pet111p* atua como ativador específico de expressão da *Cox2p* (Poutre e Fox, 1987; Green-Willms et al., 2001; Naithani et al., 2003). A *Pet112p* envolvida na expressão de genes mitocondriais e é também fundamental na expressão da proteína *Cox2p* (Mulero et al., 1994). Já as proteínas *Pet122p* (Ohmen et al., 1988; Marathe et al., 1999; Costanzo e Fox, 1988; Naithani et al., 2003) e *Pet494p* (Muller e Fox, 1984; Costanzo et al., 1986b; Naithani et al., 2003) agem como ativadores tradicionais do gene *COX3*. As proteínas *Pet117p* e *Pet191p*, que são requeridas na montagem da citocromo c oxidase ativa, porém as funções específicas ainda não foram elucidadas (McEwen et al., 1993). A *Pet309p* que é uma proteína integral da membrana interna mitocondrial que

também é requerida para a expressão da *Cox1p* (Manthey e McEwen, 1995; Manthey et al., 1998; Naithani et al., 2003) assim como a proteína *Shy1p* (Mashkevich et al., 1997; Barrientos et al., 2002). A proteína *Sco1p* ou *Pet161* envolvida no transporte de íons Cu para a COX e que também garante a estabilidade das subunidades *Cox1p* e *Cox2p* (Schulze e Rodel, 1988, 1989; Beers et al., 2002; Paret et al., 1999). A *Sco1p* é homóloga da proteína *Sco2p* codificada pelo gene *SCO2* que inicialmente foi identificado como um supressor de múltipla cópia de mutantes deficientes respiratórios devido à inatividade de *SCO1* (Lode et al., 2002; Maxfield et al., 2004).

Embora muito se saiba sobre os genes envolvidos para manter o complexo citocromo oxidase funcional ainda serão necessários muitos estudos sobre vários destes genes acima descritos, quanto a suas funções específicas e neste processo vários outros novos genes ainda poderão surgir. Um dos principais focos de estudos hoje é como ocorre o controle da expressão dos genes entre organelas distintas (núcleo e mitocôndria) envolvidas numa síntese tão complexa como esta do complexo da citocromo c oxidase mitocondrial.

1.3 O Fungo *Paracoccidioides brasiliensis*

O *Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo termo-dimórfico apresentando-se como micélio em temperatura ambiente (~25 °C) e sob a forma de levedura entre 35 e 37 °C. Este fungo foi observado pela primeira vez em 1908 por Adolfo Lutz. O fungo apresentando um formato celular arredondado se reproduzia por brotamento em cortes de tecidos de pacientes com intensas lesões orofaríngeas. Após o isolamento do fungo Lutz também observou seu crescimento na forma filamentosa em vários meios de cultura à temperatura ambiente (25 °C). Devido a essa natureza dimórfica, Lutz atribuiu o termo Hifoblastomicose para doenças que fossem causadas por este microorganismo. Uma descrição mais detalhada deste fungo e das particularidades clínicas histopatológicas dessa doença foi realizada por Afonso Splendore entre 1909 e 1912, a partir de então o fungo ficou conhecido como uma levedura ascomicotina a qual Splendore chamou de *Zymonema brasiliensis*. Duas décadas depois, Floriano Paulo de Almeida caracterizou mais detalhadamente a doença Paracoccidioidomicose (PCM) bem com o seu agente etiológico conhecido hoje como *Paracoccidioides brasiliensis* (Lacaz et al., 1991).

Atualmente o *Paracoccidioides brasiliensis* é classificado como um eucarioto pertencente ao reino Fungi, ao filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotina, a classe

Eurotiomycetes, da ordem Onygenales, família Onygenales mitospórico, do gênero *Paracoccidioides* e da espécie *Paracoccidioides brasiliensis* (NCBI-GeneBank 121759).

Embora ainda não esteja claramente definido seu habitat natural, acredita-se que o *P. brasiliensis* viva em solos úmidos cobertos por vegetais e ricos em proteínas, cuja temperatura varia de 11 a 30 °C, não ocorrendo na bacia amazônica. O fungo já foi isolado de solo, de cascas de árvores, fezes de morcegos e parasitando tatu (Restrepo, 1985).

Estudos citológicos de marcação fluorescente nuclear indicaram que o genoma deste fungo varia de aproximadamente 23 a 30 Mb e análises do cariótipo por eletroforese sugerem que ele seja constituído por quatro (04) a cinco (05) cromossomos com tamanhos variando entre 2 a 10Mb (Cano et al., 1998; Montoya et al., 1999). Estudos de cariótipo de uma coleção de doze (12) isolados clínicos sugerem que existe isolados haplóides, diplóide (ou aneuploides), multinucleado e com indicação de polimorfismo entre os isolados (Montoya et al., 1999; Feitosa et al., 2003).

1.4 A Paracoccidioidomicose

A contaminação com o *P. brasiliensis* ocorre pela inalação de conídios miceliais encontrados no ambiente e o estabelecimento da doença ocorre quando o fungo se aloja nos pulmões e em temperatura corpórea (37 °C) inicia a transição de micélio para a forma patogênica de levedura (McEwen et al., 1987).

A Paracoccidioidomicose (PCM) é a doença sistêmica crônica restrita à América Latina entretanto, devido aos fluxos migratórios estão sendo encontrados casos em outros continentes (Restrepo e Moreno, 1993). O Brasil, a Argentina, a Venezuela são considerados como áreas endêmicas da PCM sendo que a maior incidência é em trabalhadores rurais do sexo masculino com faixa etária entre 30 e 60 anos. Restrepo (1985) observou através de estudos epidemiológicos que a PCM é encontrada em regiões que possuem invernos curtos e verões chuvosos. A PCM é classificada em duas formas clínicas: **1) Crônica ou do “Tipo Adulto”**, produz manifestações que variam muito, mas geralmente os pulmões são mais afetados, sendo que a boca freqüentemente apresenta lesões. **2) Aguda ou do “Tipo Juvenil”**, com manifestações clínicas mais grave, aparecendo apenas em 4% dos casos, afetando crianças de ambos sexos.

A PCM é uma das mais importantes micoses na América Latina. Aproximadamente dez milhões de pessoas estão infectadas sendo que destas, 2% poderão desenvolver a doença (McEwen et al., 1995). Esta micose tem ganhado maior importância desde que foi reportada

entre pacientes com AIDS na América Latina (Goldani et al., 1995). Os principais fatores para o estabelecimento da PCM parecem estar ligados à idade, o estado emocional, o patrimônio genético e a integridade da resposta imunológica, além das características de virulência da cepa infectante. A patogenicidade da cepa infectante parece estar intimamente ligada à transição morfológica, desde que linhagens do fungo que são incapazes de se transformarem em levedura não são virulentas (Borges-Walmsley et al., 2002; Medoff et al., 1987; Rooney; Klein, 2002; San-Blas e Ninõ-Vega, 2001). A Transição morfológica do *P. brasiliensis* em contraste a outros fungos dimórficos que depende de estímulos complexos, como por exemplo em *C.albicans* (Enerst, 2000), pode ser induzida simplesmente por aumento da temperatura de incubação da cultura de 25 °C para 37 °C, o que destaca este fungo como um excelente modelo para o estudo dos processos fisiológicos que levam à transição dimórfica. Estudos anteriores (Medoff et al., 1987) sugerem que durante a transição morfológica ocorrem alterações fisiológicas mitocondriais como o desacoplamento parcial ou completo da fosforilação oxidativa, ausência ou baixo consumo de oxigênio e inibição da síntese de RNA e proteínas. Entretanto estes estudos não esclarecem se as alterações fisiológicas mitocondriais ocorrem como um efeito ao aumento da temperatura e da transição morfológica ou seriam estas alterações mitocondriais uma das etapas que induziriam a transição. A incidência da PCM na puberdade é igual para ambos os sexo, contudo na vida adulta, 80% dos pacientes são do sexo masculino com estatísticas apontando uma incidência de 13 homens afetados para cada mulher com idade entre 30 e 50 anos em áreas endêmicas (Bru mMer et al., 1993). A principal explicação para estas estatísticas está relacionada ao hormônio estrogênico feminino 17-beta-estradiol (E2) (Restrepo et al., 1984). Experimentos *in vitro* mostraram que o E2 inibe a transição do fungo de micélio para a forma patogênica de levedura (Restrepo et al., 1984; Salazar et al., 1988). *P. brasiliensis* possui uma proteína citosólica com alta especificidade a este hormônio (Loose et al., 1983). Acredita-se, portanto, que o hormônio atue como ligante competidor desta proteína impedindo-a de se ligar ao seu receptor específico de *P. brasiliensis*. Hipóteses sugerem que esta proteína citosólica seja receptora de sinais específicos durante a transição de micélio para levedura, uma vez que o tratamento do fungo como altas doses de 17-beta-estradiol não apresentam efeitos na formação de brotos na fase leveduriforme e apenas leves efeitos na transição da forma de levedura para micélio (Restrepo et al., 1984).

1.5 Sequenciamento De ESTs De *Paracoccidioides brasiliensis*

O sequenciamento de etiquetas de genes expressos (ESTs) deste fungo teve início em 2001 com o consórcio paulista formado por grupos de pesquisadores das seguintes Universidades: USP/Ribeirão; UNIFESP; UMC e UNIVAP. A estratégia deste consórcio foi construir bibliotecas de ESTs das fases micelial e leveduriforme de *P. brasiliensis* em vetor pCMV.SPORT6, sendo sequenciado os insertos dos clones por ambas as extremidades. Em paralelo um outro consórcio, da região central do Brasil, também construiu suas bibliotecas em vetor lambda (λ)-ZapII. Os resultados obtidos foram 13.490 sequências de ESTs depositadas no GenBank do NCBI (Glodman et al., 2003) pelo consórcio paulista e 6.022 sequências, também de ambas as fases, depositados no GenBank do NCBI pelo consórcio central (Felipe et al., 2003 e Felipe et al., 2005).

Estudos genômicos do fungo *P. brasiliensis* ainda estão em andamento com apenas um artigo (Reinoso et al., 2005) na literatura reportando o sequenciamento e análises de sete clones genômicos independentes, compreendendo um total de aproximadamente 50kb, demonstrando a organização de regiões intergênicas e introns de *P. brasiliensis*.

Entretanto, mais recentemente através de uma iniciativa do FGI - Fungal Genome Initiative - que é uma parceria entre o Broad Institute e várias comunidades de pesquisas em fungos estão sendo sequenciados e anotados os genomas de três isolados de *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb01, Pb03 e Pb18). Embora ainda não se tenha nenhuma publicação, os dados destes projetos de sequenciamento de genomas já estão publicamente disponíveis para pesquisas e análises de comparação de seqüências (disponível em: http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html, acesso em: 14/01/2009). Já o genoma mitocondrial de *Paracoccidioides brasiliensis* do isolado Pb18 (Project ID: **16676**) encontra-se sequenciado e publicado (Cardoso et al., 2007). No genoma mitocondrial de *P. brasiliensis* foi encontrado as três maiores subunidades do complexo da citocromo c oxidase *Cox1p*, *Cox2p* e *Cox3p* (Cardoso et al., 2007). A análise de anotação das sequências ESTs do consórcio central sinaliza que em *P. brasiliensis* há síntese de ATP pelas vias metabólicas clássicas (Felipe et al., 2005).

O objetivo deste trabalho é identificar e caracterizar os genes nucleares de *P. brasiliensis* que participam direta ou indiretamente da biosíntese do complexo da citocromo c oxidase (COX) mitocondrial. Para isso identificamos os genes *in silico*, testamos em ensaios de complementação heteróloga em mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* e estudamos o

padrão de expressão destes genes durante a transição morfológica de micélio para levedura e de levedura para micélio.

Iniciamos uma busca no banco de dados Saccharomyces Genome Database, disponível em: <http://www-genome.stanford.edu/> e selecionamos quarenta sequências de proteínas envolvidas nesta biosíntese do complexo da COX que foram utilizadas como sondas de identificação dos genes aqui estudados. Além dos genes *PbCOX4*, *PbCOX9*, *PbCOX12* e *PbCOX16* de estudos anteriores (Bandeira e Nóbrega, 2008), identificamos mais quinze(15) novos genes desta via.

Até o momento, ainda não disponibilizamos de uma técnica bem definida para transformação ou indução de mutação (pontual ou deleções) em *P. brasiliensis* e a caracterização dos homólogos identificados *in silico* foram realizadas por complementação funcional heteróloga em mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*.

Dos quinze novos genes estudados quatro deles *PbCOX6*, *PbCOX17*, *PbCOX19* e *PbOXAI* complementam a deficiência respiratória dos respectivos mutantes de *S. cerevisiae* enquanto os genes *PbCOX11*, *PbCOX17*, *PbCOX19* e *PbSCO1* são capazes de substituir os homólogos à função de resistência ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nos respectivos mutantes de *S. cerevisiae*.

A primeira iniciativa de utilização desse procedimento (complementação heteróloga) para caracterização de genes de *P. brasiliensis* foi realizada com o estudo da ornitina descarboxilase (ODC) que complementou com sucesso os transformantes do mutante nulo *odc* de *S. cerevisiae* com o gene *PbODC* de *P. brasiliensis* (Niño-Vega et al., 2004). Nesta época já havíamos conseguido com sucesso a complementação funcional heteróloga da capacidade respiratória do mutante de *S. cerevisiae* com gene *PbCOX9*.

A partir de análises de aproximadamente 12.000 seqüências aleatórias *P. brasiliensis* (RSTs – “Random Sequence Tags”) geradas a partir de uma biblioteca genômica construída em nosso laboratório, no vetor pUC18, acessamos a estrutura genômica de seis genes (*PbCOX8*, *PbCOX11*, *PbMSS51*, *PbPET191*, *PbOXAI* e *PbSCO1*) de *P. brasiliensis* e a partir de análises por hibridização em membranas com sondas dos genes da citocromo c oxidase de *P. brasiliensis* identificamos clones referentes à maioria dos demais genes em uma biblioteca genômica construída em fosmídeos.

A análise da expressão dos genes estudados neste trabalho foi realizada utilizando-se a técnica de PCR quantitativo em tempo real. Esta análise mostra serem estes genes são modulados durante a transição morfológica do fungo, tanto de micélio para levedura quanto na transição reversa.

Nossos resultados estão contribuindo para avançar o entendimento desta via de síntese tão complexa e essencial das células eucarióticas utilizando como sistema modelo o fungo *P. brasiliensis* em qual até então nada havia sido estudado.

1.5 Sideróferos

O ferro é um nutriente essencial requerido para o metabolismo de todos os seres vivos, porém encontra-se na forma de compostos insolúveis (óxidos-hidróxido). Os íons de ferro Fe^{3+} têm uma solubilidade muito baixa no pH neutro e conseqüentemente não podem ser diretamente utilizados pelos microorganismos. Eisendle et al., 2003 diz que o ferro representa um paradoxo muito significativo em biologia, pois este metal é indispensável em diversos tipos de cofatores tais como centros de ferro-enxofre de grupo hemes, o que o torna essencial em processos metabólicos chaves, incluindo a fosforilação oxidativa. Além de sua utilidade vital este metal também pode atuar na oxidação deletéria de biomoléculas via “Haber-Weiss/Fenton chemistry” (Halliwell e Gutteridge 1984) e, portanto, a concentração intracelular e nos fluidos biológicos de ferro deve ser altamente regulada e este controle é basicamente realizado em nível de captação e estocagem intracelular do metal (Haas, 2003). Desta forma fungos e bactérias foram obrigados a desenvolver um mecanismo altamente especializado para a mobilização de ferro e sobreviverem a bioindisponibilidade deste metal (Guerinot, 1994; Leong e Winkelmann, 1998) na natureza. Em baixas concentrações de ferro estes microorganismos sintetizam e secretam compostos de baixo peso molecular, que atuam como quelantes específicos de ferro chamados de sideróferos (Neilands, 1981). Subseqüentemente as células recuperam o ferro do complexo Ferri-siderófero via um sistema também altamente especializado (Winkelmann, 2002; Hissen et al., 2004). Além de agentes seqüestradores muitos fungos possuem sideróferos intracelulares que atuam com um compartimento de estoque de ferro (Matzanke et al., 1987).

A aquisição de ferro também é reconhecidamente um fator muito importante no processo de infecção por qualquer patógeno humano desde que este metal é rapidamente seqüestrado por proteínas com alta afinidade por ferro tais como a ferritina (Weinberg, 1999; Hissen et al., 2004) e por isso, os sideróferos freqüentemente têm sido reconhecidos também como fatores de virulência. Este fato é corroborado pelos relatos de que o transporte de sideróferos é requerido no processo específico de infecção, denominado “invasão epitelial e penetração por *Cândida albicans*” (Heymann et al., 2002; Hu et al., 2002). Considerando que as vias biosintéticas de sideróferos são ausentes em células humanas, as vias de biosíntese de

sideróferos em organismos patogênicos representam fortes candidatos a alvos de agentes quimioterápicos (Eisendle et al., 2003). O potencial uso de drogas conjugadas a sideróferos no processo de entrega de antibióticos a organismos específicos também tem sido relatado (Roosenberg et al., 2000).

“Como um organismo modelo é uma frustração o fato de que *Saccharomyces cerevisiae* não seja capaz de sintetizar nenhuma espécie de sideróferos embora este organismo seja altamente eficiente em captar e utilizar estes compostos (xenosideróferos) produzidos por outras espécies” (Lesuisse et al., 1998).

1.7 A Biosíntese De Sideróferos

Os sideróferos podem ser divididos em três grupos distintos dependendo de sua composição química (catecols, carboxilatos e hidroxamatos) e com exceção do tipo caboxilato produzido por zigomicetos, a maioria dos fungos produz sideróferos do tipo hidroxamato (Van der Helm e Reissbrodt et al., 1994). O fato de *S. cerevisiae* não produzir sideróferos pode em parte explicar o porquê embora a captação e a utilização de ferro via sideróferos seja bem conhecida, a biosíntese destes compostos em nível molecular ainda esteja em estados iniciais (Haas, 2003). Plattner e Diekmann (1994) descrevem de maneira geral a via de biosíntese de sideróferos do tipo hidroxamato em fungos. De acordo com estes autores o primeiro estágio de comprometimento na via de biosíntese de sideróferos é a N5-hidroxilação da ornitina, que é catalisada pela ornitina N5-oxigenase gerando a N5-hidroxiornitina e a formação do grupo hidroxamato é conduzida pela transferência de um grupo acil de um derivado de Acil-CoA para a N5-hidroxiornitina. Adicionalmente alguns sideróferos requerem uma acetilação no grupamento amino_NH2 do hidroxamato, como no caso do coprogen e do triacetylfulsarinine C e esta etapa ainda não foi geneticamente caracterizada (Plattner e Diekmann, 1994). A ligação de grupos hidroxamatos como no caso dos sideróferos do tipo ferrichrome e a incorporação adicional de aminoácidos são realizadas por enzimas do tipo “nonribosomal peptide synthetases” (NRPSs).

Os sideróferos desta classe freqüentemente possuem uma estrutura cíclica e/ou ramificada, contêm aminoácidos não-proteinogênicos incluindo D-aminoácidos. Carregam modificações como grupos N-methyl e N-formyl, ou são glicosilados, acilados, halogenados, ou hidroxilados. Às vezes são dímeros ou trímeros de subunidades idênticas. As proteínas do tipo NRPS constituem uma espécie de enzimas com uma constituição modular capaz de montar compostos a partir de uma considerável variedade de precursores tanto

proteínogênicos como não proteínogênicos. Cada módulo consiste em diversos domínios com funções definidas como domínio de adenilação, domínio de condensação e um domínio carregador de peptídeos, que normalmente são separados por regiões espaçadoras curtas de aproximadamente 15 aminoácidos (Kleinkauf e Von Dohen, 1996; Weber e Marahiel, 2001).

A primeira ornitina N5-oxigenase caracterizada em fungos foi a ornitina N5-oxigenase de *Ustilago maydis* (Mei et al., 1993) que é codificada pelo gene SID1 (Haas, 2003). Subseqüentemente em 2003, uma ortóloga de ornitina N5-oxigenase (SIDA) foi caracterizada em *Aspergillus nidulans* (Eisendle et al., 2003). A expressão de SID1 (*U. maydis*) e SIDA (*A. nidulans*) é reprimida em altas concentrações de ferro e a deleção destes genes leva ao bloqueio da síntese de todos os sideróforos do tipo hidroxamatos nestes fungos (Haas, 2003). Uma N5-hidroxiornitina: acetil-CoA-N5-transacetilase também já foi identificada em *Ustilago sphaerogena* (Neilands et al., 1987) e em *Rhodotorula pilimanae* (Ong e Emery, 1972) e proteínas NRPS já foram caracterizadas em *U. maydis* (Yuan et al., 2001) sendo codificada pelo gene SID2 e em *A. nidulans* (Oberegger et al., 2002) pelos genes SIDC e SIDB. Além de genes estruturais atuantes na síntese de sideróforos, vários outros genes têm sido caracterizados como transportadores ou como ativadores e repressores responsivos de ferro na síntese destes compostos (Haas, 2003).

Considerando a importância dos sideróforos tanto na sobrevivência, como no processo de infecção e estabelecimento de patogenicidade de fungos em hospedeiros humanos estamos apresentando os resultados iniciais obtidos na identificação e caracterização bioquímica e biosíntese destes compostos em *Paracoccidioides brasiliensis*.

2 OBJETIVOS

2.1 Identificar nos bancos de seqüências ESTs e genômicas que foram gerados nos projetos de seqüenciamento de *Paracoccidioides brasiliensis* seqüências homólogas aos polipeptídeos de levedura *Saccharomyces cerevisiae* envolvidos na biogênese da citocromo c oxidase mitocondrial;

2.2 Selecionar os clones com insertos de seqüências de *P. brasiliensis* que apresentem similaridade significativa dentro dos valores de E-value $\leq 10^{-5}$ estabelecido para seqüenciamento completo do inserto seguindo de depósito dos dados no GenBank/NCBI;

2.3 Estudar a estrutura genômica destes genes verificando a existência e localização de introns;

2.4 Verificar o padrão de expressão destes genes de *Paracoccidioides brasiliensis* nas fases micélio e levedura e durante a transição dimórfica induzida por temperatura;

2.5 Verificar a capacidade de restaurar a atividade da citocromo oxidase por meio da complementação funcional heteróloga em mutantes *Saccharomyces cerevisiae*;

2.6 Verificar a presença de sideróferos em sobrenadantes de cultura de *Paracoccidioides brasiliensis*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagens De Leveduras E Bactérias

As linhagens de *E. coli* e as linhagens de levedura utilizadas neste trabalho estão listadas nas tabelas 1 e 2.

TABELA 1: Cepas de Escherichia coli

Linhagem	Genótipo
DH ₁₀ B ^{1,2}	<i>F mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 oraD139 Δ(ora, leu) 7697 galU galK λ rpsL nupG</i>
SOLR TM ³	<i>e14-(McrA-) .(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 sbcC recB recJ uvrC umuC::Tn5 (Kanr) lac gyrA96 relA1 thi-1 endA1 λR [F' proAB lacIqZ.M15] Su- (nonsuppressing)</i>
XL1-Blue MRF ³	<i>Δ.(mcrA)183 .(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacIqZ.M15 Tn10 (Tetr)]</i>

Referências

1-GRANT *et al.*, 1990

2-AUSUBEL *et al.*; 1995

3-BN #946306-11. Revision #102001f Copyright © 2002 by **Stratagene**.

TABELA 2: Linhagens De *Saccharomyces cerevisiae*

Linhagem	Genótipo	Referência
<i>W303</i>	<i>MAT a/α ade2-1, trp1-1, his3-115, ura3-1 leu2-3, 112, ρ⁺, can^R</i>	ROTHSTEIN, R., Columbia University
<i>W303-1A</i>	<i>MAT a, ade2-1, trp1-1, his3-115, ura3-1, leu2-3, 112, ρ⁺, can^R</i>	ROTHSTEIN, R., Columbia University
<i>W303-1B</i>	<i>MAT α, ade2-1, trp1-1, his3-115, ura3-1, leu2-3, 112, ρ⁺, can^R</i>	ROTHSTEIN, R., Columbia University
<i>CB11</i>	<i>MATa ade1 ρ^o</i>	TZAGOLOFF <i>et al.</i> , 1975
<i>KL14</i>	<i>MATα his1, trip2 ρ^o</i>	TZAGOLOFF <i>et al.</i> , 1975
<i>BY4741Δcox5a/MHLU</i>	<i>MATa, his3, leu2, met15, ura3, cox5A::KanXM4, ρ⁺</i>	EUROFAN
<i>W303Δcox6::URA</i>	<i>MATa, ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp-1 ura3-1, ρ⁺ cox6::URA-3</i>	TZAGOLOFF, A; DIECKMANN, C.L.,1990
<i>W303Δcox11::HIS</i>	<i>MATa, ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp-1 ura3-1, ρ⁺, cox11::HIS-3</i>	TZAGOLOFF, A; Columbia University
<i>W303Δcox15::HIS</i>	<i>MATa, ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp-1 ura3-1, ρ⁺, cox15::HIS-3</i>	TZAGOLOFF, A; Columbia University
<i>W303Δcox17::TRIP</i>	<i>MATa, ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp-1 ura3-1, ρ⁺, cox17::TRIP-1</i>	TZAGOLOFF, A; DIECKMANN, C.L.,1990
<i>W303Δcox19::HIS</i>	<i>MATa, ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp-1 ura3-1, ρ⁺ cox19::HIS-3</i>	TZAGOLOFF, A; DIECKMANN, C.L.,1990
<i>W303Δcox19::LEU</i>	<i>MATα, ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp-1 ura3-1, ρ⁺, cox19::LEU-2</i>	TZAGOLOFF, A; DIECKMANN, C.L.,1990
<i>BY4741Δcox23/MHLU</i>	<i>MATa, his3, leu2, met15, ura3, cox23::KanXM4, ρ⁺</i>	EUROFAN
<i>W303Δpet100::HIS</i>	<i>MATa, ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp-1 ura3-1, ρ⁺ pet100::HIS-3</i>	TZAGOLOFF, A; DIECKMANN, C.L.,1990
<i>BY4741Δpet112/MHLU</i>	<i>MATa, his3, leu2, met15, ura3, pet112::KanXM4, ρ⁺ ou ρ^o</i>	EUROFAN
<i>W303Δoxa1::HIS</i>	<i>MATa, ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp-1 ura3-1, ρ⁺ oxa1::HIS-3</i>	TZAGOLOFF, A; Columbia University
<i>BY4741Δmss51/MHLU</i>	<i>MATa, his3, leu2, met15, ura3, mss51::KanXM4, ρ⁺ ou ρ^o</i>	EUROFAN
<i>W303Δsco1::URA</i>	<i>MATa, ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp-1 ura3-1, ρ⁺ sco11::URA-3</i>	TZAGOLOFF, A; Columbia University

3.2 Meios De Cultura Para Bactéria

Meio LB (Luria-Bertani): 1% Triptona; 0,5% Extrato de Levedura; 0,5% NaCl e 0,1% Dextrose pH 7,0

Meio LA (meio Luria-Bertani com adição de antibiótico ampicilina): 1% Triptona; 0,5% Extrato de Levedura; 0,5% NaCl e 0,1% Dextrose pH 7,0 ; ampicilina 50mg/mL

3.3 Meio de Cultura para Levedura

Meio WO (meio mínimo sem aminoácidos): 0,17% YNB (Yeast Nitrogen Base) sem aminoácido; 0,5% Sulfato de Amônio; 2% Dextrose.

Meio EG (meio completo com fonte de carbono: Etanol + Glicerol): 1% Y (Extrato de Levedura); 2% P (Peptona); 2% G (Glicerol); 2% E (Etanol)

Meio YPD (meio completo com dextrose): 1% Y (Extrato de Levedura); 2% P (Peptona); 2% D (Dextrose)

3.4 Oligo-Inicidores Utilizados Para Seqüenciamento

Para o seqüenciamento dos insertos dos clones originados das bibliotecas de ESTs –Expressed Sequence Tags, construída no vetor pCMV.SPORT6 (Invitrogen) foram utilizados os seguintes iniciadores:

(99F) 5'–TAATACGACTCACTATAGGG-3'

(100R) 5'–ATTTAGGTGACACTATAG-3'

(140) 5' – TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'

(78SS) 5' – GTAAAACGACGGCCAGT-3'

(79SR)5' – CAGGAAACAGCTATGAC-3'.

Para o sequenciamento dos clones originários das bibliotecas construídas no vetor Lambda ZAPII (Stratagene), utilizou-se os iniciadores:

(99F) 5' – TAATACGACTCACTATAGGG-3'

(128T3) 5' – ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3'

Para certificação das construções feitas com vetores pMGL3 e pMGL4 foi utilizado o iniciador (386) 5'–CAATATTTCAAGCTATAC-3'.

Para o sequenciamento dos clones gerados pela técnica de inserção de transposon foram utilizados os iniciadores:

(492) 5'-ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC-3'

(493)5'-GCAATGTAACATCAGAGAATTTTGAG-3'

3.5 Reação de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) de Sequenciamento

A reação de amplificação contém um volume final de 10 µL com aproximadamente 20 nanogramas de DNA molde, 3 a 6 picomoles de oligo-iniciador, 40 mM Tris pH9,0, 1 mM MgCl₂ e 2 µL da mistura comercial “ABI PRISM Big DyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems – PERKIN-ELMER)”, um kit que reúne a Ampli[®] tag DNA polymerase Fs, os nucleotídeos e os dideoxi terminadores (A- dRGG , C – dROX ; G – Dr110 E t –dTAMRA), ou DYEnamic ET terminator cycle sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc.). As amplificações foram realizadas no termociclador PCR PTC –100TM Proga mMable Thermal Controler (MJ Research, Inc) sendo programado de acordo com as necessidades, como temperatura de desnaturação dos oligos-iniciadores, tamanho do fragmento de DNA a ser seqüenciado etc. Após a reação de amplificação o DNA é precipitado adicionando-se 5 µL da solução NG (Glicogênio 1 mg/mL dissolvidos em 5M NH₄OAc) e 50 µL de etanol 100%. A mistura é incubada por no mínimo 30 minutos a –80 °C. Após o período de incubação centrifuga-se a mistura por 30 minutos 40000 rpm a 4 °C e despreza-se o sobrenadante. O DNA precipitado é lavado duas vezes com 110 µL de etanol-80% centrifugando-se por 15 minutos 4000 rpm a 4 °C cada. Secado a vácuo e submetido ao sequenciamento.

3.6 Sequenciamento

O seqüenciador utilizado é o 3100 Genetic Analyzer – Applied Biosystems/HITACHI, com capacidade para seqüenciamento de 96 amostras simultaneamente. O método de seqüenciamento utilizado é o resultado de um aperfeiçoamento do método original de Sanger que consiste em submeter amostras de pDNA a um processo de PCR linear utilizando-se além

dos quatro deoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs), os dideoxi fluorescentes específicos “Dye Terminators”. Após a reação de PCR e purificação do DNA amplificado este é diluído em formamida e as amostras são carregadas no aparelho seqüenciador. No eletroferograma temos a fluorescência verde como indicativa da base nitrogenada Adenina, a vermelha para Citosina, azul para Guanina e preta para Timina.

3.6.1 Análise dos Cromatogramas de Seqüenciamento

Os cromatogramas obtidos por seqüenciamento foram analisados utilizando-se a ferramenta SeqManII do programa DNASTAR- Lasergene.

Alternativamente também se utilizou a ferramenta phred com o parâmetro de qualidade 20. Os arquivos no formato FASTA foram avaliados através de um programa de computador “script” que separa as seqüências FASTAs de melhor qualidade e maior tamanho de pares de base (bp). Para o agrupamento das seqüências utilizou-se o programa CAP3.

3.7 Identificação da Fase Aberta de Leitura (“ORF - Open Reading Frame”)

As seqüências consensos no formato FASTA foram analisada quanto à presença de fase aberta de leitura utilizando-se a ferramenta ORFFinder (Open Reading Frame Finder) do NCBI (Nacional Center for Biotechnology information) disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>.

3.8 Análises das Seqüências das Proteínas de *Paracoccidioides brasiliensis*

Múltiplo alinhamento com as proteínas homólogas foram gerados pelo programa Clustal/W, disponível em: <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/multi-align/multi-align.html>. Utilizando o programa Box Shade disponível em: http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html, os resíduos idênticos foram pintados em preto e os resíduos com propriedades químicas semelhantes foram pintados em cinza. Predições de peso molecular e das características dos aminoácidos das novas proteínas de *P. brasiliensis* foram determinadas através da ferramenta EditSeq do programa DNASTAR- Lasergene. Predição de domínios característicos de regiões transmembrana foi realizada utilizando-se a ferramenta TMH MM Server v.2.0, disponível em: http://www.cbs.dtu.dk/services/TMH_MM/.

3.9 Excisão das ORFs

Após a localização da Fase aberta de leitura na sequência consenso de interesse esta é submetida à análise quanto à presença de sítios de reconhecimento de enzimas de restrição, utilizando-se o programa NEBcutter V2.0 disponível na página da New England Biolabs Inc. (www.neb.com). Quando presentes os sítios das enzimas apropriadas que excisam a fase aberta de leitura direcionada para a ligação do vetor de expressão específico estes são confirmados com uma digestão analítica seguida de análise em gel 1% agarose. Após a confirmação segue-se a digestão preparativa e o fragmento de interesse é isolado por eletroforese preparativa em gel 1% agarose e extraído do gel por eletroeluição. Neste processo as bandas de DNA desejadas são recortadas do gel com estilete e colocadas em sacos de diálise contendo tampão de TBE 1:10 (8 mM Tris; 11,3 mM ácido bórico e 0,25 mM EDTA, pH entre 8,0 a 8,3) o mesmo tampão é usado na cuba de eletroforese. Liga-se a cuba a uma fonte de eletricidade (Power PAC3000, da BioRad) e deixa-se por 5 minutos a 500V. O DNA eletroluído da agarose fica em solução no tampão, dentro do saco de diálise. Esta solução contendo o DNA é recolhida e a esta solução (~400 µL) adiciona-se 1/20 do volume de 1M Tris pH8,0 e fenol em volume igual ao volume total. A mistura é vigorosamente homogeneizada em aparelho de vortex e centrifugada por 10 minutos. A fase aquosa é transferida para novos tubos eppendorf e uma nova extração é feita com o mesmo volume de éter. À fase aquosa adiciona-se 1/20 do volume de 5M NaCl e 2,5 vezes o volume total de etanol 100%. A mistura é incubada a -80 °C por no mínimo 15 minutos. Após o período de incubação centrifuga-se por 10 minutos a 13000 rpm e aspira-se o sobrenadante. O precipitado de DNA é lavado duas vezes com etanol 80%, O precipitado de DNA é secado a vácuo (VR-I Heteorac, da Heto) e ressuspenso em 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH7,5.

Quando não existe a presença de sítios de restrição apropriados faz-se necessário a síntese de oligos-iniciadores específicos.

3.10 Preparação do Vetor de Expressão

O plasmídeo selecionado para o estudo de expressão é digerido com as enzimas cuidadosamente escolhidas para cada caso. Após digestão enzimática preparativa, adiciona-se à reação a enzima CIP–Calf Intestine Phosphatase para desfosforilação das extremidades 5'

do plasmídeo. O DNA plasmidial aberto é isolado por eletroforese em gel 1% agarose e recuperado do gel por eletroeluição, purificado por extração com fenol e éter e precipitado com etanol.

3.11 Ligação do Fragmento de DNA ao vetor

A ligação do fragmento de DNA de interesse ao vetor apropriado é realizada utilizando-se o Kit de ligação Fast Link™ DNA Ligation Kit em um volume final de 15 µL seguindo as instruções do fabricante (EPICENTRE TECHNOLOGIES). Utiliza-se 5 µL da mistura da ligação para a transformação em *E. coli* DH₁₀B (célula competente, preparada pelo método químico com CaCl₂) por choque térmico. Os pDNAs dos transformantes de *E. coli* são extraídos por minipreparações (mini-prep) e analisados com as enzimas de restrição apropriadas ou por seqüenciamento.

3.12 Reação de Inserção de Transposon

Para Inserção de Transposon utilizou-se o Kit EZ::TN™ < KAN-2 > Insertion Kit [EZ::TN™ Transposase eZ::TN™ Transposon eZ::TN™ 10X Reaction Buffer eZ::TN™10X Stop Solution e os primers KAN-2 FP-1 Forward e KAN-2 RP-1 Reverse] seguindo as instruções do fabricante (EPICENTRE Technologies).

3.13 Preparo de Célula Competente de *E.coli* pelo método químico

Um inóculo de células de *Escherichia coli* é feito em 50 mL do meio LB e incubado sob agitação de 220 rpm no “Shaker” New Brunswick Scientific a 37 °C por aproximadamente 1 hora. O crescimento é monitorado por densidade óptica através do aparelho nefelômetro KIIet até que a leitura atinja o ponto 100 de escala do aparelho o que caracteriza o crescimento em fase exponencial. Transfere-se a cultura para um tubo cônico Corning de 50 mL, centrifuga-se na SORVALL RC-5B, rotor AS-600 por 10 minutos a 5000 rpm a 4 °C. Despreza-se o sobrenadante e faz-se uma lavagem das células com 15 mL de 10 mM CaCl₂, 10 mM Tris pH8,0 centrifugando-se por 10 minutos a 5000 rpm a 4 °C. Despreza-se o sobre e ressuspende-se as células em 15 mL de 50 mM CaCl₂, 10 mM Tris pH8,0 e incuba-se a células em suspensão no gelo por 30 minutos. Centrifuga-se novamente por 10

minutos a 5000 rpm a 4 °C e resuspende-se as células competentes em 3 mL de 50 mM CaCl₂, 10 mM Tris pH8,0.

3.14 Transformação Bacteriana por choque térmico

Em volume de 200 µL de células competente, adiciona-se 5 µL da mistura de ligação em e incuba-se no gelo por 15 minutos. Submete-se a um choque térmico a 42 °C por 2 minutos e incuba-se no gelo por 1 minuto. As células são transferidas para um tubo cônico Corning 15 mL contendo 3,0 mL de LB. Incuba-se sob agitação de 220 rpm por 1 hora a 37 °C. Após este período de incubação centrifuga-se a mistura contendo as células despreza-se parte do sobrenadante. As células são novamente resuspendidas e plaqueadas em meios contendo um agente apropriado para seleção dos transformantes.

3.14.1 Método Seletivo de Clones

Os clones transformantes são coletados com o auxílio de palitos de dentes esterilizados e transferidos de maneira ordenada para nova placa de meio apropriado e incubados em estufa 37° C por aproximadamente 15 horas. Dos clones crescidos extrai-se o DNA plasmidial (pDNA) que é analisado em gel analítico 1% agarose e selecionados por digestão enzimática com as enzimas apropriadas ou por sequenciamento.

3.15 Extração de pDNA de Bactéria [método alcalino]

Com auxílio de palito de dente de ponta chata coleta-se uma amostra dos clones crescidos em placa contendo meio apropriado que é transferida para um tubo Eppendorf contendo 0,1 mL de (50 mM glicose; 10 mM EDTA; 25 mM Tris pH8,0; 2 mg/mL “lysozyme” e 0,33 mg/mL RNAase). Adiciona-se 0,1 mL de (0,2N NaOH; 1% SDS). Mistura-se gentilmente por inversão e incuba-se por 3 minutos a temperatura ambiente. Adiciona-se 0,1 mL de 3M NaOAc pH4,8 e incuba-se no gelo por 5 minutos. Após período de incubação, centrifuga-se por 5 minutos, 13000 rpm e coleta-se o sobrenadante em tubo Eppendorf novo (-250 µL). Adiciona-se 0,7 mL de 100% etanol e incuba-se a -80 °C por 20 minutos. Centrifuga-se por 5 minutos a 13000 rpm e despreza-se o sobrenadante. O pDNA precipitado é lavado duas vezes com 0,3 mL de 80% Etanol/EDTA, centrifugando-se 5

minutos 13000 rpm cada. Seca-se o precipitado a vácuo e ressuspende-se o pDNA em 10 mM Tris pH8,0; 1 mM EDTA.

3.16 Gel de Agarose para Eletroforese

Para a eletroforese, utiliza-se gel 1% agarose. Utilizamos 0,4 g de agarose em 40 mL de TBE (80 M Tris, 113 mM ácido bórico, 2,5 mM EDTA, pH8,0). A mistura é aquecida no aparelho de microondas até completa solubilização da agarose. Adiciona-se 1 µL de Brometo de etidíio (1 mg/mL) e despeja-se a solução de gel numa cuba apropriada contendo um pente apropriado para polimerização. Após a polimerização a cuba com o gel é transferida para a cuba de eletroforese. O tampão de eletroforese utilizado é o mesmo utilizado para a preparação do gel (TBE). A eletroforese ocorre em 150 V por aproximadamente 30 minutos.

Após a corrida o gel é transferido para o transluminador onde o DNA pode ser observado e fotografado sob excitação de luz UV.

3.17 Transformação de Levedura pelo método de LiOAc

Um inóculo de levedura é feito em 10 mL de meio YPD utilizando-se um erlenmeyer de 50 mL e incubado por 24 horas, sob agitação de 220 rpm a 30 °C no incubador C24 Classic Benchtop Incubator Shaker da New Brunswick Scientific. Após período de incubação cerca de 200µl da cultura é transferida para um novo erlenmeyer de 50 mL contendo 10 mL de YPD e incuba-se novamente sob agitação de 220 rpm a 30 °C por 4 horas. A cultura de células é transferida para um tubo Corning de 15 mL e precipitada por centrifugação na centrífuga SORVALL (RC-5B, rotor SA-600) por 10 minutos a 5000 rpm a 20 °C. O sobrenadante é desprezado e as células são ressuspendidas em 1,0 mL de TEL (10 mM Tris pH 7,5; 0,1M LiOAc; 1 mM EDTA), homogeneizando-se sempre gentilmente. As células são transferidas para um tubo Eppendorf de 1,5 mL. Centrifuga-se por 2 minutos na microcentrífuga (Spectrofuge 16M da National Labnet Co). O sobrenadante é desprezado e as células são novamente ressuspendidas em 100 µL de TEL, homogeneizando gentilmente com a pipeta. Incuba-se por 5 minutos à temperatura ambiente e adiciona-se 5 µL de “carrier” DNA de salmão da Sigma, na concentração (8 mg/mL) e 2 µL a 3 µL do pDNA desejado. Deixa-se 10 minutos à temperatura ambiente e adiciona-se 0,8 mL de PEG 40% (PEG-3640 em TEL), homogeneizando-se por inversão. Incuba-se por 15 minutos à temperatura ambiente, sem agitação. As células são transferidas para um choque térmico a 42 °C por 12 minutos.

Centrifuga-se por 5 minutos na microcentrífuga e remove-se o sobrenadante. As células são lavadas em 0,5 mL de TE (10 mM Tris pH 7,5; 1 mM EDTA) centrifugando-se por 2 minutos. O sobrenadante é removido com a pipeta e as células são ressuspensas em 150 µL de TE. Em seguida são plaqueadas em meio seletivo.

3.18 Extração de pDNA de Levedura [modificado por Alex Tzagoloff Columbia University]

Um inóculo das células do clone transformante crescido em placa de EG é coletado e transferido para um tubo Eppendorf contendo 0,5 mL de H₂O_{dd} (destilada e deionizada). As células são precipitadas centrifugando-se por 1 minuto a 13000 rpm. O sobrenadante é descartado e as células são lavadas com 0,3 mL de 1,2 M Sorbitol centrifugando-se por 5 minutos a 13000 rpm. As células são ressuspensas em 0,2 mL de solução de Zymolyase (1,2M sorbitol; 0,1 M Citrato pH 7,0; 60 mM EDTA; 0,4 M β- mercapto /Etanol (v/v) e 1 mg/mL Zymolyase) e incubadas por aproximadamente 25 minutos a 37 °C. Após o período de incubação a 37 °C, transfere-se o protoplasto para o gelo e adiciona-se 0,2 mL de 1,2 M Sorbitol. Centrifuga-se por 5 minutos a 13000 rpm e despreza-se o sobrenadante. O protoplasto é lavado duas vezes com 0,3 mL de 1,2M sorbitol centrifugando-se por 5 minutos a 13000 rpm cada. Após a lavagem, ressuspende-se o protoplasto em 0,1 mL de (50 mM glicose; 25 mM Tris pH 8,0; 10 mM EDTA e 250 µg/mL RNase). Adiciona-se 0,2 mL de (0,2 N NaOH; 1% SDS) agitando-se gentilmente por inversão e deixa-se por 5 minutos a temperatura ambiente. Adiciona-se 150 µL de 3M NaOAc pH 4,8 e incuba-se no gelo por mais 10 minutos. Centrifuga-se por 5 minutos a 13000 rpm e coleta-se o sobrenadante em um tubo eppendorf novo (~200 µL). O pDNA é precipitado adicionando-se 1 mL de 100% etanol e incubando-se a -80 °C por 15 minutos seguido de centrifugação por 5 minutos a 13000 rpm. O sobrenadante é desprezado e o precipitado de pDNA é ressuspendido em 0,3 mL de 2 M NH₄OAc. Em seguida adiciona-se 1 mL de 100% de Etanol e incuba-se a -80 °C por 15 minutos. O pDNA é precipitado centrifugando-se por 15 minutos a 13000 rpm. O sobrenadante é desprezado e o precipitado de pDNA é lavado duas vezes com 80% Etanol/EDTA centrifugando-se por 5 minutos a 13000 rpm, cada. O pDNA é secado a vácuo e redissolvido em 20 µL de H₂O_{dd}. Utiliza-se 10 µL para transformação em *E.coli*.

3.19 Extração de RNA total de *Paracoccidioides brasiliensis* [método adaptado por Nobrega, M]

Aproximadamente 5 gramas de células foram rompidas por maceração em nitrogênio líquido e imediatamente misturada com 20 mL de STE (20 mM Tris pH 7,5; 1 mM EDTA; 0,2% SDS) e o mesmo volume de PCI (fenol:clorofórmio: álcool isoamílico 25:24:01). A mistura foi homogeneizada com 2 pulsos de 15 segundos em um homogeneizador Heavy Duty Laboratory Blender (WARING LABORATORIES & SCIENCE) e em seguida centrifugada por 10 minutos a 6000 rpm em temperatura de 4 °C. A fase aquosa foi coletada e submetida a duas extrações com 20 mL PCI e uma terceira extração foi realizada com 20 mL de clorofórmio. O RNA foi precipitado com adição de 1:20 volumes de 5 M NaCl e 2.5 volumes de 100% etanol e incubação a -80 °C por 30 minutos. O RNA foi coletado por centrifugação por 10 minutos a 6000 rpm a 4 °C e lavado duas vezes com 80% etanol. O precipitado foi secado a vácuo e redissolvido em 3 mL de TE (10 mM Tris pH 7,5; 1 mM EDTA). Para verificar a integridade do RNA aproximadamente 5 µL do RNA total foi analisado em gel 1% agarose, corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz UV. Tratamento com DNaseI-RNase-free (Ambion) foi feito em alíquotas de 100 µL de acordo com o protocolo do fabricante. A ausência de DNA contaminante foi verificada por reação de PCR através de testes de amplificação do gene *PbGP43* de *P. brasiliensis* (Cisalpino *et al.*, 1996) utilizando os oligos nucleotídeos senso 5'-TTCGAAGCAGGCGGGA e anti-senso 5'-TCGATAGTATATGCTCACTTT. O oligo-nucleotídeo anti-senso alinha com a região intrônica do gene *PbGP43*.

3.20 Reação de PCR em tempo real (RT-qPCR)

A abundância dos transcritos dos genes de *P. brasiliensis* foi medida por reação de PCR em tempo real utilizando tanto a tecnologia TaqMan (Applied Biosystems) quanto a de SYBR green (Invitrogen) para quantificar a expressão dos genes pelo método 2^{-DDCt} (Livak e Schmittgen 2001). Os oligos nucleotídeos e as sondas para cada gene alvo foram desenhados e sintetizados pelo sistema Assay-by-DesignSM software (Applied Biosystems) enquanto que os oligos nucleotídeos para a amplificação do gene *PbeIF3* (Nunes *et al.*, 2005) utilizado como controle endógeno foi feita através do sistema Custom TaqMan® MGBTM Probe (esta forma de síntese de oligos iniciadores foi utilizada quando se utilizou a tecnologia TaqMan). Para os oligos iniciadores utilizados com a tecnologia SYBR Green utilizou-se o ferramenta

“PrimerQuest” da empresa Integrated DNA Technologies (idtdna) disponível no endereço eletrônico <http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/>. O RNA total do fungo *P. brasiliensis* foi extraído em seis pontos (0, 5, 10, 24, 48 e 120 horas) durante a transição dimórfica induzida por mudança de temperatura de 25 °C (forma de micélio) para 37 °C (forma de levedura) e na transição contrária. A transcrição reversa foi realizada com 5 µg de RNA total utilizando-se o conjunto de reagentes High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. A reação de PCR em tempo real foi realizada com o aparelho de PCR em tempo real ABI Prism 7300 sequence detection system (Perkin-Elmer Applied Biosystems). As condições de termociclagem compreenderam um estágio inicial de 50 °C por 2 minutos seguidos de 10 minutos a 95 °C mais 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C. Quando utilizamos a tecnologia SYBR Green, as reações seguiram as instruções do fabricante utilizando as condições de termociclagem recomendadas para os instrumentos ABI.

TABELA 3: Lista de Primers e Probes para PCR em Tempo Real (RTqPCR) pela Tecnologia TaqMan

Gene	Primers and Probes
<i>PbCOX2</i>	Forward- ATTTGTAGTATCAGCAGCGGATGT Reverse- CCCGGATATGCATCACATTTAATACCT Probe- ATGGACACGCAAATGA - FAM
<i>PbCOX4</i>	Forward- CCGCAAGCGTCCAATTGAAC Reverse- CCAATGTACTCCATCTTGACAACGT Probe- CCGCACTCAGAACAA – FAM
<i>PbCOX5A</i>	Forward- CAACAGAGCCGCTCAATGG Reverse- GGCTAGTGTCGGATTGGCAAT Probe- CTACGGCTGAACATGCC – FAM
<i>PbCOX6</i>	Forward- GCTGCACGGAGGGTCAA Reverse- GACTTTGGCTTTGATGCCTTCA Probe- ACTTCCCCACCGCCGTC - FAM
<i>PbCOX9</i>	Forward- GCTTGTATGCCCGTATCGAATC Reverse- GGACGGTAAGAAGTCTAGTCAAGGA Probe- CCTTGTGCGCGCTCG - FAM
<i>PbCOX12</i>	Forward- GCCAAGGGCGAGGACTT Reverse-TCTGTAGGCGAGGTAGAACTGTT Probe- CCGCCCATGCAGACAG - FAM
<i>PbCOX16</i>	Forward- TCCAACCTCTTCGGCTCAAC Reverse- GAGGTTTGC GCGGTATTTGG Probe- CACCCAGGCGTTCAC - FAM
<i>PbCOX17</i>	Forward- GGACGATTGCATGCTCTTCTC Reverse- AGTGGTCGACATTCCTGTTGTG Probe- CAGGGTCGTCTGATTTT - FAM
<i>PbCOX19</i>	Forward- CCGCAAGTTAGCCAAGTCCTAT Reverse- GCACTCTGGAGCCATTAAATTGTGA Probe- CCATGCGGCAAGACAA - FAM

3.20.2 Lista de Oligos iniciadores Utilizados Nos Experimentos de PCR em Tempo Real (Real Time - RTqPCR) pela Tecnologia SYBR Green

PbCOX2

Forward: CAAGATTTGTAGTATCAGCAGCGG

Reverse: CCGCAGATTTTCAGAGCATTGTCCA

PbCOX4

Forward: ATTGAACGTTGTTCTGAGTGCGGC

Reverse: AAAGTCAGCCATGGTCTTGGGTTC

PbCOX5A

Forward: TGAAGGTCGATTGGCACGAGATGA

Reverse: AGAACACGACGAATGAGATGGCGA

PbCOX6

Forward: TGCTGCACATGAGGAGGAAACCTT

Reverse: AGTTCGAAGACATCCTGAACGGCA

PbCOX8

Forward: ATGGCCAGTCCTTTCCATTACCCA

Reverse: TTTGCCAGACAGCAATAGCGAAGG

PbCOX9

Forward: AACCTTCGCCTACCTCTTCTGGTA

Reverse: ATTCGATACGGGCATACAAGCGGT

PbCOX11

Forward: TGCCACAGATAGCACCATTCTGGA

Reverse: AGCGCTGCTGCTTACAGACAAATG

PbCOX12

Forward: TCGATCGGTAAATGGTTGCCGAGA

Reverse: ATAAGGGACTTGACCCGTGGGATT

PbCOX13

Forward: TGATTCCCGTCATCATCCTTGCGA

Reverse: TTGGTGCGAATGTTCTGGTAGGGA

PbCOX15

Forward: TTTGTCCTACCAGCGGCCTACTTT

Reverse: AACCATCCACCAACCAATGATGCC

PbCOX16

Forward: TCCTCTTCGGCCTCCCATTCAATTA

Reverse: ATATCCTCCGCCGTGGATTCTTT

PbCOX17

Forward: CATGCTGCGTCTGCAAACCTGAAA

Reverse: ACCCGGCCATGCAACTCTTATACT

PbCOX19

Forward: ATATCAAACCCAAACCGCCAGAGC

Reverse: TCGGCAAGTCTCATCATTACAC

PbCOX23

Forward: GAAGGCGAAGCCCATGTTACAAA

Reverse: GCCGCATGCATTTGATACTGCGAT

PbPET100

Forward: AATCAACAATGCTCAGCGCCATCC

Reverse: ACGGAGAAGCGTTCTTCGAGGTTT

PbPET112

Forward: ACACGATGGCATTGCTAAGGAGGA

Reverse: ATCTCGATAAGAGGGCGCGAAACA

PbPET191

Forward: TGCCTCCAACAATCCGACTGCATA

Reverse: GGCCCTTGCGTAATTGCTGACATT

PbSCO1

Forward: TCTGTTCTCCGGCCCATCTTCATT

Reverse: TTTGCACACATGCTTCACCTGCTC

PbMSS51

Forward: GTGTGCGACACAATCCGGCAAATA

Reverse: TCTCGTCACCTGCCTCATGTTTCT

PbOXA1

Forward: AGTTGATGAAGCTGGCGTATCCGA

Reverse: AAGAGTGGATCGTGCACCGTAACA

PbATP4

Forward: GAGCCAATCACACCAATGCCGTTA

Reverse: ACTGCACCCATGAGTCAAGAACCT

PbATP7

Forward: AGCACTTCAAGTCGTTCACTCCCT

Reverse: GTTCAACCTTGTCTTCGTCTCCT

PbRIP1

Forward: GGTGTTAACTGCTGTTGGTGCGA

Reverse: GGGTTTGCCTCGCCATTTGATGAT

PbQCR7

Forward: TCCCAAGGAAGCTTATGACCGTGT

Reverse: TCGACGTCCTCTTCTGGTTTGTT

PbNDI1

Forward: TGAACCTGTCTTAACCTCCGCT

Reverse: AGGGAGCACGATTAGTTTCAGCGA

3.21 Síntese de cDNA POLI(T) Para Clonagem do mRNA de Gene PbSCO1

Para Clonagem do mRNA do Gene PbSCO1 utilizou-se o kit de reagentes da Invitrogen. A síntese de cDNA poli(T) seguiu as instruções do manual do fabricante (Invitrogen (Cloned AMV RT Module)). A reação foi preparada da seguinte forma:

Em tubos de PCR (0,6 mL) foram adicionados 5 µL (aproximadamente 1 µg) de RNA total de *Paracoccidioides brasiliensis*, 1 µL da mistura de dNTPs (25 mM cada), 1 µL (820 ng/µL) de GeneRacer™ oligo-dT primer 5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTG(T)18-3' (54 bases) e 5 µL de H₂O dd esterilizada. Esta mistura foi incubada a 65 °C por 5 minutos e resfriada rapidamente em gelo por dois minutos. Em seguida adicionou-se 2 µL de 10 X PCR buffer, 1 µL da solução RNaseOut (40 U/µL), 1,3 µL da enzima transcriptase reversa (Cloned AMV RT_ 5 U/µL) e 4 µL de H₂O dd esterilizada. A mistura contendo um volume total de 20 µL H₂O dd esterilizada foi incubada a 45 °C por um hora e 85 °C por 15 minutos e estocada a -80 °C. Para amplificação do gene PbSCO1 utilizamos 1 µL de cDNA poli(T) por reação.

3.22 Hibridização em Membrana

Para identificação de clones na biblioteca genômica de *P. brasiliensis* construída em vetor do tipo fosmid utilizamos a técnica de hibridização em membrana (~110 cm²) contendo 1152 clones cada. Foram analisados no total 2304 clones. Para marcação das sondas seguimos o protocolo do fabricante do kit de marcação (*Gene Images* Random Prime Labelling Module – Amersham Biosciences). As reações de hibridizações nas membranas seguiram as instruções do fabricante do kit de detecção (*Gene Images* CDP-*Star* detection module - Amersham Biosciences) inserindo algumas modificações no volume (para menos) das reações:

A membranas foram inicialmente umedecidas em solução 5 X SSC [20 X SSC (0.3 M Na₃ citrato, 3 M NaCl)]. Em seguida colocadas em tubos (biômetra com tampa) com a face contendo o DNA, voltada para o interior do tubo. Adiciona-se a solução de pré-hibridação [(5 X SSC, 0.1% SDS, 5% (w/v) sulfato de dextran e 1:20 (v/v) líquido de bloqueio)] na proporção de ~0.15 mL/cm² (15 mL no tubo médio) e incuba-se por aproximadamente 1 hora a 60 °C em forno de hibridização biometra. Após este período adiciona-se a sonda (~10 µg/mL), previamente diluída em TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA) desnaturada a 100 °C e mantêm-se sob incubação por aproximadamente 12 horas ou uma noite.

No dia seguinte recolhe a solução contendo a sonda que poderá ser reutilizada. Transfere-se a membrana para um recipiente adequado para as lavagens. A primeira lavagem é feita com uma solução contendo 0.1% SDS, 1 X SSC sob agitação a 60 °C por 15 minutos. A segunda é feita nas mesmas condições com uma solução contendo somente a metade da concentração de SSC (0.1% SDS, 0.5% SSC).

Após as lavagens a membrana é novamente transferida para o tubo biometra (médio) contendo (15 mL) a solução de bloqueio [Buffer A (10 mM Tris, pH 9,5; 300 mM NaCl) com 1:10 (v/v) líquido de bloqueio] e incubada no forno de hibridização biometra sob agitação a temperatura ambiente por 1 hora.

Após o bloqueio da membrana, despreza-se esta solução e adiciona a solução [Buffer A, 0.5% (w/v) BSA] contendo o anticorpo diluído na concentração 1:5000 (v/v) e mantém nas mesmas condições de incubação por mais 1 hora.

Após a incubação com o anticorpo a membrana é novamente transferida para um recipiente adequado para as lavagens de retirada de excesso de anticorpo. Segue-se então três lavagens sucessivas com 250 mL (~3 mL/cm²) da solução 0.3% Tween20 (Amersham Biosciences US 20605) diluída em buffer A, sob agitação a temperatura ambiente por 10 minutos cada. Após as lavagens a membrana é transferida para um filme plástico e cobre-se a superfície da membrana contendo o DNA ligado à sonda conjugada com o anticorpo, com o líquido de revelação CPD-Star [Solução aquosa de [1.5% (w/v) Disodium 2-chloro-5-(4-methoxy Spiro[1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)-tricyclo[3,3,1,13,7]decan]-4yl)phenyl phosphate]]. Em seguida outro filme plástico é esticado sobre a membrana que ficará exposta ao líquido de revelação por 5 minutos protegida de luz. Após este período a membrana é transferida para outro filme plástico e embrulha para exposição ao filme de raio-X em cassete apropriados. A exposição ao filme de raio-X é mantida por aproximadamente 24 horas. Após o período de exposição o filme é revelado para visualização dos possíveis alvos identificados.

3.23 Extração Alcalina do DNA fosmidial (pCC1DNA) [adaptado por Nóbrega M]

O transformante contendo o clone de interesse é Inoculado em meio LB (20 mL) com adição de clorofenicol (12 µg/mL) e L-arabinose (0,01%) e incubado em agitador “New Brunswick Shaker” por cerca de 20 horas sob agitação de 300 rpm a 37 °C. Após o período de incubação as células são coletadas por centrifugação a 5000 rpm por 5 minutos a 4 °C. As células precipitadas são lavadas com 10 mL de água. Em seguida adiciona-se às células lavadas 1 mL de solução de quebra contendo a enzima lisozima [25 mM Tris-Cl pH 8,0; 50

mM Glicose; 10 mM EDTA; 2 mg/mL Lisozima; 100 µL RNase (10 mg/mL)] e incuba-se a temperatura ambiente por 15 minutos. Adiciona-se 1 mL de solução alcalina (0,2 M NaOH, 1% SDS) agitando-se gentilmente por inversão até que a mistura torne-se translúcida. Então, adiciona-se 1 mL da solução ácida (3 M NaOAc pH 4,8), novamente agitando-se gentilmente por inversão. A mistura total é submetida à incubação em gelo, por cerca de 10 minutos. Após o período de incubação no gelo a mistura é centrifugada a 6000 rpm por 20 minutos a 4 °C. Coleta-se o sobrenadante (~2 mL) em tubo de vidro “corex” e precipita-se o DNA fosmidial (pCC1DNA) adicionando-se 7 mL de etanol 100% e incubando a -80 °C por no mínimo 30 minutos. Após incubação a -80 °C a mistura é centrifugada a 7000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Descarta-se o sobrenadante e resuspende-se o DNA fosmidial precipitado com 1,5 mL da solução (DNA fosmidial 2 M NH₄OAc, 0,2 mM EDTA) agitando-se vigorosamente em agitador tipo vortex. Em seguida incuba-se a mistura em gelo por aproximadamente 15 minutos. Após período de incubação a mistura é centrifugada a 7000 rpm por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante é cuidadosamente coletado descartando-se o precipitado de proteínas. O DNA fosmidial é novamente precipitado adicionando-se duas vezes e meia (2,5 X) o volume de 100 % etanol e incubando-se a -80 °C. Após período de incubação a mistura é centrifugada a 7000 rpm por 15 minutos a 20 °C. O sobrenadante é descartado e o DNA fosmidial é resuspendido com 1,5 mL de solução TE (10 mM Tris-Cl pH 8,0; 0,1 mM EDTA). Em seguida a mistura é submetida à extração com fenol (volume/volume) e novamente recuperada por precipitação com etanol 100% seguido de duas lavagens com etanol 80%. O DNA fosmidial (pCC1DNA) final é secado a vácuo e resuspendido com TE em volume final de 1 mL.

3.24 Quebra do DNA fosmidial (pCC1DNA) por Nebulização [adaptado Nóbrega M]

Uma alíquota de aproximadamente 400 µL do DNA fosmidial (pCC1DNA) purificado é misturado a 350 µL de glicerol 100% e 250 µL de solução TE, totalizando um volume final de 1 mL. Esta mistura é submetida à quebra por nebulização utilizando-se um nebulizador individual da Microban (encontrado em farmácia e modificado no nosso laboratório para este processo). A quebra é processada em quatro ciclos de 50 segundos com pressão de 0,75 Kg/cm² (compressor de ar da Fisatan modelo 820) e potência de 300 W / 115 V. Após a quebra a mistura contendo os fragmentos de DNA fosmidial nebulizado é coletada (~800 µL) em dois tubos de 1,5 mL (400 µL/cada) e os fragmentos de DNA fosmidial é precipitado com adição de 100 µL de 5 M NH₄OAc e 1 mL de Etanol 100% seguido de incubação a -80 °C por

no mínimo 30 minutos. Após período de incubação a mistura é centrifugada a 13000 rpm por 10 minutos. Os fragmentos de DNA fosmidial precipitados são lavados com etanol 80% e secados a vácuo. Finalmente os fragmentos de DNA fosmidial são resuspendidos com 50 µL de TE e uma alíquota é analisada em gel 1% agarose. Nas condições relatadas o pCC1_DNAs é fragmentado em fragmentos que variam de 400 pb a 1000 pb.

3.25 Construção de Biblioteca de DNA fosmidial (pCC1DNA) em Vetor de clonagem pUC18 [Nobrega M et al.]

Os fragmentos de DNA fosmidial é primeiramente submetidos à reação de reparo das extremidades. Nesta reação utilizamos o kit (DNA polymerase I large (Klenow) - Pharmacia). Para cada 1 µg de DNA utilizou-se 1 µL da enzima Klenow; 2 µL de tampão concentrado (10 X); 1 µL da enzima T4_Kinase e água bidestilada para completar o volume total de 20 µL. A mistura é incubada à 37 °C por 30 minutos. Após incubação a mistura é submetida a uma extração (volume/volume) com a solução de fenol/clorofórmio. A fase aquosa (~20 µL) e recolhida e passada em coluna (MicroSpin columns da Amersham). O eluído contendo os fragmentos de DNA fosmidial com as extremidades reparadas é submetido à ligação em vetor de clonagem pUC18 previamente linearizado com a enzima de restrição *SmaI* e tendo a extremidade 5' desfosfatada com a enzima CIAP – “Calf Intestine Alkaline Phosfatase”. Para a reação de ligação utilizamos o kit “FastLink” da Epicentre com incubação de 2 horas a 20 °C.

Ao termino da ligação, a mistura é inserida em *E.coli* (DH₁₀B) competente (obtida pelo método químico de tratamento com CaCl₂) por transformação utilizando-se o método de choque térmico. Os transformantes são selecionados através da expressão do gene LacZ em placas de meio LA contendo X-Gal (40 µg/mL) dissolvida em N,N-dimetilformamida 100% (20 mg/mL).

3.26 Ensaio de Sensibilidade ao Peróxido de Hidrogênio [adaptado por Bandeira S]

As linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* W303 e BY4741 e as linhagens isogênicas deficientes de citocromo c oxidase *aW303Δcox11*, *aW303Δcox17*, *aW303Δcox19*, *BY4741Δcox23* e *aW303Δsco1* foram inoculadas em tubos corning (50 mL) contendo 20 mL de meio mínimo (WO) devidamente suplementado e incubadas por aproximadamente 24 horas a 30 °C sob agitação de 220 rpm. As culturas saturadas foram então transferidas (1:50)

para novos tubos contendo meio fresco e incubadas por mais 4h, quando o peróxido de hidrogênio (Sigma) foi adicionado em três concentrações distintas (6 mM, 8 mM e 10 mM). A cultura foi incubada nas mesmas condições por mais 1 hora ou 2 horas. Diluições seriadas de 10 X foram então esgotadas em meio YPD sólido e incubadas por aproximadamente 36 horas a 30 °C. Depois disso a viabilidade das colônias foi comparada com as linhagens não tratadas.

3.27 Meio Sólido Para Detecção De Siderófero Em *Paracoccidioides brasiliensis*

[adaptado por Bandeira S]

Para o meio sólido prepara-se uma solução contendo: 5 mM KCl; 7,5 mM NH₄OAc; 8,5 mM NaCl; 1 mM Tris; 10 mM MgSO₄; 1 mM KH₂PO₄:K₂HPO₄; 1 mM CaCl₂; 0,2% glicose e 0,3% casaminoácido, pH final: 5,6, (2% Agar).

Em um recipiente separado, prepara-se outra solução contendo o corante (CAS) complexado com ferro (FeCl₃.6H₂O) e HDTMA descrita por Bernhard e Neilands em 1987: (0,73 mg/mL de Hexadecyltrimethylammonium Bromide – HDTMA; 0,6 mg/mL Chrome Azurol B – CAS; 1 mM HCl e 0,1 mM FeCl₃.6H₂O). As duas soluções são autoclavadas separadamente e após o resfriamento até 50 °C, são misturadas e distribuídas em placas de petri do tamanho desejado.

Após a polimerização do meio o fungo é inoculado e à medida que for crescendo um halo alaranjado começa a se formar em volta da cultura indicando que o fungo está secretando sideróferos e que estes estão seqüestrando o ferro complexado com o corante (CAS-Fe/HDTMA).

3.28 Meio Líquido Para Detecção De Siderófero Em *Paracoccidioides brasiliensis*

[adaptado por Bandeira S]

Para a detecção de sideróferos em meio líquido, o fungo é crescido em meio líquido (5 mM KCl; 7,5 mM NH₄OAc; 8,5 mM NaCl; 1 mM Tris; 10 mM MgSO₄; 1 mM KH₂PO₄:K₂HPO₄; 1 mM CaCl₂; 0,2% glicose e 0,3% casaminoácido) sem adição de ferro. Após aproximadamente sete dias de crescimento o sobrenadante da cultura é recolhido por centrifugação, seguido de filtração em seringa.

A detecção é obtida quando misturamos (volume/volume) o sobrenadante com a solução de detecção (Schwyn e Neilands, 1987).

3.28.1 Para 100 mL de solução de detecção

Um volume de 6 mL de uma solução de 10 mM HDTMA é colocada em uma erlenmeyer de 100 mL e diluída com um pouco de água. Em seguida adiciona-se 1,5 mL de uma solução contendo (1 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 10 mM HCl) e 7,5 mL de 2 mM de solução de CAS são adicionados sob agitação. Adiciona-se 4.307 gramas de piperazine dissolvida em água e 6,25 mL de 12 M HCl são adicionados cuidadosamente e o volume é então acertado para 100 mL total com água. O pH final deve ser de igual a 5,6. Esta solução deve ser mantida protegida de luz.

4 RESULTADOS

O objetivo deste trabalho foi estudar um conjunto de genes nucleares do fungo *Paracoccidioides brasiliensis* relacionados à expressão funcional do complexo da citocromo c oxidase mitocondrial (COX).

Para identificação dos genes de *P. brasiliensis* utilizamos um banco de dados com aproximadamente 20 mil seqüências de ESTs - “Expressed Sequence Tags” provenientes de projetos de seqüenciamento de genoma (Goldman et al., 2003, Felipe et al., 2003 e Felipe et al., 2005), depositadas no GenBank/NCBI.

A seleção das ESTs de *P. brasiliensis* foi realizada por comparação com as seqüências de polipeptídeos de *S. cerevisiae* que atuam como subunidades estruturais ou participam direta ou indiretamente na montagem e manutenção deste complexo.

Para seleção dos clones de seqüências ESTs de *P. brasiliensis*, com alto grau de similaridade aos genes de *Saccharomyces cerevisiae*, utilizou-se cerca de quarenta e quatro (44) seqüências de proteína de *S. cerevisiae* como sondas para as buscas *in silico*. No processo de identificação dos clones utilizamos a ferramenta TBLASTn do BLAST disponível na página do banco de dados do consórcio paulista disponível em: <http://143.107.203.68/pb/frame2.htm>, onde contamos com uma réplica do banco de dados do NCBI já disponível publicamente.

No total, identificamos e estudamos dezenove genes de *P. brasiliensis* envolvidos na biosíntese do complexo citocromo c oxidase mitocondrial (Tabela 4). Quase todos os genes estudados foram clonados das bibliotecas de ESTs (Goldman et al., 2003; Felipe et al., 2003), com exceção do gene *PbPET191* que foi amplificado diretamente por reação de PCR a partir do genoma nuclear de *P. brasiliensis* e o genes *PbCOX8* e *PbSCO1* que foram clonados a partir de cDNA sintetizado a partir de RNA total de *P. brasiliensis*.

TABELA 4: Genes de *P. brasiliensis* Completos com Sequências Depositadas No GenBank/NCBI

Gene <i>S. cerevisiae</i>	Gene <i>P. brasiliensis</i>	Identidade	Positivos	Numero de Acesso no NCBI
<i>ScCOX4</i> (155aa)	<i>PbCOX4</i> (197aa)	50%	69%	AY603795
<i>ScCOX5A</i> (153aa)	<i>PbCOX5A</i> (204aa)	36%	56%	AY603790
<i>ScCOX6</i> (148aa)	<i>PbCOX6</i> (171aa)	58%	73%	AY603791
<i>ScCOX8</i> (78aa)	<i>PbCOX8</i> (86aa)	32%	47%	EF681771 - EF988665
<i>ScCOX9</i> (59aa)	<i>PbCOX9</i> (62aa)	30%	60%	AY603792
<i>ScCOX11</i> (300aa)	<i>PbCOX11</i> (253aa)	54%	74%	EF679210 - EF679211
<i>ScCOX12</i> (83aa)	<i>PbCOX12</i> (141aa)	79%	87%	AY603794
<i>ScCOX13</i> (129aa)	<i>PbCOX13</i> (142aa)	37%	52%	DQ003716
<i>ScCOX15</i> (486aa)	<i>PbCOX15</i> (491aa)	50%	66%	DQ003717
<i>ScCOX16</i> (118aa)	<i>PbCOX16</i> (135aa)	39%	56%	AY842443
<i>ScCOX17</i> (69aa)	<i>PbCOX17</i> (78aa)	47%	67%	DQ003718
<i>ScCOX19</i> (98aa)	<i>PbCOX19</i> (107aa)	51%	63%	DQ003414
<i>ScCOX23</i> (151aa)	<i>PbCOX23</i> (76aa)	43%	66%	DQ402182
<i>ScMSS51</i> (436aa)	<i>PbMSS51</i> (514aa)	38%	53%	DQ003715
<i>ScPET100</i> (111aa)	<i>PbPET100</i> (103aa)	42%	68%	AY603796
<i>ScPET112</i> (541aa)	<i>PbPET112</i> (603aa)	31%	52%	DQ402183
<i>ScPET191</i> (108aa)	<i>PbPET191</i> (123aa)	47%	67%	não depositado
<i>ScOXA1</i> (402aa)	<i>PbOXA1</i> (474aa)	27%	46%	DQ836715
<i>ScSCO1</i> (295aa)	<i>PbSCO1</i> (304aa)	53%	75%	EF679209

A presença de segundo número de acesso do NCBI para os genes *PbCOX8* e *PbCOX11*, refere-se ao depósito da sequência da região genômica do gene.

Para cada clone identificado, o inserto de cDNA ou de DNA contendo os genes de interesse foram completamente seqüenciados para obtenção da sequência completa e confirmação da presença da fase aberta de leitura (ORF) – “Open Reading Frame”. Os genes completos foram clonados em vetores de expressão e submetidos a testes de complementação funcional heteróloga em mutantes de *S. cerevisiae*. Obtivemos sucesso em quatro complementações funcionais da função respiratória com os genes *PbCOX6*, *PbCOX17*, *PbCOX19* e *PbOXA1*. Estes resultados indicam que os genes acima descritos de *P. brasiliensis* são homólogos aos genes de *S. cerevisiae*, pois complementam a função respiratória dos mutantes.

Os genes *PbCOX8*, *PbCOX13* e *PbPET191* não foram submetidos a teste complementação. O restante dos genes (Tabela 4) embora apresente similaridades significativas não são capazes de substituir a função de seus homólogos em mutantes de *S. cerevisiae*.

4.1 Estudo dos Genes de *P. brasiliensis*

4.1.1 *PbCOX5A*

Para o estudo deste gene selecionamos o clone referente à EST-VP1-Pb30001-211E08 pertencente ao consórcio paulista (Goldman et al., 2003). Analisando a sequência completa do inserto deste clone através da ferramenta ORFfinder do NCBI identificamos a região codificadora (ORF- Open Reading Frame) completa do gene *PbCOX5A* que codifica para uma proteína constituída de 204 resíduos de aminoácidos (AY603790). A comparação da sequência protéica da *PbCox5Ap* com as seqüências desta proteína de outros organismos pode ser observada na figura 1. Há regiões bem conservadas entre os diversos organismos entretanto existe uma extensão da porção N-terminal somente nas proteínas de *P. brasiliensis* e de *A. nidulans*. Outra diferença que pode ser significativa é a ausência de um bloco bem conservado de oito resíduos de aminoácidos (**SEGYSGKG**) na porção C-terminal somente das proteínas *Cox5Ap* e *Cox5Bp* de *S. cerevisiae*. Em *S. cerevisiae* a proteína *Cox5Ap* possui uma homóloga que é a *ScCox5Bp*. Embora *ScCox5Ap* seja preferencialmente expressa, na ausência dessa, a *ScCox5Bp* é capaz de sustentar cerca de 12 a 15% da capacidade respiratória do mutante de *ScCox5Ap* (Trueblood e Poyton, 1987).

A análise da sequência de DNA deste gene, através da ferramenta nebcutter disponível na página da New England Biolabs (www.neb.com), indicou ausência de sítios de restrição apropriados para a excisão da ORF direcionada para a construção do novo recombinante em vetor apropriado para expressão em *S. cerevisiae*. Portanto, oligos iniciadores específicos foram sintetizados para amplificação da região da ORF e inserção dos sítios de enzimas apropriados (*SacI* e *PstI* nas extremidades 5' e 3' respectivamente). Os oligos foram desenhados utilizando-se a ferramenta Primer Select do programa DNASTAR, Inc. Após a reação de amplificação por PCR da região da ORF, o produto de PCR foi digerido com as mesmas enzimas, isolado em gel 1% agarose eletroeluido e purificado por precipitação com etanol. O fragmento *SacI/PbCOX5A/PstI* foi ligado (reação descrita em Material e Métodos) no vetor de expressão em *S. cerevisiae* pMGL3 (Fig. 2) previamente linearizado com as enzimas *SacI* e *PstI* e tendo as extremidades 5' desfosforiladas com a enzima CIP- Calf Intestine Phosphatase. A mistura de ligação foi então inserida por transformação em *E.coli* DH₁₀B competente. Coletamos nove transformantes aleatoriamente para extração dos pDNAs que foram analisados por digestão enzimática e por seqüenciamento confirmando a presença do gene. O clone selecionado (*pMGL3/PbCOX5A*) foi utilizado no ensaio de complementação

heteróloga no mutante de *S. cerevisiae* *aBY4741Δcox5a/MLHU*. A transformação foi realizada pelo método de LiOAc e os transformantes foram selecionados em meio específico (meio mínimo WO suplementado) e testados quanto à capacidade de restauração da capacidade respiratório do mutante em meio com fonte de carbono não fermentável etanol/glicerol. Após incubação a 30 °C por período apropriado verificamos que este gene *PbCOX5A* de *P. brasiliensis* não foi capaz de restaurar a capacidade respiratória do mutante *aBY4741Δcox5a/MLHU* de *S. cerevisiae* mostrando que embora haja similaridade entre as proteínas de *P. brasiliensis* e *S. cerevisiae* (36% de identidade e 56% de positivos - Tabela 1) a *PbCox5Ap* não é ortóloga a proteína *ScCox5Ap*.

COX5A

```

An_a_ 1 MFLRSVTRAAARSSAVPTTGLRSYR-----TVSGPMACLNARPQTEKKSIPQOQTR----
An_b_ 1 MFAPSI SRAVARSSAMPMPAIRSYR-----TISSPMTCVNARPQAEKKSIPAAQOQTR----
Pb    1 MSFRAIPRGLAASTRCTRPIIAYSSSPSSSSSSSIRCLNAGRTCSANGLSSRSQQSRSM
Nc    1 -----MLRTPVTSALVRNVAVRAAKPTMPVR-----
Pa    1 -----MSSAVRNALVRASRPATPAALGRR-----
Mg    1 -----MLRRTGSAMLRRSVVQATAR--R-----
Sc_a_ 1 -----MLRNTFTRAGELSRITSVRFQOT-----
Sc_b_ 1 -----MLRRTSLTKG---ARLTGTRFVQT-----
Sp    1 -----MKLLCTRNAATVSAATNALQKEQP-----

An_a_ 52 AASEHAIANPTLAGIEKRWEAMPPQEQAEIWMQLRDRMKVDWHQMTIQEKKAAYWISFGP
An_b_ 52 AASEHAIANPTLAGIEKRWEALPPQEQADLWMQLRDRMKVDWHQMTIQEKKAAYWIAFGP
Pb    61 ATAETHAIANPTLAGIEKRWESMPPQEQAEIWMQLRDRMKVDWHEMTIQEKKAAYWIAFGP
Nc    27 AASTMFI SNPTLANIEKRWEQMPMQEQAEIWMQLRDRMKGNWADLTIQEKKAAYWIAFGP
Pa    24 AATTHAISNPTLANIEKRWEQMPMQEQAEIWMQLRDRMKGNWADLTIQEKKAAYWIAFGP
Mg    22 ASSTHAISKPTLANIEKRWESMPLQEQAEIWMQLRDRMKGNWADLTIQEKKAAYWISFGP
Sc_a_ 24 ----HAI SNAAVMDLQSRWENMPSTEQDITVSKLSEROKIPWAQLTIEPKQAVWYISYGE
Sc_b_ 21 ----KALSKATLTDLPERWENMPNLEQKEIADNLTEROKIPWKTINNEETKAAWYISYGE
Sp    26 -SGEAMIAERPLVDLDRKRWGIMSQEEKDGLITDLYARQKQPWITLSEKKAAYWIAFGE

An_a_ 112 HGPR-SVPPKGENLKIFFKVAQLTLVSVFGIFYVIHLFA-KPQPKMTKEWQEASNEYAKQ
An_b_ 112 HGPR-SQPPKGENLRIFFKVAQLCVSVVGLFYFIHLFA-KPLPKMTSKEWQEATNEYALR
Pb    121 HGPR-AETLKGEGVKVVFQVMKYVAISFVVFYTRMFA-NPPPKTLTKEWQEATIEYAKR
Nc    87 HGPR-ALPPPGEQKQVLAITVAGVFLSFVIFATMRAFA-KPPPAITMKEWQEATNEYLKA
Pa    84 WGPR-TEPPOGEGKKVFLYTVIGLVTAIFGTMRFA-KPAPAITMKEWQEATNEYLKA
Mg    82 HGPR-ALDPPDEGKKVAMGVAIGLAVSEMI FATMRFA-KPAPHTMKEWQEATNEYLKS
Sc_a_ 80 WPRRPVLNKGDSSFTAKGVAAGLLFSVGLFAWRMAG-GQDAKTMKEWQLKSDYLKS
Sc_b_ 77 WPRRPVHGKGDVAFITKGVFLGLGTSFGLFGLVRLANPETPKTMKEWQLKSDYLKS
Sp    85 HGPR--AFSHISQKTVFWGTVAGLTIGVWVLFGLRTOA-AFSPRMTKEWQEKSENYMKE

An_a_ 170 EKINPIYGISAEGYEGKGFVQSPPAEKQ-----
An_b_ 170 EKINPIYGVSSQGYEGKGFVQSPPADKS-----
Pb    179 EKLDPIYGISSEKYAAKHIONAPAKK-----
Nc    145 QKSDPLTGLTISEGYNGKGHVQSPSAS-----
Pa    142 QNSDPLTGLSSEGYKKGKHTQSPSSKA-----
Mg    140 QNTEPLTGLSSEGYSGKGVQSPPAASKH-----
Sc_a_ 139 KNANPWGGYS-----QVQSK-----
Sc_b_ 137 KNANPWGGYS-----QVQSK-----
Sp    142 NKINPISGEASEGFKGRGQISGGIFSPSEKDKK

```

FIGURA 1: Alinhamento da *PbCox5Ap* de *P. brasiliensis* (Pb) com as proteínas homólogas.

de *Aspergillus nidulans* (An), *Magnaporthe Grisea* (Mg), *Podospora anserina* (pa), *Neurospora crassa* (Nc), *Schizosaccharomyces pombe* (Sp) e *Saccharomyces cerevisiae* (Sc). An_a e Sc_a representam a seqüência da *Cox5ap* de *A. nidulans* e *S. cerevisiae*, respectivamente enquanto que An_b e Sc_b, a seqüência da *Cox5bp*.

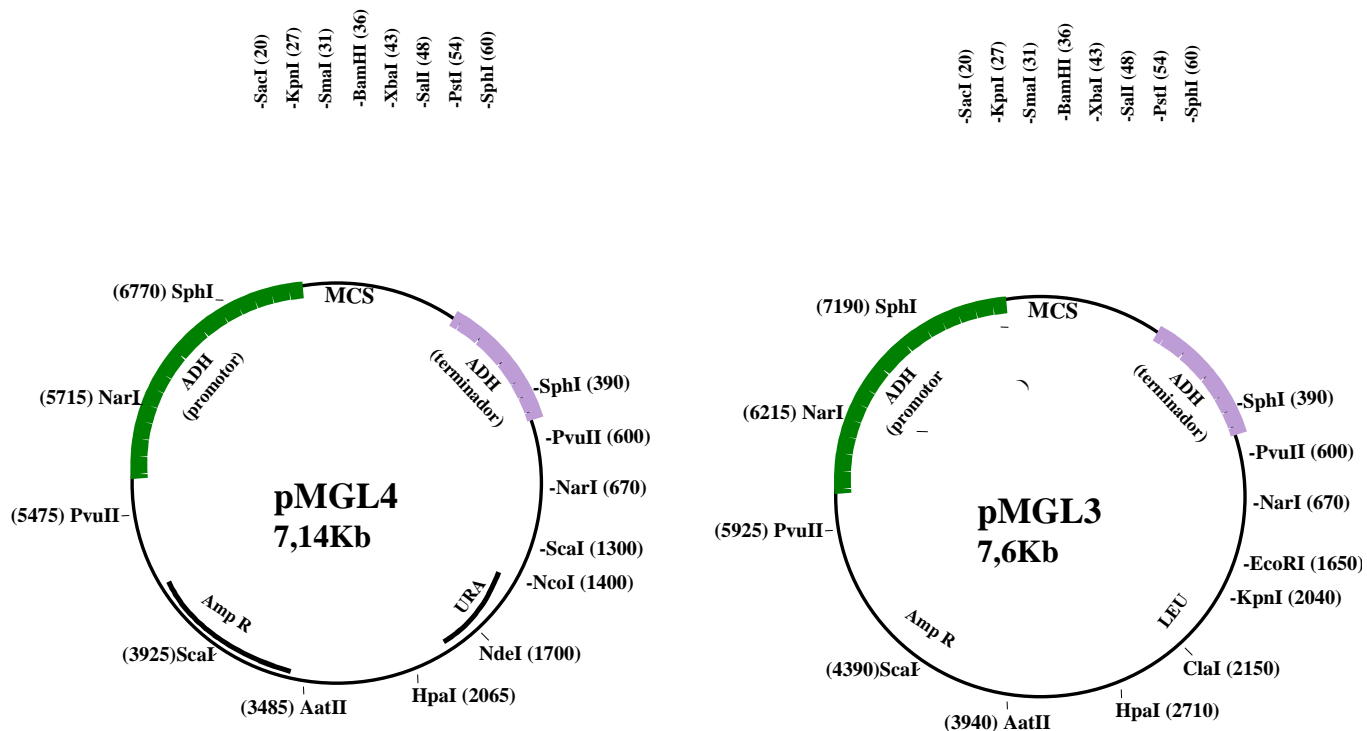


FIGURA 2: Vetores de expressão em *Saccharomyces cerevisiae*.

Os vetores de expressão pMGL3 e pMGL4 foram construídos a partir dos vetores “ponte” YEp351 e YEp352, respectivamente, com inserção do promotor e terminador do gene de alta expressão em levedura ADH1 (Álcool desidrogenase). Estes vetores foram construídos pela Dra. MOIRA GLERUM da Universidade Alberta no Canadá.

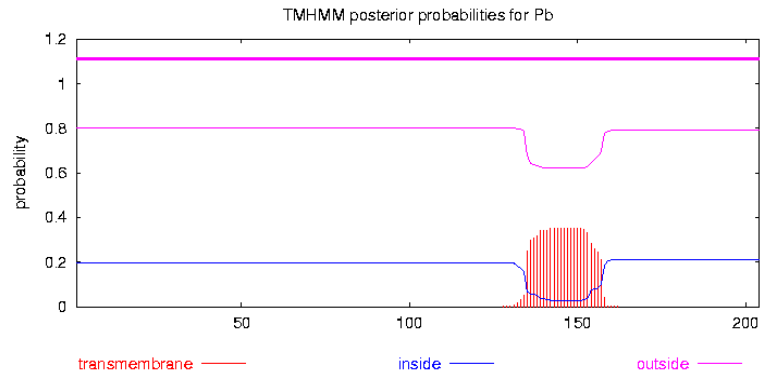
Uma análise quanto à presença de resíduos característicos de hélices transmembrana indica que a proteína *PbCOX5A* de *P. brasiliensis*, possui cerca de sete resíduos de aminoácidos característicos de região de hélice transmembrana (Fig. 3A) o que pela ferramenta utilizada, não foi suficiente para a predição de uma hélice transmembrana (existente na proteína homóloga de *S. cerevisiae*). Entretanto, Analisando a sequência da proteína *ScCox5A* de *S. cerevisiae* a região correspondente (Fig. 3B) corresponde a uma hélice transmembrana. Esta observação sugere que a proteína de *P. brasiliensis* possa não ser capaz de se inserir corretamente na membrana mitocondrial o que poderia justificar a incapacidade de complementação funcional heteróloga.

A

```

# Pb Length: 204
# Pb Number of predicted TMHs: 0
# Pb Exp number of AAs in TMHs: 7.55778
# Pb Exp number, first 60 AAs: 0.00047
# Pb Total prob of N-in: 0.19705
Pb      TMHMM2.0      outside      1      204

```



B

```

# Sc_a Length: 153
# Sc_a Number of predicted TMHs: 1
# Sc_a Exp number of AAs in TMHs: 20.96889
# Sc_a Exp number, first 60 AAs: 0.01263
# Sc_a Total prob of N-in: 0.69999
Sc_a_  TMHMM2.0      inside      1      92
Sc_a_  TMHMM2.0      TMhelix      93     115
Sc_a_  TMHMM2.0      outside     116     153

```

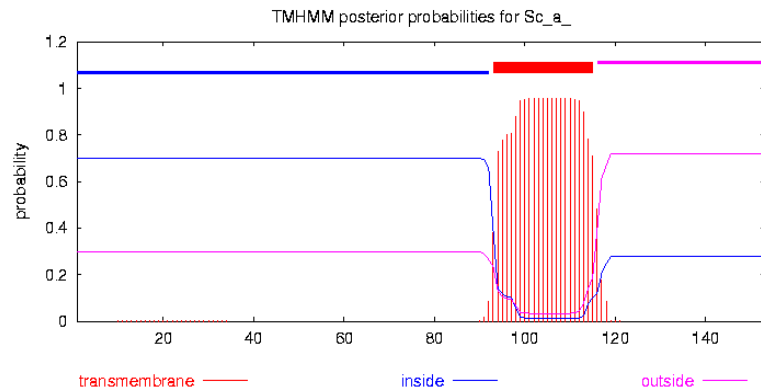


FIGURA 3: Análise de resíduos característicos de hélices de transmembrana na *PbCox5Ap*. obtida a partir da ferramenta TMHMM Server v. 2.0 disponível na página <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>. 3B: Refere-se à mesma análise com a proteína *ScCox5Ap* de *S. cerevisiae*.

4.1.2 *PbCOX6*

Para os estudos deste gene de *P. brasiliensis* escolhemos o clone referente à EST-RC2-PbNEW1-155A05 cuja sequência protéica predita (AY603791) apresenta cerca de 70% de similaridade à proteína de *S. cerevisiae* (Tabela 4). O clone referente a esta sequência de EST pertence à biblioteca do consórcio paulista (Goldman et al., 2003). A partir do sequenciamento completo e obtenção da sequência total do inserto deste clone, a sequência protéica foi comparada à sequência da proteína *Cox6p* de *S. cerevisiae* utilizando-se a ferramenta BLASTx do NCBI. Esta análise confirmou sua identidade (58%) e similaridade (73%) com a sequência da *ScCox6p* de *S. cerevisiae* (Tabela 4). A análise através da ferramenta ORFFinder identificou uma ORF com 171 resíduos aminoácidos referente a *PbCox6p* de *P. brasiliensis*. O mapa físico de restrição obtido a partir de análise com a ferramenta nebcutter da New England Biolabs indicou os sítios para as enzimas *SacI* e *XbaI* como apropriados para a realização da excisão da ORF direcionada à construção do recombinante deste gene no vetor de expressão pMGL3 de *S. cerevisiae*. Os recombinantes selecionados após transformação em *E.coli DH10B* foram confirmados por dupla digestão com *SacI/PstI* e por sequenciamento. O recombinante selecionado *pMGL3/PbCOX6* foi inserido por transformação no mutante deficiente respiratório de *S. cerevisiae* (*aW3O3Δcox6::URA*) e os transformantes selecionados foram testados quanto à capacidade de restauração da função respiratória. Após aproximadamente 48 horas de incubação a 30 °C verificamos o crescimento comparável ao da linhagem selvagem (Fig. 4) em meio de cultura com fontes de carbono não fermentável (EG) indicando que a proteína *PbCox6p* de *P. brasiliensis* é capaz de restaurar a capacidade respiratória do mutante *aW3O3Δcox6::URA* de *S. cerevisiae*. Este resultado foi confirmado posteriormente através da técnica de transformação reversa (“Back transformation”) onde o recombinante (vetor::gene) é extraído da linhagem recombinante competente respiratória é novamente testado em complementação heteróloga, confirmando ser este o agente da complementação funcional.

A *ScCox6p* de *S. cerevisiae* codifica para a subunidade VI da citocromo oxidase e é constituída de 148 resíduos de aminoácidos, portanto em *P. brasiliensis* esta proteína é acrescida de 23 resíduos de aminoácidos (total 171aa) sendo que a maioria deles estão na região N_terminal da proteína (Fig. 5). Embora haja esta inserção de aminoácidos nesta região, a proteína de *P. brasiliensis* contém a maioria dos resíduos de aminoácidos conservados nos outros fungos analisados (Fig. 5) o que provavelmente favorece o

endereço correto da proteína para a mitocôndria. Além disso, o restante da proteína apresenta um alinhamento homogêneo com as proteínas homólogas.

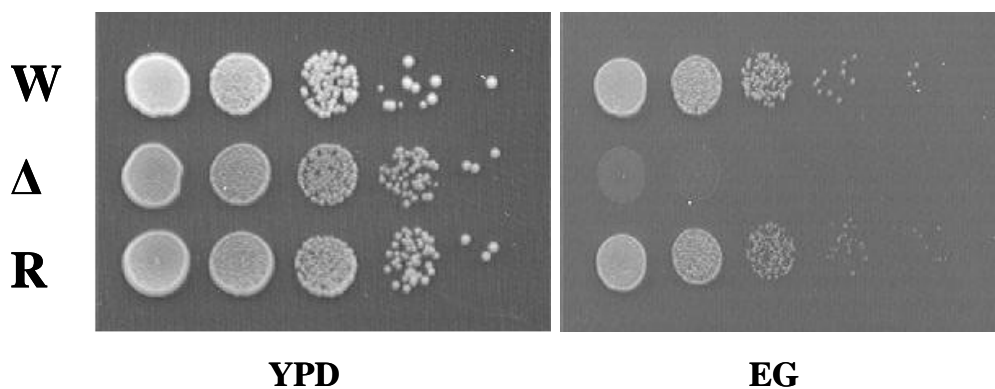


FIGURA 4: Complementação funcional heteróloga do gene *PbCOX6* no mutante de *S. cerevisiae*. Crescimento das linhagens selvagem (W), mutante deficiente respiratório de *S. cerevisiae* com deleção do gene *COX6* [*COX6aW3O3Δcox6::URA* (Δ)] e o recombinante *aW3O3Δcox6::URA/ pMGL3/PbCOX6* (R) em meio de crescimento YPD e em meio contendo etanol/glicerol (EG) após 48 horas de incubação a 30 °C.

COX6

Pb	1	MMSSTTFEFLASRTA-PVNVFRASYSARSRAATTPWASTAASAIVAFGGLSSFSTTSRC
Nc	1	---MASFFRTAVRGP-SAGLFRVAVRPPQ-----TAAR--VSLFSTSSRFR-----
Mg	1	--MSASLLRRTAARGP-ATAFLRTHAVARESMARAATAPALSAVNSNNSFSSSARLR--
An	1	-MPSISVFRLATRAVRPSGLFRASQLPRAR-----VQTPAALIGRPAFSTSMKLR--
Sc	1	----MLSRATFRNF---VINRNTLLRARPG-----AYHATRLTNTFTIQSRKYS--
Sp	1	----MKAVQRIFQTG-----RFSVAAGPS-----VRFCAGFLAANQVRF-----
Pb	60	AGHSAHEEETFEFVSARYEKEFDAVQDVFEHQRNLNNAFAYDLVPSVSVMTAALKAARR
Nc	41	----SEHHEETFEFVTARYEKEFDAVQDVFEHQRNLNNAFAYDLVPSVSVLAAALKAARR
Mg	56	---AGPHAEETFEFVSARYEKEFDAVQDVFEHQRNLNNAFAYDLVPSVEVLKAALKAARR
An	50	---SGQHDEETFEFVSARFEKEFDGVQDVFEHQRNLNNAFAYDLVPSVEVLSAALRAARR
Sc	42	----DAHDEETFEFVTARYEKEFDEAYDLFEVQRVLNNAFAYDLVPAFAVTEKALRAARR
Sp	38	----SNHGVSLEEINTKYNDFFSNVQDQFELQRLNNAFAYDLVPSVSDVTEQALRAARR
Pb	120	VNDFPTAVRIFEGIKAKVENKQYEMYLEELKGLREELGVTIQEELYPEEKK---
Nc	97	VNDFPTAVRVFEGIKAKVENKQYEQYLAELKPLREELGVTILKEDLYPEEAN---
Mg	113	VNDFATAVRIFEGIKAKVENDGQYKQYLEELKPLREELGVTPLKEDLYPEGEAAH
An	107	VNDFPTAVRVFEGIKAKVENKQYKQYLEALEGLRQELGVPVREELYPDEE----
Sc	98	VNDLPTAVRIFVFEALKYKVENEDQYKAYLDELKDVROELGVPVKEELFESSS----
Sp	93	VNDFPTAVRIFEGIKVKLPTKEQYQAYVKEELKFCNELGIVLKEDLFK-----

FIGURA 5: Alinhamento da *PbCox6p* de *P. brasiliensis* (Pb) com as proteínas homólogas de *Aspergillus nidulans* (An), *Magnaporthe Grisea* (Mg), *Neurospora crassa* (Nc), *Schizosaccharomyces pombe* (Sp) e *Saccharomyces cerevisiae* (Sc).

A análise da sequência protéica da proteína *PbCox6p* quanto a presença de uma região característica de aminoácidos de hélice transmembrana indica uma certa quantidade destes resíduos característicos (aminoácidos em hélices de transmembrana) nos primeiros 60 resíduos de aminoácido da proteína *PbCox6p* (Fig. 6) entretanto, a predição deste tipo de aminoácido na região N-terminal pode ser uma indicativa de um peptídeo sinal e não de uma hélice transmembrana. Esta observação sugere que os resíduos excedentes encontrados na região N-terminal da proteína de *P. brasiliensis* em relação à proteína de *S. cerevisiae* (Fig. 5), constituiriam uma porção de peptídeo sinal desta proteína e que seria então retirada no processo de importação para a mitocôndria.


```

# Pb Length: 171
# Pb Number of predicted TMHs: 0
# Pb Exp number of AAs in TMHs: 5.58336
# Pb Exp number, first 60 AAs: 5.43901
# Pb Total prob of N-in: 0.13702
Pb      TMHMM2.0      outside      1      171

```

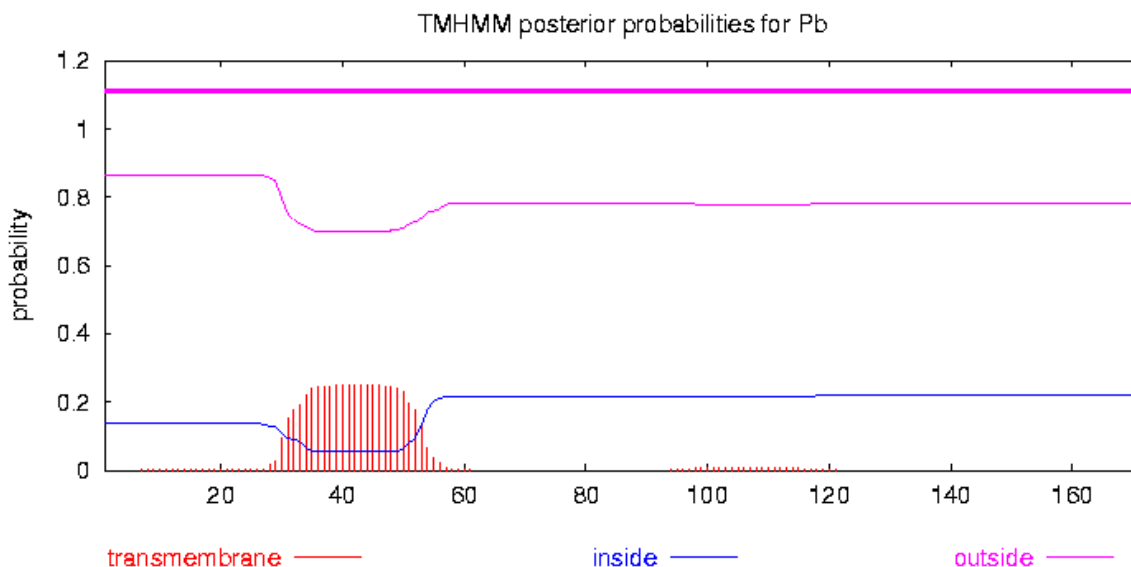


FIGURA 6: Análise de resíduos característicos de hélices de transmembrana na *PbCox6p*. obtida a partir da ferramenta TMHMM Server v. 2.0 disponível na página <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>.

4.1.3 *PbCOX8*

Usando a proteína *ScCox8p* de *Saccharomyces cerevisiae*, identificamos no banco de dados de *Paracoccidioides brasiliensis* a EST018969 depositada do GenBank/NCBI sob o número de acesso CN253032 referente ao isolado Pb01 (Felipe et al., 2003). A análise por BLAST-x indica que a sequência da EST018969 apresenta 30% de similaridade na porção do alinhamento com a sequência da proteína *Cox8p* de *S. cerevisiae*.

Utilizando a sequência da EST018969 para uma nova busca no banco de dados identificamos um clone de DNA genômico de *P. brasiliensis* RST-VP1-Pb30003-012G11 (pertencente a uma biblioteca construída Nobrega, M e colaboradores) contendo uma região de aproximadamente quarenta nucleotídeos com 90% identidade à EST018969, correspondente ao gene *PbCOX8*. Este clone de DNA genômico foi isolado e totalmente sequenciado utilizando-se a técnica de inserção de transposons descrita em material e métodos, obtendo-se um consenso com aproximadamente 1971bp. A região codificadora do

gene *PbCOX8* (fase aberta de leitura – ORF) foi identificada na porção central do fragmento. O gene *PbCOX8* está interrompido por dois íntrons como pode ser observado na figura 7. As seqüências dos íntrons, bem como os motivos canônicos de borda intrônica [(5' GT...AG 3' (Reinoso et al., 2005)], também podem ser observados na Fig. 7. A seqüência nucleotídica e a seqüência predita da proteína foram depositadas no GenBank/NCBI sob o número de acesso EF988665.

```
>PbCOX8
ATGTTGTATAAGACGACAGTCTCCCGCCGTATTAGAACCATCCTTCACAAGCCCATTGACTGTCTCTTTCTG
CTCTTGTCTTCTTGGCTCGAGGTTTGGGGGCTCCTTGAGGAGGAATTCCTGAAAGGGGTTTATCCTCAAACA
CATTGAACAGATCGTCCATGTTGGGTAGACAGTCCACTGAAATCCCTTTTAATTCCTCCGACGCTGCGTTGTG
GAAAGTCTCCAGCTGCATCTATATACAACCTTTTATGCGACTAAGTTTGTAAAATTGTCAAAATTGCATCG
GCGAAACTCTCCGATAAGGTTTCTCCGATTGATTTGGCTGGGAGCTAGTTATATCACGTGTTATGGACTCA
GGCTGAGTCAGCAAGAGTTGCCAACTAACGTCGGGAGGAGTTCAAGAGACATTCTTCTGTATATTCCCGTCT
ACGACACAACCTCAAAGTCAATTCTGCCTCGACAGCATCCTAAAGGTACGGGCTAGTCCCTAGTGGCATCAGTC
CGCTCAGTCTGTTGCTAACTGGCCGTTCAAGATGATCGCTCAAACCGCAACCCGTGCCAGAATGGCCACCACC
ATTGCCCGCCGTGGCCTCCACTCCTCCCGCCCGCAGATGGCCAGTCCCTTTCCATTACCCAGAGGGCCCTCGCT
CTAATCTCCCCTTTAATCCCTTTGACGAAGTATTTCTTCTTGAGATATTGGGGCTTTGTGGTAAAGTAGGAATT
TCTCCGAATTATGTGGCCACTATTCGATTGCTGACAACCTGTAGCTGTTGGTTTCGGCGCTCCCTTCGCTATT
GCTGTAATACTTAAACCCAATGTACCATCATATATGTGCAAGTAAACACTAATAACAATGATAAACATC
TGGCAAACCTAAGAAAACCCAAGTAAACGTGTTGGCAAGTTTATTTATTGATCTGGACCGTGGTGATGTGACA
AGGAAGATGTTCTTTAAAGTTCACATAGGTTGTTTGTGTTGACTTTGTAATGTGTATATACATAGTTGCGGAGC
TAGAATTACCATAAAGTCAAATCTCCCATGTTGCCATAGCTAGATATGTGTAATTCGAAAATATTGTATGG
TGGGTGCTGTATTAGACTATTTATAAGGAGTTTGTGTTGGTTGAGCCAGTTCATGGATGCAGAAAAAATT
GTTACTCACCCCAAAAGAAAATTGAGAAGCACATTTATTTTACCTTCGCTTGAATTACATCTATCCCA
ACCAACAACCTCATAATAGACTATGACGCCGTGCGCTTAAAATACCAGACTGTATGGGATAGTATTTAAAATA
AAAAGGTGTTCTCGAACCTAGGTACAGCGCATACGGTCAATATAAAATGCGCAATTTGAGGAACATACACCTG
CGCGAGACTCCGCTTGGGGGGGAGCTGCCTCTGACTGCAACGGCATGGGATCCTGTGACGGATTCCATCCTTT
GCACATTTGGCCAACGAAACAAGTGTCTGATTGAACTGAAACGAAAAGTGCAGGATGCAAACGAGGAGGC
GGAGGATATCCAGTTGATCACCTCTTGGGATGCACCATGTCCGCTCCAGATTTGCAACATGACAGAGTTTTA
TCATTGCAATATTTTGCAGATACTTTAGTTACATGCCTTGTGTTAGAAGGCGGTGATATCATAGTTGTGCGTG
AAGACCCCAACCGGGCGAGGACAAAATTGAAATCGTGGGGTCAAGTGCAGTGGGAATTACAGCAGCGGCATG
GTCTCCGGATGAAGAGCTACTTGCAGTCACCACCAGGTCCAACACACTTCTCTATATGACAAGGGATTTCGAA
AATGTGGCCAACATTGCATTACAAGCGACGATCTCAAGGCGTCAAGACATGTTTCTGTTGGCTGGGGAAAAA
AGGAGACACAGTTTCAGGGCAAGAGAGCAAAAGCTCTGAGGGACCCGACGATA
```

FIGURA 7: Análise da seqüência consenso da RST-VP1-Pb30003-012G11.

Indicando a região codificadora do gene *PbCOX8* de *P. brasiliensis* na posição mais central do fragmento. Na porção C-terminal pode se observar uma região N-terminal de outra proteína hipotética de *P. brasiliensis*.

Para obtenção da seqüência expressa (cDNA) deste gene e confirmação da localização dos íntrons, sintetizamos um par de oligos específicos ([Forward: 5'-GGGCTAGTCCCTAGTGGTACCAGTCCGCTCA e Reverse: 5'-CCTATGTGAACTTTCTAGAACATCTTCCTT]) para amplificação do gene *PbCOX8* a partir de cDNAs Poli(T). Obtivemos um produto de PCR com aproximadamente 369bp que foi clonado em vetor TOPO TA Cloning/Invitrogen. Por seqüenciamento do fragmento amplificado, identificamos a fase aberta de leitura para a proteína *PbCox8p* contendo 86 resíduos de aminoácidos. Esta análise confirma o resultado predito da seqüência genômica e a confirmação da presença e localização dos íntrons. Esta seqüência encontra-se depositada sob o numero de acesso EF681771. O produto constituído por 86 resíduos de aminoácidos possuiu uma região característica de aminoácidos em hélices de transmembrana entre os resíduos 49 e 71 (Fig. 8) e estima-se que a proteína predita tenha uma massa de aproximadamente 9689.34 Daltons.

```
# Sequence Length: 86
# Sequence Number of predicted TMHs: 1
# Sequence Exp number of AAs in TMHs: 22.22797
# Sequence Exp number, first 60 AAs: 10.77505
# Sequence Total prob of N-in: 0.89295
# Sequence POSSIBLE N-term signal sequence
Sequence      TMHMM2.0    inside    1    48
Sequence      TMHMM2.0    TMhelix  49    71
Sequence      TMHMM2.0    outside   72    86
```

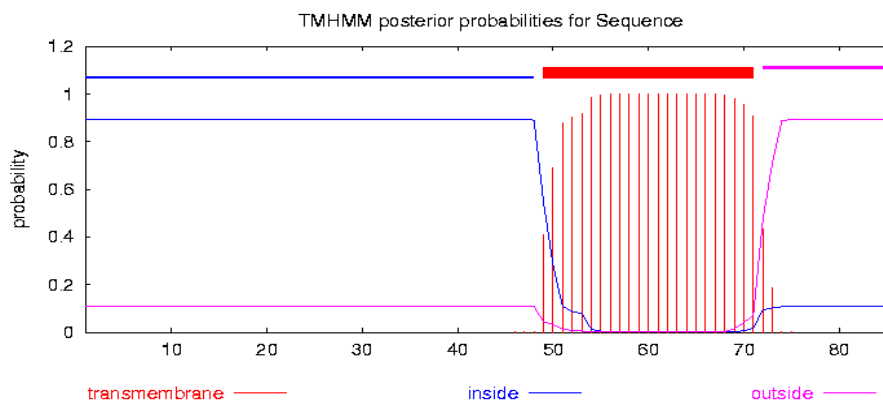


FIGURA 8: Análise de resíduos característicos de hélices de transmembrana na *PbCox8p*.
 características obtida a partir da ferramenta TMHMM Server v. 2.0 disponível na página
<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>.

Os estudos com este gene não foram concluídos faltando ainda realizar a transferência do fragmento de cDNA contendo a região codificadora (ORF) para vetor de expressão em *S. cerevisiae* e o ensaio de complementação funcional heteróloga no mutante específico deste gene na levedura.

Na porção 3' do fragmento genômico seqüenciado (Fig. 6) pode-se observar o início de uma outra região codificadora que por comparação de seqüências observamos alta similaridade com a proteína AFUA_4G07140 "killer toxin sensitivity protein" (IKI3), putativa [*Aspergillus fumigatus* Af293].

A subunidade VIII da citocromo c oxidase foi inicialmente identificada por Power et al., 1984 que descreveu a seqüência polipeptídica da proteína *Cox8p* de *Saccharomyces cerevisiae* e também propôs um modelo para sua estrutura secundária. Devido à presença de uma região central altamente hidrofóbica estes autores sugerem que estes resíduos façam parte de uma região transmembrana da proteína *Cox8p*. A análise da seqüência proteica identificada como *PbCox8p* também indica a presença de uma região transmembrana corroborando nosso resultado (Fig. 8). Power et al., 1984 também destacam que a proteína *ScCox8p* possui uma região carboxiterminal com dupla lisina, fato que é confirmado quando Patterson e Poyton (1986) resolvem a estrutura genômica do gene *ScCOX8* de *S. cerevisiae*. Neste trabalho os autores demonstram por comparação da seqüência predita a partir da seqüência nucleotídica, com a seqüência da proteína *ScCox8p* (Power et al., 1984), que esta proteína assim como outras proteínas mitocondriais, codificadas no genoma nuclear, possui um peptídeo sinal de endereçamento mitocondrial. Além disso, a *ScCox8p*, assim como as subunidades VI e VIIa do complexo da citocromo c oxidase, é processada em ambas as extremidades e portanto em *S.cerevisiae* a *ScCox8p* é derivada de uma precursora maior sendo estendida por um peptídeo líder na região N-terminal com aproximadamente 22 a 27 resíduos e por um peptídeo trailer, com 4 resíduos, que se estende após o potencial sítio de clivagem lys-lys-COOH que constitui a região carboxiterminal identificado no seqüenciamento da proteína (Power et al., 1984). Na proteína *PbCox8p* também podemos identificar o sítio de dupla lisina (KK) (Fig. 9) na região C-terminal sugerindo que em *P.brasiliensis* este processamento C-terminal também existe e que portanto, sua porção C-terminal também possa ser dependente do processamento de uma protease.

A subunidade VIII do complexo da citocromo c oxidase é requerida para o nível máximo da respiração e da atividade da citocromo c oxidase entretanto, mutantes desta subunidade ainda são capazes de crescer em meio com fontes de carbono não fermentáveis como etanol e glicerol (Patterson e Poyton,1986).

COX8

```

Pb18      MIAQTATRAR----MATTIARRGLHSSRPQMASPFHYPEGPRSNLFPNPLTK--YFFLRY 54
Nc        MFSRVALRAAPRQQPFSLVARRTFQTTRAQLSSPYHYPEGPRSNLFPNPKTR--FFWFRY 58
Sc        MLCQQMIRTT-----AKRSSNIMTRPIIMKRSVHFKDGVIYENIPFKVKGRKTPYALSH 53
          *:::  *:           : :   :  . * : *  .*:**:  :   : : :

Pb18      WGFVAVGFGAPFAIAVWQTKKTQVNVLASVFI 86
Nc        LMYCVVGFSGSPVAIAVWQTYRPRS----- 82
Sc        FGFFAIGFAVPFVACYVQLKKSAGF----- 78
          :  .:**. *.. . *  :.

```

FIGURA 9: Múltiplo alinhamento das seqüências das proteínas *Cox8p* de do isolado Pb18 com as homólogas.

Neurospora crassa (*Nc*) e *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*). (*) significa que todos os resíduos são iguais na coluna; (:) significa que existe substituição conservada em algum resíduo na coluna e (.) significa que existe a substituição semiconservativa em alguns resíduos da coluna. A ferramenta ClustalW está disponível em http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_clustalw.html. Em lilás pode-se observar o duplo resíduo de lisina (KK) na região carboxiterminal. Estes resíduos são preditos como sitio de atuação de protease durante o processamento e importação da proteína *Cox8p* para a mitocôndria.

4.1.4 *PbCOX11*

Para o estudo do gene *PbCOX11* de *Paracoccidioides brasiliensis* identificamos o clone de EST-RC2-Pb30001-153C08, pertencente ao consorcio paulista (Goldman et al., 2003) entretanto, não foi possível obtermos este clone no banco de origem. Em uma nova análise utilizando como sonda a seqüência do inserto do clone da EST-RC2-Pb30001-153C08 depositada no banco de dados para uma nova análise de comparação com o banco de dados de seqüências de *P. brasiliensis*, identificamos um clone de seqüência genômica (RST-RC2-Pb30004-018D01) da coleção de RSTs –Random Sequence Tags (Nobrega, M e colaboradores), ainda não depositada em banco de dados publico. Esta seqüência apresentou um excelente alinhamento com 100% de homologia com a seqüência da EST sugerindo que este clone representava um fragmento genômico de *P. brasiliensis* contendo o gene *PbCOX11*.

O clone RST-RC2-Pb30004-018D01 foi inteiramente seqüenciado utilizando-se a técnica de inserção de transposons. Obtivemos um consenso com aproximadamente 2800bp. O gene *PbCOX11* está inteiro neste fragmento genômico que se encontra depositado no GenBank/NCBI sob o numero de acesso EF679211. A comparação de seqüências entre o consenso da seqüência genômica e a seqüência da EST RC2-Pb30001-153C08 demonstrou claramente a presença de três íntrons neste gene (Fig. 10). A seqüência dos íntrons, bem como os motivos canônicos de borda intrônica [(5' GT...AG 3' (Reinoso et al., 2005)] também podem ser observados na Fig. 10. Além do gene *PbCOX11* outra fase aberta de leitura esta presente neste fragmento e a proteína predita possui alta similaridade com a subunidade C de

um fator de replicação Rfc5 de DNA. A região intergênica entre esta proteína e a proteína *PbCox11p* consiste de aproximadamente 0,5Kb.

```
>PbCOX11_018D01_2804bp
GATCCTCACCTTGGAGCCTAGGCTTCCCATTTTGGAGCCTAGGCTTCCCATTAAGACTAGCCACGGCAGAGTAGTTTATACCGAGATAGCT
ACCAATACAACCAATTGAGAGCTCTCACAGATTGTTCCTGGCCCAACGAGCCGAGTGCAGTGAATATCACCOCGATCCGGAATTGATGTCAT
CGAACACTTCTCTCAATGAGCTTGTTCATCTAATTTTCCACACTCCGACATATCGAGTACTATGCTTCCACAGATAGCAACATTTGCGG
GTGAAAGCTTATAGGCTTCTCCCATTTTCCACTGCTTCATTTGTTCTGTAAAGCAAGGCTATGCTCTCAAGGAGCTTCTCCGGCCCG
GCAGCCGGCCACCCAGAAACACTATCACCGCAATGCAAGCCAAGATGTCACACGAAAAGAAATCAATTCGCCCTTCTGAGTGTTTTCTGCTTT
CTTTCTTATAGTTGGTTTATACCAATACATCTTAGCTACTATGCTATGAGGCTAATTATCGGAACAAATGCTCTCCGATATGGGTCGGTTC
CCATGTACAAAATGTTACTTGAACCTTTCATTTTATACCCTCTGCTCATCATCCTAATAGAGCCCTGTACATATGCCACCAACCCGGCTGGA
ATGGTCAGCCCATTCAAAACCTCCGACAGAAAAAGCCCTCCCTCCGCTCAAACCAAGTAAGCTCTTCCGCCGACTACGAATTAOCTTC
AACGGA TCCGTGCTCGGATGTCCTTCCCTTGGAACTTCCACACCCCAACAGCGGGAAGTAAAGATTCTACAGGTGAAACCCGCTTGGCA TTTA
CACGCCAACGAATAGGGACCAAAATGATATCATCCGGCTTCCACAGTACAGCGTGAAGTCCGCCACAGGTTTCCGCGTATTTCAGCAAGATCC
AATGCTTTTGCCTCGAGGAGCAACGACTTAGTCCGGGAAGATCGGTTGATATGCCAGTGTCTTTTTCATCGACCCCTGATTTTGTCAATGAG
ECTGCCATGAGATCAA TTAGCACCA TTAGCCCTCCTGACACTTCTTTAGTAAGTTCGAGTCTGGAAA TTTTACCAGCTTCTGT TTAG
ATTCCGACCTTAATGGATGCTGCTACAGAGGCTCGATA TGAATCAAATGGGCTGCTGAGCCCAAGACAGGGATGGCTCCCTGACCATGC
CCTTAATTAATTGCGGAGGGACAGGCTCCAACTTCCGTAGTGATTTCCAGGAACTTTGGCTTTTGGGGGCAATATCTCTATTTCCGTCAT
TCGGGGATGAGCAATAAAACGTCACCTTATTATACATGGGGGGGTGATAAGTGTCCATTTCCAGACACA TTTGATCTCTCTGTGGGCTCCATC
CTAAATGGCAATGAGCCATTTCCGTTCAATCTTCACTCAAACACTTCAGAACCA TCGACTTGTTCGGCCAGGCTCAAGACCTATATATA
GAAACTCAATTTGGAA TGGAGCGGAAATGAATCTCTGTGT TTTCTATATATA TTTGCA TTTTATA TCTAGGGCTGT TTTGATCAAGCAGAT
TCAACCTGGGGCATGGTATGTGGGCTTCTGGGAAATTAATTTCTAGAAATCA TAAATAGCATCACTCATCTCAAACTATCTCCAGAAA
TAGAATCAAGTCTGAA TTTT TGGTATCTCAAATTTGATTAATGGATTTGCTGCAGTTCGGGCTCCAAAGAGCGGGGAGTAGTCAGCCGGA
GCACAGACCACCACTTAAAGTCCGTTGGGGCACGGCTTTCTTCTCTCAGGAGCTTTGAATATCAAACCCACTAAACAATTCATACGTA
TTTTAATTTCAAACACACCATTTACTACTAACAATGGCAC TTTTAGTTGATAGGCTCCGGCTAGGAGCTCCGACCTCTTAOCTACCACCG
TCAACTTTCCGCTCCACTGAAATCACTTGTGAGCATTA TAACTGGCTCTACATCCCTA TTAGTATATTCA TTTGCCGGCTGACTATTGGAGCG
AATTCACAGGCGCAAAAGCGGTGATTTCCGACCTTCTGGTTTATGCAOCTCAGGAGCAGGGAAGAGCAAGAATTAATCCOACCGCTGAA
GCAACTTTTGGTACTGGTGGTOSAAAAGATCAAAA TOGACCTCGAGTCTTCCAAACGAGCACCAATCCAAAGTTGGAATTCACATTTGTCT
CCTCAGTCTACCACTTGAATTCACACCATCTGACGTGGCAATTAAGATCCGGTGTGGTACAGGAACTTCTGAGAGGGGTTCGCCAGAGCG
CAACAGGTCCATCTGTCCGGGAGCGAGCATTTAAGGTCCGTTGTCATTAATGAGCAGATCATCTTACGAGGATGCCAGGCAGCATTAAG
AAGGACTATGGAAAAGTACAGTCTAATCTGAGAGTTACTTACTTGCAAAACAGCACTGCAAAATCA TCGCTCCATTAGATCCAGAACAC
TCTTTGTCAGGCTCCGTCACCCACTGAAGCTGAAATA TGTCAAGTACTAAGCTTGCAGGAAAGAAAGGAAATTTGGGCAAGGCACAGGA
CTTAATAAAAGGATAGCCAAAGAGAGTGGAGCAAAA TCTGAGACGCTGCTCTCTCATGTTCGAGGCTATATATGCCAGAGTACGTTGAGTC
GGGGCTCCACAGCTGCAAAATAGCAATTTCAACTGCAAGTTTCATTTCCGAAATAGCGAAGGAGTACGGATGATAGCCAAATTCACCT
CCTGAACTGGAGGCAATGATCCTGTCTCTTATACACATCTCAA
```

FIGURA 10: Análise da seqüência consenso da RST-RC2-Pb30004-018D01.

Indicando a região codificadora do gene *PbCOX11* de *P. brasiliensis* e a seqüência dos íntrons, bem como os motivos canônicos de borda intrônica (5' GT...AG 3').

Para clonagem do cDNA referente ao gene *PbCOX11* foi sintetizado um par de oligos nucleotídeos específicos (senso: 5'- CTAATTTTCAGAGCTCCGCACATATCGAGTT e anti-senso: 5'- GCCATTTAGGCTGCAGCGCACAGAGAGA) que inseriram os sítios de reconhecimento das enzimas de restrição *SacI* e *PstI* respectivamente.

O produto da reação de PCR, obtido com a amplificação do gene *PbCOX11* partir de cDNAs Poli(T) gerou um fragmento com aproximadamente 911bp. Este fragmento foi clonado em TOPO TA Cloning/Invitrogen. Após o seqüenciamento completo do fragmento de cDNA, identificou-se a fase aberta de leitura referente à proteína *PbCox11p* contendo 253 resíduos de aminoácidos. A análise da seqüência do cDNA confirmou o resultado predito a partir da análise da seqüência genômica quanto a presença e a localização dos íntrons. Estima-se que a proteína predita tenha uma massa molecular de 2,8KDa. A seqüência nucleotídica e da proteína predita a partir do cDNA está depositada no GenBank/NCBI com o número de acesso **EF679210**.

O gene *COX11* codifica para uma proteína da membrana interna mitocondrial que é essencial para a montagem do complexo da citocromo c oxidase. A maioria dos estudos sobre esta proteína foi realizada em *S. cerevisiae* entretanto esta proteína é bem conservada entre os organismos incluindo as bactérias, fungos, plantas e animais tendo mais de 300 seqüências de proteínas homólogas depositadas no banco de dados do GenBank/NCBI. A proteína *Cox11p* está envolvida na incorporação de cobre no centro CuB na subunidade *CoxIp* e magnésio durante a montagem do complexo da citocromo c oxidase (Tzagoloff *et al.*, 1990; Tzagoloff *et al.*, 1993, Pungartnik *et al.*, 1999; Hiser *et al.*, 2000). O cobre é doado para a proteína *Cox11p* por ação da proteína *Cox17p* que também atua no transporte deste elemento para a proteína *Scolp*, também envolvida na montagem da COX (Horng *et al.*, 2004). Estudos demonstram que a proteína *Cox11p* encontra-se ancorada na membrana interna da mitocôndria por um único seguimento transmembrana (Carr *et al.*, 2005). A análise da seqüência protéica da *PbCox11p* também indica a presença de um domínio transmembrana (Fig. 11). Esta proteína possui uma topologia conhecida como N “in” C “out”, onde a porção N-terminal está voltada para a matriz mitocondrial e a porção C-terminal que contém várias cisteínas, metioninas e histidinas capazes de se ligar ao cobre encontram-se exposta no espaço intermembranas, onde forma um homodímero que liga dois íons do Cu (I) (Carr *et al.*, 2002; Carr *et al.*, 2005; Khalimonchuk *et al.*, 2005). Na Fig. 11 podemos observar que a proteína *PbCox11p* de *P. brasiliensis* também possui uma topologia predita com uma porção N “in” C “out”. Estas observações corroboram para a caracterização desta proteína de *P. brasiliensis*.

```

# Sequence Length: 253
# Sequence Number of predicted TMHs: 1
# Sequence Exp number of AAs in TMHs: 23.02633
# Sequence Exp number, first 60 AAs: 2.05
# Sequence Total prob of N-in: 0.41051
Sequence      TMHMM2.0      inside      1      63
Sequence      TMHMM2.0      TMhelix     64      86
Sequence      TMHMM2.0      outside     87      253

```

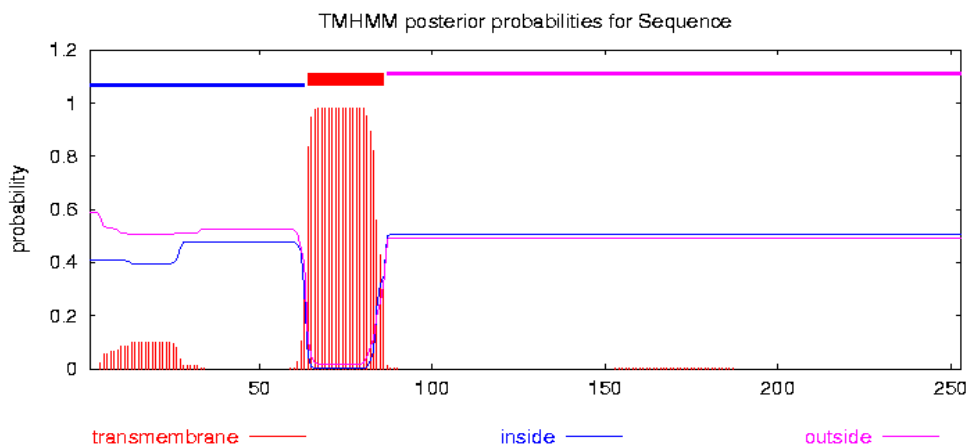


FIGURA 11: Análise de resíduos característicos de hélices de transmembrana na PbCox11p. obtida a partir da ferramenta TMHMM Server v. 2.0 disponível na página <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>.

Khalimonchuk e colaboradores em 2005 sugerem que a porção N-terminal da proteína *Cox11p* interage com os ribossomos mitocondriais mais que esta função na tradução ainda não é clara já que a porção N-terminal não é essencial para a função da proteína *Cox11p*. Entretanto, a ligação entre a função de *Cox11p* e o sistema mitocondrial de tradução parece ser conservada entre os organismos, desde que em *Schizosaccharomyces pombe* também se observa a existência de uma extensão na porção 5' da proteína relativa a *Cox11p* de *S. cerevisiae* que codifica para uma proteína similar (Rsm22p) às proteínas ribossomais mitocondrial (Carr et al., 2005). Ainda segundo Khalimonchuk et al., 2005 e Banting e Glerum (2006) a *Cox11p* pode ajudar na incorporação de cobre na subunidade *CoxIp* de uma maneira co-translacionalmente e que de acordo com esta hipótese, os níveis de *CoxIp* estariam reduzidos em um mutante nulo de *cox11*.

O mutante de *cox11* é deficiente respiratório e para testarmos a capacidade de complementação funcional heteróloga da proteína *PbCox11p* de *P.brasiliensis* no mutante nulo *aW303ΔCOX11::HIS3* de *S. cerevisiae* construímos o recombinante *pMGL3/PbCOX11*, utilizando-se dos sítios *SacI* e *PstI* inseridos nas extremidades 5' e 3' do gene respectivamente na amplificação do mesmo a partir do cDNA poli(T). Este recombinante foi inserido no mutante por transformação utilizando o método de acetato de lítio como descrito em material

e métodos. Os transformantes foram selecionados em meio mínimo (WO) devidamente suplementado e submetidos ao teste de crescimento em meio contendo fontes de carbono não fermentáveis como etanol e glicerol (EG). Neste ensaio não obtivemos crescimento dos transformantes indicando que embora a proteína *PbCox11p* de *P. brasiliensis* mantenha alta similaridade de seqüência com a proteína *ScCox11p* de *S.cerevisiae*, incluindo similaridade com a região característica de hélice transmembrana e a região do domínio ligante de cobre (Fig. 12) essencial para a função da proteína, a *PbCox11p* não é capaz de substituir a função homóloga neste organismo.

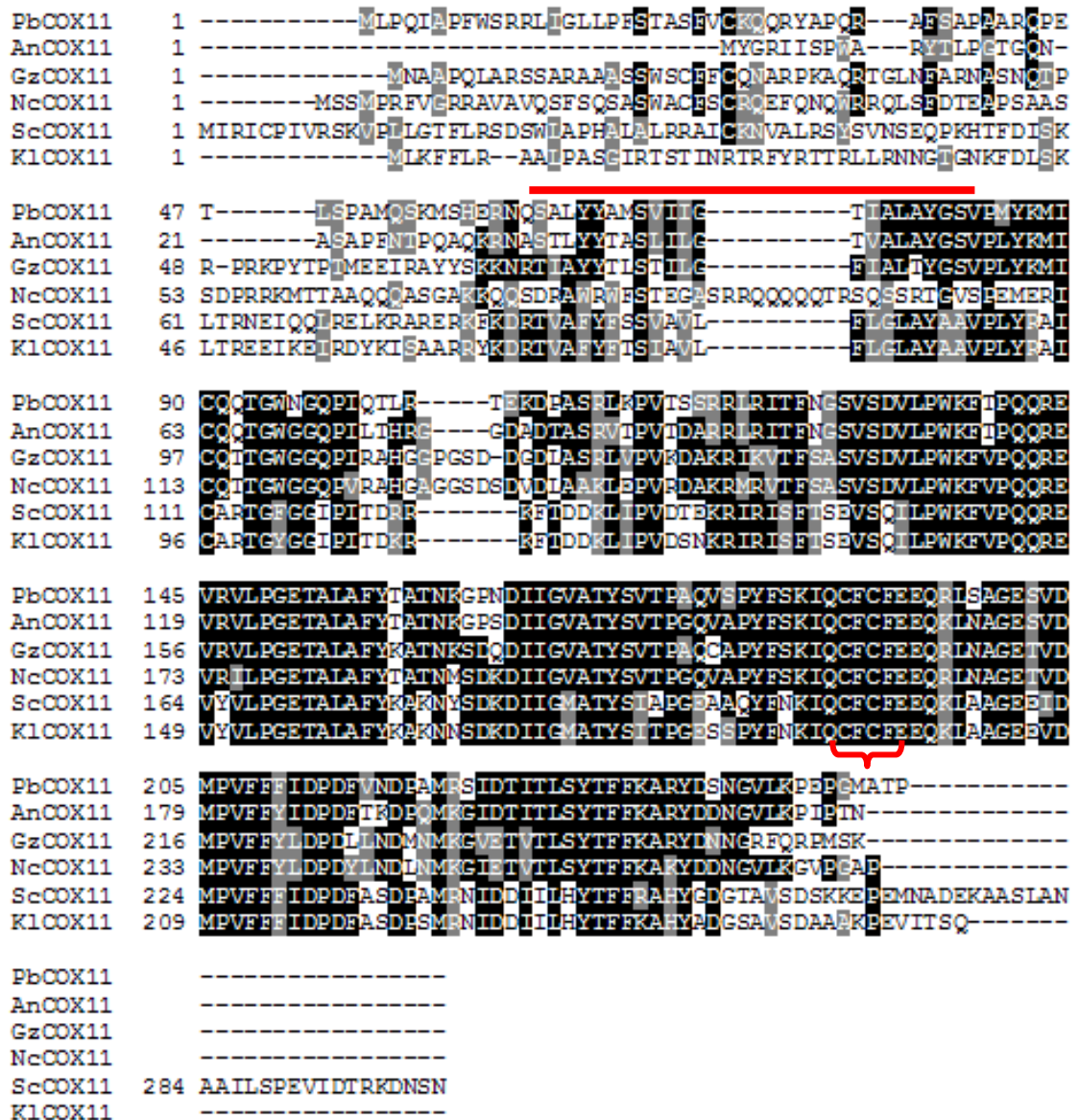


FIGURA 12: Alinhamento da *PbCox11p* de *P. brasiliensis* (Pb) com as proteínas homólogas *Aspergillus nidulans* (An), *Gibberella zeae* (Gz), *Neurospora crassa* (Nc), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) e *Kluyveromyces lactis* (Kl). Resíduos de aminoácidos idênticos são pintados em preto e resíduos com características semelhantes estão em cinza. A barra vermelha indica a região de hélice transmembrana (abaixo) e a chave indica o domínio ligante de cobre (acima).

4.1.5 *PbCOX13*

Para o estudo deste gene selecionamos a EST-CN243928-1 (Felipe et al., 2003). A sequência completa do inserto deste clone indicou a presença de uma ORF com 142 resíduos de aminoácidos (DQ003716) apresentando 32% de identidade à proteína *ScCox6a* de *S. cerevisiae*. A ORF da *PbCox13p* foi extraída do vetor de clonagem pBluescript a partir de

digestão enzimática com *SacI* e *XhoI*. Estes sítios fazem parte da região de clonagem do vetor. O fragmento contendo o gene *PbCOX13* foi clonado em vetor de expressão em *S. cerevisiae*, porem o teste de complementação funcional heteróloga no mutante se *S. cerevisiae* não foi realizado. Análise de comparação da seqüência da proteína *PbCox13* com os polipeptídeos de outros organismos indica boa conservação de seqüência (Fig. 13).

COX13

Gz	1	-----MSAVRFTRAATRATAQLRAPAQRFFAS-----TQNEFIKERQHIKEHAA
Mg	1	-----MIASRVAPRVARQLRAPAQRRLMSSAN----AGENSFVREREAVREHAI
Nc	1	----MFAQRQMFFARLAANLRAPAVROTVQRFFASTPANE--SGKNAFVREREAVKQHAA
Pb	1	MLTRPSAFRLAQRVGGAPAVRSNPVRSGLLQRRFTSTEQSGPVLDPDNEFRERAAVKQHAA
Kl	1	-----MFKQAIRRASTLPKYALEPAFGKPDL---AAACAYKDYMKHSTEHAK
Sc	1	-----MFRQCAKRYASSLPPNALKPAFGPPDK---VAACKFKESLMATEKHAK
Sp	1	---MSMMNRNIGFLSRITLKT SVPKRAGLLSFRAYSN-----EAKVNWLEEVOAEEEHAK
Gz	45	GTTELWKKISLYG-----VAPCLIAAGANAYWLWSEHWEHWSHMPPLEER---TEYPYQ
Mg	46	HSTALWKKISLTFRPKHSVVPVSLVAAGANAYYLNWEHWEHWSHMPPLEER---TEYAYQ
Nc	55	ETTELWRKISLYG-----IPPALALAGYNAYTLNWEHWEHWSHLPLEER---TEYPYQ
Pb	61	ATSDLWRKLSIYG-----VIPVILASINAWNLNWEHWEHWSHMPPLEER---VEYPYQ
Kl	45	QTSNLWVKISIFV-----AAPATAALTAVNTYFVEAEHAEHREHLKHVPEEWPRIYEFQ
Sc	46	DTSNMWVKISVWV-----ALPATAALTAVNTYFVEKEHAEHREHLKHVPESEWPRIYEFM
Sp	52	RSSEFWKKVITYYIG-----GPALILASANAYYIYCKHOEHAKHVEDTTPG-----YSEF
Gz	96	NIRTKNYQWGNQDKTLFWNDEVNYHNKDKTS
Mg	103	NIRTKNYQWGDGDKTIFWNDKVNHYHNKDK--
Nc	106	NIRTRNYPWGDGDKTLFWNESVNYHNDRDKVT
Pb	112	NIRTKNYPWGDGDKTLFWNPKVNHYHNPNKTT
Kl	99	NLRQKPFQWGDGDKTLFWNPVINRHVSHD--
Sc	100	NIRSKPFFWGDGDKTLFWNPVVNRHIEHDD-
Sp	101	NLRFKKYPWGDGSKTLFWNDKVNHLKDKDE-

FIGURA 13: Alinhamento da *PbCox13p* de *P. brasiliensis* (Pb) com as proteínas homólogas *Gibberella zeae* (Gz), *Neurospora crassa* (Nc), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) e *Kluyveromyces lactis* (Kl), *Magnaporthe grisea* (Mg) e *Schizosaccharomyces pombe* (Sp). Resíduos de aminoácidos idênticos são pintados em preto e resíduos com características semelhantes estão em cinza.

Análise quanto à presença de resíduos característicos de hélice transmembrana revela alguns resíduos típicos de regiões transmembrana entretanto nenhuma estrutura de hélice é predita (Fig. 14A). Já a proteína *ScCoxVia* de *S. cerevisiae*, através da mesma análise, apresenta uma região bem definida de hélice transmembrana (Fig. 14B). Esta observação pode ser um indicativo da não complementação funcional, a exemplo do que também pode estar ocorrendo com a proteína *PbCox5A*.

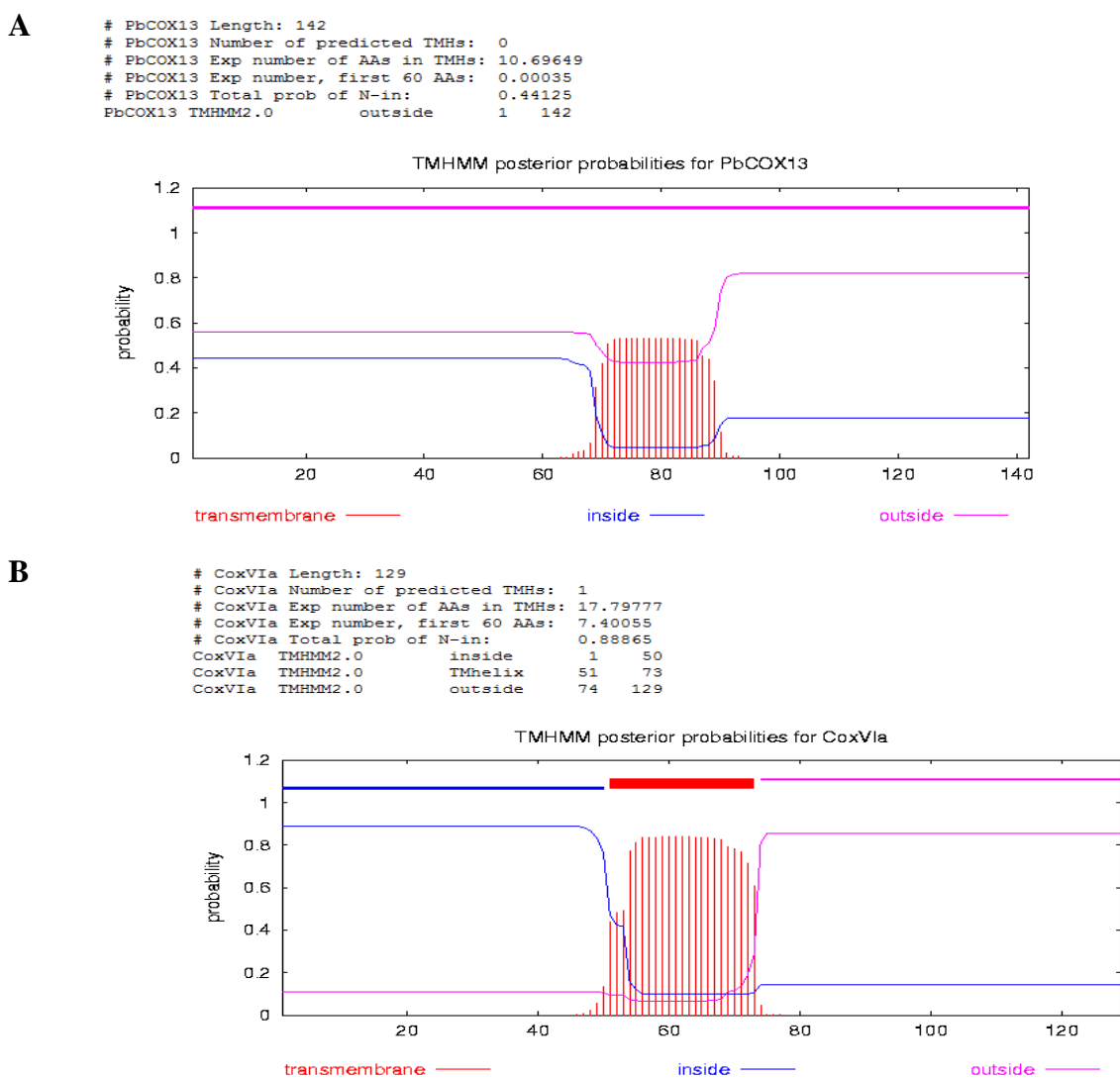


FIGURA 14A: Análise de resíduos característicos de hélices de transmembrana na *PbCox13p*. obtida a partir da ferramenta TMHMM Server v. 2.0 disponível na página <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>. 14B: Análise semelhante com a proteína *ScCoxVia* de *S. cerevisiae*.

Em *Saccharomyces cerevisiae*, o gene nuclear *COX13* codifica para o subunidade VIa do complexo da COX. Este é um gene de cópia única por genoma haplóide (Taanman e Capaldi, 1993). Esta proteína é sintetizada como uma precursora compreendida de uma sequência líder de nove (09) resíduos e um polipeptídeo maduro de 120 resíduos do aminoácido. Mutantes nulos de *COX13* apresentam uma taxa de crescimento ligeiramente reduzida em fontes de carbono não fermentáveis entretanto o complexo da COX está integralmente montado nestas linhagens mutantes além deste complexo ser mais ativo em meios com baixa concentração iônica. Foram também observados efeitos distintos de ATP na atividade da COX entre a linhagem mutante *cox13* e a selvagem (*COX13*), sugerindo que o ATP interage especificamente com esta subunidade, através da qual, modula a atividade da citocromo c oxidase mitocondrial (Taanman e Capaldi, 1993).

4.1.5 *PbCOX15*

Através da análise de comparação (tBLASTn) da sequência proteica da *Cox15p* de *S. cerevisiae* contra o banco de dados de sequências de ESTs e RSTs de *P. brasiliensis*, identificamos duas ESTs (EST006267 e EST007018) originárias da biblioteca do consórcio da região central do Brasil (Felipe et al., 2003), apresentando alto nível de similaridade, observado pelo valor de E-value ($4e-27$ e $6e-08$) respectivamente.

O clone referente à EST006267 foi selecionado para o estudo de caracterização do gene *PbCOX15* de *P. brasiliensis*. O inserto de cDNA foi completamente sequenciado através da técnica de inserção de transposons (descrita em Material e Métodos) e verificou-se que ele é constituído de aproximadamente 2030 bp. Através da ferramenta ORFfinder do NCBI identificamos um fase aberta de leitura (ORF) correspondendo à proteína *PbCox15p* que é constituída por 491 resíduos de aminoácidos. A sequência completa do cDNA e a sequência peptídica da *PbCox15p* foram depositadas no GenBank/NCBI sob o número de acesso DQ003717. A proteína deduzida a partir da ORF identificada compartilha 43% de similaridade com a *Cox15p* de *S. cerevisiae* (Tabela 4) e tem uma predição de peso molecular de 55KDa.

A partir da análise física de restrição da sequência do cDNA (utilizando a ferramenta NEBcutter www.neb.com) podemos nos certificar de que a ORF (*PbCox15p*) poderia ser excisada direcionalmente para a clonagem em vetor de expressão em *S. cerevisiae* utilizando as enzimas *SacI* e *KpnI*, que cortam nas extremidades 5' e 3' respectivamente do plasmídeo, adjacentes ao inserto de cDNA. A digestão enzimática seguiu as instruções do fabricante

(New England Biolabs). O fragmento de tamanho esperado foi separado em gel preparativo 1% agarose eletroeluído e purificado por extração com fenol e éter seguido de precipitação com etanol.

Utilizando o kit de ligação (Fast Link™ DNA Ligation Kit -EPICENTRE TECHNOLOGIES), o fragmento *SacI/PbCOX15/KpnI*, purificado, foi ligado no vetor pMGL4 previamente linearizado com as mesmas enzimas e tendo as extremidades 5' defosforiladas com a enzima CIP – Calf Intestine Phosphatase. A mistura de ligação foi inserida em *E. coli* DH10B por transformação pelo método de CaCl₂ e 10 transformantes foram coletados aleatoriamente. Os pDNAs dos transformantes coletados foram extraídos e a seleção do plasmídeo recombinante *pMGL4/PbCOX15* foi realizada através de sequenciamento utilizando o oligonucleotídeo (386 – 5'-CAATATTTCAAGCTATAC-3') específico para este plasmídeo. O recombinante selecionado foi então inserido por transformação pelo método de LiOAc no mutante nulo *aW303Δcox15::HIS* de *S. cerevisiae*. Os transformantes foram selecionados em meio mínimo (WO descrito em Material de Métodos) devidamente suplementado e a capacidade da proteína *PbCox15p* de restaurar a deficiência respiratória dos mutantes de *S. cerevisiae* foi analisada quanto à capacidade de crescimento em meio com fontes de carbono não fermentáveis (etanol e glicerol).

O crescimento dos transformantes incubados em estufa a 30 °C foi observado durante o período suficiente e nenhum crescimento foi detectado em meio contendo etanol e glicerol como fonte de carbono, indicando que embora esta proteína *PbCox15p* de *P. brasiliensis* compartilhe 43% de similaridade com a proteína *Cox15p* de *S. cerevisiae* esta não é capaz de restaurar a deficiência respiratória do mutante *aW303Δcox15::HIS* de levedura *S. cerevisiae*.

Em *S. cerevisiae* a proteína *Cox15p* foi inicialmente identificada por complementação de mutantes do grupo de complementação G4 (Tzagoloff et al., 1975) através de transformação de mutantes deste grupo com uma biblioteca genômica de levedura. Os mutantes deste grupo são deficientes respiratórios devido à incapacidade de síntese da citocromo c oxidase funcional, portanto, a proteína *Cox15p* é essencial para a montagem do complexo da citocromo c oxidase em *S. cerevisiae* (Glerum et al., 1997). Homólogos desta proteína foram identificados em *Schizosaccharomyces pombe* e *Caenorhabditis elegans* sugerindo que ela possa ser amplamente distribuída entre eucariotos (Glerum et al., 1997), inclusive nos humanos. A identificação e caracterização da *hCox15p* humana (Petruzzella et al., 1998) indica uma proteína (AF026850) de 255 resíduos apresentando cerca de 42% de identidade com a *Cox15p* de *S. cerevisiae* e mutações neste gene humano *h-COX15* já foi descrita como responsável pela desordem “Leigh syndrome” (Oquendo et al., 2004) e

Antonicka et al., 2003, já havia descrito que a super expressão de *hCOX15* pode complementar funcionalmente a deficiência isolada de citocromo c oxidase em fibroblastos de pacientes com cardiomiopatia hipertrófica infantil fatal, o que corrobora para importância de identificação de caracterização de genes associados a biosíntese deste complexo (COX).

Embora Glerum et al., 1997, sugira que a *Cox15p* não esteja relacionada ao metabolismo de cobre ou a biosíntese de heme A, Barros et al., 2001 descreve que mutações neste gene (*COX15*) levam a perda de absorção visível das bandas de citocromos a e a3 e promove aumento da frequência de renovação traducional das subunidades da citocromo c oxidase. Diferentemente dos outros mutantes com perda de heme A, mutações no gene *COX15* bloqueia a síntese do grupo prostético (heme A) e não bloqueia a síntese de heme O, sugerindo um fenótipo consistente com uma mutação que possa bloquear o último estágio da biosíntese de heme A, na qual ocorre a substituição do grupo metil do carbono oito do anel da porfirina por um grupo formil (Barros et al., 2001). Em *S. pombe*, *COX15* está fusionado à *YAH1*, que codifica uma ferredoxina mitocondrial e a fusão destes dois genes em *S. cerevisiae* recupera a deficiência de ambos os mutantes sugerindo que a *Yah1p* atuam em conjunto com a *Cox15p* e baseado nestes resultados Barros et al., 2001 sugere que a proteína *Cox15p* seja uma monooxigenase, que em conjunto com a ferredoxina mitocondrial *Yah1* e a ferredoxina redutase *Arh1* catalisem a hidroxilação do heme O.

A *PbCox15p* de *Paracoccidioides brasiliensis* quando comparada com homólogas de outros fungos apresenta-se muito bem conservada ao longo de quase toda a sua extensão (Fig. 15) diferindo apenas na região que compreende os primeiros noventa resíduos da região N-terminal e 10 a 12 resíduos na porção C-terminal. Esta diferença pode ser uma indicativa para explicar a não complementação funcional desta proteína *PbCox15p* de *P. brasiliensis* no mutante de *S. cerevisiae*, sugerindo uma incompatibilidade de endereçamento para a mitocôndria, desde que normalmente a seqüência de endereçamento mitocondrial encontra-se na porção inicial das proteínas exatamente onde a *PbCox15p* não apresenta uma boa similaridade com a sua homóloga de *S. cerevisiae*.

Entretanto, pela análise quanto à presença de hélices transmembrana, pode-se observar uma total conservação dos domínios transmembrana entre as proteínas de *P. brasiliensis* e *S. cerevisiae* (Fig. 16A e 16B), tornando o resultado de incompatibilidade funcional um tanto curioso.

COX15

AfCOX15	1	MASIGGSVPMFRSLAPRFSKDFFTCRQCLGRTQTYATKSLFRKQFAGLSFGQKSSNATPK
AnCOX15	1	-----MDATFLRSKARKAFARYASDSAANG---
PbCOX15	1	---MASAVPMFRSLAPRLPKEFFTCRQCLHHNQAFKFSRRWGMHRFQNSTRMAPPFLP
MgCOX15	1	---MSLYRIGIPRTLGRLLSSPAFVCRQCLHTOPLKASQVAVQVIRSPALSRNQTSTSTST
ScCOX15	1	---MLFRNIEVGRQAALLRTRTSRLAWQSIGASRNISIRQQIRKTKQLYNFKKIVSIRP
AfCOX15	61	-----AFSVTATKFFSPILRRSVAGSAVAGALEDGASQAKSSFPKVSDDKIV
AnCOX15	27	-----AKPEASKSAFPDVSSKSV
PbCOX15	58	-----ATTRQDLSILN-----LFFFSSAAKFATNGSSASSKFPDVSSKVV
MgCOX15	58	GNNARTKWLVGGSRTFFRSGTKSSSGSTATAVEAATAEASSEAGAGARSSFPETNSKAV
ScCOX15	58	-----FSLSSPVFKPHVASESNPIESRLKTSKNV
AfCOX15	107	AYWLLGSAASVFGIVVFGGLTRLTESGLSITWWRPVTGSLPPMNAEDWESFAKYRASPE
AnCOX15	45	AYWLLGSAASVFGIVVFGGLTRLTESGLSITWWRPVTGSLPPMNAEDWESFSKYRASPE
PbCOX15	99	AYWLLGSAASVFGIVVFGGLTRLTESGLSITWWRPVTGSLPPFNADWESFEKYRSPFPE
MgCOX15	118	GYWLLGSAASVFGIVVFGGLTRLTESGLSITWWRPVTGSLPPRMAEDWESFSKYRASPE
ScCOX15	87	AYWLLGTSGLVFGIVVFGGLTRLTESGLSITWWRPVTGSLPPMNAEDWESFEKYRSPFPE
AfCOX15	167	YQQLNPNMNLSEFKSIYYMEWIHRLWGRFVGLSFVLPALYFVAKKKVSKPMSLRLAGIAG
AnCOX15	105	FQLLNPNMNLSEFKSIYYMEWIHRLWGRFVGLSFVLPALYFVAKKKVSKPMSLRLAGIAG
PbCOX15	159	YQVLRPNMNLSEFKSIYYMEWIHRLWGRFVGLSFVLPALYFVATKRVSKPMSLRLAGIAG
MgCOX15	178	FALLNPNMNLSEFKSIYYMEWIHRLWGRFVGLSFVLPALYFVATKRVSKPMSLRLAGIAG
ScCOX15	147	FKLLNPNMNLSEFKSIYYMEWIHRLWGRFVGLSFVLPALYFVAVSKKTSGHVNRKRLFLIAG
AfCOX15	227	LIGFQGFIGWMMVKSGLKDDLFAQGSHPRVSQYRLTAHLGAFTCYTAMLWNLAILRS
AnCOX15	165	LIGFQGFIGWMMVKSGLKDDLFAQGSHPRVSQYRLTAHLGAFTCYTAMLWNLAILRS
PbCOX15	219	LIGFQGFIGWMMVKSGLKDDLFTPGSHPRVSQYRLTAHLGSAFLCYTAMLWNLAILRS
MgCOX15	238	LIGFQGFIGWMMVKSGLKDDLFAQGSHPRVSQYRLTTHLGTAFLCYSAMLLSGLSVLRT
ScCOX15	207	LLGLQGFVIGWMMVKSGLDQQLDARKSKPTVVSQYRLTTHLGTAFFLYMGMLWTGLEILRE
AfCOX15	286	HRLADPEAGIKLLDSLRLDPKIKTFRRSVAGLALLVFATAMSGALVAGLDAGLIYNEFPPL
AnCOX15	224	HRLSDPEAGIKLLDSLRLDPKIKTFRRSVAGLALLVFATAMSGALVAGLDAGLIYNEFPW
PbCOX15	278	NRLIADPSKGIETLNALRHPKLSIFRKSVAGLTLLVFATAMSGGLVAGLDAGLIYNEFPY
MgCOX15	297	RRLVADPTAATKLFSQLNAATTPFRRYVLAAMTALVFTTAMSGALVAGLDAGLIYNEFPK
ScCOX15	267	CKWKIKNPQAISLFFKLLDNPALGPMRKISLALLAVSFLTAMSGGMVAGLDAGVYNTWPK
AfCOX15	346	MGNGLAPPKSELLDERYSRHEDRSDLWWRNMLENPSLVQLDHRILAMTTFTSIMALWAYS
AnCOX15	284	MGNGLAPPKSELLFDDRYSRHEDRSDRWWRNMLENPSLVQLDHRILAMTTFTSIMALWAYT
PbCOX15	338	MGERVFPPTSELFSHSYRLADKSDLWWRNMLENPSLVQLNHRILAMTTFTSVMGLWAYT
MgCOX15	357	MGVGLTPPMTLELDFKIFYRKEGSDLWWRNMLENPSLVQLDHRILAMTTFTCAVVMFVWS
ScCOX15	327	MGERWFPSSRELMDENFCRREDKKDLWWRNMLENPSLVQLVHRTCAVYVFTSVLAHMYA
AfCOX15	406	RRSPTMKRLLPPAARKGLHGVAFAWVQVGLGISTLLYLVPITPLASAHQAGSLFLLTWVL
AnCOX15	344	RRSPNPKRLLPSPAKKGVHGVAFAWVQVGLGLTLLYLVPITPLASAHQAGSLFLLTWVL
PbCOX15	398	HFSNPKQLLPKIAKGMHGVAFAWVQVGLGISTLLYLVPITPLASAHQAGSLFLLTWVL
MgCOX15	417	RR---LGAVLPTSARKGSMGVLHLALIQVALGITLLIYVPTHLAATHQACALALLTGSLL
ScCOX15	387	IK---KKAIVIPRNAMTSLHVMMGVVTLQATLGLITLLYLVPISLASIHQACALALLTSSLL
AfCOX15	466	VLGSRVWHPSTAKLLQMAAKARGQAVRNATAQAANKL-----
AnCOX15	404	VLGSRVWHPSTAKLLQMAAKARGNSLPNVTQAAPKL-----
PbCOX15	458	VLGSRVWHPSTAKLLQMAAKMKSAAAPKTVAGR-----
MgCOX15	474	VLSHRLVSKSTVSLIQRQLLKSAGSGGAARLPTKRI-----
ScCOX15	444	VFASQLRKRERAPMRNVIITLPHSSKVTSGKILSEASKLASKPL

FIGURA 15: Alinhamento da *PbCox15p* de *P. brasiliensis* (Pb) com as proteínas homólogas.

Aspergillus nidulans (An), *Aspergillus fumigatus* (Af), *Magnaporthe grisea* (Mg) e *Saccharomyces cerevisiae* (Sc). Resíduos de aminoácidos idênticos são pintados em preto e resíduos com características semelhantes estão em cinza.

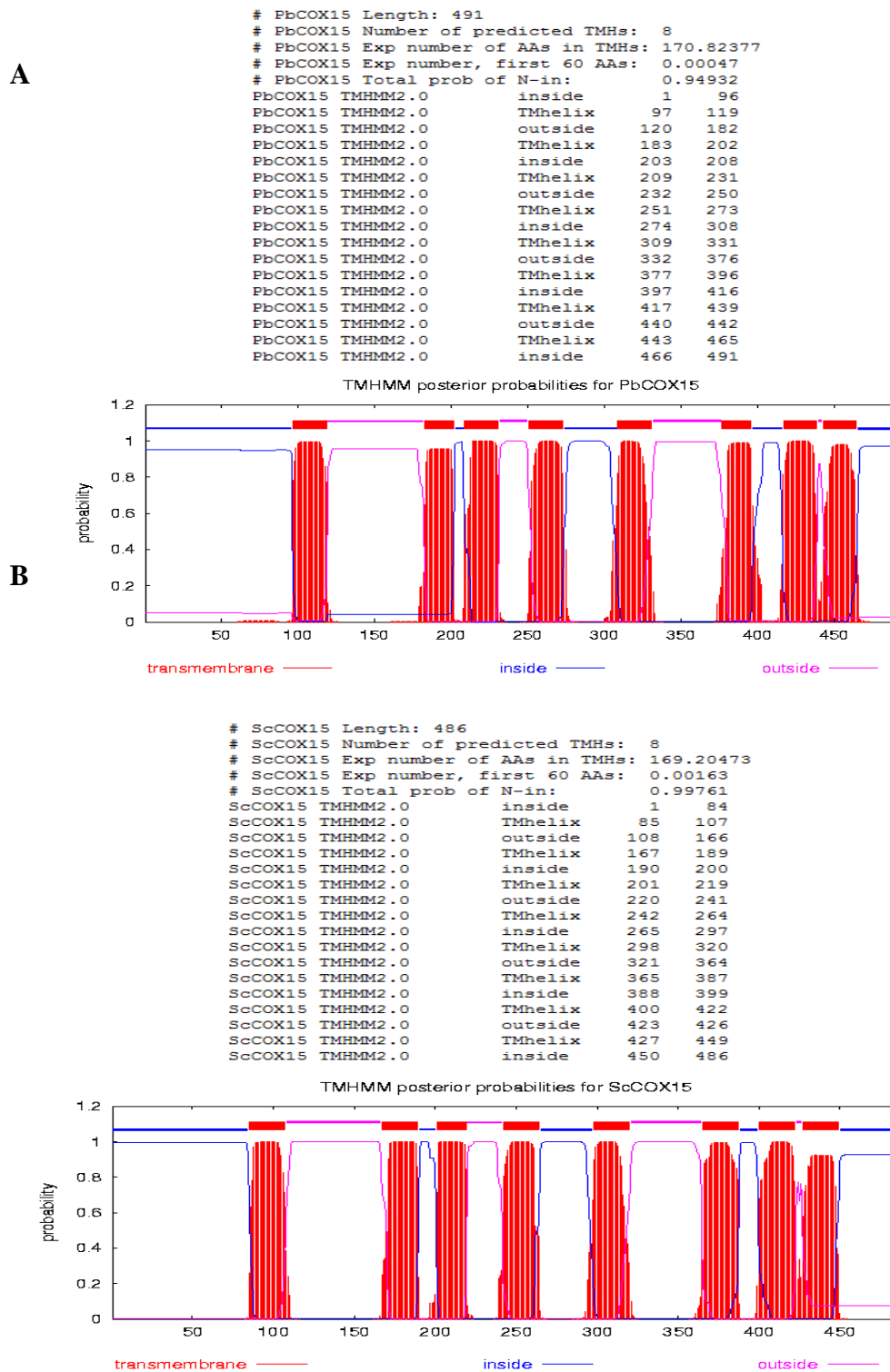


FIGURA 16A: Análise de resíduos característicos de hélices transmembrana na *PbCox15p*.

obtida a partir da ferramenta TMHMM Server v. 2.0 disponível na página <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>. 16B: Análise semelhante com a proteína *ScCox15p* de *S. cerevisiae*.

4.1.6 *PbCOX17*

Identificamos pelos menos seis ESTs nos bancos de dados do *P. brasiliensis* apresentando excelente valor de E-value. Todas elas são do consórcio da região central do Brasil (Felipe et al., 2003). Para o estudo deste gene de *P. brasiliensis* selecionamos a EST (EST006191). O inserto de cDNA originalmente clonado no pBluescript (Stratagene) foi completamente seqüenciado e contém aproximadamente 700bp. Análise da seqüência pela ferramenta ORFfinder do NCBI revelou a presença de uma ORF de 78 resíduos de aminoácidos (predição de 8,3KDa) apresentando 47% de identidade com a proteína *ScCox17p* de *S. cerevisiae*.

A seqüência completa do cDNA do *PbCOX17* foi submetida à análise física de restrição utilizando a ferramenta nebcutter disponível na página da New England Biolabs. Embora na região do cDNA não existisse sítios apropriados, foi possível excisar a ORF, direcionada para clonagem em vetor de expressão, utilizando os sítios *SacI* e *XhoI* presentes nas seqüências adjacentes, que compreende as extremidades da inserção do plasmídeo. O fragmento *SacI/PbCOX17/XhoI*, purificado, foi ligado no vetor pMGL4 previamente linearizado com as enzimas *SacI* e *SalI* e tendo as extremidades 5' desfosforiladas. A mistura de ligação foi inserida por transformação em *E. coli DH10B* competente. Coletamos 10 clones aleatoriamente para extração do pDNA e a seleção do recombinante *pMGL4/PbCOX17* foi realizada por seqüenciamento. O recombinante *pMGL4/PbCOX17* foi então inserido por transformação no mutante nulo de *S. cerevisiae aW303Δcox17/TRIP* pelo método de LiOAc. Os transformantes foram selecionados em meio mínimo WO devidamente suplementado e a capacidade de complementação funcional da deficiência respiratória do mutante de levedura pelo gene *COX17* de *P. brasiliensis* foi observada pelo crescimento do mutante em etanol e glicerol (EG). Todos os recombinantes *aW303Δcox17/TRIP/pMGL4/PbCOX17* apresentaram crescimento comparável ao selvagem (Fig. 17) após o período de 48 horas de incubação a 30 °C.

Os resultados do ensaio de complementação funcional da proteína *PbCox17p* em mutantes de *S. cerevisiae* indica que esta proteína é homóloga à proteína *ScCox17p*.

O alinhamento da proteína *PbCox17p* de *P. brasiliensis* com as proteínas homólogas de outros fungos (Fig. 18) indica que não existe boa similaridade na seqüência de endereçamento mitocondrial entre as proteínas comparadas. Entretanto, o restante da seqüência protéica apresenta-se com similaridade bem homogênea o que provavelmente

contribua para a preservação da função em ambos os fungos (*P. brasiliensis* e *S. cerevisiae*), observado no sucesso da complementação funcional.

ScCox17p foi originalmente caracterizado em *S. cerevisiae* (Glerum et al., 1996a) através de rastreamento genético por complementação funcional de mutantes com deficiência respiratória devido a inatividade do complexo da citocromo c oxidase. A deficiência respiratória dos mutantes de *cox17* é restaurada pela adição de sais de cobre ao meio de cultura sugerindo que a *ScCox17p* esteja envolvida no transporte desses íons para a mitocôndria (Glerum et al., 1996a). A proteína *ScCox17p* é uma metalochaperona encontrada tanto no citoplasma quanto no espaço intermembrana mitocondrial (Beers et al., 1997) envolvida no transporte de íons cobre tanto para *Sco1p* quanto para *Cox11p* na formação do centros CuA e CuB, respectivamente, no complexo da COX (Horng et al., 2004).

Nenhum domínio de hélice transmembrana é identificado nesta proteína em qualquer organismo. A resolução por ressonância magnética nuclear (NMR) da estrutura desta proteína em estado oxidado mostrou que a *Cox17p* é encontrada em conformação “coiled-coil” estabilizada por duas pontes dissulfeto envolvendo as cisteínas Cys(26)/Cys(57) e Cys(36)/Cys(47). Esta forma terciária tem sido observada entre as proteínas que fazem parte de uma classe de proteínas localizada no espaço intermembranar que contém o motivo Cys-x(9)-Cys, com duas cisteínas sempre espaçadas por nove resíduos de aminoácidos (Arnesano et al., 2005).

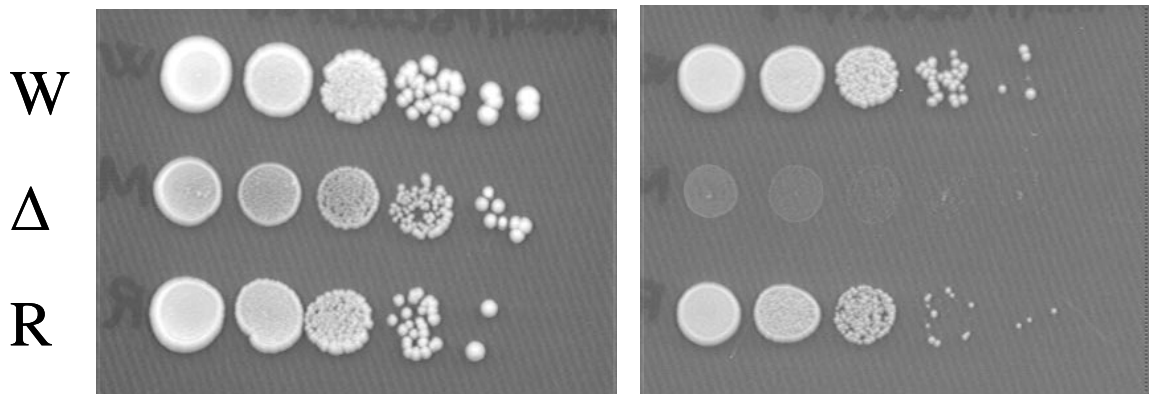


FIGURA 17- Complementação Funcional da *PbCox17p*.

Crescimento das linhagens selvagem (W), mutante deficiente respiratória de *S. cerevisiae* *aW303Δcox17::TRIP* (Δ) e do recombinante *aW303Δcox17::TRIP/pMGL4/PbCOX17* (R) em meio rico YPD e em meio contendo etanol/glicerol como fonte de carbono (EG) após 48 horas de incubação a 30 °C.

COX17

Pa	1	-----MSSAQATASSIAS	SAPVAPVITQ	SAAAAAAD	KPKPCCVCK
Gz	1	-----MDAAQTTLSSPVS	---	AAANVAST	STTATNKPKPCCVCK
Nc	1	-----MASQSFSLTALPS	--	AAAPAQIATPS	SDAPAKPKPCCVCK
Mg	1	-----	---	MPATTAPAQT	TANAADANKPKPCCVCK
An	1	MSWLFGSSSGKPI	SCDIPALPSV	NALQLANGLT	SGSAEKTPIPVATEAPAEKPKPCCVCK
Pb	1	-----MSSPAISSLS	SSDNSTSLN	SSSTSTSSSS	SKPKPCCVCK
Sc	1	-----	---	MTETDKKQEQEN	HAECEDKPKPCCVCK
Pa	41	DEKAKRDECMLFSKAAD	PQK-DCLSTIDQYRSCMAGFGFKV	----	
Gz	37	DEKAKRDECMLFSNAKDPAA	-DCKSMIDQYRSCMSGFGFQV	----	
Nc	39	EEKAKRDDCMLFSKSDDPQK	-DCVSTIDQYRACMAGFGFKV	----	
Mg	27	DEKAARDECMLFSNAKDPAE	-DCKIKLEQYKSCMAGFGFKV	----	
An	61	TEKTARDDCMLFSKSDDP	TQ-ECKSMIEQYKACMAGYGFVK	----	
Pb	38	PEKAARDDCMLFSKSDDP	AAQQE-CRPLIEQYKSCMAGYGFKI	----	
Sc	28	PEKEERDTCLIF-NGDSEK	--	CREFLIEKYRECMKGYGFEVPSAN	

FIGURA 18: Alinhamento da *PbCox17p* de *P. brasiliensis* (Pb) com as proteínas homólogas.

Aspergillus nidulans (An), *Magnaporthe Grisea* (Mg), *Neurospora crassa* (Nc), *Gibberella zeae* (Gz), *Podospora anserina* (Pa) e *Saccharomyces cerevisiae* (Sc).

4.1.7 *PbCOX19*

Somente uma seqüência de EST foi identificada no bancos de dados de seqüência de *P. brasiliensis*, apresentado boa similaridade à proteína *ScCox19p* de *S. cerevisiae*. O clone correspondente a EST014900 pertence à biblioteca do consórcio da região central do Brasil (Felipe et al., 2003).

O inserto de cDNA compreendendo cerca de 1kb foi completamente seqüenciado. A análise da seqüência indicou a presença da ORF completa, correspondente à proteína *PbCox19p*, constituída por 107 resíduos de aminoácidos (predição de 11,3KDa) com 51% de identidade à proteína *Cox19* de *S. cerevisiae*.

Através da análise física de restrição da seqüência do cDNA verificou-se a possibilidade de excisão da ORF direcionada para clonagem em vetor de expressão utilizando as enzimas *SacI* e *XhoI*. Após a digestão enzimática, o fragmento *SacI/PbCOX19/XhoI* foi isolado em gel preparativo 1% agarose extraído por eletroeluição e purificado por precipitação com etanol. O fragmento purificado foi ligado no vetor pMGL4 previamente linearizado com as enzimas *SacI* e *SalI* e tendo as extremidades 5' desfosforiladas. A mistura de ligação foi inserida em *E. coli DH10B* por transformação e dez (10) transformantes foram coletados aleatoriamente. Os pDNAs dos transformantes foram extraídos e a seleção do plasmídeo recombinante *pMGL4/PbCOX19* foi realizada através de seqüenciamento. O recombinante escolhido foi inserido por transformação pelo método de LiOAc em duas linhagens de mutantes nulos *cox19* distintos de *S. cerevisiae*. A linhagem mutante com deleção parcial do gene *COX19* (*α W303 Δ cox19::LEU*) e a linhagem mutante com deleção total do gene (*α W303 Δ cox19::HIS*). Os transformantes foram selecionados em meio mínimo WO devidamente suplementado e a capacidade do gene *PbCOX19* de restaurar a função respiratória deficiente desses mutantes foi analisada quanto ao crescimento em meio com fonte de carbono não fermentável (etanol e glicerol). Após 48 horas de incubação em estufa a 30 °C verificou-se o crescimento das linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* com o gene *PbCOX19* de *P. brasiliensis* em níveis comparáveis ao da linhagem selvagem (Fig. 19) indicando que este gene de *P. brasiliensis* é ortólogo ao gene *ScCOX19* da levedura *S. cerevisiae*. Este resultado foi confirmada a partir de extração do pDNA de alguns transformantes e fazendo-se a transformação reversa nos mutantes de levedura.

Em *S. cerevisiae* a *ScCox19p* é uma proteína de aproximadamente 11-kDa necessária para a atividade da citocromo c oxidase (Nóbrega et al., 2002). Assim como *ScCox17p*, a proteína *ScCox19* é uma proteína solúvel encontrada tanto no citoplasma como na

mitocôndria e á essa semelhança soma-se a presença de quatro cisteínas conservadas na proteína *ScCox19* em relação à *ScCox17* sugerindo que, assim como *ScCox17p*, a proteína *ScCox19p* também possa estar envolvida no transporte de cobre do citoplasma para a mitocôndria (Nóbrega et al., 2002). Podemos observar na (Fig. 20) que as cisteínas são conservadas em todos os organismos comparados corroborando para a importância desse aminoácido na função da mesma. Assim como a proteína *Cox17p*, nenhum domínio de hélice transmembrana foi identificado na proteína *Cox19p*.

Este não é o primeiro relato em que as proteínas *Cox17* e *Cox19* são submetidas em ensaios de complementação funcional heteróloga em mutantes de *S. cerevisiae*. Resultados similares também foram obtidos os genes *COX17* e *COX19* da planta *A. thaliana* (Balandin and Castresana, 2002; Attallah et al., 2007) e com o gene *COX17* humano (Amaravadi et al., 1997). Estes resultados indicam que esta proteína é bem conservada entre as diferentes espécies de eucarioto.

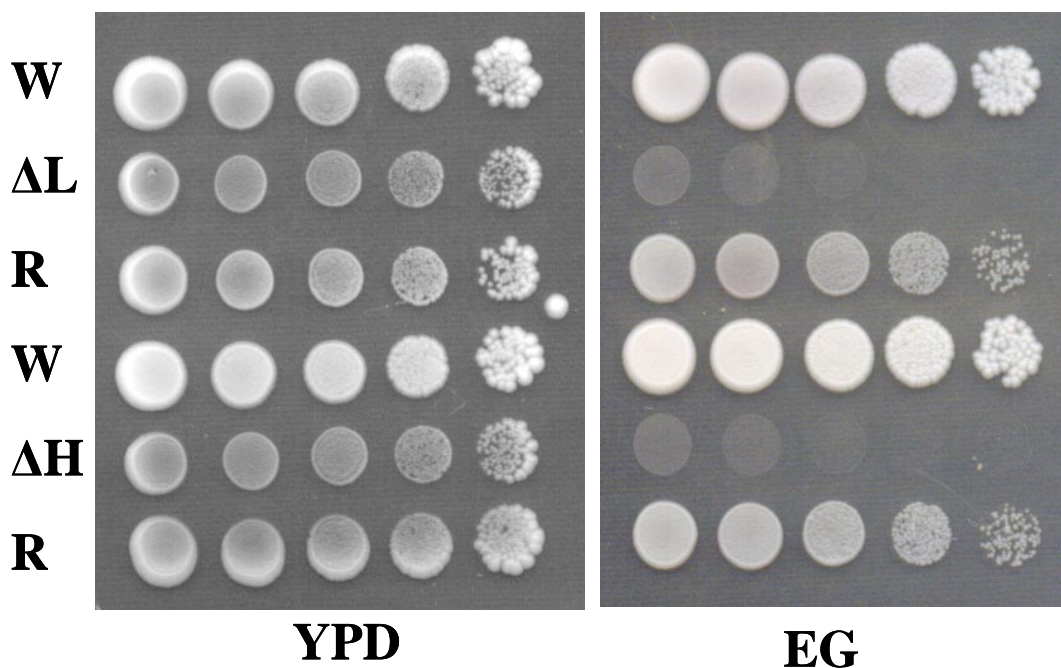


FIGURA 19: Complementação Funcional da *PbCox19p*. Crescimento das linhagens selvagem W303 (W), dos mutante deficientes respiratório de *S. cerevisiae* α W303 Δ cox19::*LEU* (Δ L) e α W303 Δ cox19::*HIS* (Δ H) e dos recombinantes α W303 Δ cox19::*LEU* /pMGL4/*PbCOX19* e α W303 Δ cox19::*HIS*/pMGL4/*PbCOX19* (R) em meio rico YPD e em meio contendo etanol/glicerol como fonte de carbono (EG) após 48 horas de incubação a 30 °C.

COX19

```

Cg 1  M S S G N P G G A L R A L S P T P P P E R G S F P L D H D G E C A E Y M Q K Y L O C M R L A A N E N A H N C R L L A K D Y
Sc 1  - M S G N P G S S L S A L R P T P P P E R G S F P L D H D G E C T R Y M Q E Y L K C L Q L V Q N E N A M N C R L L A K D Y
Kl 1  - M S A N P G N S L K A L S P T P P P E R G S F P L D H D G D C T K Q M Q E Y L S C I K L V K G E N A P N C R L L A K E Y
Pb 1  M S F G S P G G R S V N I K P K P P E R G S F P L D H D G E C K F I I S S Y L Q C L K K G G G V M D E T C R K L A K S Y
Sp 1  ----- M T R E P P P E R G S F P L D H F G E C T H V M K Q Y L E C I K V K R - E N Q E E C R L L A K Y

Cg 61  L K C R M D H O L M D K D E W K N L G L P P D D K Q -----
Sc 60  L R C R M D H O L M D Y D E W S H L G L P E D A P G N N G K T I K D A T D N K -----
Kl 60  L K C R M D N K L M D R D D W K H L G L P S D K K E A N D V T K E T T P T S G Q -----
Pb 61  L S C R M D H N L M A P E C F E N L G L V F D E D K K K R E E A S A S T T A A S E S K K P S T -----
Sp 49  L Q C R M D T G L F G K D D M K N L G F H G D E N A T S T S L S S S N D G N N N S N S S S S D N K T G G E

```

FIGURA 20: Alinhamento da *PbCox19p* de *P. brasiliensis* (Pb) com as proteínas homólogas de *Candida glabrata* (Cg), *Schizosaccharomyces pombe* (Sp) *Kluyveromyces lactis* (Kl) e *Saccharomyces cerevisiae* (Sc).

4.1.8 *PbCOX23*

A busca por ESTs de *P. brasiliensis* que apresentassem similaridade com a proteína *Cox23p* de *S. cerevisiae* retornou três clones distintos de ESTs (EST008699 eST001598 e EST019466), todos pertencentes ao consórcio da região central do Brasil (Felipe et al.,2003). Para o estudo deste gene de *P. brasiliensis* selecionamos o clone EST008699. O fragmento do inserto de cDNA foi inteiramente seqüenciado e é constituído de aproximadamente 800bp e a região codificadora da *PbCox23p* é constituída por 76 resíduos de aminoácidos que apresenta 43% de similaridade à proteína homóloga de *S. cerevisiae* (Tabela 4). O alinhamento entre as regiões é significativo entre os resíduos 81 a 147 aa da *ScCox23p* que é constituída por 151 aa (Fig. 21). A ORF da proteína *PbCox23p* de *P. brasiliensis* está localizada bem no início da seqüência do cDNA da EST, que apresenta uma longa região 3'UTR (não traduzida). Outra ORF de 104 resíduos é observada em outra fase aberta de leitura deste mesmo cDNA, porém esta não apresenta similaridade com nenhuma outra proteína depositada nos bancos de dados do GenBank/NCBI. Esta observação poderia indicar que a ORF codificadora da proteína *PbCox23* de *P. brasiliensis* não esteja completa no fragmento de cDNA entretanto, quando olhamos para o alinhamento com as homólogas de outros fungos (Fig. 22) podemos observar grande diversidade em ambas as extremidades da proteína. *S. cerevisiae* possui a maior região N-terminal enquanto que em *Aspergillus nidulans* verifica-se a maior região C-terminal. A ORF referente à *PbCox23p* de *Paracoccidioides brasiliensis* apresenta maior similaridade com a proteína homóloga de *Neurospora crassa* (Fig. 22). Considerando que somente *S. cerevisiae* e *Kluveromyces latis* contem uma extensa região N-terminal e que a parte conservada da proteína *Cox23* encontra-se na região central, é possível que a ORF de 76 resíduos encontrada na EST008699 de *P. brasiliensis* possa estar completa. As seqüências nucleotídica e peptídica da proteína *PbCox23p* foram submetidas ao banco de dados do GenBank/NCBI e pode ser acessada através do numero de acesso DQ402182.


```

> gi|6321908|ref|NP\_011984.1 G Mitochondrial intermembrane space protein that
functions in mitochondrial copper homeostasis, essential for functional cytochrome
oxidase expression; homologous to Cox17p; Cox23p [Saccharomyces
cerevisiae]
Score = 68.2 bits (165), Expect = 4e-10 Identities = 30/69 (43%), Positives =
46/69 (66%), Gaps = 3/69 (4%) Frame = +2

Query 59 EEPQSVWEKAKPMFTNKPASGYDDPCQDFADRSIKCMRRNGNDKTMCSDFQAYRDCKKE 238
++P++ K K F K S YYDPC++ + S +C+ RN D++ C +YF AYR+CKK+
Sbjct 81 DDPENFVNKYK--FALKADSQYYDPCEESKLSFQCLERNDYDRSKCQEYFDAYRECKKQ 138

Query 239 W-TTQRKNK 262
W T +RKN+
Sbjct 139 WLTARRKNR 147

```

FIGURA 21: Comparação entre a *PbCox23p* e a seqüência da proteína *ScCox23*. Alinhamento por BLASTx entre as seqüências completa do cDNA da EST008699 de *P. brasiliensis* correspondente à proteína *PbCox23* e a seqüência da proteína *ScCox23* de *S. cerevisiae*.

```

KlCOX23 1 -----MTDKQETTQPAEKLQOPEKVAENVDPSSLELN
ScCOX23 1 MEKPSPTRRQTSSLSTISNGMTMTNDNRDTTNTNSGSTSSNNSQPSSSSTPPAASGPVTD
NcCOX23 1 -----
GzCOX23 1 -----MSSSTPKD
PbCOX23 1 -----
AnCOX23 1 -----MAS

KlCOX23 32 RTKVNFTBEKTDVNYKRYEDDPESTLNQVRFVAVGASEYYDPCQESSKMSKCTEINNY
ScCOX23 61 RTKVNYYVPRSDDPSSFOYYEDDPENFVNKYKFAFKADSQYYDPCQESSKLSFQCLERNDY
NcCOX23 1 -----MAQAGSENKEPWNNEETPAKFEKSRSEVLDPCQEAQRSIRCLERNQG
GzCOX23 9 TVDTAEIPRVKDPESQAWSIDK-----PKFEKSKSEYDPCQEAQRSYRCLERNGG
PbCOX23 1 ---MDADKVKKEPQSVWEKAKE-----METNREASQYYDPCQDFADRSIKCMRRNGN
AnCOX23 4 HPEQSSSSSADVSSSWGKVER-----KETNKSASEYYDPCQDFADRSIRCMRRNPD

KlCOX23 92 DRDICHDYEDAYRECKKQWIKARREKREHFE-----
ScCOX23 121 DRSKCQEYFDAYRECKKQWLTARRKNFOQRE-----
NcCOX23 49 DRIMCSDYFQAYRECKKQWIERREQKRKAGALF-----
GzCOX23 63 DRNMCGEYFQAYRECKQEWTEKRREGRGTF-----
PbCOX23 50 DKTMCSDYFQAYRDCKKEWITQRNKS-----
AnCOX23 57 DRDMCHDYFQAYRECKKQWSTNAAFGLCVLGEWQENSVPNLHCEVYYTLGSAYMKLTNR

KlCOX23 -----
ScCOX23 -----
NcCOX23 -----
GzCOX23 -----
PbCOX23 -----
AnCOX23 117 QLTQKKLGSSTAK

```

FIGURA 22: Alinhamento da *Cox23p* de *P. brasiliensis* (Pb) com as proteínas homólogas de *Aspergillus nidulans* (An), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Gibberella zeae* (Gz), *Neurospora crassa* (Nc) e *Kluyveromyces lactis* (Kl). Resíduos de aminoácidos idênticos são pintados em preto e resíduos com características semelhantes estão em cinza.

A excisão a região codificadora da proteína *PbCox23p* direcionada para clonagem no vetor de expressão em *S. cerevisiae* foi realizada através de dupla digestão com as enzimas *SacI* e *KpnI*.

A digestão enzimática seguiu as instruções do fabricante (New England Biolabs). O fragmento de tamanho esperado foi separado em gel preparativo 1% agarose eletroeluído, purificado por extração com fenol e éter e precipitação com etanol. A ligação do fragmento *SacI/PbCOX23/KpnI* purificado no vetor pMGL4 foi realizada utilizando-se o kit de ligação (Fast Link™ DNA Ligation Kit -EPICENTRE TECHNOLOGIES). A mistura de ligação foi inserida em *E. coli* DH10B por transformação pelo método de CaCl₂ e 10 transformantes foram coletados aleatoriamente. Os pDNAs dos transformantes coletados foram extraídos e a seleção do plasmídeo recombinante *pMGL4/PbCOX23* foi realizada através de sequenciamento utilizando o oligonucleotídeo (386 – 5'-CAATATTTCAAGCTATAC-3'). O recombinante selecionado foi inserido por transformação, pelo método de LiOAc, no mutante nulo *a4741Δcox23::MHLU* de *S. cerevisiae*. Os transformantes foram selecionados em meio mínimo WO devidamente suplementado e a capacidade de complementação funcional da proteína *PbCox23p* em restaurar a deficiência respiratória dos mutantes de *S. cerevisiae* foi analisada quanto à capacidade de crescimento em meio com fontes de carbono não fermentáveis (etanol e glicerol). O crescimento dos transformantes incubados em estufa a 30 °C foi observado durante o período necessário entretanto nenhum crescimento foi detectado nesta condição, indicando que esta proteína não é capaz de restaurar a deficiência respiratória do mutante de levedura *S. cerevisiae*.

A *Cox23p* de *S. cerevisiae* é uma proteína solúvel também presente no citoplasma e no espaço intermembranar mitocondrial. Sendo uma proteína solúvel também não apresenta domínios de hélice transmembrana. É requerida para a homeostase mitocondrial e mutação neste gene leva à deficiência respiratória devido à ausência da citocromo c oxidase funcional (Barros et al., 2004). A *Cox23p* é homologa da *Cox17p* (Barros et al., 2004), uma metalochaperona (Beers et al., 1997) envolvida no transporte de cobre para a mitocôndria (Glerum et al., 1996). Barros et al., 2004, também reporta que homologas desta proteína em alguns fungos e em humano também são desprovidas de região N-terminal longa existente na proteína *Cox23p* de *S. cerevisiae* e que a *Cox23p* de *S. cerevisiae* truncada nos primeiros 75 resíduos ainda retém a capacidade de complementação funcional do respectivo mutante. Este resultado favorece nossas expectativas de que a ORF de 76 resíduos, identificada no genoma de *P. brasiliensis* possa realmente estar completa e que a incapacidade de complementação

funcional desta proteína *PbCox23p* no mutante *a4741Δcox23::MHLU* de *S. cerevisiae* não esteja relacionada à ausência da porção N-terminal.

4.1.9 *PbPET100*

Na busca inicial por seqüências de ESTs de *P. brasiliensis* similares à proteína *Pet100p* de *S. cerevisiae* identificamos somente um clone de EST (EST002126) o qual pertence ao consórcio da região central do Brasil (Felipe et al., 2003). O inserto de cDNA deste clone foi completamente seqüenciado e análise com a ferramenta ORFFinder do NCBI identificou uma ORF com 72 resíduos de aminoácidos com 39% de identidade à proteína *ScPet100p* de *S. cerevisiae* que é constituída por 111 resíduos. Esta ORF de 72 resíduos de *P. brasiliensis* não apresenta, portanto, a região N-terminal da proteína. Entretanto, na análise pela ferramenta BLASTX/NCBI da seqüência completa do inserto do cDNA indicou que a região N-terminal está presente, alinhando com similaridade razoável à região N-terminal da proteína *ScPet100p*.

Em uma nova busca, agora utilizando a seqüência do inserto de cDNA do clone da EST002126 como sonda, identificamos vários outros clones que apresentam similaridade com a proteína *Pet100p* e inclusive uma EST (RC2-Pb30001-125H07) representante do isolado Pb18, já que a EST002126 é originária do isolado Pb01. Portanto, além da possibilidade de identificarmos a fase de leitura completa referente à proteína *PbPet100p*, agora também teríamos a possibilidade de verificarmos se havia diferenças neste gene entre os dois isolados (Pb01 e Pb18) de *Paracoccidioides brasiliensis*.

O inserto do clone referente a EST-RC2-Pb30001-125H07 foi totalmente seqüenciado e a seqüência obtida foi submetida à análise através da ferramenta ORFFinder/NCBI. Neste clone identificamos uma ORF com 103 resíduos apresentando 42% de identidade com a proteína *Pet100p* de *S. cerevisiae*. As seqüências nucleotídica e peptídica foram submetida ao GenBank/NCBI sob o número de acesso AY603796. A proteína *PbPet100p* predita, apresenta uma massa molecular estimada de 11,5 KDa. A análise através da ferramenta ORFFinder mostra a presença de uma microORF (34 resíduos de aminoácido) em fase de leitura com ORF de 103 resíduos referente a *PbPet100p* na região 5'UTR, indicando que este gene possa ser regulado pos-transcricionalmente, ou seja, durante a tradução.

Utilizando o par de iniciadores (senso- 5' AGAAAGAGCTCGAAAGAAA 3' e anti-senso- 5' ACCGATCTGCAGTTAAAA 3') a região da ORF de 103 resíduos foi amplificada a partir do cDNA original e clonada no vetor de expressão pMGL3 de *S. cerevisiae*. Através

dos iniciadores utilizados para amplificação da ORF, foi inserido os sítios de reconhecimento para as enzimas SacI e PstI, nas extremidades 5' e 3', respectivamente. O fragmento amplificado e purificado foi inserido por transformação em célula competente *E.coli DH10B*.

Após a transformação da mistura de ligação em *E.coli DH10B* os pDNAs dos transformantes foram extraídos e analisados por seqüenciamento. O recombinante *pMGL3/PbPET100* selecionado foi utilizado no ensaio de complementação funcional do mutante nulo *aW303 Δ pet100/HIS* de *S. cerevisiae*. Não obtivemos a complementação funcional da deficiência respiratória deste mutante de *S. cerevisiae* com o gene *PbPET100*, indicando que a *PbPet100p* não é capaz de substituir a função da *ScPet100p*.

Através de análise de comparação de seqüência das duas ESTs de *P. brasiliensis* referentes ao gene *PbPET100*, sendo a EST002126 do isolado Pb01 e a EST-RC2-Pb30001-125H07 do isolado Pb18, verificou-se a existência de diferenças de seqüência entre os dois isolados. A análise pelo BLAST-2-sequence do NCBI indica as regiões das seqüências que apresentam diversidade (Fig. 23).

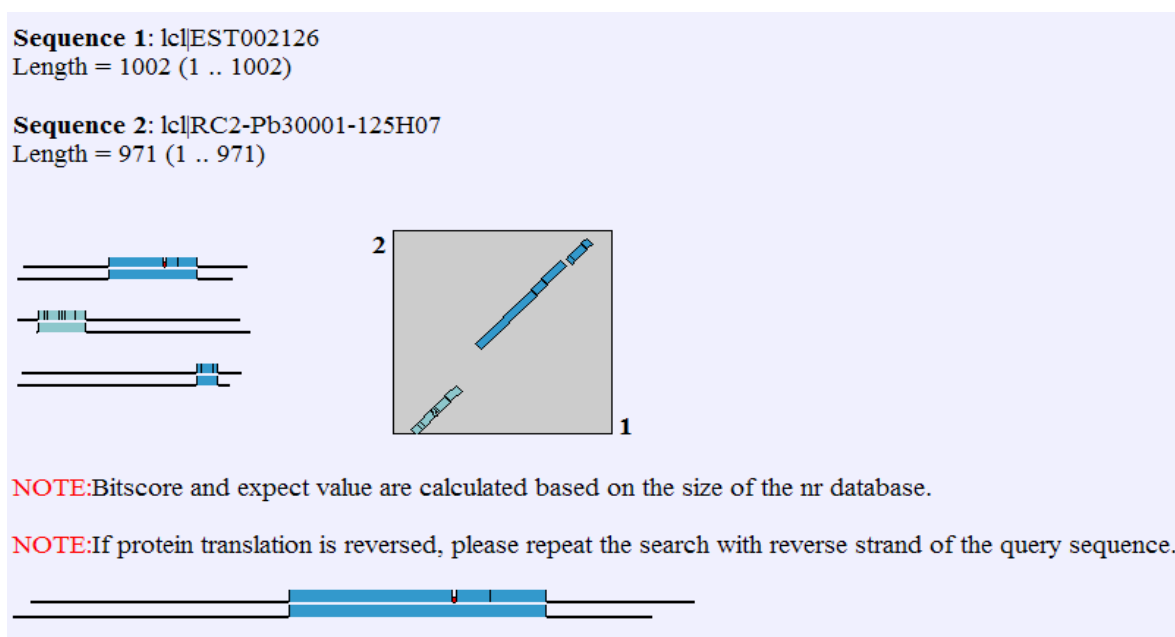


FIGURA 23: Comparação das seqüências das ESTs RC2-Pb30001-125H07-Pb18 e EST002126-Pb01, através da ferramenta BLAST 2 sequence do NCBI indicando presença regiões diferenciadas entre os dois isolados de *P. brasiliensis*.

Analisando os detalhes das seqüências de cDNAs dos dois isolados de *P. brasiliensis* podemos observar melhor esta diversidade (Fig. 24). Na seqüência da EST do Pb18 temos a presença de um microORF com 34 resíduos (comentada acima) em fase com a região

codificadora da proteína *PbPet100* enquanto que na EST do Pb01 não verificamos nenhuma, pelo menos não em fase.

>PbPET100 Pb18 (RC2-Pb30001-125H07)

AATTC^{~~~~~}CCCGGGATGGAAGAcGACGAGGCGCAGAcTACAGAGAATATTTCTGCGCaAATTGtGCCGCAATTCGA
 GAACCCCTCTTCATATCCGTCCGTTCCATCTTTCTGGATTCACTCGTTGCTTTGAATACATCGAACCCGT
 CCTATCGCTTGAACCCAGTTCGACACTGGTATCTCCTCCTGGAGTCCCCCGTCAGCACATCGCTTTTCGCGGAA
 GCGAAAAAGACCAATATTTCTGTTTCAGAAAAAAGGGCCTCTCCTACACTTCACTTTTGAATACATGGGGAAA
 GTATAGAGGTATAAATGAAAAGAATTACCAGGCAGAAAAGACCAGAAGGAAAAGAAATAGAAGAACATATCAATC
 CACCTTCTACAACA^{~~~~~}AAATCCAAGACTACTGCAAAAAGGAATATA^{~~~~~}TAGCGAGATACGAACAAAGAAAAGATACATG
 AGAGGAACCCCGCGCATCTCTACTAATCAACAATGCTCAGCGCCATCCTCCGCAGGCTCCAAGGCGGGAACC
 TGGAAAGTCTTCAAGTTCGGCATCTATATCCTTTTCCCCATCGGCTGCATGTACTACTTCGGCACAAACCTCGA
 AGAACGCTTCTCCGTCCCGGGCTACTGGCCACGAAGGAGCAATCGCATAAGATTCCGATGGAGCTAGAGGAG
 ATTGAGAAGGAATTGGCACGCATGAATAAGCAGAAGGCGCTGAGGAGAGCGCAGCTGAAAGGGGAGAAATGCCG
 AGAGCCAGAGTGGAAGTGGGAGTGGGAGTGGGAGTGGCAGGCGGGTTCATGAGATGGATGTTGGAAACAAC
 GGGATGGTTGTATGTGGACGTTGTTTATGGGGTGTTTTAACTGGAGATCGGTAACATCTTTGCTCCTTCAATT
 CTCTTTTCGTTTTATATATATAAATGGATGTGAGGATGCATTGTTAGATCGTGGATCTTAATTTGGCATGGGAT
 TGAGGAGTTGAGGAGTTTGAGATAGGATTTAATCTTGTCTTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

>PbPET100 Pb01 (EST002126)

A^{~~~~~}ACTAGTGGATCCCCCGGTGCTGCAGGAATTCGGCACGAGGACCAACTGAAAAGACAGCGGAAGCTGGAGGGA
 GAGAGTGCAGATACAGAAGTAATTCTGCCAATCGGCCCAATTCGAGAACCCCTCTCTTTCAATTTCCGTCC
 GTTCCATCTGTGCGAGATTGCTCGTTGCTTTGAATACATCGAACCCGTTCTATCGCTTGAACCCAGTTCGAAA
 CTGGTCTCCTCCTGAGTCCCCCGCAGCACATCGCTTTCTGGAAAGCGAAAAAGGGCAATATTTCTGTTTCGAAA
 AAAGGGCCTCTCCTACACTCCACTTTTGAATACATGGGGAAAGTACAAGAGGTATAAATGAAAAAGAATTACT
 AGGCAGAAAAGAAAGACCAGAAGGAAAAGAAATAGAAGAACATATCAATCTACCTCCTACAACACAATCCAAGGC
 GGGAACTGGAAAGTCTTCAAGTTCGGCATCTACATCCTTTTCCCCATCGGCTGGATGTACTACTTCGGCACAA
 ATCTCGAAGAACGCTTCTCCGTCCCCGGCTACTGGCCACGAAGGAGCAATCGCATAAGATTCCAATGGATCT
 AGAGGAGATTGAGAAGGAATTGACACGCATGAATAGGCAGAGGGCGCTGAGGAGAGCGCAGCTGAAAGGGGAG
 AATGTGCGAGAGTCAGGGTGGAAAGTGGGAGTGGGAGTGGCAGACGGATTCTGTGAGATGGATGTTGGATGCAAC
 TGGGGTGGTTGTATGTGAACGTTGTTTATGGGGTGTTTTAACTGGAGATCGGTAACATCTTTGCTCCTTCAAT
 TCTCCTTCGTTTTATATATATATATATATATATAAATAGATGTGAGGATGCATTGTTAGATCTTGGATCTT
 AATTTGGCATGGGATGAGGAGTTGAGGAGTTTGGATAAGATTTAATCTTGTCTTTTTTTTTTTGTTTTCCAT
 TTTAgGGGGTTTGCATATTGTGAATATATCTGTAGAGCCACTCCAGAAAATTTAAAAGACATGAAGCCCTT
 TAAAAAAAAAAAAAAAAA

FIGURA 24: Comparação das seqüências das ESTs RC2-Pb30001-125H07-Pb18 e EST002126-Pb01

indicando as regiões diferenciadas entre os dois isolados de *P. brasiliensis*. Presença de uma microORF na região 5'UTR em fase com a ORF codificadora da proteína *PbPet100* do isolado Pb18. Ausência de uma repetição GGGAGT na região C-terminal da proteína no isolado Pb01 e a diferença de tamanho da repetição TA na região 3'UTR de ambos os isolados.

Outra diferença é o tamanho da repetição (TA) observada na região 3'-UTR de ambos os isolados, sendo bem maior na EST do Pb01. Na região compreendendo a ORF referente à proteína *PbPet100p*, além da diferença de tamanho, também observamos a ausência de uma repetição (GGGAGT) na seqüência do isolado Pb01. A observações obtidas sugerem que este gene *PbPET100* representa mais um gene de *P. brasiliensis* que apresenta variações entre isolados.

O alinhamento das seqüências das proteínas *PbPet100* dos isolados Pb01 e Pb18 com as proteínas homólogas e de outros organismos pode ser observado na figura 25. Existe grande variação na região C-terminal das proteínas. De acordo com Forsha et al., 2001 a porção C-terminal da proteína compreendendo os últimos 62 resíduos de aminoácidos são essenciais para a função da *ScPet100p*. Esta diversidade nesta região da proteína de *P. brasiliensis* em relação à proteína *Pet100* de *S. cerevisiae* pode ser uma indicativa para explicar a ausência de complementação funcional da proteína *PbPet100* na linhagem mutante de *S. cerevisiae*.

Pb18-PET100	1	--MLSAILRRR	QGGNLEVF	KFGIYIL	FP	IGMYYF	GTNLE	ERFSV	PGW	WPTKE	QSHKI	PM					
Pb01-PET100	1	-----	-----	-----	-----	-----	MYF	GTNLE	ERFSV	PGW	WPTKE	QSHKI	PM				
An-PET100	1	---MSSILRRR	QGGNLEVF	KFGMYV	LF	PIGW	MYF	GTNLD	ERFSV	PGW	PTAEQ	SHKI	PL				
Nc-PET100	1	-----	MGGINLEVF	KFGMYL	LM	FP	IGM	FY	GTNLD	QRFSV	PD	FWPK	PENANKV	PY			
Mg-PET100	1	-----	MGRINLEVF	KFGMYV	MF	PIGV	MFY	GTNLD	NRFT	VND	FWPK	PEQ	INKV	PT			
Sc-PET100	1	MGLFNNFK	FKYTRA	LEIF	RF	SFCL	LAPVA	V	MYI	IGT	DTDK	RLN	VPG	FWED	PAT	INC	IPK
Ca-PET100	1	-----	-----	-----	-----	-----	MYV	VGL	DTDK	ENL	PG	FWED	P	ST	INC	IPK	
Pb18-PET100	59	ELEEIEKEL	LARMNK	OKAL	RRAQL	KGENA	ESQ	SGSG	SGSG	SAE	AGS	-----	-----				
Pb01-PET100	30	DLEEIEKEL	TRMNR	ORAL	RRAQL	KGENV	ESQ	GGSG	SGSA	ETDS	-----	-----	-----				
An-PET100	58	EKEEIDQEL	LARMRR	VDAL	KRRER	RERQL	AMQ	CELEA	QSQA	LAQA	QAQS	QNQSV	SE				
Nc-PET100	51	DRDEIHEEL	ERLRAR	RLYL	REOR	LASEA	RQ	QQQ	QHSN	DCE	-----	-----	-----				
Mg-PET100	51	DRDEIRAEL	ERLR	TQRL	LNDR	RLA	AEAA	EARL	RPOA	PEE	SRTE	-----	-----				
Sc-PET100	61	EPYEIKAE	LARMK	ERLE	KRIR	LEK	KIQ	EFG	LDLEE	EKE	KIKR	DL	L	K	K	G	---
Ca-PET100	30	EPHEIQAE	LARIK	VRLE	KRKR	LEK	ARE	LGI	SEED	FEE	EQ	QE	ILS	-----	-----	-----	-----

FIGURA 25: Alinhamento das proteínas *PbPet100* dos dois isolados (Pb01 e Pb18) de *P. brasiliensis* (Pb) com as proteínas homólogas de *Aspergillus nidulans* (An), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Neurospora crassa* (Nc), *Magnaporthe grisea* (Mg) e *Candida albicans* (Ca). Resíduos de aminoácidos idênticos são pintados em preto e resíduos com características semelhantes estão em cinza.

A análise quanto à presença de domínios característicos de hélices transmembrana indicou a presença de uma hélice de membrana nesta proteína (Fig. 26A), localizada na região N-terminal da proteína de *P. brasiliensis*.

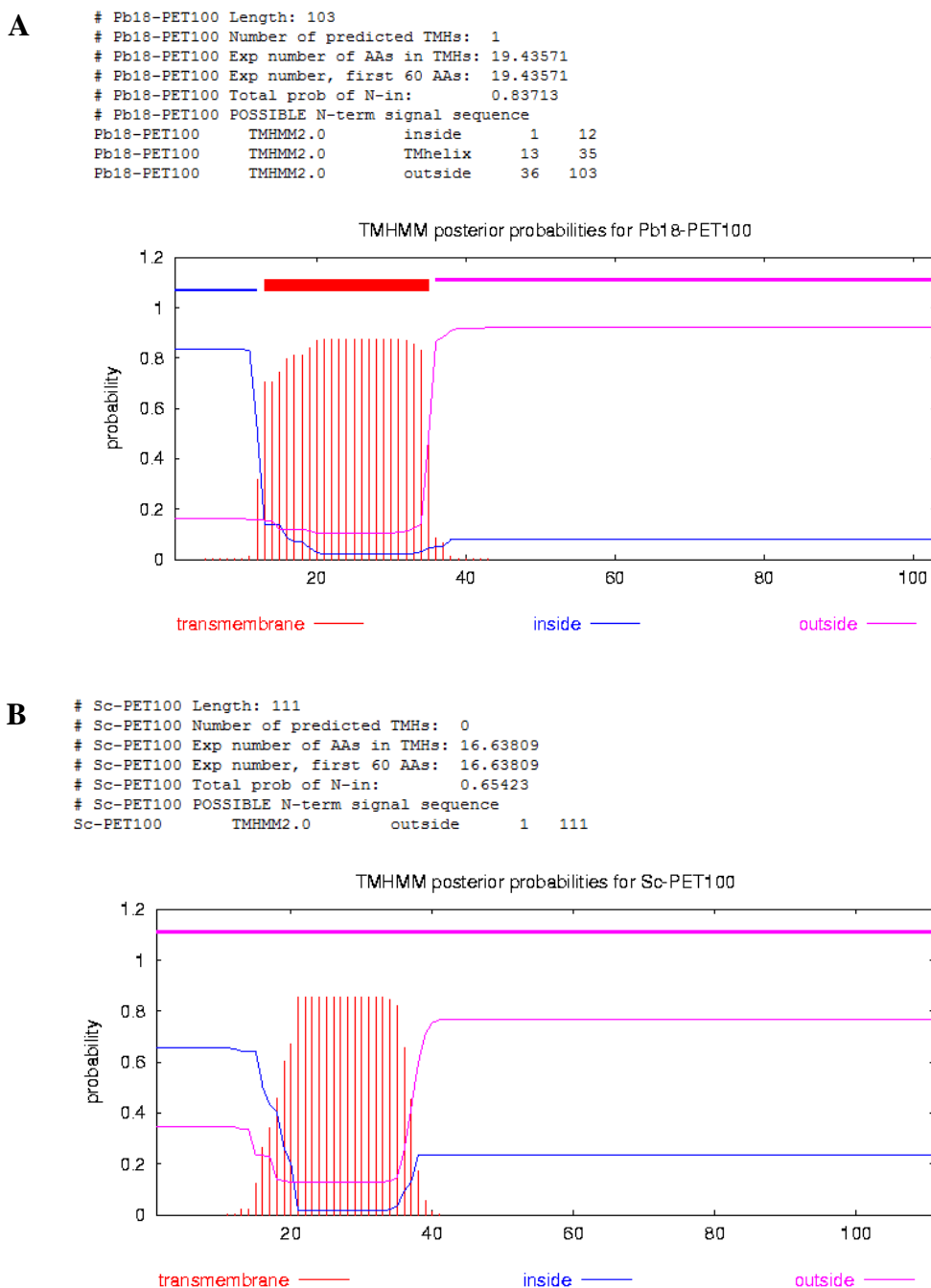


FIGURA 26A: Análise de resíduos característicos de hélices transmembrana na *PbPet100p*, obtida a partir da ferramenta TMHMM Server v. 2.0 disponível na página <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>. 26B: Análise semelhante com a proteína *ScPet100p* de *S. cerevisiae*.

Esta mesma análise também identifica resíduos característicos de hélices de membrana na proteína ScPet100p de *S. cerevisiae* (Fig. 26B) entretanto nenhuma hélice é predita. De acordo com Church et al., (2005), a proteína ScPet100p de *S. cerevisiae* não está presente no citoplasma e na mitocôndria é predominantemente encontrada na membrana interna, como uma proteína integral, não tendo sido localizada na matriz ou no espaço intermembranas.

As linhagens de *S. cerevisiae* com mutação nula do gene PET100 perdem a atividade da citocromo c oxidase devido à ausência dos citocromos a e a₃, portanto, a proteína ScPet100p é requerida para a biogênese do complexo da citocromo c oxidase ativa. Entretanto, não é necessária para síntese, processamento ou transporte de subunidades da citocromo c oxidase para a membrana interna da mitocôndria e nem para a síntese do grupo heme A. Os estudos sugerem que a *Pet100p* não é requerida para a síntese ou localização das subunidades da COX na mitocôndria, mas é requerida em estágios posteriores na montagem do complexo indicando que a *ScPet100p* poderia estar atuando tanto na organização das subunidades como na montagem das mesmas no complexo da citocromo c oxidase funcional (Church et al., 1996).

A proteína *ScPet100p* embora não tenha sido encontrada como parte da holoenzima citocromo c oxidase foi identificada em um sub-complexo incluindo as subunidades VII, VIIa e VIII através de experimentos de sedimentações em gradientes de sucrose e, portanto embora se saiba que esta proteína seja necessária para a biogênese do complexo citocromo c oxidase funcional estudos futuros ainda deverão ser realizados para se determinar a função específica da mesma. Provavelmente esta proteína seja a primeira chaperonina envolvida na montagem do complexo da citocromo c oxidase identificada que não está participando da montagem do grupo heme A ou no recrutamento de íons cobre para a mitocôndria (Church et al., 2005).

4.1.10 *PbPET112*

Para estudarmos o gene *PET112* de *P. brasiliensis* homólogo da proteína *Pet112p* de *S. cerevisiae* selecionamos a EST-VP1-Pb30001-203E03 (Goldman et al., 2003). O seqüenciamento completo do inserto deste clone foi realizado utilizando-se a técnica de inserção de transposons. O cDNA completo é constituído de aproximadamente 2003bp. A fase aberta de leitura correspondendo à proteína *PbPet112p* é constituída por 603 resíduos de

aminoácido e foi identificada utilizando-se a ferramenta ORFfinder do NCBI. Esta ORF compartilha 32% de identidade com a proteína *Pet112p* de *S. cerevisiae* e contém os domínios conservados (GatB) da família de proteínas *Pet112p* (Fig. 27).

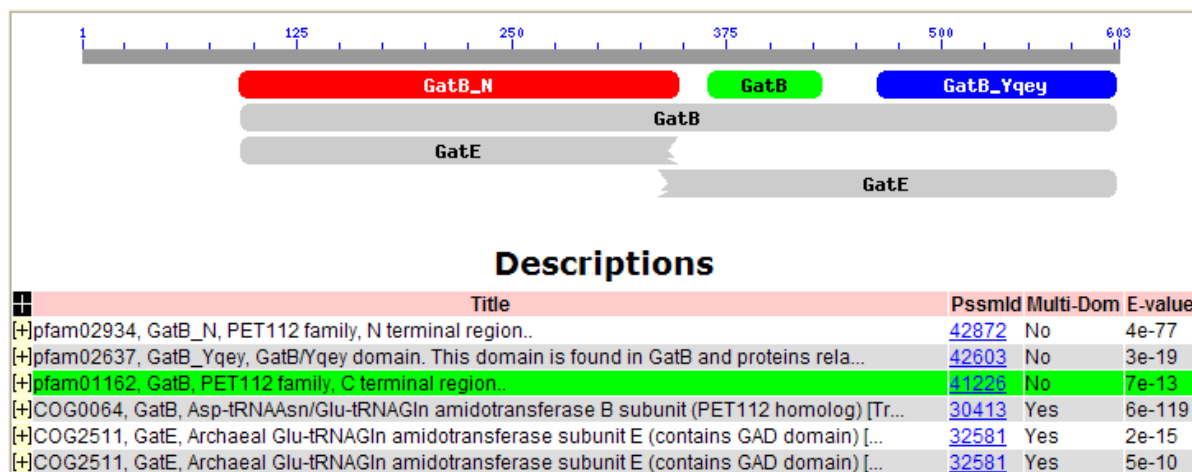


FIGURA 27: Alinhamento por BLASTp da ORF referente a proteína *Pet112p* de *P. brasiliensis*. identificada na EST-VP1-Pb30001-203E03. A figura mostra os domínios conservados da família de proteína *Pet112*.

Uma análise de seqüência peptídica da *PbPet112p*, utilizando a ferramenta EditSeq do programa DNASTAR indica que esta proteína possui uma massa molecular de aproximadamente 66,7KDa. As seqüências nucleotídica e peptídica referente à *PbPet112p* foram depositadas no bancos de dados do GenBank/NCBI com o número de acesso DQ402183.

Para excisão desta ORF direcionada para clonagem em vetor de expressão de *S. cerevisiae* utilizou-se as enzimas *KpnI* e *XbaI*. Ambos os sítios estando presentes nas extremidades adjacentes do plasmídeo original de clonagem (pCMV-Sport6 da Invitrogen). A digestão foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (New England Biolabs). O fragmento *KpnI/PbPET112/XbaI* foi separado em gel preparativo 1% agarose e recuperado do gel por eletroeluição, seguido de purificação por extração com fenol e éter e precipitação com etanol. O fragmento purificado *KpnI/PbPET112/XbaI* foi ligado no vetor de expressão pMGL4, previamente linearizado com as mesmas enzimas e tendo as extremidades 5' defosforiladas pela enzima CIP –Calf Intestine Phosphatase. O recombinante foi então selecionado por transformação da mistura de ligação em *E.coli DH10B* competente seguido de análise por seqüenciamento dos pDNAs isolados dos transformantes.

O gene *PET112* está envolvido no processo de síntese protéica mitocondrial e conseqüentemente o mutante *aW4741Δpet112/MHLU* possui o genoma mitocondrial muito

instável. Embora, várias tentativas de se isolar uma linhagem mutante de *pet112* contendo o mtDNA íntegro tenham sido realizadas este objetivo não foi atingido, portanto, os testes de complementação funcional do gene *PbPET112* em mutantes de *S. cerevisiae* também não foram realizados.

A complementação heteróloga funcional em mutantes de gene em *S. cerevisiae* já foi obtida com a proteína homóloga *Pet112p* da bactéria *B. subtilis* (Kim et al., 1997).

O gene nuclear *PET112* foi identificado em *S. cerevisiae* através da análise de um mutante (pontual) *pet112* que apresenta uma inibição na concentração da *Cox2p* enquanto que o nível de mRNA para o gene COX2 no mutante *pet112* apresenta-se normal. Deleção do gene *PET112* em *S. cerevisiae* desestabiliza o genoma mitocôndrial, sugerindo que esta proteína possa estar envolvida na síntese protéica da mitocôndria (Mulero et al., 1994).

Em uma busca por seqüências relacionadas ao gene *PET112* nos bancos de dados de ESTs, Petruzzella e colaboradores (1998) identificaram um cDNA no genoma humano que possui uma fase de leitura correspondendo a homóloga desta proteína (*Pet112-like*) em que compartilha 30% de similaridade com a proteína *Pet112p* de *S. cerevisiae*. Testes de complementação funcional com esta proteína (*Pet112-like*) humana ainda não foram descritos.

Nenhum domínio de hélice transmembrana foi identificado nesta proteína de *P. brasiliensis* ou em *S. cerevisiae*.

O alinhamento da proteína *Pet112p* identificada em *P. brasiliensis* com as homólogas de outros fungos e com a proteína *Pet112* da bactéria *B. subtilis* (Fig. 28) indica um bom nível de conservação da *PbPet112p* em várias regiões entretanto há várias regiões onde não existe semelhança alguma. Se considerarmos a importância da região N-terminal na complementação heteróloga, podemos perceber que há pouca ou nenhuma semelhança nesta região entre as proteínas de *P. brasiliensis* e de *S. cerevisiae*, ao contrário do que ocorre entre as proteínas de *S. cerevisiae* e *B. subtilis* (que são funcionalmente intercambiáveis) existindo alta similaridade nesta região (Fig. 28).

PbPET112

```

Pb 1 --MIRQCLSRRAACPCYRIAAGGTELTGCLYPQSSRLSRRGRDWSSTSR-----
Ao 1 -----MLRPWLRQSTRAARSLPCCQCPRPYSRLPTLTSPSSSVRR-----
Nc 1 MPRIPTVELSRYLTLGHIASPGCLRARAALPGKNTRVALGGAPLPSRQLQPRQHARYLTT
Bs 1 -----
Sc 1 -----

Pb 49 --AIDTQTSGASNGADYVPLRKQLKEQAREGRAATR--KGEVSPPEHEDWELTVGIEIHA
Ao 42 -----LQTSASESQDRVPLRKQLKONAKALKAERQ--RRESEEEASRQKWELTVGIEIHA
Nc 61 ETSFANPSATTSSPAAAAPFRKQLKEQAKALKKSGHKKKSSDNQTVPGWELTVGIEIHA
Bs 1 -----MHFETVIGLEIVHV
Sc 1 -----MLRLARFYSLARTKAIHSHGAPFRPEYALKCGLEIHT

Pb 105 QLDTDTKLFSRAS---AAIDDPNSNVALFDIALPGSQPLFQPATLIPALRAALALNCDV
Ao 95 QLNTETKLFSTRAS---TSSTDLPSNVALFDLAFPGSQPEFQVPTLIPALRAALALNCDI
Nc 121 QLNTAHKLFSPAT---TSFNDEPNTHVAFDLALPGSQPLFQPATLIPAVRAALALNCSI
Bs 14 ELKTDSKMFSPSP---AHFGAEPNSNTNVIDLAPGVLPVVRRAVDWAMRASMALNMDI
Sc 38 QLNTKNKLFSSQSTNSATSLVDAPNHHTSYDIALPGTQPVLNLEAIFAMKLSLALGSQV

Pb 162 QRVSFRDRKHYFYQDOPAGYQITQY YEPYAKNGSIWLGPHDGI AKEDGVGVKIGIKQIQQL
Ao 152 QPVSFRDRKHYFYQDOPAGYQITQY YEPFARNGYVDLFGYDGIAPEDGDHVRIGIKQVQL
Nc 178 QPVSFRDRKHYFHWDPQSCYQITQY YEPFAKDFITLYARDGIAAEDGEIKVGIKQVQM
Bs 71 ATNSKFRDRKNYFYPDNPKAYQISQFDQPIGNGYIDIEVDG-----ETKRIGITRILHM
Sc 98 NSISQFDRKHYFYGDOPQGYQLTQHYRPFARGCKINLSKELDDIDES--AKEIGILQLQI

Pb 222 EQDTAKSQELPSS---TYLLDFNRVSRPLIEIITLPEQIHPATAAACVVKIQITILQSVGA
Ao 212 EQDTAKSQEYHPS---TQLLDFNRVSHPLVEIITLPEQIHTPATAAACVVKIQAILQSCSA
Nc 238 EQDTAKITTAQPGD---VQWLDNRVGVPLIEIITLPEIHPATAAAIVRKVQMVLASVDA
Bs 124 EEDACKSTHKDG---YSLVDLNRQGTPLIEIVSEPDIRSPKEAMAYEKRSITQYTG
Sc 156 EQDTGKSHYETDKDVI TLVDLNRSNVPLIELVTKPDLFSDIKQVRAFIKKYQLVRLHI

Pb 279 VTTGMEGGLRADVNVSVRKRSEGVGDHGYHGITGLGORTEIKNLSSFKAVENAI IAERD
Ao 269 VTTGMEGGLRADVNVSVRQRGTEGVHGYGGIGGLGORTEIKNLSSFKAVEDAIIAEN
Nc 295 CVSGLEEGLRADVNVSVRRTDPS-----GKLGTRTEIKNLSSFKAVEDAIIAERD
Bs 180 SDCKMEEGSLRCDANISLRPYQKE-----FGTKTELKNLNSFNKYKKGLEEYEEK
Sc 216 SSGDLETGAMRVNVNLSINEYARVE-----LKNLPNTS-----STINAIKYEYQ

Pb 339 RQIAVLRAGGA---IEGETRGWTLGSTETRLRGKEGEVDYRYPDPDLGPVIIGIDVFF
Ao 329 RQIAVLESGGV---VEGETRGWTLGSTETRRRLRGKEGEVDYRYPDPDLPLLLIGADLVS
Nc 347 RQIELLEEGGE---VKGETRGWSLGSTETRRRLRGKEGEVDYRYPDPDLGPVWIGEDLVA
Bs 230 RQEEELLNGGE---IGQETRRFDESIGKTIIMRVKEGSDDYRYFLEPDI VPLYVDEDWKA
Sc 260 RQVELLSVGDTSLSLMEPETRGWTG--SSTVVKLRSKETTIDYRYPDPPELPIYNLAPDVIS

Pb 396 ELKAKL PVL PDALLQSLVQDPKYGLSTDDAKALTELDDGDRLDYKDAVDILITLQKDL
Ao 386 ELANTLETSSDELIG--LLTGKEYGLSIEDAKPLVELEDGARLEYQVVDILRDLQQDQD
Nc 404 RLRETMGVLPDQEQAD--QLMERYNLSAKDALSLMLLDGGARLQYFYNVLDLSEERLVADG
Bs 287 RVRETIPPELDERKA--KYVNDLGLPEYDAHVLTTLTKEMS--DFEFGAIDHGADVK----
Sc 318 GVRGLMPQLPDDIMR--ILMKKPYQLSLKDAKITLYNSNQND--MYNHEALRSYLDTFREF

Pb 456 DDFS GGGK---VVCNWLHELGLLTKSN-----LHWD SERVPQAQSLAE
Ao 445 PKSRGGLAR--VAGNWLHELGLLTKAD-----LPWDAERVSALSLAQ
Nc 462 QAVPEGAEHATLAANWCLHELGLLTKSASSSSSCSDPDVLEGLAMTPLGESPIVPSSSLAA
Bs 339 -----LTSNWL MGVNEYLNKNC-----VELKDTQLTPENLAG
Sc 376 SKLAGERSNAKIPTNWLIHFFLGDINKLQIP-----LAKAKETIAPPVFAQ

```

FIGURA 28: Alinhamento da *PbPet112p* de *P. brasiliensis* (Pb) com as proteínas homólogas (continua)

```

Pb 497 IINLLSRNKITGSTAKSLLAMVFDGDKR-----SISQIVEDENLLLSLSREYYI
Ao 487 IIDHVQRKQITGPTAKQVLAMVFDGDTTR-----AIPQLLEENLLLRPLSREYYV
Nc 522 ILHHLYSRTITAKVAKDLLWAVYRGEIPE-----GGTTSYIDTHGLWFKEIPPEEYYA
Bs 372 MIKLIEDGTMSSKIAKKVFPELAENGGD-----AKQIMEDKGLVQISDEATLL
Sc 422 FLKLLHEEVISATSCKMLLFHILENFQSNQCQLSIPDFSKLLEKFEIHLAINQVDPQELM

Pb 547 ALAEEVMRQNPKMVMEICEKRO-----LGKIGWLVGQIKQIGDRNRVEAQKAEELRE
Ao 537 ALAEAAISQNPQMVQIRTKNQ-----LGKLGWLVGQIMRMGEKGRVEAPKADAILRE
Nc 574 KLADEVIQGEEKIIGEFRLRWKQGKMKAYPQGLMFLVCKMVRGCPGRVEASGAERVLRR
Bs 420 KfvTDALDNNPQSTIEDYKNGKG-----KAMGFLVGOIMKAS-KGQANPOKVNSSLKQ
Sc 482 DLcNDVIAQHTDDTFIRNLVTGKK-----KSSIKFLIGQGMRRS-QGRIKANEFKFKFKE

Pb 600 IILK-----
Ao 590 IILG-----
Nc 634 RIIEEVYLPPELEKGE
Bs 471 ELDNR-----
Sc 536 IINIQW-----

```

FIGURA 28: Alinhamento da *PbPet112p* de *P. brasiliensis* (Pb) com as proteínas homólogas (continuação). *Aspergillus oryzae* (Ao), *Neurospora crassa* (Nc), *Bacillus subtilis* (Bs) e *Saccharomyces cerevisiae* (Sc). Resíduos de aminoácidos idênticos são pintados em preto e resíduos com características semelhantes estão em cinza.

4.1.11 *PbPET191*

Usando a seqüência da proteína *Pet191* de *Saccharomyces cerevisiae* como sonda para identificação de EST e RSTs no banco de dados de *P. brasiliensis* identificamos somente um clone de ESTs (EST013844) que apresentou similaridade significativa. O clone correspondente a esta EST pertence à biblioteca do consórcio da região central do Brasil (Felipe et al., 2003). Entretanto este clone não foi utilizado devido a falha de obtenção da excisão do plasmídeo (pBluescript do fago lambda) contendo esta EST embora tenhamos realizado este procedimento com sucesso em várias outras amostras. Análise de comparação por BLASTn da seqüência da EST013844 contra o banco de *P. brasiliensis* também não identificou nenhum outro clone com similaridade significativa. Portanto, para o estudo deste gene, a estratégia utilizada foi a clonagem da região codificadora a partir de amplificação direta do DNA genômico por PCR utilizando-se os oligo nucleotídeos específicos (senso: 5'-CGTGCGGAGCTCGATTGTGTT-3' e anti-senso: 5'-TCCGTTCTGCAGCTCCCC-3'), desenhados com base na seqüência da EST013844. Ao desenhar os oligos iniciadores inseriu-se os sítios de reconhecimento das enzimas *SacI* e *PstI* nas extremidades 5' e 3' da região codificadora do gene *PbPET191*. A amplificação por PCR foi realizada a partir de DNA genômico de *P. brasiliensis* nas seguintes condições: Uma desnaturação inicial de 94 °C por 4 minutos, seguido por 35 ciclos de: desnaturação a 94 °C por 1 minuto; anelamento dos oligos iniciadores a 55 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto. Após os 35 ciclos seguiu-se mais 10 minutos a 72 °C e finalmente resfriamento a 4 °C.

O produto amplificado (~640 bp) foi submetido à dupla digestão com as enzimas *SacI* e *PstI* seguindo as condições do fabricante (Fermentas Life Sciences). O produto da digestão foi purificado e ligado no vetor pMGL3 previamente digerido nas mesmas condições e tendo suas extremidades 5' desfosforiladas com a enzima CIAP – “Calf Intestine Alkaline Phosphatase”. A ligação seguiu o protocolo do fabricante (Promega). A mistura de ligação foi inserida por transformação na bactéria *E.coli DH10B* competente, preparada pelo método de Cloreto de Cálcio. Obtivemos vários transformantes sendo coletados aleatoriamente cerca de dez (10) deles para extração e análise de seus insertos por seqüenciamento. Dos dez transformantes analisados somente um, continha o fragmento genômico referente ao gene *PbPET191*. O produto da amplificação foi clonado diretamente no vetor de expressão pMGL3 como o objetivo de realizar o ensaio de complementação heteróloga direta (a partir do DNA genômico) no mutante de *S. cerevisiae*. Entretanto, uma análise por BLASTn da seqüência consenso obtida contra a seqüência da EST013844 revelou a presença de dois íntrons

interrompendo a região codificadora deste gene de *P. brasiliensis*. Portanto, inviabilizando o ensaio de complementação funcional, que não foi realizado até o momento com este gene.

Os motivos canônicos de borda intrônica (5' GT...AG 3') que interrompem o gene *PbPET191* podem ser observados na figura 29. A proteína *PbPet191p* predita a partir da seqüência de nucleotídeos é constituída por 123 resíduos com massa molecular estimada de 13.1 KDa.

O alinhamento da seqüência da proteína *PbPet191p* com as homólogas de outros organismos indica que esta proteína é altamente conservada entre os fungos (Fig. 30) entretanto, com a proteína de *S. cerevisiae* o grau de similaridade é bem menor.

O gene *PET191* identificado e caracterizado (McEwen et al., 1993) como codificador de um fator de montagem do complexo da citocromo c oxidase devido à capacidade de restaurar a deficiência respiratória de mutantes respiratórios de *S. cerevisiae*. Entretanto, ainda não foi definida nenhuma função específica para está proteína. Pela escassez de EST (uma) encontrada nos bancos de dados de *P. brasiliensies* deve ser um gene pouco expresso entretanto é bem conservado entre os fungos analisados (Fig. 30).

Um estudo feito entre 53 pacientes, com deficiência da citocromo c oxidase, analisaram a presença de mutações em três genes (*COX16*, *COX19* e *PET191*) relacionados com atividade da COX entretanto, não foram identificadas nenhum tipo de mutação nesses três genes que pudessem ser responsáveis pela deficiência (Tay et al., 2004).

```
>PCR Pb18 PbPET191
TGTTGGAAGAGATCAATAGACAGGATATCATTATAATTATAATGCCAGCTCCTGCAAAGATATCCGTAAGTT
CTCCATCTTAGATACCTTCGATATATCATTAGTGCCTATCCAATTCCTGGTGCCTGCTCTTCC
CCTTCGAGCATATTAATTTGTGCCTGCTAAGGTTTTTCCAAGTAGGCCTCGCCCTGGCACAGTGCCTCCAACA
ATCCGACTGCATATTAGTTCAACAGAAAGCACCAGCATGAATGCCTCAGACCCCGCACCTCGATGAGCTACCC
GTGAAATGTCAGCAATTACGCAAGGGCCTCGGTGAATGCAAGTGCCTTGAAAACCTCCCGTTATTCCTCAAAT
TCCACTCTAGCAGTCAAAATTTGTGCCGTTAACTAACCAGGCCCATGTTGGAAAACCAATACAGACGGGGAATGG
TAGATATGCGCAAGCGGTTCCGCGTAACCAACCCATCGCATTGGGGAATGAAGTCGATTCCAAAACAGGTGA
AGTTATTAGTAACAGAAAGCCGTTAAACAGTTGTATGCGGGCAAGCCGGCGTTTCAAAGTGTCAAGGAGATT
AATGGTGTGAAGGTGCAGATGGATCCAGAGAAGACGAGGGGTCTGTAGATAACGGGGG
```

FIGURA 29: Análise da seqüência consenso do inserto da construção pMGL3/PbPET191. indicando a região codificadora do gene PET191 de *P. brasiliensis* bem como os introns e as bordas intrônicas (5' GT...AG 3').

PET191

```

Pb01 1 MPSSCKDIRLALAQCLOOYDCILVQOKTPECLRPPHLDELVPVKCQQLRKGLSECKRGMV
Pb18 1 MPSSCKDIRLALAQCLOQSDCILVQCKAPHECLRPPHLDELVPVKCQQLRKGLGECRGMV
Ac 1 MPSSCQDIRLALAQCLOQSDCIMVQGKTPHECLOPPYLENLPVKCQQLRKGLSDCKRGMV
Ci 1 MPSSCKDIRLALAQCLOESDCIMVQRNTPRECLREPHLDQLVPVKCQQLRKGLSECKRGMV
Sc 1 MVA SCKDQKKAVALCLQRSPCVMIERHNPECELDNPEL NKDLPEL CIAOMKAFLDCRGI

Pb01 61 DMRKRFRGNQPIALGSEVDPKTGEVISKRQPVKQLSAGKPAFCNVKEINGDEVQMDPEKT
Pb18 61 DMRKRFRGNQPIALGNEVDSKTGEVISNRKPVKQLYAGKPAFQSVKEINGDEVQMDPEKT
Ac 61 DMRKRFRGNQPIALGSEVDPTTGEVITKTKPVGQLYAGKPAFQSVKEISGDEVQMDPEKT
Ci 61 DMRKRFRGNAPVSLTKRETD TDTGEVVEKRTPVPEQLYAGKPAVQSIKQTS GDEA QMDPEKT
Sc 61 VDMT RFTGNAPLSTGKYDQOYENLCKGK FDPREEMEKLKLLNSQQKD

Pb01 121 RGL
Pb18 121 RGL
Ac 121 RGL
Ci 121 RGL
Sc

```

FIGURA 30: Múltiplo alinhamento das seqüências das proteínas *Pet191p* de *Paracoccidioides brasiliensis* dos isolados Pb18 e Pb01 com as proteínas homólogas, de *Ajellomyces capsulatus* (Ac), *Coccidioides immitis* (Ci) e *Saccharomyces cerevisiae* (Sc). Resíduos de aminoácidos idênticos são pintados em preto e resíduos com características semelhantes estão em cinza.

4.1.12 *PbMSS51*

Utilizando a seqüência da proteína *Mss51p* de *Saccharomyces cerevisiae* em análise comparativa de seqüências através da ferramenta tBLASTn identificamos nos bancos de dados de ESTs de *Paracoccidioides brasiliensis* várias ESTs apresentando alto nível de similaridade com a proteína da levedura *S. cerevisiae*. Para o estudo do gene *PbMSS51* de *P. brasiliensis* selecionou-se o clone de EST-VP1-Pb00001-166F10 que pertence à biblioteca do consórcio paulista (Goldman et al., 2003). O inserto deste clone foi inteiramente seqüenciado através da técnica de seqüenciamento por inserção de transposons e a seqüência completa do cDNA consiste de aproximadamente 1774bp. Utilizando a ferramenta ORFFinder do NCBI identificou-se uma fase aberta de leitura referente à proteína *Mss51p* de *P. brasiliensis* que é constituída de 514 resíduos. Esta ORF compartilha 38% de identidade com a proteína *ScMss51p* (Tabela 4). As seqüência nucleotídica e peptídica deste gene de *P. brasiliensis* foram depositadas no GenBank/NCBI com número de acesso DQ003715.

Por análise do mapa físico de restrição da seqüência completa do cDNA utilizando-se a ferramenta nebcutter da New England Biolabs, identificou-se os sítios para as enzimas KpnI e XbaI nas extremidades 5' e 3' da região da ORF que excisam a ORF direcionada para a

construção do recombinante com o vetor de expressão pMGL4 de *S. cerevisiae*. A digestão seguiu as instruções do fabricante (New England Biolabs) das enzimas e após a digestão com as respectivas enzimas de restrição o fragmento *KpnI/PbMSS51/XbaI* foi isolado em gel preparativo 1% agarose e recuperado do gel por eletroeluição, seguida de purificação por extração com fenol e éter e precipitação com etanol. O fragmento purificado foi ligado no vetor de expressão pMGL4 previamente linearizado com as mesmas enzimas e tendo as extremidades 5' defosforiladas pela enzima CIP –Calf Intestine Phosphatase. O recombinante foi então selecionado por transformação da mistura de ligação em *E.coli DH10B* competente seguido de análise por dupla digestão com SacI/PstI e seqüenciamento dos insertos dos pDNAs isolados dos transformantes. O recombinante selecionado *pMGL4/PbMSS51* foi então inserido por transformação no mutante deficiente respiratório de *S. cerevisiae aW4741Δmss51/MHLU* seguindo o método de LiOAc. Os transformantes obtidos foram selecionados em meio mínimo de cultura (WO) devidamente suplementado e a capacidade de restauração da função respiratória dos transformantes com o *PbMSS51* foi analisada em meio de cultura contendo etanol e glicerol como fonte de carbono (EG). Neste caso, mesmo após longo período de incubação a 30 °C longo não obtivemos sucesso na complementação funcional.

O alinhamento da *PbMss51p* com as proteínas homólogas de outros fungos incluindo *S. cerevisiae* (Fig. 31) apresenta algumas características da proteína predita *Mss51p* de *P. brasiliensis* que explicaria a não complementação funcional no mutante de *S. cerevisiae* utilizado.

Embora a *PbMss51p* compartilhe de 38% de identidade com a *Mss51p* de *S. cerevisiae* entretanto, a *Mss51p* de *P. brasiliensis* possui 78 resíduos a mais, sendo que estes resíduos são encontrados na forma de inserções, tanto na região N-terminal (supostamente uma região de endereçamento da proteína *PbMss51p* para a mitocôndria e, portanto, crucial no que diz respeito ao desempenho de sua função) quanto em regiões conservadas da proteína o que conseqüentemente estaria atuando na estrutura tridimensional da proteína *Mss51p* de *P. brasiliensis* suficientemente para impedir as interações necessárias com seus alvos em *S. cerevisiae*. Quando observamos a comparação destas proteínas (*PbMss51p* e *ScMss51p*) podemos observar que os 78 resíduos extras da *PbMss51p* estão distribuídos em inserções ao longo da proteína da seguinte maneira: 25 resíduos extras na *PbMss51* entre os resíduos 33 e 34 de *S. cerevisiae*; 12 resíduos entre os resíduos 42 e 44; 28 resíduos entre os resíduos 87 e 88 e 7 resíduos de *P. brasiliensis* entre os resíduos 298 e 299 de *S. cerevisiae* (Fig. 31).

A proteína *Mss51p* de *S. cerevisiae* foi inicialmente identificada (Faye et al., 1983) como sendo requerida para a maturação *Cox1p*. Este gene também já foi identificado em outros organismos além de fungos, inclusive no reino animalia como *Drosophila virilis* e *Apis mellifera*. Barrientos et al., 2004, mostram que a proteína *Mss51p* de *S. cerevisiae* atua tanto como fator de indução de transcrição quanto como fator de alongação durante a tradução da proteína *Cox1p* na mitocôndria. Segundo o autor, a *Mss51p* juntamente com a proteína *Cox14p* formariam um complexo transiente com a proteína *Cox1p* recém sintetizada e a liberação de *Mss51p* que atuaria na indução de nova transcrição de *COX1* estaria dependente do próximo estágio de montagem da citocromo c oxidase, provavelmente envolvendo a proteína *Shy1p* (Barrientos et al., 2002).

Como este gene de certa forma está envolvido no processo de síntese protéica mitocondrial, poderíamos desconfiar da instabilidade do genoma mitocondrial desta linhagem mutante (*a4741Δmss51/MHLU*) desde que segundo Myers e colaboradores (1985), mutantes de genes nucleares envolvidos na síntese protéica mitocondrial de *S. cerevisiae*, induzem a instabilidade deste genoma e isso se reflete na geração espontânea de petites, ou seja, linhagens com grandes deleções ou perda total do genoma mitocondrial. Entretanto essa possibilidade foi descartada através da análise de cruzamento da linhagem mutante (*a4741Δmss51/MHLU*) com a linhagem α KL14p^o, que não apresenta DNA mitocondrial. Os diplóides deste cruzamento cresceram em meio contendo etanol e glicerol como fontes de carbono, indicando que o genoma mitocondrial da linhagem mutante *a4741Δmss51/MHLU* está funcional. Assim, como a proteína de *S. cerevisiae*, a proteína *Mss51* predita de *P. brasiliensis* também não apresenta nenhum domínio característica de hélice transmembrana.

MSS51

```

Pb 1  -----MAMEFTCQKCAQALRLGIRPQIPAIRVRTLSHVGRRYQHLSTNASSLQAS
An 1  -----MAAEFTCGRCLQALRGLSSRSPLRAPHYAVSS-----KQVHGSSAALTRG
Nc 1  -----
Mg 1  MASTAEPAMRAAATLCRPCSRYMTAQLLAHRTASRRLCTAPSKTPRAGVSSSTQHKSSSA
Sc 1  -----MTVLYAPSGATQLYFHLLRKSPHNRLVVSHQTR-----
Cg 1  -----MIRTRTRAVQNTGKFYACVSK-----

Pb 51  KAGSWSTKVRTETTTITNVASLSASQPTTSGTSEAYNGRPLLQPHNLFHSYSNSSPSPEIR
An 47  LESRRSSRYLLAPKLASLPTAAPIIQKATSATSNGPNSRPLLKPNNLFHDFTQSPSPEIR
Nc 1  -----
Mg 61  PLVCQHEAARSSSPAGPVRKSYAKYSSSAAAAAAPSKPETKLSQDDLFHPMSESPIPSMR
Sc 34  -----RHLMGFVR-----N---ALGLDPPPSPEDPTPENRFHPWDQSPSVDLR
Cg 22  -----RQLMGFVR-----N---ALGLDPPPSPEDPTEQNRFHPWDQSPAVDLR

Pb 111  QRAAFIVQNAFCPHPSHRRTRVPTSPHDSEARKSPEASSDSQPPLHSQFECPCDCGVPIIYC
An 107  QRAAFIKQNAFCPHPSHQQTRVPVSPHDPESRKS--LTNASLPPAHSHFECPCDCGIPIIYC
Nc 1  -----
Mg 121  QRAAYIRQHAYCPHPDHRMSRVTPDGEVQPPAEN-----ATQSPAHVDFECPCDCGVPVYC
Sc 74  ERAAKIRTLAHCP-----VTGKDINYTCPLSGIPTHH
Cg 62  ERAARIKTLAKCP-----VTHKPIQYTCPISGIPTHH

Pb 171  SEEHWMDDFEAH-LEVCDTIRQINEDDHDLRSGRFFSEFNYPGPQEEESTVNMTNWDTFL
An 165  SEGHWMDDFEAH-LEVCETLRQINEDDHDLRSGRFFPEFVMPGLQENFVINMTNWDTFL
Nc 1  -----
Mg 176  SKEHWMDHYEEH-LEICDVLKQINEDDHDLRSGRFFPEFQYAGPQLEEAMVNMESWDTFL
Sc 106  SREAWEMDKAYHDSKKYEILLKVNIYEHDLRSGRPFPEDFPQQGYDKAVNITNWDLEF
Cg 94  SREAWEQDKEYHASKKYEILLKVNIYEHDLRSGRPFPEDFPRDQGPDRTVNITNWDLFL

Pb 230  YTRQFDAINDRNMRQVTRLLTYPVTIASVLHELSPYHIRKGGRLTPEGLKSLSALRYTL
An 224  YTREFDAIDDRSMRQVTRMLTYPLTIGSVLHELSPYSIRKNQRLTTEGLKSVSALRYSL
Nc 1  -----NDRCMRQATRLLTYPLTIGSVLHELSPYHIRN--RLTVEGLKSLIALRYTL
Mg 235  YTRAFNAINSDRCMRQATRLLTYPVTIGSVLHELSPYNIRKGGRLTTTEGLKSFSALRYTL
Sc 166  YTRSFYSMDTEFQIAAVTKMLSYPITIGSLLHKFSPYSLNPKGPITLEGLKSLAALRYTL
Cg 154  YTRSFYSMDTEFQIAAVTKMLSYPITIGSVLHQFSPYSLNPKGPITLEGLKSLAALRYTL

Pb 290  HPPKTGEGAAMSLRLKAPPVRIFILGARAESSLPRDVWLQLSYLFPRALISLIFIGPES
An 284  HPPRTGEGVDIQGLRVKAPPVRIFILGARAESSLPRDVWLQLSHIFPRSLIHLLIFIGPES
Nc 51  HPPKTGGNESIKGLRPEAPPVRIFILGARAESSLPRDAWVQLAHLFPLSRIHLLIFIGPES
Mg 295  HPPRSGGDGSVKGLRPEAPPARIFVLGARAESSLPRDVWVQLAHLFPRQIHLIMIGPES
Sc 226  YPLENRS--LPT--TTKNRAMRIFILGARAEAQLPGHVWKQLQFLFPEQSFEIHFIGPEC
Cg 214  YELQNRA--VTT--TAKNKPMRIFILGARAEAQLPGHVWKQLQFLFPQQNFEIHFIGPES

Pb 350  MANRDDEFPLPDRTPSNPFG-----AIVEDRLHSLMKITTYVDYFHTLHRANMFQPYD
An 344  MANRDEEFPLPERTPENPFG-----GIVEDRLGGQMKITTYVDYFHTMYKAQYFQPED
Nc 111  MMNRDDEFPLPERTPENPYG-----AVVEDRVWPTMKISTIVDYYHTIHKTYGFAPHD
Mg 355  MLNRDDEFPLPPRTPSNPYG-----AVVEDRVWPTMKISTIVDYYHNIHRTGHFAPYD
Sc 282  LYKRDKQEYVKSTTP-----VVQRVDETLKFIYRTNFFEVFHEAQDFFPYD
Cg 270  LYDRERNEYIRSATANGETAADGTTSSIPVTKRIDETMKFFYHTDYFHTLHTAQDFFPYD

Pb 403  PYFDCFVLFHPGLGHPSSSHEWE-ETLPYLLETKVPILCTGYSEWDMKRDLDWVMEKCGG
An 397  PYLDCTVLFHPGLGHPASSHEWE-ETLPLLLETKVPIITTGYTQWDMERDINWVREKCAG
Nc 164  PYFDCFVLFHPGLGHPASSHEWE-ETLPMLLETKAPIIATGYTQADMERDVEVWNKKKAG

```

FIGURA 31: Alinhamento da *Mss51p* de *P. brasiliensis* (Pb) com as proteínas homólogas (continua).

```

Mg 408 PYFDCFVLFHPGLGHPASAHEWS-ETVPMLETKAPIIVTGYTQFDMERDLAWVNKTAAG
Sc 328 PYMDVFFTFHHPGYASPE SHGSWMGETMKALLETKCAIFTTGFNKKDITDDINLVKSKYCK
Cg 330 PYQDVFFMFHPGLASPE SKDTWMKDTVKGLLDTKCAIFTTGFNKKDMADDIQILQDITYCK

Pb 462 EVDILLEPGENRFRSLRWDLNDMPHDISCGNWGLWVFRGKRYEATYKESAE-----
An 456 EFDILLEPGENIFRSLRWDLNDLDPHDISCGNWGLWAFRGKRYEATFKA-----
Nc 223 EFDILMEPGENIFRSLRWDLNDLDPQDVSA GNWGVWAFRGKSCGPREALICNGQARAACS
Mg 467 EFDILLEPGENKFRSLRWDLNDLDPQDVSSCNWGVWAMRGKRYETTTKGTAEQ-----
Sc 388 EMDVLMPEVRNVFGSTKWELNDMNPQEVYQFNMYIAGFRGKRYHTTIKRQ-----
Cg 390 EMDMLMNPVKNVFGSTKWELDDSDPHSVYQFNMYIAGFRGKRYHPIKV-----

Pb -----
An -----
Nc 283 KCLVSRQSAVARVMTA
Mg -----
Sc -----
Cg -----

```

FIGURA 31: Alinhamento da *Mss51p* de *P. brasiliensis* (Pb) com as proteínas homólogas (continuação). de *Aspergillus nidulans* (Na), *Neurospora crassa* (Nc), *Magnaporthe grisea* (Mg) *Candida glabrata* (Cg), e *Saccharomyces cerevisiae* (Sc). Resíduos de aminoácidos idênticos são pintados em preto e resíduos com características semelhantes estão em cinza.

No banco de dados do fungo *Paracoccidioides brasiliensis* identificamos somente dois clones de ESTs (EST003371; EST001174) e um clone da biblioteca genômica (RST-VP1-Pb50003-038F06) que apresentaram um bom nível de similaridade com a proteína *Sco1p* de *S. cerevisiae*. Os dois clones de ESTs pertencem ao consorcio de Brasília (Felipe et al., 2003). Os insertos destes dois clones foram totalmente seqüenciados resultando em um consenso de aproximadamente 0,9Kb cada. Entretanto em nenhum deles o a fase aberta de leitura (ORF) que codifica para a proteína *PbSco1p* está completa, faltando aproximadamente 112 resíduos na região N-terminal. As seqüências consensos destes clones foram utilizadas para a uma nova análise de comparação de seqüências contra o banco de dados de *P. brasiliensis* e nesta análise identificou-se outros dois clones da biblioteca genômica (RST) de *P. brasiliensis* que apresentavam alto índice de similaridade. Além dos dois clones genômico várias outras ESTs do consorcio de Brasília apresentaram similaridade de seqüências com as ESTs (EST003371; EST001174) referente á proteína *Sco1p* entretanto através de análise comparativa por BLASTx contra o banco de dados do NCBI verificamos que não se tratava da proteína *Sco1p* e sim de uma outra proteína com similaridade a família de proteína de citocromo p450. Um dos clones genômico (RST-VP1-Pb50003-038F06) foi escolhido submetido ao seqüenciamento completo utilizando-se a técnica de inserção de transposons. Obtivemos um consenso com 2115bp e por comparação de seqüências contra o banco de dados do GenBank/NCBI verificamos que embora tivéssemos obtido um pouco mais da porção 5' do gene *PbSCO1*, acessando inclusive o domínio completo da proteína *PbSco1p* este ainda não

estava completo (Fig. 32). A comparação da seqüência consenso do clone RST-VP1-Pb00003-038F06 por BLASTn contra o banco de dados do *P. brasiliensis* nos indicou que este gene é dividido estando interrompido por dois íntrons sendo que o segundo está em fase com a fase aberta de leitura do gene *PbSCO1p*. Entretanto, a partir da análise de comparação utilizando a nova seqüência consenso obtida se pode verificar a presença de outra EST (EST008644) alinhando na região 5' do fragmento genômico e por esta EST finalmente conseguimos identificar o condon inicial do gene de *PbSCO1*.

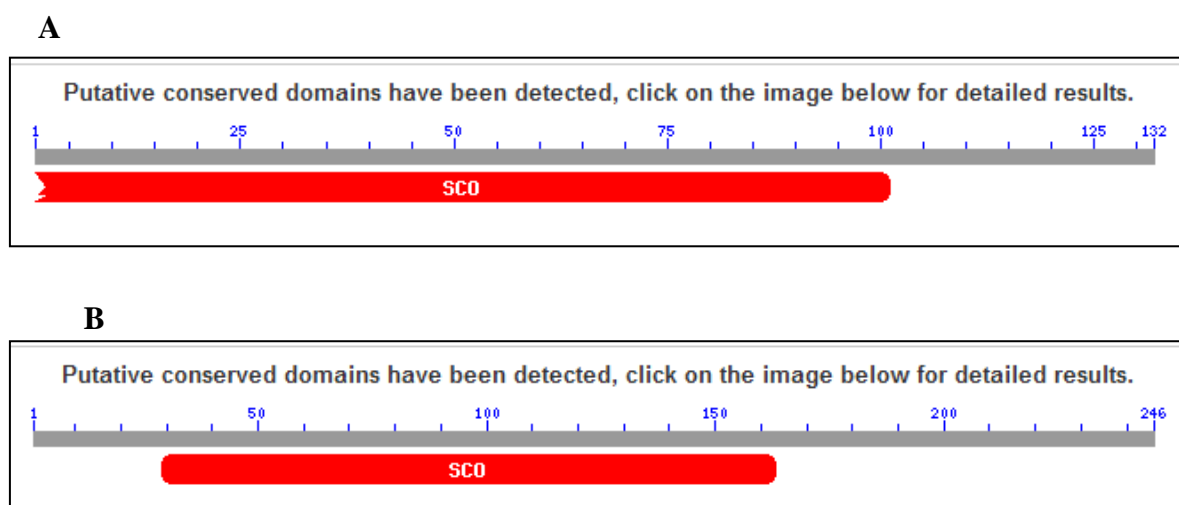


FIGURA 32: Comparação das ORFs dos Clones EST003371, EST001174 e RST-VP1-Pb00003-038F06.

Alinhamento por BLASTp da fase aberta de leitura com 132 aa, identificada para o gene *PbSCO1* nas ESTs EST003371; EST001174 (A), e da fase aberta de leitura com 246 aa (B) identificada na seqüência do clone genômico de *P. brasiliensis* RST-VP1-Pb00003-038F06. Embora o domínio da proteína *PbScolp* esteja completo, a região 5' do gene *PbSCO1* não está completa no fragmento.

Para confirmarmos o sítio inicial de transcrição do gene *PbSCO1* fizemos a clonagem do mesmo utilizando o sistema de 5'-RACE. Desenhamos um oligonucleotídeo (5'-AAGTGTATGAAGAGTGGAGACTCAAAA-3') específico para a região 3' do gene *PbSCO1* baseando-se nas seqüências das ESTs e do clone genômico. A clonagem foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante ["GeneRacer. Kit - For full-length, RNA ligase-mediated rapid amplification of 5' and 3' cDNA ends" (RLM-RACE) - Invitrogen]. Na amplificação obtivemos um cDNA com aproximadamente 1,1kb. O cDNA foi purificado e clonado em TopoTA para o seqüenciamento. Após o seqüenciamento obtivemos um consenso com 1,167bp, sendo que as trinta (30) primeiras bases (Fig. 33) correspondem ao GeneRacer 5' Nested Primer. Neste clone, portanto, obteve-se um acréscimo de seqüência na região 5' do gene correspondendo a 194 nucleotídeos a montante da seqüência ATC assinalado em cinza

na figura 33. Verificamos que o códon inicial (ATG marcado em verde na figura 33) estava a 300bp a montante do códon inicial previamente identificado (ATG marcado em lilás na figura 33) na seqüência consenso do clone genômico RC2-Pb50003-038F06. Portanto, o gene *PbSCO1* codifica para uma proteína com 304 resíduos de aminoácidos. As seqüências de nucleotídeos e a seqüência predita da proteína *Sco1p* de *Paracoccidioides brasiliensis* foram depositadas no banco de dados do GenBank/NCBI sob o número de acesso EF679209.

A proteína predita a partir da seqüência nucleotídica possui uma massa molecular estimada de 3.5KDa. A partir da comparação entre a seqüência genômica (RST-VP1-Pb00003-038F06) e a seqüência expressa (5'RACE-PbSCO1) foi também possível confirmar a presença dos dois íntrons do gene *PbSCO1* e os motivos canônicos (5' GT...AG 3') de borda intrônica (Fig. 34).

>PbSCO1 5'RACE Topo

```
GGACTGACATGGACTGAAGGAGTAGAAA AATTGCTAGACAAAAATCTCCAATTCTGTTCTTTTTAAATCT
TTAAATTGGAAATAAGCCTGACAGCGTAATAATGACCTCGGTCTTCTCTTTCTCGTTCGCTGG ATGCG
ACATGCCCTCCACCAATCCCCGTTCCCTCACAGAGCATCCACGTCCGCCTTCTCTCACTCCCCGCTTATGCCA
ACCAGATCACTAATACTATTCCAGCGGAGGAGCGTTACAACTTACTATCCTCGGTCCGGATTACGATTGTCTCCAT
TATTGATACGATCGAARCCGCATGCTACTTCAATTTCCGCCTCCTCATCCCGCCGAAAAGCCAAAACCATTCA
GCAATTAAGCTCGCGCCGCAACGGGCCCAATTCTCATGGAAAGCTGCAGTCTTATTTGTGCAACGGGCGTG
ACGATGATATTTACTTTCGTTATGAGAAAGAGAGGCTTAATCGTAAGAGGATTGCTGAGATGAGCAAAGGTG
TGGCAGGCCGAAAAGTTGGCGGACCATTTCGTCCTCAAGGATTTGGATGGAAATGAATCACGGACGAACAAC
GAAGGGGAAATACAGCTTTATTTATTTCCGGCTTCACTCATTGCCCGGATATTTGCCAGATGAACTCGACAAA
ATGGCCGAGATAATCGATCTTGTAATACTAGATCGAGCAACAAATCTGTTCTCCGGCCCATCTTCATTACCT
GCGACCCAGCCCGTGACAGCCCCGAAGTGCTGCGCAAATACCTAGCAGAATCCACAAGGGTATTATAGGCTT
GACGGGCACGTACGAGCAGGTGAAGCATGTGTGCAAACAATATCGCGTCTATTTAGCAGCCCGGAGAACGTG
AAGCCTGGAGAGGATTATCTTGTGGACCACAGCATTATTTCTACCTAATGGATCCGGATGGAGATTTATTG
AATGTATCGGACGCCAAGACACTGCAGAAACCGCAGCCAACACCATTCTTGCTCATATAAAGGATTGGAAGAG
GGAAGGGAAACCCTTAACACTAAAGAGGAG TAA TGTCTGGGAGAGTAAACACAAGACCTTTCTTTTTGAGT
CTCCACTCTTCATACACTTAAGGGCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATA
```

FIGURA 33: Análise da seqüência consenso do clone 5'RACE-PbSCO1.

indicando a região codificadora do gene *PbSCO1* de *P. brasiliensis*. Em amarelo temos a seqüência do GeneRacer 5' Nested Primer. A seqüência ATC indica o início da seqüência do clone RST-VP1-Pb00003-038F06 e a seqüência ATG em lilás o códon inicial predito inicialmente no clone genômico.

> RST-VP1-Pb0003-038F06 _PbSCO1

```

GGGGCaT CATACTATTCCAGCGGAGGAGCGT TACAACTTACTATCCTCGGTCGGGATTACGATTGTCTCCATTATTGATA
CGATCGAAACCGCATGCTACTTCATT TTCGCCTCCATC CCGCCGAAAAGCCAAACCA TTCAGCAAT TAAAAGCTCGC
GCCGCAACGGGCCCATTTCTCATGGAAAGCTGCAGTCTTATT TGTGCAACGGGTGT GACGATGATATTTACTTT CGTTAT
GAGAAAGAGAGGCTTAATCGTAAGAGGATTGCTGAGATGAGCAAAGGTGTGGCCAGGCCGAAAGT TGGCGGACCATTTCGT C
CTCAAGGATTTGGATGGAAAT GAATT CACGGACGAA CAACT GAAGGGGAAA TACAGCTTT GTGGGTGCTC CATT CCATCT
CTATTTT TATAT TGCCTT CCAT TCCAAATTGCCCTTGGAGGAGGATAT GTTAAATTGAACACCT GTTGACACT CCTACGTCCTT
GAAGATT TATTT CGGCT TCACTCATT GCCCGGATAT TTGCCAGAT GAACT CGACAAAATG GCCGAGATAATCGATCTTGT
AAAACTAGATCGAGCAACAAATCTGTTCTCGGCCATCTTCATT ACCTGCGACC CAGCCCGTGACAGCCCGGAAGTGT
GCGCAAAATACCTAGCAGAATT CCACAAGGGT ATTATAGGCCTGACGGGCACGTACGAGCAGGTGAAGCATGTGTGCAACA
ATAICGCGTCTATTTTCAGCACGCCGGAGAACGTGAAGCCTGGAGAGGATTA TCTTGTGGACCACAGCATT TATTT CTACCT
AATGGGTATGTCGTGTGTTCTATCAT TACCT CCCAGGTTATATACTGGGATTTTT ATCCCTGGT CTCCT TACCC TGGTCT
CCTTACCCTGGT CACCT GGGAAATATA GAACT AACCT CCGCT TCTCT GTAGATCCGGATGGAGATT TCATT GAATGTATCGG
ACGCCAAGACACTGCAGAAACCGCAGCCAACACCAT TCTTGTCTATATAAAGGATT GGAAGAGGGAAGGGAACCCTTAA
CACTAAAAGAGGAG TGTGTGTCTGGGAGTAAAACACAGACCTTCTTTTT GAGTCTCCACTCTT CATACTCTT CGTTTT G
ACGGCAATTCATCTATT TTGT GCCCGAAACGTGGGATTTCTGGGGT TGAGAGCCCCCGCGT TGTGATGCAATATCATTGT C
GCACTCTGTCTATATTACTTGATTATGGAGT TGGTT GGAAT TTTTGAGTATATGT AAGAT TACTCCTATGTTGATTA T
AATCTACACAGCACTCTCTACAGTAATTCT TTCTGAGCT TCAAACATTA GTATGAGACATTAAAAATGACTTATGATA C
CACTATT CCTGAGACTATTGCTGGGAATTGAATTGGATGTCGAATT TGACATCTTGGAGTGACCT AATTT ATTAT TTCAT T
AAACCAACAATA TCGTATTTAATCGT TGTGCGAAAT AATCCCGGGATATTTT TCAACAT CATCACATGAACCATCCTGT
TGGTTTGAATGAGCTTCTGACCTG CAGAACACCC AACAAATGCCAGTCCGACCTG CGGAGGAAAAACAC TTTTT CTCGCG
CTAATTT AAAAT ATTCATCACAAGAA TCAAC CAAGC TTGCATAAACGGCTCAAAGAAAGAT ATTAAGTAGAACAT TAATA
AAAAATC CCGTGTCAAACCGAGTATAGCACCCACACCAAT CCCC AAAGCCGTCG CCGCCGAAATT CTCTCTCTCTCC
AACTCCCGCTCAATTCGT CTCAGGTTT CAAGCGATGGAAATCACCCCTCAGGCCCCT CATTCTCTCTGACAACTTGAT T
TTCTCTGCAGCTGTGT CTGGTCCC CCGCAGCGCGCGGCCATACT CGGAATCCTT CTGCCGAGTGCCT CGTCGAACCTC
TGCCCCAACGCCACGAGTTCGCGGCGTATC GTTGTCTCTCATCT CCATATCCGCATATAGTTCTCGGCCCTGCAGCCGT G
TTGCTCAGCTGT TGGTT GTGT AACACCATTT CTCGT TGGATGTCGAGGACTATGGGCTGTCTT GTGCAAGAAGGGCTT C
ACGATCCTT

```

FIGURA 34: Sequência consenso da RST-VP1-Pb00003-038F06 do gene *PbSCO1* de *P. brasiliensis*.

indicando a região codificadora (parcial) e a sequência dos introns, bem como os motivos canônicos de borda intrônica (5' GT...AG 3'). O segundo íntron está em fase de leitura com a região codificadora.

Para a realização do teste de complementação heteróloga do gene *PbSCO1* de *Paracoccidioides brasiliensis* no mutante nulo de *S. cerevisiae* foi necessário síntese um par de oligonucleotídeos (senso 5'-AAATCGGAAATAGAGCTCACAGACGTAA e anti-senso 5'-AAGTGTATGAAGAGTCGACACTCAAAA) que inseriram os sítios de reconhecimento das enzimas de restrição *SacI* e *SalI* nas extremidades 5' e 3' respectivamente da região codificadora. A amplificação da região codificadora do gene *PbSCO1* foi realizada a partir de cDNAs Poli(T) nas seguintes condições: Uma desnaturação inicial de 94 °C por 4 minutos, seguido por 35 ciclos de: desnaturação a 94 °C por 1 minuto; anelamento dos primers a 56 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto. Após os 35 ciclos seguiu-se mais 10 minutos a 72 °C e finalmente resfriamento a 4 °C. O produto amplificado foi submetido à dupla digestão com as enzimas *SacI* e *SalI* seguindo as condições do fabricante (Fermentas Life Sciences). O produto da digestão foi purificado e ligado no vetor pMGL3 previamente digerido nas mesmas condições e tendo suas extremidades 5' desforiladas com a enzima CIAP – “Calf Intestine Alkaline Phosphatase”. A ligação seguiu o protocolo do fabricante (Promega). A mistura de ligação foi transformada na bactéria *E.coli DH10B* competente preparada pelo método de Cloreto de Cálcio.

O recombinante *pMGL3/PbSCO1* selecionado por análise de seqüenciamento foi utilizado no ensaio de complementação funcional mutante nulo *aW303Δsco1::URA* de *S. cerevisiae*. Não obtivemos a complementação funcional da deficiência respiratória deste mutante de *S. cerevisiae* com o gene *PbSCO1* indicando que a proteína *Sco1p* de *P. brasiliensis* não é capaz de substituir a função da proteína homóloga *ScSco1p*.

O gene *SCO1* foi identificado e caracterizado por (Schulze e Rodel, 1989) que relataram que, mutações neste gene induzia uma deficiência respiratória relacionada especificamente a COX desde que, não foi constatado nenhuma alteração em outras enzimas da cadeia respiratória ou da ATPase. Verificou-se em trabalhos posteriores que o gene *SCO1* era necessário para estabilizar as proteínas mitocondriais *Cox1p* e *Cox2p* (Kru mMeck e Rodel,1990), proteínas estas que constituem o corpo catalítico da citocromo oxidase. Glerum et al., 1996, baseando-se na observação de que a super expressão da *Sco1p* combinada com um ligeiro aumento na concentração de cobre no meio de cultura é capaz de suprimir a deficiência da proteína *Cox17p*, a qual já se sabia ser uma proteína ligante de cobre, sugeriram que a proteína *Sco1p* teria uma função no transporte de cobre para o complexo da citocromo c oxidase (Glerum et al., 1996b; Beers et al., 1997). Estudos posteriores propuseram que a proteína *Sco1p* possui um domínio ligante de cobre (CxxxC) e que estaria envolvida no transporte de cobre para as subunidades I e II do complexo da citocromo c oxidase (Rentzsch et al.,1999). Em *S. cerevisiae* a proteína *Sco1p* possui um seguimento transmembrana contendo cerca de dezessete (17) resíduos de aminoácidos (Buchwald et al., 1991), já o motivo ligante de cobre (CxxxC) da proteína *Scop1* foi identificado na porção C-terminal sendo uma região hidrofílica que se encontra projetada para a região intermembranar mitocondrial (Rentzsch et al.,1999; Beers et al., 1997). A proteína *PbSco1p* identificada em *Paracoccidioides brasiliensis* também apresenta uma região de hélice transmembrana predita com cerca de vinte e dois resíduos de aminoácidos (Fig. 35) e o motivo (CxxxC) ligante de cobre (Fig. 36).

```

# Sequence Length: 304
# Sequence Number of predicted TMHs: 1
# Sequence Exp number of AAs in TMHs: 20.42121
# Sequence Exp number, first 60 AAs: 0.01431
# Sequence Total prob of N-in: 0.47309
Sequence      TMHMM2.0      inside      1      84
Sequence      TMHMM2.0      TMhelix     85     107
Sequence      TMHMM2.0      outside     108    304

```

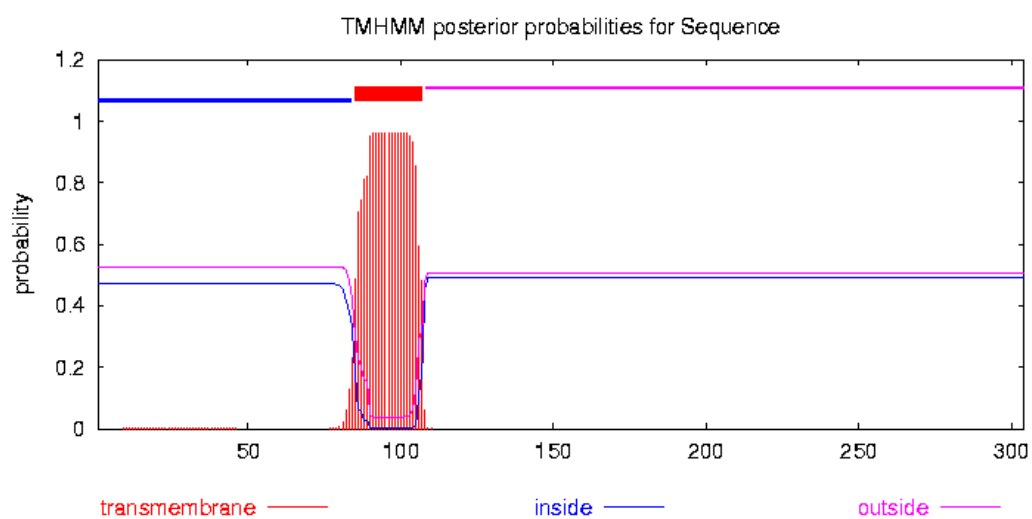


FIGURA 35: Análise de resíduos característicos de hélices transmembrana na *PbScolp*.
quanto a presença de regiões características de hélice transmembrana obtida a partir da ferramenta TMHMM Server v. 2.0 disponível na página <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>.



FIGURA 36: Alinhamento da *ScoIp* de *P. brasiliensis* (Pb) com as proteínas homólogas.

de *Aspergillus nidulans* (An), *Gibberella zeae* (Gz), *Neurospora crassa* (Nc), *Magnaporthe grisea* (Mg) e *Saccharomyces cerevisiae* (Sc). Resíduos de aminoácidos idênticos são pintados em preto e resíduos com características semelhantes estão em cinza. A barra indica o domínio CXXC ligante de cobre.

O alinhamento (Fig. 36) entre proteínas *ScoIp* de vários organismos indicam que esta proteína é bem conservada entre as várias espécies entretanto, a região N-terminal, representante do peptídeo sinal de endereçamento para a mitocôndria apresenta-se bem diversificada entre as espécies e embora a proteína de *P. brasiliensis* apresente o motivo ligante de cobre CXXC esta diferença pode ser um dos motivos da incapacidade de complementação funcional da proteína *ScoI* de *P. brasiliensis* no mutante de *S. cerevisiae*.

Em *S. cerevisiae* o gene *SCO1* compartilha homologia com o gene *SCO2* cujo produto também está localizado na mitocôndria, mas não é requerido para a respiração e o mutante nulo apresenta níveis normais do complexo da citocromo c oxidase (Glerum et al., 1996a).

Super expressão de *SCO1* pode restaurar a deficiência do mutante nulo de *cox17*, já o seu homólogo *SCO2* embora também possa restaurar a capacidade respiratória do mutante nulo, isto só ocorre parcialmente e na condição específica em que o meio é suplementado com cobre exógeno (Glerum et al., 1996a). A super expressão de *COX17* não restaura a deficiência do mutante *sco1* sugerindo que a proteína *Sco1p* atua em uma etapa posterior a proteína *Cox17p*, tanto antes como durante a inserção do cobre (Glerum et al., 1996a). A homologia da seqüência primária dos genes *SCO1* e *SCO2* e suas atividades na supressão da mutação de *cox17* sugeriram que eles possam ter uma função redundante entretanto ensaios de complementação funcional do mutante nulo *sco1* com seu homólogo *SCO2* demonstraram que o gene *SCO2* não é capaz de restaurar a deficiência do mutante nulo *sco1*, indicando que estas duas proteínas não são intercambiáveis e, portanto, não são funcionalmente equivalentes. (Entretanto, o gene *SCO2* é capaz de restaurar parcialmente, algum tipo de mutações pontual no gene *sco1* Glerum et al., 1996a). A supressão alelo específica de *sco1* pelo homólogo *SCO2* poderia indicar uma interação física da *Sco1p* e *Sco2p* necessária para a função, entretanto esta suposição é contradita pela observação de que o mutante nulo *sco2* não apresenta deficiência respiratória (Glerum et al., 1996a).

Diferentemente do que ocorre em *Saccharomyces cerevisiae* em humanos, mutações tanto em *SCO1* quanto em *SCO2* causam deficiências fenotípicas bem severas. Mutações nestes genes produzem uma deficiência tecido-específica da citocromo c oxidase associada a fenótipos clínicos distintos embora ambos sejam expressos igualmente em todos os tecidos (Leary et al., 2004). Mutações no gene *SCO2* em humanos são predominantemente associadas com o aparecimento de cardiomiopatia hipertrófica infantil (Jaksch et al., 2000) enquanto que mutações em *SCO1*, identificadas até o momento somente em uma família, resultam em uma desordem neonatal progressiva afetando predominantemente o fígado (Valnot et al., 2000).

Estudos mais recentes (Leary et al., 2007) relatam que as chaperonas mitocondriais *Sco1* e *Sco2* que são essenciais na montagem do complexo da citocromo c oxidase, também são responsáveis pela manutenção da homeostase de cobre das células e desta forma estes autores demonstram uma nova função da mitocôndria. Segundo estes pesquisadores mutações em qualquer um destes dois genes (*SCO1* e *SCO2*) resultam em uma deficiência celular de cobre que é tanto tecido quanto alelo específico. Este fenótipo pode ser dissociado da deficiência na montagem do complexo da citocromo c oxidase e a deficiência de cobre é suprimida pela super expressão de *SCO2*, porém não de *SCO1* (Leary et al., 2007). Estes pesquisadores concluem que o fenótipo de deficiência de cobre não reflete em uma mudança na alta afinidade de captação de cobre, porém sim no aumento proporcional do efluxo de

cobre. Portanto, ainda serão necessários mais estudos sobre a função destes genes (*SCO1* e *SCO2*), pois esta ainda não foi completamente elucidada.

4.1.14 *PbOXAI*

Com a sequência da proteína *Oxal* de *S. cerevisiae* fez-se a primeira busca nos bancos de dados de *P. brasiliensis* utilizando-se a ferramenta tBLASTn. Identificou-se um clone de EST (EST001011) com boa similaridade. EST esta do consorcio central Brasil (Felipe et al., 2003) que foi clonada em fago lambda. Neste caso não conseguimos excisar o plasmídeo (pBluescript) embora, tenhamos realizado este mesmo procedimento com sucesso em outras amostras. Na segunda busca utilizou-se a sequência da EST001011 para uma nova análise busca por comparação de sequências (BLASTn) nos bancos de dados de *P. brasiliensis*. Foi possível identificar mais dois clones sendo uma nova EST (EST-VP1-Pb30001-205H03) e um clone de sequência genômica RST-VP1-Pb50003-024E10, ambos pertencentes ao consórcio paulista (Goldman et al., 2003).

O clone referente à EST-VP1-Pb30001-205H03 foi então submetido ao seqüenciamento através da técnica de inserção de transposons. O cDNA completo consiste de aproximadamente 2047bp. Utilizando a ferramenta ORFfinder do NCBI localizou-se a fase aberta de leitura compreendendo a proteína *PbOxalp* que é constituída de 474 resíduos com predição de 51,7KDa. As seqüências nucleotídica e peptídica referente ao gene *OXA1* de *P. brasiliensis* estão depositadas no GenBank/NCBI sob o número de acesso DQ836715.

Uma análise de comparação de seqüência por BLASTp indica que esta ORF identificada possui o domínio conservado YidC (Fig. 37), uma proteína de membrana de *E. coli* que facilita a inserção de um conjunto de proteínas de membrana e é homologa da *Oxalp* mitocondrial e Alb3 de cloroplastos (Samuelson et.al., 2000; Celebi et al., 2006; du Plessis et al., 2006).

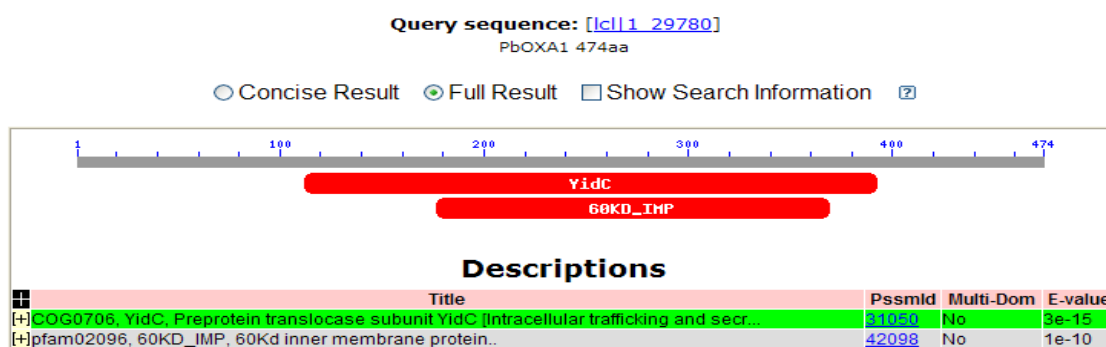


FIGURA 37: Alinhamento por BLASTp ORF da proteína *PbOxa1p*. identificada na EST-VP1-Pb30001-205H03. A figura mostra o domínio conservado YidC indicando uma função de insertase para esta proteína.

Após a confirmação da identidade deste clone, a sequência completa do inserto de cDNA foi submetida à análise física de restrição utilizando a ferramenta NEBcutter www.neb.com e através desta análise verificou-se a possibilidade de excisão da ORF direcionada para clonagem em vetor de expressão de *S. cerevisiae* utilizando-se as enzimas *Sma*I e *Xba*I. Após a dupla digestão enzimática, o fragmento *Sma*I/*PbOXA1*/*Xba*I foi isolado em gel preparativo 1% agarose extraído por eletroeluição e purificado por precipitação com etanol.

O fragmento purificado foi ligado no vetor *pMGL3* previamente linearizado com as mesmas enzimas e tendo as extremidades 5' desfosforiladas com a enzima CIP –Calf Intestine Phosphatase. A mistura de ligação foi inserida em *E. coli* DH10B por transformação em células competentes pelo método químico de CaCl_2 e dez (10) transformantes foram coletados aleatoriamente. Os pDNAs dos transformantes selecionados foram extraídos e a seleção do plasmídeo recombinante *pMGL3/PbOXA1* foi realizada através de sequenciamento.

O recombinante selecionado (*pMGL3/PbOXA1*) foi então inserido por transformação pelo método de LiOAc no mutante nulo *aW303Δoxa1::HIS* de *S. cerevisiae*. Os transformantes foram selecionados em meio mínimo (WO) devidamente suplementado e a capacidade da proteína *PbOxa1p* de restaurar a deficiência respiratória deste mutante de *S. cerevisiae* foi analisada quanto à capacidade de crescimento em meio com fontes de carbono não fermentáveis etanol e glicerol. Após 48 horas de crescimento em estufa a 30 °C verificou-se o crescimento das linhagens recombinantes com o gene *PbOXA1* de *P. brasiliensis* (*aW303Δoxa1::HIS/pMGL3/PbOXA1*) em níveis comparáveis ao da linhagem selvagem (Fig. 38) indicando que este gene de *P. brasiliensis* é homólogo ao gene *OXA1* da levedura *S. cerevisiae*.

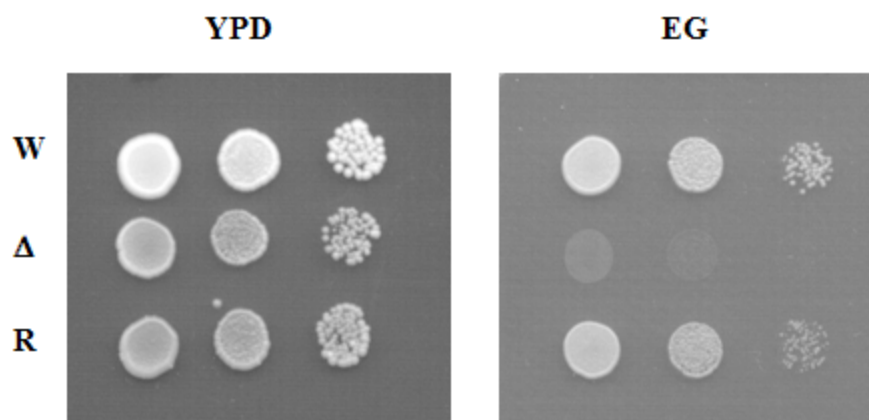


FIGURA 38- Complementação funcional da proteína *PbOxa1*.

Crescimento das linhagens selvagem *aW303* (W), do mutante deficiente respiratório de *S. cerevisiae* *aW303Δoxa1::HIS* (Δ) e dos recombinante *aW303Δoxa1::HIS* /pMGL3/PbOXA1 em meio rico YPD e em meio contendo etanol/glicerol como fonte de carbono (EG) após 48 horas de incubação a 30 °C.

Para confirmarmos este resultado fizemos a “Transformação reversa”. Como esperado o resultado foi confirmado, ou seja, novamente houve a restauração da capacidade respiratória do mutante *aW303Δoxa1::HIS* de *S. cerevisiae*.

O alinhamento entre a proteína *PbOxa1* com suas homólogas em outros fungos (Fig. 39) mostra que embora o alinhamento não apresente blocos muito conservados ele se estende mais ou menos homogêneo em toda a extensão das proteínas, inclusive há um bom alinhamento na região N-terminal onde geralmente encontra-se a seqüência sinal de endereçamento mitocondrial. Pode-se notar que aproximadamente na posição do resíduo 107 da proteína de *P. brasiliensis* existe uma inserção de 15 resíduos que é específica deste organismo. Esta inserção não causa um efeito divergente suficiente para impossibilitar a complementação desta proteína (*PbOxa1p*) de *P. brasiliensis* em mutantes de *S. cerevisiae*.

```

PbOXA1 1 MSGSHFARLPILLIMLGKTCVVRPWAAVSLSGVTRRTMLAAPPSTRHLSTVTTKFFQSKL
AnOXA1 1 -----MLAGPGLK-----GRIARQAAAFASTRSTRSISRFSR-----N
ScOXA1 1 -----MFKLTSR-----LVTSRFAASSRLAARTIVLPRRHPSPWISFQ
NcOXA1 1 -----MLPSRGLLRSTPALGLARASFKKAPSSRQFGTALRSSFPQGSRRIGG
SpOXA1 1 -----MFSVIGRG-----IKFSSKSHYSVSCFLIATQGAKIR-----

PbOXA1 61 RNPIHNATGLLRTSSWNSVAVQFAGLANPRFNSTTTNPSSISAPSSLN SIDTVNPPLSSG
AnOXA1 34 SKVLG-----GNTSWR-APVPEIALPTARFNSTSTTAPTEVTPETQ-----
ScOXA1 39 AKRFN-----STGPNANDVSEIQTQLPSIDELTSSAPSLASASTSD-----
NcOXA1 47 PLGTTATAASHQLLSSLRQVRYASTGPDAAVAADAAAAAAPPSSSP-----
SpOXA1 33 QIHTHN-----TFKKNFSFAKLGRNQRTSSLIKIHNSSISFPKSR-----

PbOXA1 121 VESIDSLSVADPVSIDISQIPETLGYLKAIGLDYGWG-PSRLIETILESLHHGGLPWVG
AnOXA1 74 -----PSSELDVSNIDLTQIPERIGYKDLGLDYGWG-PSATVEFMIEHITHYSGLPWVG
ScOXA1 79 -----LIANTTQTVGELSSHIGYLNSTGLAQTWYWPSDIIQHVLEAVHVSGLPWWG
NcOXA1 95 -VDAVAAPVELTGSDLNLNPEQIGFLKTI GLDYGWG-VTSMMQWLTEHVYVYSGLPWWA
SpOXA1 73 -----SEKVVYTPSLPLSSVLAESFSL-PHNILQNGINTLHIVSGLPWWA

PbOXA1 180 ATITTAVALLRVAMLKFAIDASDTSAKVASVK--HLTQPTIQEVRKRCYREN-DTIGMORAL
AnOXA1 128 SIIATGIFFRILAMAPLFWRAQDTSARLANAQ--PILAPIKEKMLNAARSG-NQVEAQKWR
ScOXA1 131 TIAATITLIRCLMFPLYVKSSDITVARNSHIK--PELDAENNKLMSTT----DLQQGQLVA
NcOXA1 153 TLAAVAAIVRVAFKPSL GASQESQKMODLNKNPKYAAIMAKVKEASFDTTKQNDLVKRYR
SpOXA1 118 SIAACAVAMRIAVFPIMLK MMKTSAKLALIN--PKVAEHMSVL SKAKAENSEL MMQATT

PbOXA1 237 SARRIINENYNIKLMKLAYP-MIQIPLNFCFRVLRGMSALPVPGLDSESEFWLSSVTVH
AnOXA1 185 AEMAKTNANLGI VPRNTFMPLVFLQPIGFCFRVIEGMAGLPVPGLAEEQFAWINDFTVA
ScOXA1 185 MQRKKLSSHGIKNRWLAAP-MLQIPIALGFENALRHMANYPVDGFANQGVAVFTDLTQA
NcOXA1 213 QEMALMTKNAGINYFKVFIP-FIQVPIGFCMFRILIRGMAALPVE SLETGTTWFPDLTVA
SpOXA1 176 QIQNLKYNVNVNPLNLSAP-VFQGI L F ISFYALKTMAGVPVEGFTDGC FWWVNDLSQP

PbOXA1 296 DPLFILPVSTGLLMHYTFKLGGEVSASTDQTAMAAPL LYLGLPVLSTVCTLFLPGLIQI
AnOXA1 245 DPTYILPILCCTVLHLSIRKGGETGSSMSGDMATIRKG MMYGIPAFSFFVAFPPAALQA
ScOXA1 244 DPYLGLOVITAAVFI SFTRLGGETG---AQFSSPMKRLFTLPLISIPATVNLSSAVVL
NcOXA1 272 DPYFALP IASACL FVASMRKPIPYMAP---QAR MMKSMGLVLPVVSIFATAWLPALQW
SpOXA1 235 DPLHIFPVANGLMLLNIELGSETGSN-KVAMSPSMKKFFRFLCLASPLFTMNFMAIFM

PbOXA1 356 FFASTSVLAILQSYFHSYFRRALGMAPPFKR---PDQSSNTPTGPKVRIEAPRDN-
AnOXA1 305 YFLTTCFLGLLQAYAFANATFRKATGMTVIEKLNVPQPSGPNPAEPNRAIRLITEALERE
ScOXA1 301 YFAFNCAFVSLQTMILRNKWRVRSKLIKITEVAKP---RIP IAGASPTENMGLIFQSLKHN-
NcOXA1 329 YFLVSAIQYFQASIFHLPAFRRWVGLPELVPGGMRGSPSFAKAAAPSSTIQYVAPRTMD
SpOXA1 294 YWFPSNIFSVFQGAFLRSSITIRHKLGLPEVPSAMP-VPNAQNESFVKSFTDI VHGQVVKG

PbOXA1 411 ----STASSHIEQVPKVS--FIDRFISSCQNS----IKDTRKKMEDIVGQNQKVEKFADG
AnOXA1 365 NAKLNEAKIAAEQPKIS--FIDRAINNIKESKEKLTKET TQKMQLSGQGPKNADGSL
ScOXA1 356 -----IQKARDQAEFRQ--LMQDNEKKLQESFKEKRQNSKIKIV
NcOXA1 389 TTATPVDSGSLGDIKDSNFVKEKLEDWKKNDNTNIH SRAKEYEERRALEHEHAYLAR
SpOXA1 353 -----KYPQASEILDATRF LKTDNTNEQKP----TNNSTITKATTLSDNSQNDKSSSV

PbOXA1 461 TPKVRMTKQLQGC-----
AnOXA1 423 AEPPLSEKDRKLAEDYERRRKEEEDWKREERNHARREAYRQAMERERQAKAALNKSEV
ScOXA1 393 HKSNIINNK-----
NcOXA1 449 LELKKQKQGRKNH-----
SpOXA1 402 TKPTEKID-----

PbOXA1 --
AnOXA1 483 KQ
ScOXA1 --
NcOXA1 --
SpOXA1 --

```

FIGURA 39: Alinhamento da proteína *Oxa1p* de *P. brasiliensis* (Pb) com as proteínas homólogas de *Aspergillus nidulans* (An), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Neurospora crassa* (Nc) e *Schizosaccharomyces pombe* (Sp). Resíduos de aminoácidos idênticos são pintados em preto e resíduos com características semelhantes estão em cinza.

O clone genômico RST-VP1-Pb50003-024E10 também foi inteiramente seqüenciado através da técnica de inserção de transposons obtendo-se um consenso com 1762bp. A comparação entre a seqüência genômica e a seqüência expressa do clone de ESTs indicou a presença de dois (02) íntrons no gene *PbOXAI*.

Considerando que com o gene *OXA1* de originário do clone de EST *P. brasiliensis* restabeleceu a função respiratória do mutante nulo de *S. cerevisiae*, foi também constituído o recombinante deste gene originário de segmento genômico com dois introns. Com esta constuição não foi possível restabelecer a função respiratória deste mesmo mutante de *S. cerevisiae*. Provavelmente porque a linhagem mutante de *S. cerevisiae* não processou os introns encontrados no *PbOXAI* genômico. Portanto, os estudos indicam a inexistência de complementação heteróloga direta (a partir de seqüência genômica) entre os fungos *S. cerevisiae* e *P. brasiliensis*.

A proteína *Oxa1p* é conservada desde os procariotos até os eucariotos superiores (Bauer et al., 1994; Bonnefoy et al., 1994a). Em *S. cerevisiae*, a proteína *Oxa1p* é codificada pelo genoma nuclear, traduzida no citoplasma é importada para a matriz mitocondrial em uma forma precursora, onde é processada e submetida vários eventos de exportações através da membrana interna da mitocôndria (Herrmann et al., 1997). De acordo com estes autores, a proteína *Oxa1p* contém cinco domínios transmembrana (TM) intercalados por regiões hidrofílicas. Entretanto, a análise por domínios de hélices transmembrana através da ferramenta TMH MM Server v. 2.0 indica que embora haja cinco regiões com aminoácidos hidrofóbicos, característicos de hélice transmembrana, somente uma hélice é predita (Fig. 40A). A homóloga de *P. brasiliensis* também possui regiões características, mas não apresenta nenhuma hélice predita, segundo esta ferramenta (Fig. 40B).

Mutações no gene *OXA1* levam ao bloqueio da biosíntese da citocromo c oxidase e oligomicina sensível ATPase (Altamura et al., 1996) devido principalmente a uma deficiência nos estágios pos-traducionais (Bonnefoy et al., 1994). Além do produto gênico do *OXA1* ser requerido para a biosíntese da citocromo c oxidase, desordens neste gene também ocasionam um defeito secundário pleiotrópico em estágios iniciais da expressão de proteínas mitocondriais (Bonnefoy et al., 1994). O gene *OXA1* da levedura *S. cerevisiae* está localizado no cromossomo VIII e é adjacente ao gene *PET122*, o qual controla o início da tradução do mRNA de *COX3* (Bonnefoy et al., 1994; Ohmen et al., 1988). O produto gênico de *OXA1* é requerido para a exportação da subunidade II da citocromo c oxidase, sendo a principal responsável pela geração da topologia N-out e C-out, através da qual as duas extremidades da proteína *Cox2p* ficam expostas no espaço intermembranar (He et al., 1997; Hell et al., 1997).

O gene *HsOXAI* foi o primeiro gene envolvido na biogênese da citocromo c oxidase a ser caracterizado em humano, através da complementação funcional em mutantes de *S. cerevisiae* (Bonnefoy et al., 1994b). A complementação funcional em mutantes *oxal* de *S. cerevisiae* também foi obtida com sucesso para o gene *AtOXAI* de *Arabidopsis thaliana* (Hamel et al., 1997). A função conservada da proteína *Oxalp* em bactérias gram-positiva e negativa, bem como em eucariotos superiores sugere que esta proteína possui uma função crucial em todos os seres vivos (Bonnefoy et al., 1994).

Deleção do gene SpoIIIJ, homólogo de *OXA1* em *B. subtilis*, bloqueia a esporulação em um estágio intermediário (Errington et al., 1992) entretanto, o fato de que o SpoIIIJ é um gene expresso somente durante o crescimento vegetativo e tem um homólogo em bactéria não esporogênica, sugere que o defeito de esporulação possa não ser um efeito primário da deleção, principalmente considerando que leveduras deficientes respiratórias também não esporulam (Bonnefoy et al., 1994). Estudos posteriores têm sugerido que existe uma via biosintética conservada evolutivamente para a inserção de proteínas na membrana interna da mitocôndria, cloroplastos e bactérias e acredita-se que as proteínas *Oxa1/Alb3/YidC* atuem como insertases que possuem uma função importante na biogênese de proteínas de membrana relacionadas à produção de energia (Ott et al., 2005).

4.2 Resistência à Peróxido de Oxigênio (H₂O₂)

Além da função na atividade respiratória da célula, a proteína *Cox11p* foi recentemente relacionada à outra função que é a de conferir resistência a peróxido de hidrogênio (Banting e Glerum, 2006). Sabe-se também que mutantes de *S. cerevisiae* com deficiência na proteína *cox11p* apresentam sensibilidade a vários produtos químicos como, por exemplo, psoralenos fotoativados e N-nitrosodietilamina (NDEA) (Brendel e Henriques, 2001; Pungartnik et al., 2002). Entretanto, a função da proteína *Cox11p* na resistência a peróxido de hidrogênio é independente de sua função na citocromo c oxidase (Khalimonchuk et al., 2007). Segundo estes autores o mutante nulo de *cox11* possui deficiência respiratória e sensibilidade a peróxido de hidrogênio, porém, quando mutações pontuais que afetam seus sítios ligantes de cobre são inseridas no gene *cox11* estes mutantes têm seu crescimento em fontes de carbono não fermentável impedido entretanto estas mutações não causam sensibilidade a peróxido de hidrogênio. O fenótipo sensível a peróxido de hidrogênio do mutante nulo é provavelmente devido ao acúmulo de um intermediário transiente formado pelo grupo heme a₃-*Cox1p* e que confere sensibilidade ao oxidante (H₂O₂). Esta forma intermediária (heme a₃-*Cox1p*) não se forma nas linhagens selvagens ou nos mutantes pontuais da *Cox11p*, mesmo que o complexo da citocromo c oxidase não seja completamente montado (Khalimonchuk et al., 2007).

Diante das evidências de que esta função é independente da função em COX decidimos verificar se a proteína *PbCox11p* de *Paracoccidioides brasiliensis* poderia ser funcional na complementação heteróloga desta segunda função. Para este ensaio a linhagem recombinante *aW303ΔCOX11::HIS3/pMGL3-PbCOX11*, a linhagem teste

aW303ΔCOX11::HIS3/pMGL3-PbCOX11 e as linhagens controle (a selvagem *aW303* e a linhagem com mutação nula de *cox11* (*aW303ΔCOX11::HIS3*) foi submetida ao estresse de peróxido de hidrogênio em várias concentrações e em períodos de 1 e 2 horas de exposição.

Os resultados apresentados na Fig. 41A indicam que a proteína *Cox11* de *P. brasiliensis* restabelece esta função (sensibilidade a peróxido) em mutantes de *cox11* de *S. cerevisiae*. A diferença de crescimento entre a linhagem mutante e a linhagem recombinante ficou mais evidenciada após cinco dias a 4 °C.

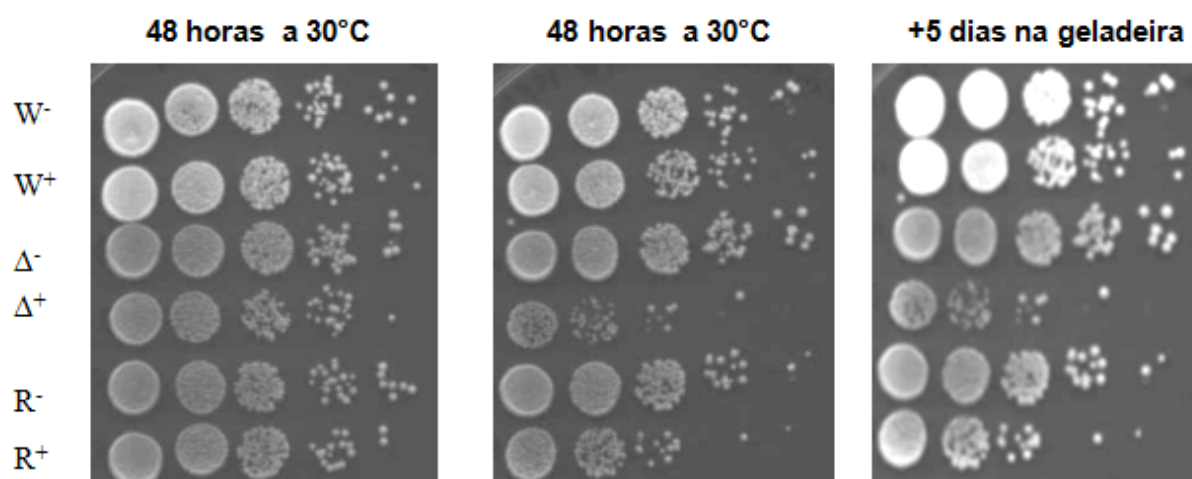


FIGURA 41A: Teste à sensibilidade por peróxido de hidrogênio.

Estão indicados na figura as concentrações usadas de H_2O_2 ; a temperatura de incubação e o tempo de exposição ao peróxido. As linhagens utilizadas foram: (-) ausência, (+) presença de H_2O_2 ; (W- ou W+) = W303-1A; (Δ^+ e Δ^-) = *aW303 Δ COX11::HIS3* e (R+ e R-) = *aW303 Δ COX11::HIS3/pMGL3-PbCOX11*.

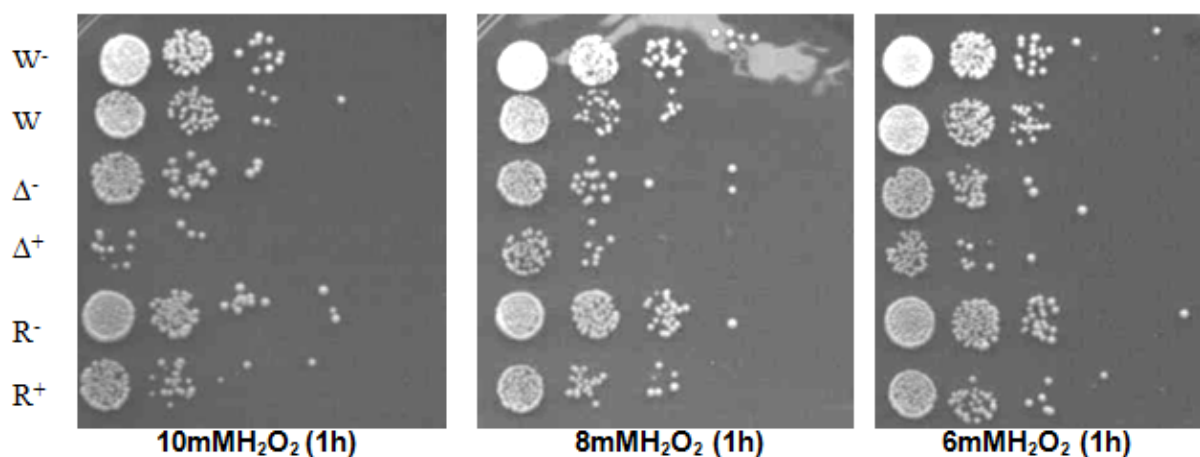


FIGURA 41B: Sensibilidade por peróxido de hidrogênio.

Estão indicadas as concentrações de H_2O_2 utilizadas numa exposição de uma hora. As linhagens e os símbolos são os mesmos da Fig. 41- A

Para melhorar a diferenciação de crescimento entre as linhagens mutantes *aW303 Δ COX11::HIS3* e recombinantes *aW303 Δ COX11::HIS3/pMGL3-PbCOX11* da linhagem selvagem estas linhagens foram submetidas a um novo ensaio em condições um pouco mais drásticas do estresse de peróxido de hidrogênio. Neste ensaio as concentrações foram de 6 mM, 8 mM e 10M H_2O_2 e o período de exposição foi de apenas 1 hora.

Nas novas condições estabelecidas tornou-se evidente que a *PbCox11p* restabelece a função quanto a sensibilidade à peróxido (Fig. 41B) em mutante nulo para *cox11* de *S. cerevisiae*. Este resultado é semelhante ao obtido por Khalimonchuk et al., 2007 com a proteína humana (*HsSco1p*) em mutante de *S. cerevisiae*. Sabe-se que as proteínas *Cox11* e *Sco1* foram relatadas como pertencentes à classe de proteínas envolvidas nas duas funções (Banting e Glerum 2006). Assim como a proteína *PbCox11p* a proteína *HsSco1p* também não complementa a capacidade respiratória de mutante de *S. cerevisiae*.

O recombinante de *S. cerevisiae* com a proteína *PbSco1p* também foi submetido a este ensaio e os resultados foram comparáveis aos obtidos com a *PbCox11p* (Fig. 42).

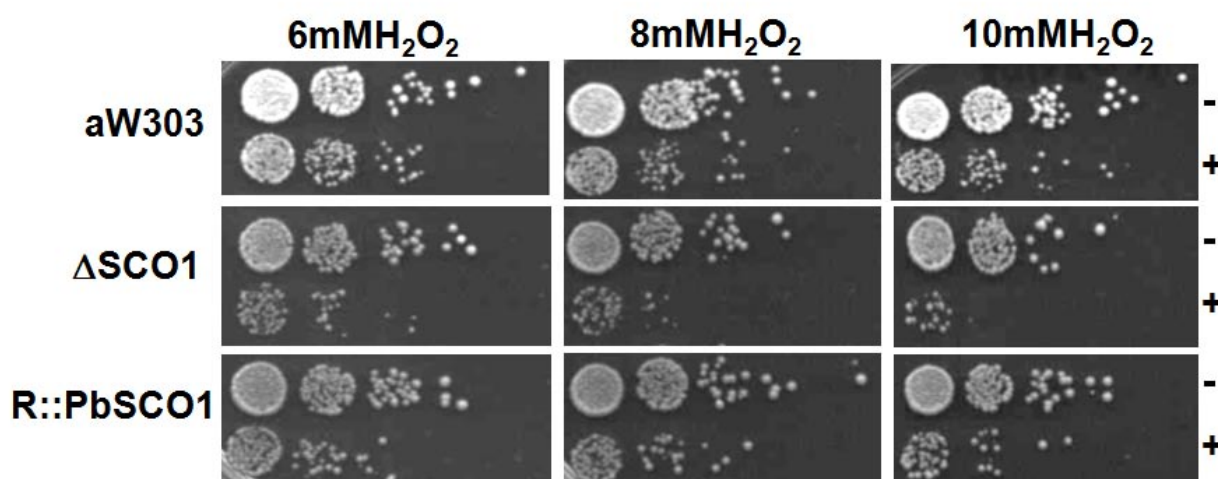


FIGURA 42: Hipersensibilidade do mutante *aW303Δsco1* ao peróxido de hidrogênio.

A cultura líquida em fase exponencial foi exposta a 6, 8 e 10 mM H_2O_2 (+) por 1h, diluídas em série (1:10) e inoculadas em meio YPD, juntamente com as linhagens controle não tratadas (-), e incubadas por 36h à 48h para se determinar o potencial de formação de colônias. A linhagem parental *aW303* não apresenta hipersensibilidade a H_2O_2 . A resistência ao peróxido foi restabelecida com a expressão do gene homólogo *PbSCO1* de *P. brasiliensis*.

Outros genes de *S. cerevisiae* estão relacionados ao fornecimento de cobre para o complexo da citocromo c oxidase mitocondrial. O gene *COX17* (Glerum et al., 1996), *COX19* (Nóbrega et al., 2002) e o *COX23* (Barros et al., 2004). Mutantes de *cox17* foram reportados como sendo não sensíveis ao peróxido de hidrogênio (Banting e Glerum, 2006). Com o objetivo de verificar se este mutante (*cox17*) apresenta alguma sensibilidade ao peróxido em diferentes concentrações e testar a sensibilidade ao peróxido dos outros dois mutantes (*cox19* e *cox23*) de *S. cerevisiae* relacionados ao metabolismo de cobre estas linhagens mutantes de *S. cerevisiae* foram submetidas ao estresse de peróxido de hidrogênio nas condições citadas

acima. Os resultados indicam que os mutantes *cox19* e *cox23* também são sensíveis ao peróxido e que o mutante *cox17* também apresenta certa sensibilidade em altas concentrações (8 mM e 10 mM) desse oxidante (Fig. 43).

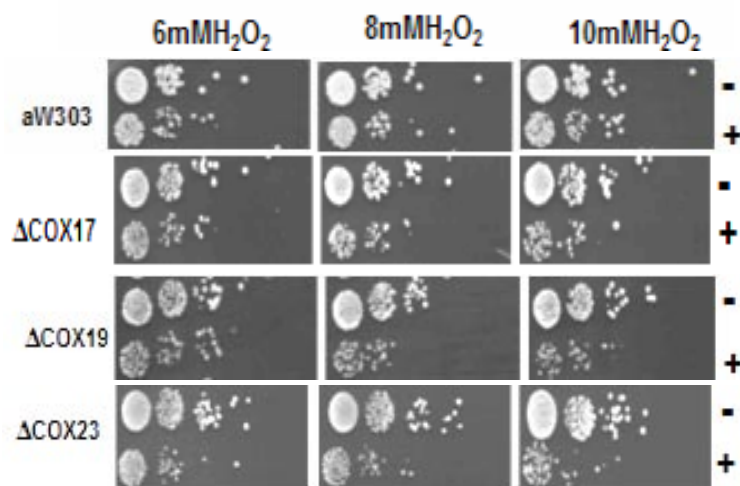


FIGURA 43: Sensibilidade dos mutantes *aW303Δcox17* e *aW303Δcox19* e *BY4741Δcox23* a H₂O₂.
O ensaio foi realizado de acordo com o descrito na figura 02. Os mutantes apresentam diferentes níveis de sensibilidade ao peróxido de hidrogênio.

Com o objetivo de verificar se os homólogos de *P. brasiliensis* são capazes de substituir esta função nos respectivos mutantes de *S. cerevisiae*, as linhagens mutantes de *S. cerevisiae* e as linhagens recombinantes com os genes *PbCOX17*, *PbCOX19* e *PbCOX23* de *P. brasiliensis* foram submetidas ao estresse de peróxido de hidrogênio. A resistência ao peróxido foi restabelecida nas linhagens recombinantes com os genes *PbCOX17* e *PbCOX19* de *P. brasiliensis* (Fig. 44). Já no caso da linhagem recombinante com o gene *PbCOX23* a sensibilidade ao peróxido parece ser ainda mais exacerbada. Este resultado necessita ainda ser melhor investigado.

No total temos, portanto, cinco complementações heteróloga positivas na função respiratória e quatro na função de resistência ao peróxido de hidrogênio.

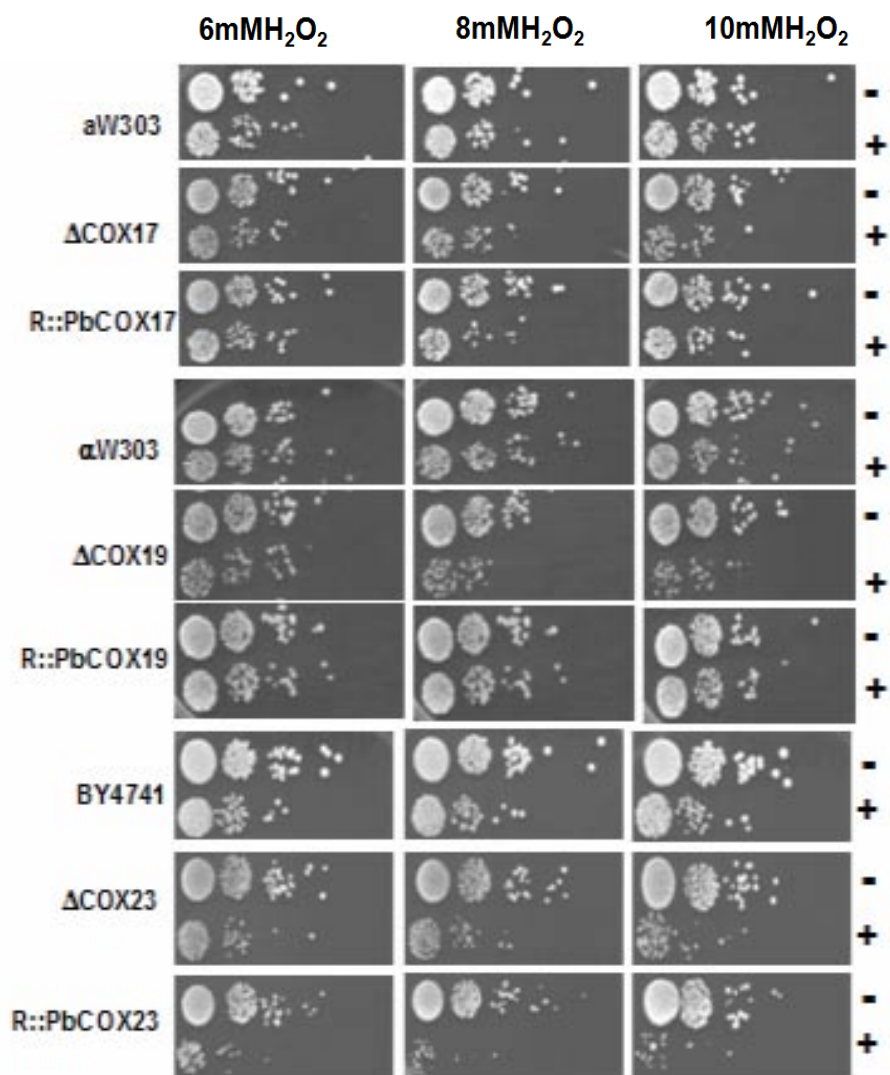


FIGURA 44: A resistência ao peróxido de hidrogênio é restabelecida pelos homólogos de *P. brasiliensis*. nos mutantes aW303Δcox17 e aW303Δcox19. O ensaio foi realizado de acordo com o descrito na figura 02. Os mutantes apresentam diferentes níveis de sensibilidade ao H₂O₂. Os homólogos *PbCOX17* e *PbCOX19* são capazes de restaurar a resistência ao peróxido nos respectivos mutantes de *S. cerevisiae*. O mutante *BY4741Δcox23* também é sensível, porém a expressão dos homólogos *PbCOX23* de *P. brasiliensis* parece aumentar esta sensibilidade.

4.3 Estrutura Genômica

Através de análise de comparação de seqüências dos genes identificados (Tabela 4) com aproximadamente 12.000 seqüências genômica aleatórias *P. brasiliensis* (RSTs – “Random Sequence Tags”) geradas a partir de uma biblioteca construída em vetor pUC18 (Nóbrega, M e colaboradores), foi possível acessarmos a estrutura genômica de seis genes (*PbCOX8*, *PbCOX11*, *PbMSS51*, *PbPET191*, *PbOXA1* e *PbSCO1*).

Para o estudo da estrutura genômica dos genes *PbCOX4*, *PbCOX5A*, *PbCOX6*, *PbCOX9*, *PbCOX12*, *PbCOX13*, *PbCOX15*, *PbCOX16*, *PbCOX17*, *PbCOX19*, *PbCOX23*, *PbPET100* e *PbPET112* a estratégia foi a identificação de clones na biblioteca genômica de *P. brasiliensis* construída em vetor do tipo fosmídeo contendo insertos de aproximadamente 40kb (Nóbrega, M e colaboradores). A biblioteca total consiste de 29 placas com 96 clones cada, ou seja, 2784 clones. A identificação dos clones foi realizada pelo método de hibridização em super-membranas contendo 96 amostras, com cada amostra contendo 12 clones da biblioteca genômica. As sondas foram preparadas a partir da amplificação dos insertos referentes a cada um dos genes. Na maioria dos casos utilizamos os oligonucleotídeos das extremidades dos plasmídeos para a amplificação dos insertos. Os fragmentos foram purificados (Fig. 45) e utilizados para marcação das sondas seguindo o protocolo do fabricante do kit de marcação (Gene Images Random Prime Labelling Module – Amersham Biosciences). As reações de hibridizações nas membranas seguiram as instruções do fabricante do kit de detecção (Gene Images CDP-Star detection module - Amersham Biosciences). Como cada amostra das membranas foi montada a partir de uma coleção de 12 clones, a detecção se deu sempre em duas etapas. Primeiro identificamos a amostra da coleção contendo os 12 clones e em seguida identificação do clone específico de interesse.

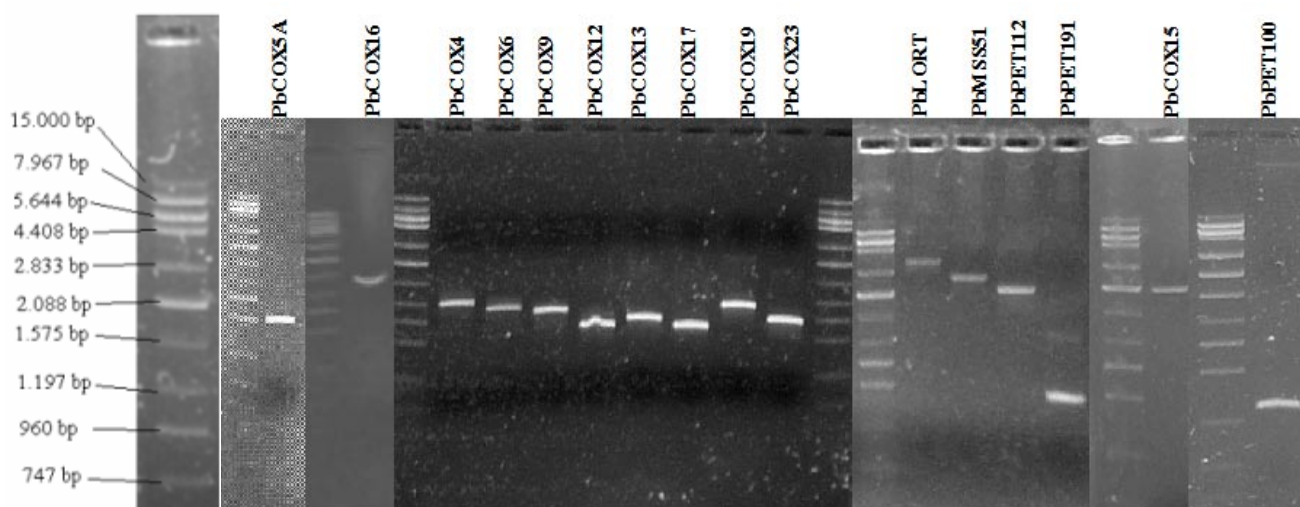


FIGURA 45: Fragmentos utilizados com sonda de hibridização.

Análise em géis 1% agarose contendo 1 μ L do produto da reação de PCR (eletroeluído e purificado) referentes a cada gene que foi utilizado para a marcação gerando as sondas para as reações de hibridização em membranas.

Dois abordagens foram utilizadas para identificar o clone específico de interesse: Uma delas consistiu em preparar uma nova membrana contendo os doze clones dispostos individualmente e em seguida fazer uma nova hibridização. Esta estratégia foi utilizada na identificação dos clones referentes aos genes *PbCOX4*, *PbCOX6*, *PbCOX9*, *PbCOX12*, *PbCOX15*, *PbCOX19*, *PbCOX23*, *PbPET112*, *PbPET191* e *PbMSS51* (Fig. 46: A-L). A outra abordagem foi amplificar os fragmentos por reação de PCR a partir dos clones individuais da coleção referente ao clone já identificado utilizando os oligonucleotídeos disponíveis. Desta forma identificou-se os clones referentes aos genes *PbCOX5A*, *PbCOX16* e *PbPET191*.

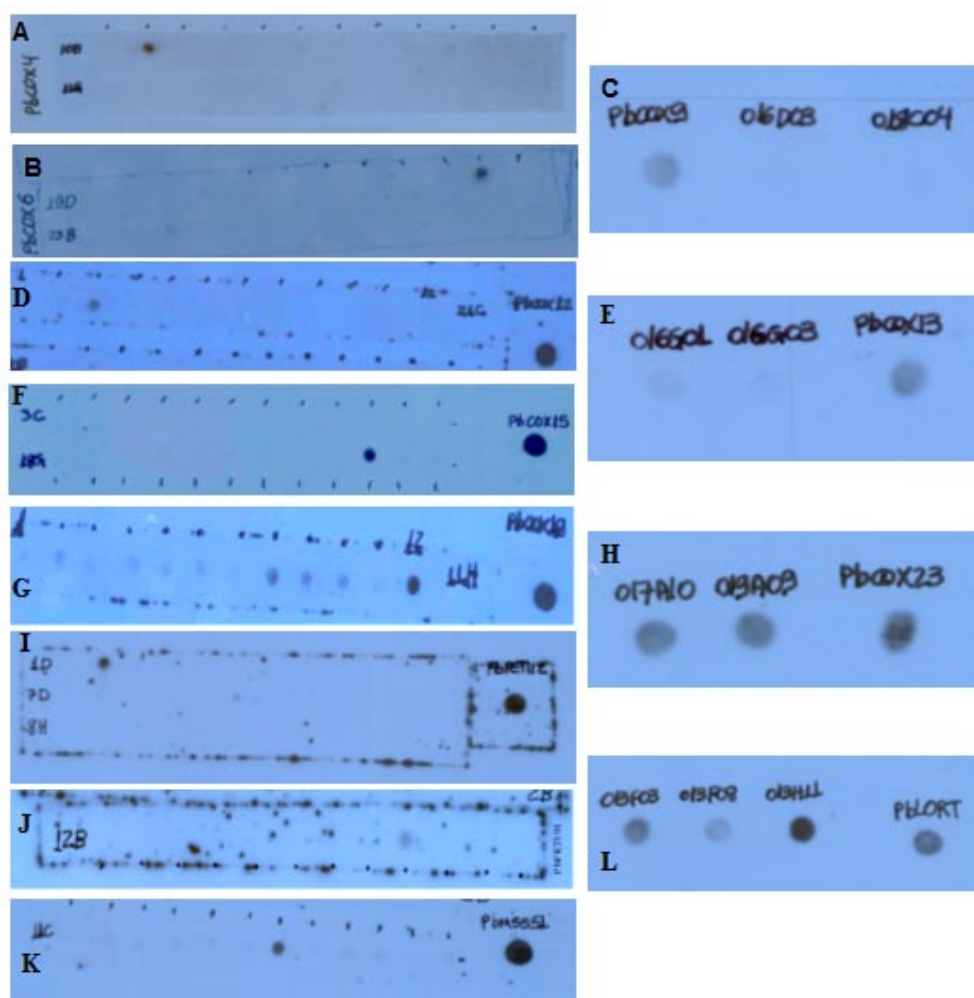


FIGURA 46: A-L: Identificação dos clones da biblioteca genômica (Fosmid) de *P. brasiliensis*. referente aos genes *PbCOX4* (A), *PbCOX6* (B), *PbCOX9* (C), *PbCOX12* (D), *PbCOX13* (E), *PbCOX15* (F), *PbCOX19* (G), *PbCOX23* (H), *PbPET112* (I), *PbPET191* (J), *PbMSS51* (K) e *PbLORT* (L) a partir de hibridização em membranas.

Após a identificação dos clones da biblioteca de fosmídeos referente a cada gene de interesse cada clone seria submetido ao seqüenciamento completo entretanto, como já comentado na introdução deste trabalho, os genomas de três isolados de *P. brasiliensis* foram totalmente seqüenciados pelo FGI - Fungal Genome Initiative e se encontram disponíveis em: http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html.

Diante dessa situação, o seqüenciamento dos clones identificados foi interrompido, sendo a análise da estrutura genômica dos genes de interesse realizadas através de comparação de seqüências utilizando os dados genômicos disponíveis. A análise consistiu na comparação das seqüências dos genes identificados com a seqüência genômica dos isolados

Pb01, Pb03 e Pb18, utilizando a ferramenta de BLASTn disponível na página do FGI. Os resultados foram sumarizados na Tabela 5.

TABELA 5: Distribuição de íntrons dos genes estudados no isolados Pb01, Pb03 e Pb18 de *P. brasiliensis*.

Gene	Supercontig g Pb01	Número de Introns	Supercontig g Pb03	Número de Introns	Supercontig Pb18 / (chr)	Número de Introns
* <i>PbCOX4</i>	20	7	2	5	4 / (chr 4)	7
* <i>PbCOX5A</i>	29	2	17	2	16 / (chr nd)	2
<i>PbCOX6</i>	23	3	9	3	7 / (chr 1)	3
* <i>PbCOX8</i>	26	2	20	2	15 / (chr 2)	2
* <i>PbCOX9</i>	7	2	15	3	8 / (chr 5)	3
<i>PbCOX11</i>	1	3	8	3	10 / (chr 5)	3
<i>PbCOX12</i>	17	4	8	4	10 / (chr 5)	4
* <i>PbCOX13</i>	16	4	9	3	7 / (chr 1)	4
<i>PbCOX15</i>	30	1	19	1	18 / (chr 4)	1
<i>PbCOX16</i>	3	1	3	1	1 / (chr 1)	1
<i>PbCOX17</i>	3	2	5	2	1 / (chr 1)	2
* <i>PbCOX19</i>	6	3	4	3	2 / (chr 3)	3
* <i>PbCOX23</i>	2	3	-----	-----	4 / (chr 4)	4
<i>PbPET100</i>	11	1	-----	-----	5 / (chr 2)	1
* <i>PbPET112</i>	4	5	3	4	1 / (chr 1)	4
<i>PbPET191</i>	10	2	5	2	11 / (chr 1)	2
* <i>PbMSS51</i>	32	2	2	2	4 / (chr 4)	2
* <i>PbOXAI</i>	10	3	5	3	11 / (chr 1)	2
* <i>PbSCO1</i>	19	2	3	2	1 / (chr 1)	2

Os dados foram obtidos na página do FGI – fungal Genome Initiative. Os genes assinalados com (*) apresentam fortes evidências de splicing alternativo e chr (cromossomo), chr nd (cromossomo não determinado). Dados atualizados em 28/10/008.

Em geral há grande diversidade entre os isolados quanto à quantidade de íntrons e às evidências de ocorrência de splicing alternativo. Para o isolado Pb18 já se encontra disponível o números do cromossomo em que localiza os genes.

O gene *PbCOX4* é o exemplo mais significativo de gene que apresenta splicing alternativos. Além da diferença de número de íntrons entre os isolados, o gene estudado através do transcrito da EST001692 apresenta uma fase aberta de leitura de 197 resíduos de aminoácidos (AY603795) enquanto que a análise genômica apresenta a possibilidade de esta proteína ser constituída por 313 resíduos no isolado Pb18. A comparação entre as duas seqüências protéicas indica a permanência de íntrons na proteína predita (313 aa) por análise do genoma.

O gene *PbCOX5A* também apresenta evidências da ocorrência de splicing alternativo. Também apresenta variação no número de resíduos preditos entre os isolados e entre a proteína predita pelo transcrito da EST-VP1-Pb30001-211E08 e a proteína predita pela análise da seqüência genômica. A diferença neste caso é de somente três (03) resíduos.

O gene *PbCOX6* com três íntrons, apresenta-se bem consistente entre os três isolados com 171 resíduos preditos para a proteína *PbCox6*, o que é também coincidente com o números de resíduos preditos a partir do estudo da EST-RC2-PbNEW1-155A05.

O gene *PbCOX8* foi inicialmente identificado no clone RST-VP1-Pb30003-012G11 com um fragmento genômico de aproximadamente 1971bp que está depositado no banco de dados do GenBank/NCBI sob o número de acesso EF988665. A região codificadora do gene está localizada na porção central do fragmento com cerca de 542bp a montante do códon iniciador. O gene *PbCOX8* codifica para uma proteína com 86 resíduos de aminoácidos e está interrompido por dois (02) íntrons contendo os motivos canônicos (5'GT...AG3') de borda intrônica (Reinoso et al., 2005). A análise do gene *PbCOX8* no genoma dos três isolados de *P. brasiliensis* confirmam a presença dos dois íntrons em cada isolado entretanto mostra variações entre as proteínas preditas, tanto entre a proteína identificada no transcrito identificado por amplificação por PCR (EF681771) quanto entre os três isolados. A proteína *PbCox8p* predita no genoma do isolado Pb01 é composta por 77 resíduos de aminoácidos e nos isolados Pb03 e Pb18 por 67 resíduos cada. Também há notáveis variações nas regiões 5'UTR e 3'UTR do gene *PbCOX8* entre os isolados.

O gene *PbCOX9* foi localizado no genoma dos três isolados entretanto há um grande diferença entre as proteínas preditas através da análise dos genomas e a proteína estudada através do transcrito de EST (EST-VP1-Pb30001-209C04) depositada sob o número de acesso (AY603792). Além disso, no isolado Pb18 encontramos esta proteína em dois lócus distintos no cromossomo 05 [(Supercontig 8: 834464-835888 - (122 aa)) e (Supercontig 8: 833321-834882 + (174 aa))]. O número de íntrons também variando entre os dois lócus (3 e 5, respectivamente).

O números de resíduos (62aa) preditos para a proteína *PbCox9* estudada (AY603792 - Bandeira e Nobrega, 2008) está mais próximo das proteínas preditas nos genomas dos isolados Pb01 (53aa) e Pb03 (62aa).

O gene *PbCOX11* foi inicialmente identificado no clone RST-RC2-Pb30004-018D01 em um fragmento de aproximadamente 2800bp. A região codificadora do gene *PbCOX11* está depositada no banco de dados do GenBank/NCBI sob o numero de acesso EF679211. Análise da seqüência do fragmento demonstrou claramente a presença de três íntrons neste gene.

Além do gene *PbCOX11* outra fase aberta de leitura esta presente neste fragmento. A proteína predita possui alta similaridade com uma subunidade “C subunit Rfc5” de um fator de replicação de DNA. A região intergênica está em torno de 0,5Kb.

A análise das seqüências genômicas dos três isolados de *P.brasiliensis* confirma os resultados obtidos com o estudo do clone RST-RC2-Pb30004-018D01, indicando que o gene *PbCOX11* encontra-se bem conservado em relação ao número de íntrons (03) entre os três isolados e o número de resíduos (253aa) nas proteínas preditas e a proteína estudada (EF679210) a partir de amplificação direta por PCR a partir de cDNA Poli(T).

O gene *PbCOX12* também apresenta-se bem consistente em relação ao número de íntrons (04) entre os três isolados e o número de resíduos (92aa) nas proteínas preditas a partir de análise dos genomas. Entretanto, a proteína estudada através do transcrito da EST003252 do isolado Pb01 (AY603794) apresenta 141 resíduos. Estas observações sugerem o processamento incompleto do transcrito da EST003252 estudado anteriormente.

O gene *PbCOX13* estudado através do transcrito da EST CN243928-1 do isolado Pb01 codifica para um proteína com 142 resíduos de aminoácidos (DQ003716). Este número de resíduos também é predito através da análise da seqüência genômica deste isolado (Pb01) bem como no isolado Pb18, ambos sendo interrompidos por quatro (04) íntrons. Já no isolado Pb03 ocorre uma variação tanto no número de íntrons (03) quanto no número de resíduos preditos (132aa).

O gene *PbCOX15* apresenta apenas um íntrons em todos os isolados. O número de resíduos preditos (491aa) também é exatamente o mesmo no três isolados inclusive na proteína *PbCox15* estudada através do transcrito da EST EST006267 do isolado Pb01 (DQ003717).

No gene *PbCOX16* observa-se um intron em todos os isolados analisados e número de resíduos estimados para a ORF (135aa) é o mesmo em todos eles confirmando os resultados obtidos no estudo da EST-RC2-PbNEW1-172D04 do isolado Pb18 (AY842443). Observamos que, no entanto as regiões 5' UTR e 3'UTR são diferentes nos três isolados.

O gene *PbCOX17* apresenta apenas dois (02) íntrons em todos os isolados e o número de resíduos preditos (78aa) também é constante no três isolados inclusive na proteína *PbCox17* estudada através do transcrito da EST EST006191 do isolado Pb01 (DQ003718). Semelhante ao gene *PbCOX16*, também variações nas regiões 5'UTR e 3'UTR nos três isolados.

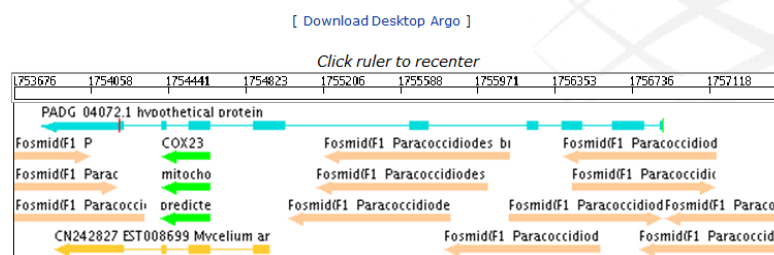
O gene *PbCOX19* com dois (02) íntrons em todos os isolados, apresenta variação no tamanho da proteína predita entre os isolados sugerindo a ocorrência de splicing alternativo.

A análise das seqüências dos genomas dos isolados Pb01 e Pb18 indica a presença da proteína *PbCox19* com 107 resíduos de aminoácidos. Também se observa variação nas regiões 5'UTR e 3'UTR do gene em todos os isolados. A proteína predita a partir do estudo da EST EST014900 do isolado Pb01 também é constituída por 107 resíduos (DQ003414). Já no isolado Pb03 a proteína predita é constituída por apenas 95 resíduos de aminoácidos.

Na análise da seqüência do transcrito da EST008699 referente ao gene *PbCOX23* frente à seqüência genômica dos isolados de *P. brasiliensis* observou-se que a proteína predita nos dados genômicos de *P. brasiliensis* seria bem maior que as proteínas homólogas de outros fungos e até mesmo que a proteína predita (76 aa) no transcrito estudado através do clone da EST008699. Observou-se que esta é constituída por 254 resíduos no isolado Pb18 e 432 no Pb01. Não foi identificada em Pb03.

No caso do isolado Pb18 a análise genômica do gene *PbCOX23* indica que este apresenta oito (08) íntrons (Fig. 47A) enquanto que a região genômica referente ao transcrito EST008699 (DQ402182) estudado apresenta somente três íntrons. A proteína predita no estudo da EST alinha exatamente com a porção C-terminal da proteína predita no genoma (Fig. 47B) sugerindo que o transcrito estudado possa ser resultado de uma seqüência de cDNA incompleto, que não contem a porção N-terminal de 179 resíduos, ou ainda que proteína possa ser expressa de forma fusionada a outras proteínas ou então processada pós-traducionalmente.

A Feature Map: *Paracoccidioides brasiliensis* Pb18 Supercontig 4



B

```
> sp|Q208S3|COX23\_PARBR Cytochrome c oxidase-assembly factor COX23, mitochondrial precursor
gb|ABD64679.1 mitochondrial cytochrome oxidase assembly factor [Paracoccidioides brasiliensis]
Length=76

Score = 157 bits (398), Expect = 5e-37, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 73/76 (96%), Positives = 73/76 (96%), Gaps = 0/76 (0%)

Query 179 MDADKVKEEPQSAWEKAKPMFTNKPASGYDPCQDFADRSIKCMRRNGNDKTMCSDYFQA 238
          MDADKVKEEPQS WEKAKPMFTNKPASGYDPCQDFADRSIKCMRRNGNDKTMCSDYFQA
Sbjct 1 MDADKVKEEPQSVWEKAKPMFTNKPASGYDPCQDFADRSIKCMRRNGNDKTMCSDYFQA 60

Query 239 YRDCKKEWMTQRKKKS 254
          YRDCKKEW TQRK KS
Sbjct 61 YRDCKKEWTTQRKNKS 76
```

FIGURA 47: *PbCox23p* predita no genoma do isolado Pb18.

(A) Indica os íntrons (em azul) da proteína *PbCox23p* predita no genoma do isolado Pb18. (B) Análise comparativa da proteína *PbCox23p* estudada através do transcrito da EST008699 e a proteína predita no genoma do isolado Pb18.

Sabe-se que a *Cox23p* faz parte de uma família de proteínas que apresentam um domínio conservado denominado CHCH ([coiled coil 1]-[helix 1]-[coiled coil 2]-[helix 2] domain) este domínio também é encontrado em outras proteínas mitocondriais como *Cox17p*, *Cox19p* e a proteína ribossomal Mrp10. Este domínio também é observado na proteína predita *P. brasiliensis*.

O gene *PbPET100* como já mencionada anteriormente apresenta variação entre os isolados Pb01 e Pb18. Em ambos os isolados este gene está dividido por um (01) íntron. A proteína identificada no transcrito EST-RC2-Pb30001-125H07 (AY603796) do isolado Pb18 apresenta 103 resíduos de aminoácidos enquanto que a proteína predita pela análise do genoma apresenta 105 resíduos. A diferença de dois (02) resíduos de aminoácido é decorrente da presença de uma repetição GGGAGT a mais na proteína predita, ou seja, no transcrito existem três (03) dessas repetições enquanto que na proteína predita existem quatro (04).

No isolado Pb01 a proteína *PbPet100* apresenta 101 resíduos sendo que os resíduos a menos também são decorrentes no números de repetições GGGAGT. Os íntrons dos dois

isolados estão presentes na mesma posição entretanto a seqüência dos mesmos também apresenta variações. Há grande diferença também nas regiões 5'UTR e 3'UTR do gene *PbPET100* dos dois isolados (Pb01 e Pb18).

Como as repetições GGGAGT não se encontram em regiões de borda intrônica a diferença do número de repetições das mesmas entre a proteína predita e a proteína estudada (AY603796) pode ser resultado de um erro de transcrição.

O gene *PbPET112* estudado no transcrito EST-VP1-Pb30001-203E03 codifica para uma proteína com 603 resíduos de aminoácidos (DQ402183) enquanto que a proteína *PbPet112p* predita no genoma do isolado Pb18 é constituída por 661 resíduos. A análise comparativa das duas proteínas indica que a proteína estudada (DQ402183) é resultado de um cDNA incompleto que não possui 58 resíduos de aminoácidos na região N-terminal. Este gene está dividido por quatro (04) íntrons no isolado Pb18.

No isolado Pb01 a proteína *PbPet112p* predita é constituída por 775 resíduos de aminoácidos sendo interrompida por cinco (05) íntrons. Já no isolado Pb03 não temos uma predição finalizada. Portanto, a análise das seqüências genômicas dos isolados Pb01 e Pb18 do fungo *P. brasiliensis* indicam variação na região codificadora do gene *PbPET112* desses dois isolados.

No estudo do gene *PbPET191* amplificou-se o gene diretamente do genoma de *P. brasiliensis* utilizando os oligonucleotídeos específicos (senso: 5'-CGTGCGGAGCTCGATTGTGTT-3' e anti-senso: 5'-TCCGTTCTGCAGCTCCCC-3') que foram desenhados com base na seqüência da EST EST013844 (Felipe et al., 2003). Amplificamos um fragmento com 634 pares de base contendo o gene *PbPET191* que está interrompido por dois (02) íntrons que codificam para uma proteína com 123 resíduos de aminoácidos. A seqüência expressa deste gene ainda não foi clonada, porém a análise da seqüência genômica dos três isolados de *P. brasiliensis* (Pb01, Pb03 e Pb18) confirma tanto a presença dos dois íntrons quanto o tamanho da proteína predita que é igual nos três isolados com 123 resíduos.

O estudo da estrutura genômica do gene *PbMSS51* foi inicialmente acessada através do estudo do clone genômico RST-VP1-Pb00003-010H04 que contém um fragmento genômico com cerca de 2,4kb. A comparação entre a seqüência expressa (EST-VP1-Pb00001-166F10) e a seqüência do fragmento genômico indicava que este gene teria um intron. No entanto, a comparação entre a seqüência expressa (DQ003715) e a seqüência do fragmento genômico indicou que o gene *PbMSS51* não está completo faltando aproximadamente 235bp da região terminal 3' do gene onde verificou-se presença de mais um intron posteriormente.

Através da análise das seqüências genômicas dos três isolados (Pb01, Pb03 e Pb18) verificou-se que o gene *PbMSS51* está interrompido por dois (02) íntrons, sendo o mesmo padrão observado em todos os isolados. Também não se observa a ocorrência de variação no tamanho da proteína predita com 514 resíduos entre os isolados e a proteína estuda através do transcrito de EST-VP1-Pb00001-166F10 (DQ003715).

Na definição da estrutura genômica do gene *PbOXAI* trabalhou-se inicialmente com o clone genômico RST-VP1-Pb50003-024E10 que é constituído por aproximadamente 1942bp, verificando-se a presença dois (02) íntrons. Na região 5' deste fragmento observa-se a presença de 81bp que não está presente no clone EST-VP1-Pb30001-205H03. Nesta região adicional (81bp) verifica-se um condon iniciador ATG em fase com a ORF deste gene acrescentando mais 58 resíduos à proteína *PbOxalp* totalizando uma proteína com 532 resíduos diferentemente da proteína com 474 resíduos (GenBank/NCBI - DQ836715) identificada através do clone de EST. Numa análise mais cuidadosa da região 5' da EST verificou-se 31pb diferentes nesta região da seqüência expressa. Este resultado poderia indicar que: ou a seqüência expressa (EST-VP1-Pb00001-205H03) não contém a região codificadora completa do gene *PbOXAI*, ou temos um caso de gene de cópia dupla no genoma e neste caso o fragmento genômico identificado (RST-VP1-Pb50003-024E10) não corresponde ao locus da seqüência expressa (EST-VP1-Pb30001-205H03) estudada.

A análise da seqüência genômica dos três isolados confirma a presença dos dois íntrons no isolado Pb18, sendo a proteína predita com 514 resíduos de aminoácidos. No isolado Pb01, o gene *PbOXAI* está interrompido por três (03) íntrons sendo constituída por 644 resíduos de aminoácidos. Já no isolado Pb03 este gene também está interrompido por três íntrons entretanto a proteína predita é constituída por 505 resíduos de aminoácidos. Os genes dos isolados Pb01 e Pb18 são mais parecidas entre si, incluindo a região 3' terminal e os dois primeiros íntrons do isolado Pb03. A partir do segundo íntron ocorre diferenciação. Já o isolado Pb01 é o mais distante tendo as seqüências intrônicas bem diferentes.

A estrutura genômica do gene *PbSCO1* foi acessada inicialmente no clone RST-VP1-Pb50003-038F06 com aproximadamente 2115bp. Nesta análise identificou-se a presença de dois (02) íntrons sendo que o segundo está em fase com a fase aberta de leitura do gene *PbSCO1*. Neste clone o gene não está completo faltando uma porção da região 5' do gene. A análise das seqüências genômicas dos três isolados (Pb01, Pb03 e Pb18) de *P. brasiliensis* indica que nos isolados Pb01 e Pb18 o gene *PbSCO1* está interrompido por dois íntrons e a proteína predita é constituída por 316 resíduos de aminoácidos, diferente da que foi previamente observada (304 resíduos) no estudo do transcrito obtido através de amplificação

por PCR (EF679209). Esta diferença se encontra na região N-terminal da proteína. Entretanto, o códon iniciador correspondente com o códon iniciador da proteína predita na sequência genômica, também está presente no transcrito amplificado por PCR, porém não está em fase com a região codificadora e, portanto, a proteína previamente predita (EF679209) com 304 resíduos está iniciando no segundo condon ATG do gene. Provavelmente ocorreu algum erro na sequência durante a reação de amplificação por PCR do gene. No isolado Pb03 ainda não há uma predição finalizada.

4.4 Expressão Relativa De Genes Nucleares De *P. brasiliensis* Durante O Período De Transição Morfológica Induzida Pela Mudança Da Temperatura

Verificar o padrão de expressão dos genes nucleares de *P. brasiliensis* envolvidos na expressão do complexo da citocromo c oxidase mitocondrial, nas formas de levedura, micélio e nas formas intermediárias do fungo, durante o período de transição morfológica, induzida pela mudança de temperatura do meio de crescimento foi mais um dos objetivos deste trabalho, considerando que a fosforilação oxidativa seria desacoplada durante a transição morfológica de *P. brasiliensis* de micélio para levedura (Medoff et al., 1987).

A expressão do complexo da citocromo c oxidase mitocondrial funcional depende da expressão coordenada de genes mitocondriais e nucleares. Além das subunidades estruturais (oito) que formam o complexo, outras dezenas de produtos gênicos são necessárias para garantir a montagem funcional deste complexo.

Para quantificação do nível de expressão de mRNAs estáveis destes alvos específicos utilizamos reação de PCR em tempo real (RT-PCR) baseada na emissão de fluorescência e o método 2^{-DDCt} (Livak e Schmittgen 2001) para a quantificação relativa. De acordo com este método (2^{-DDCt}) a expressão de cada gene é subtraída da expressão do gene utilizado como controle endógeno (ΔC_t) e desta forma pode-se padronizar a quantidade inicial de amostra utilizada em cada experimento. Esta técnica é a mais utilizada atualmente para a caracterização da expressão de genes alvos através da comparação do nível dos respectivos mRNAs em diferentes populações de amostras (Orlando et al., 1998). Como controle endógeno utilizou-se o gene PbeIF3 (Nunes et al., 2005). A amostra inicial (0h ou levedura) foi escolhida como agente calibrador ou referencial à expressão de cada amostra obtida após as mudanças de temperatura (5h, 10h, 24h, 48h e 120h) até a completa transição morfológica.

As análises da expressão relativas dos genes nucleares de *P. brasiliensis* envolvidos na biosíntese do complexo da citocromo c oxidase foram realizadas utilizando-se duas tecnologias distintas, a tecnologia TaqMan e a de SYBR Green.

A lista dos “primers” e “probes” dos genes alvos (*PbCOX2*, *PbCOX4*, *PbCOX5A*, *PbCOX6*, *PbCOX9*, *PbCOX12*, *PbCOX16*, *PbCOX17* e *PbCOX19*) está descrita na Tabela 3. Os “primers” e “probes” dos genes alvos foram obtidos através do sistema Assay-by-DesignSM system (Applied Biosystems) enquanto que os “primers” e a “probe” para o controle endógeno (*PbeIF3*) foi obtido pela sistema de Custom TaqMan® MGB™ Probe (Applied Biosystems). Estes foram os genes analisados com a tecnologia TaqMan. Já as seqüências dos primers dos demais genes estudados através da tecnologia de SYBR Green estão descritas na lista de iniciadores na seção de material e métodos.

Ao todo foram analisados a expressão de vinte e quatro (24) genes sendo o *PbCOX2* representante de uma subunidade mitocondrial do complexo. O genes nucleares *PbCOX4*, *PbCOX5A*, *PbCOX6*, *PbCOX8*, *PbCOX9*, *PbCOX12* e *PbCOX13* representantes de subunidades estruturais e os genes *PbCOX11*, *PbCOX15*, *PbCOX16*, *PbCOX17*, *PbCOX19*, *PbCOX23*, *PbOXA1*, *PbPET100*, *PbPET112*, *PbMSS51* e *PbSCO1* também nucleares, representantes de subunidades que auxiliam na montagem e manutenção do complexo COX funcional. Além dos genes envolvidos no complexo da COX também foi analisado a expressão de representantes de genes de outros complexos da cadeia respiratória mitocondrial: O gene *PbNDI1* do complexo da NADH-Coenzima Q-redutase (complexo I). Os genes *PbRIP1* e *PbQCR7* do complexo da ubiquinol citocromo c redutase (complexo III), os genes *PbATP4* e *PbATP7* complexo da ATP-sintase mitocondrial.

Após a normalização dos resultados da reação de RT-PCR (PCR em tempo real) contra o gene *PbeIF3*, utilizado como controle endógeno, os resultados foram resumidos em gráficos como mostram as figuras (48A a 71A). A observação dos resultados mostra que existe uma modulação da expressão de todos os genes durante o processo de transição morfológica do fungo. Pode-se observar uma variação no comportamento de alguns genes em relação à maioria entretanto a visão geral indica que ocorre aumento da expressão quando a temperatura é aumentada de 25 °C para 37 °C e diminuição quando a temperatura é baixada de 37 °C para 25 °C.

Considerando que os mRNAs utilizados para as reações de qRT-PCRs foram todos quantificados, foi realizada também a análise da expressão desses genes sem a normalização com o controle endógeno. Embora se observe um mesmo padrão quando a temperatura é elevada, ou seja, aumento da expressão, pode ser observado um padrão diferenciado na

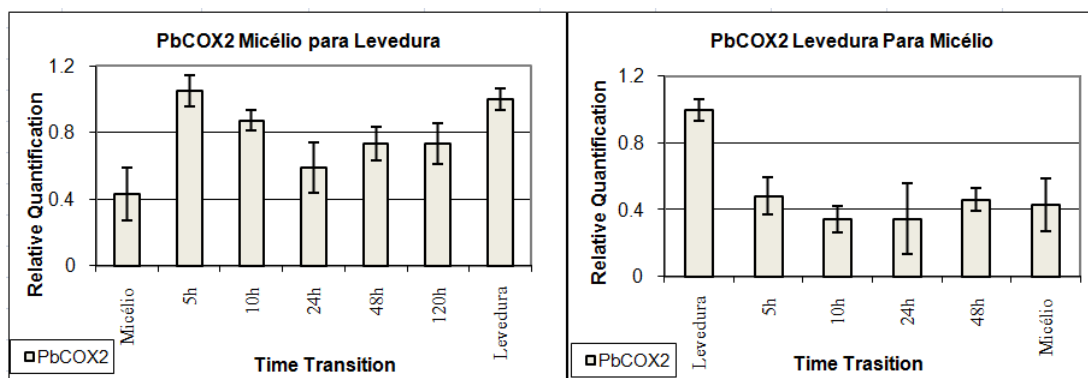
expressão destes genes quando a temperatura é diminuída de 37 °C para 25 °C em relação à análise utilizando o *PbeIF3* como controle endógeno (Fig. 48B a Fig. 71b). Nesta situação geralmente ocorre um aumento da expressão durante as primeiras 10 horas seguida de um progressivo declínio no restante do período analisado.

A análise da expressão do gene *PbeIF3* durante o período da transição morfológica mostrou que este gene também sofre modulação (Fig. 72) durante este processo e que portanto, não é apropriado para o uso como controle endógeno. Diante deste resultado consideramos a expressão dos genes estudados, a partir da análise sem o controle endógeno (Fig. 48B a Fig. 71B).

Portanto, durante a transição morfológica de levedura para micélio induzida por mudança da temperatura do meio de crescimento do fungo *P. brasiliensis* ocorre um aumento da expressão de todos os genes analisados durante as primeiras 10 horas de diminuição da temperatura com progressivo declínio da expressão no restante do período.

Já quando a temperatura é aumentada de 25 °C para 37 °C na transição de micélio para levedura observa-se aumento contínuo da expressão da maioria dos genes durante todo o período da transição morfológica. As exceções são quanto aos genes *PbND11* do complexo I e os genes codificadores de proteínas auxiliares da montagem e manutenção do complexo da COX, *PbMSS51*, *PbPET112*, *PbCOX15*, *PbCOX16* e *PbCOX17*. Nestes genes observa-se ou um aumento discreto ou somente pequenas variações da expressão durante o período da transição.

A



B

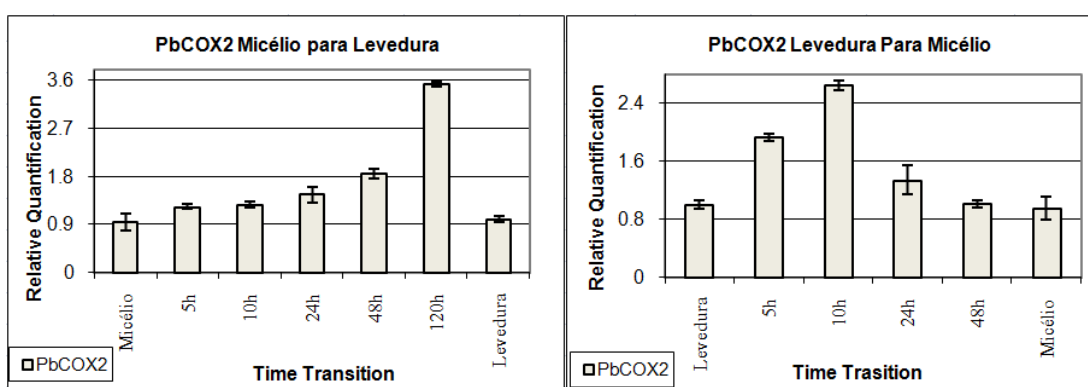


FIGURA 48: Expressão do gene *PbCOX2* durante a transição morfológica de *P. brasiliensis* induzida pela mudança da temperatura. **A: Com controle endógeno. **B:** Sem controle endógeno.**

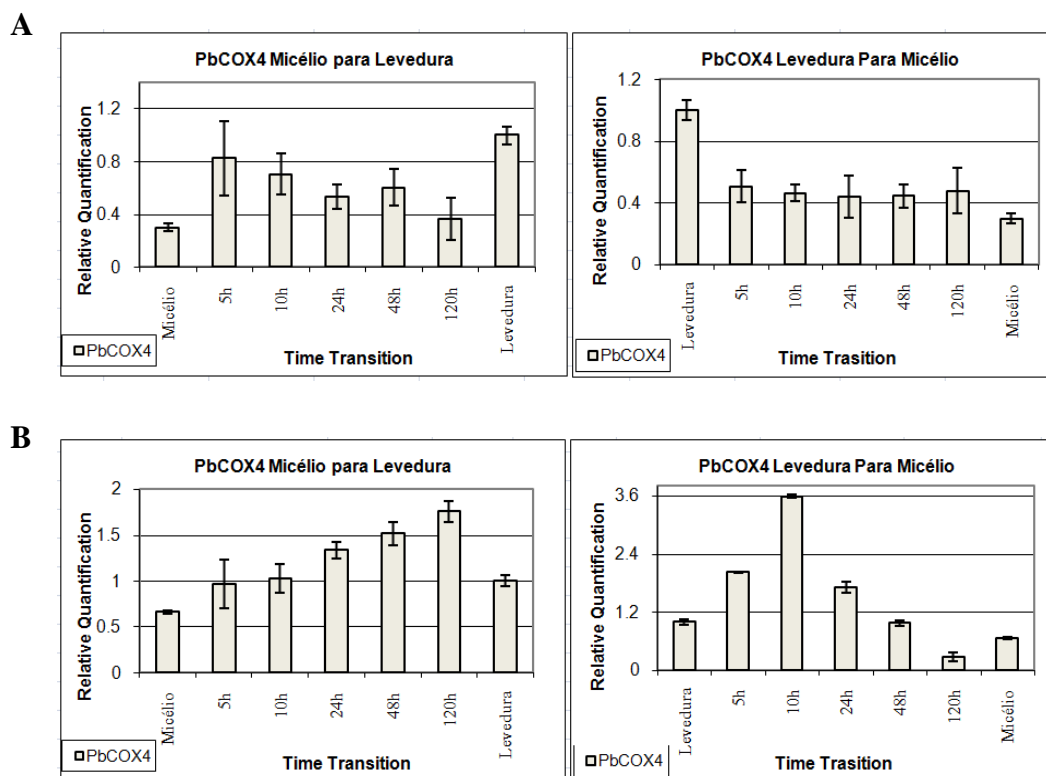


FIGURA 49: Expressão do gene *PbCOX4* durante a transição morfológica de *P. brasiliensis* induzida pela mudança da temperatura. **A:** Com controle endógeno. **B:** Sem controle endógeno.

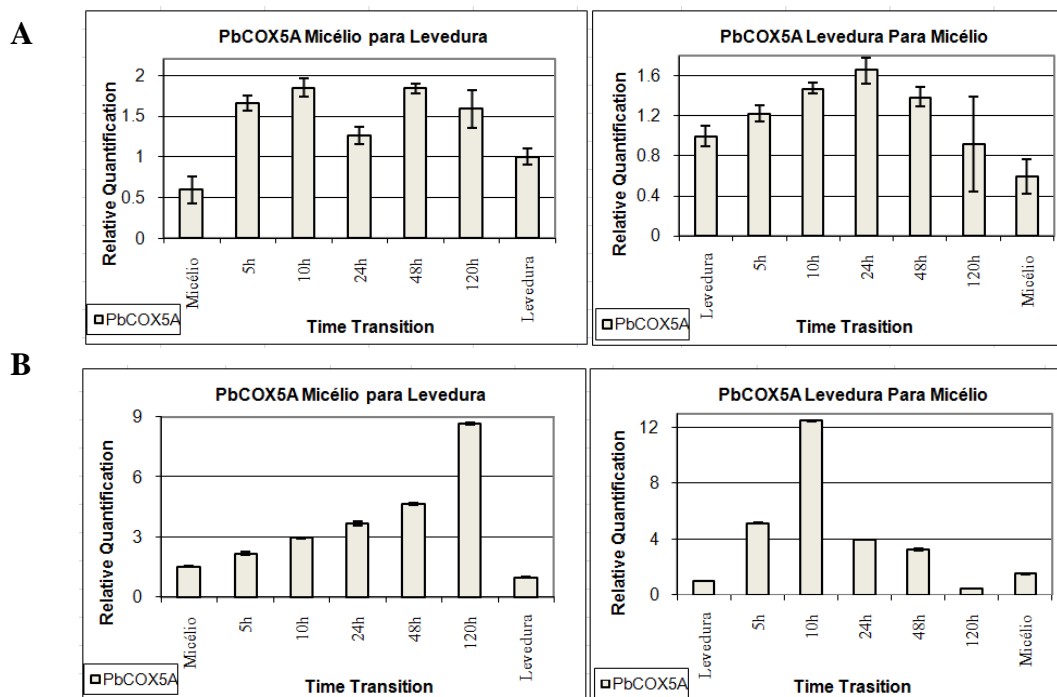


FIGURA 50: Expressão do gene *PbCOX5A* durante a transição morfológica de *P. brasiliensis* induzida pela mudança da temperatura. **A:** Com controle endógeno. **B:** Sem controle endógeno.

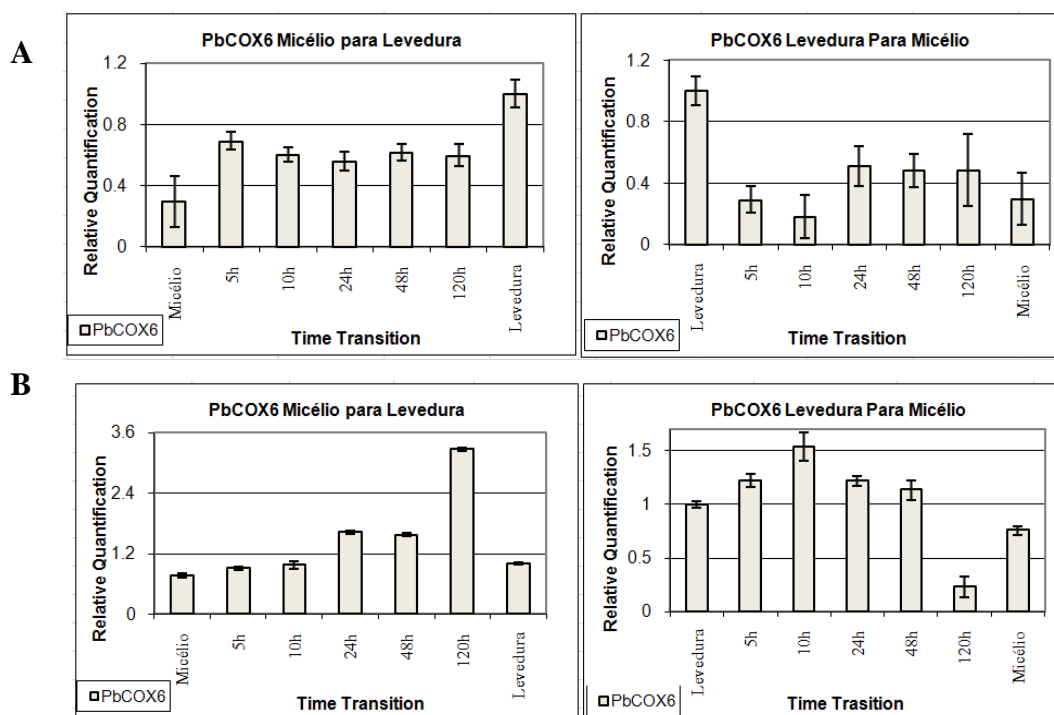


FIGURA 51: Expressão do gene *PbCOX6* durante a transição morfológica de *P. brasiliensis* induzida pela mudança da temperatura. **A:** Com controle endógeno. **B:** Sem controle endógeno.

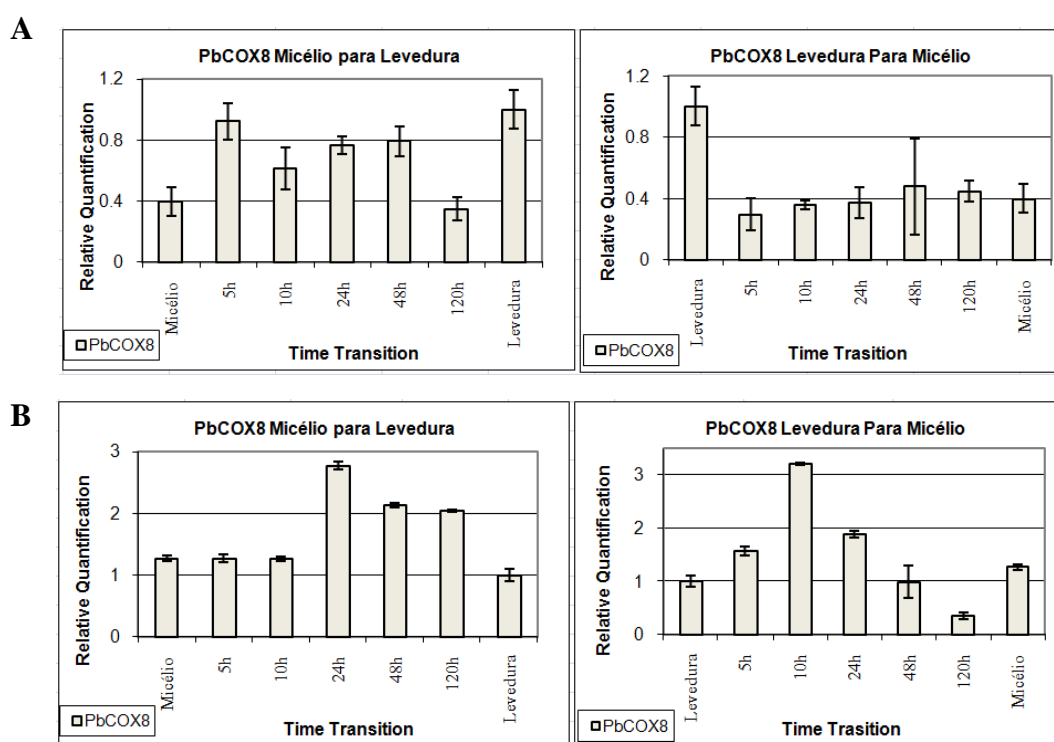


FIGURA 52: Expressão do gene *PbCOX8* durante a transição morfológica de *P. brasiliensis* induzida pela mudança da temperatura. **A:** Com controle endógeno. **B:** Sem controle endógeno.

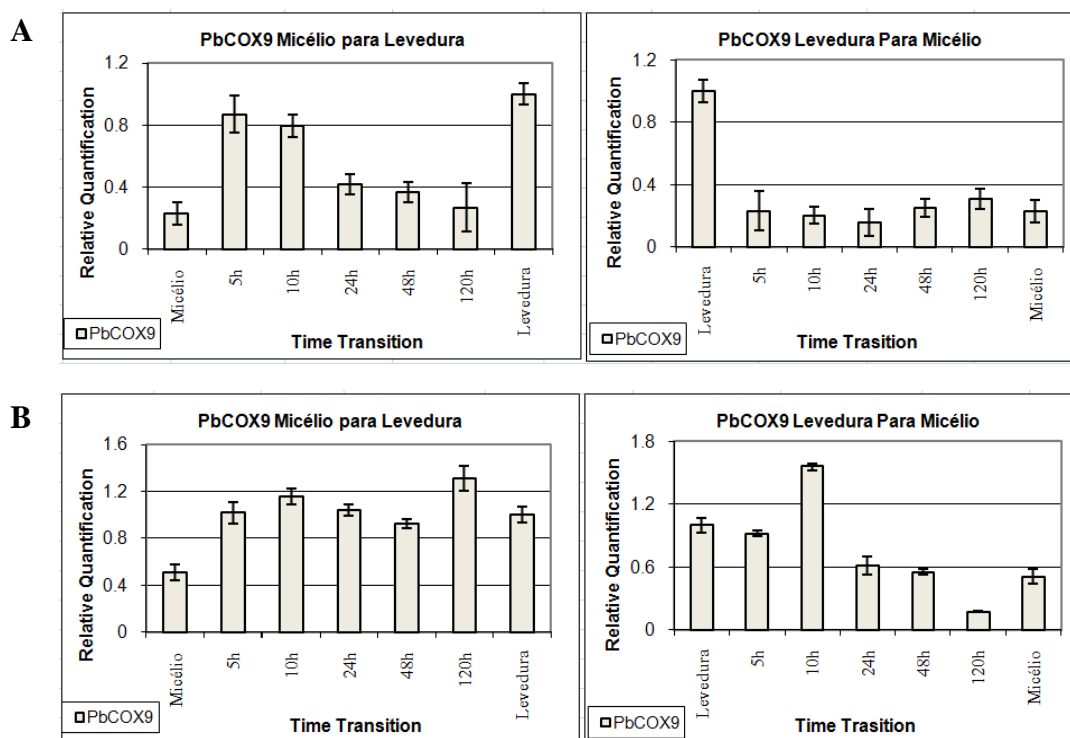


FIGURA 53: Expressão do gene *PbCOX9* durante a transição morfológica de *P. brasiliensis* induzida pela mudança da temperatura. **A:** Com controle endógeno. **B:** Sem controle endógeno.

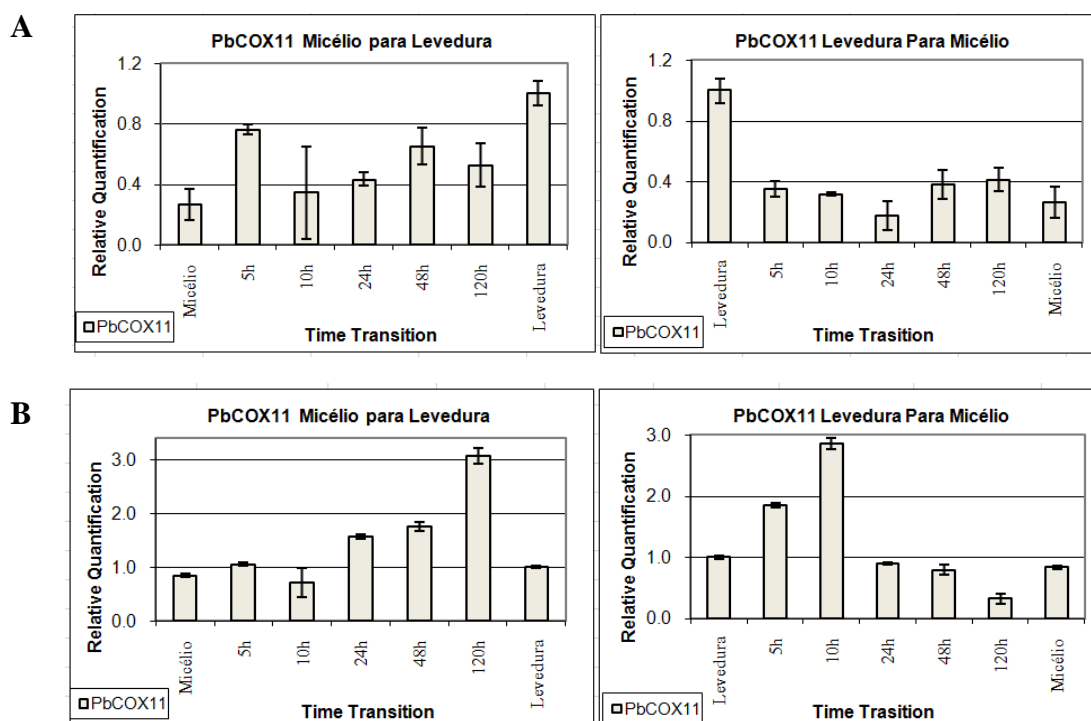


FIGURA 54: Expressão do gene *PbCOX11* durante a transição morfológica de *P. brasiliensis* induzida pela mudança da temperatura. **A:** Com controle endógeno. **B:** Sem controle endógeno.

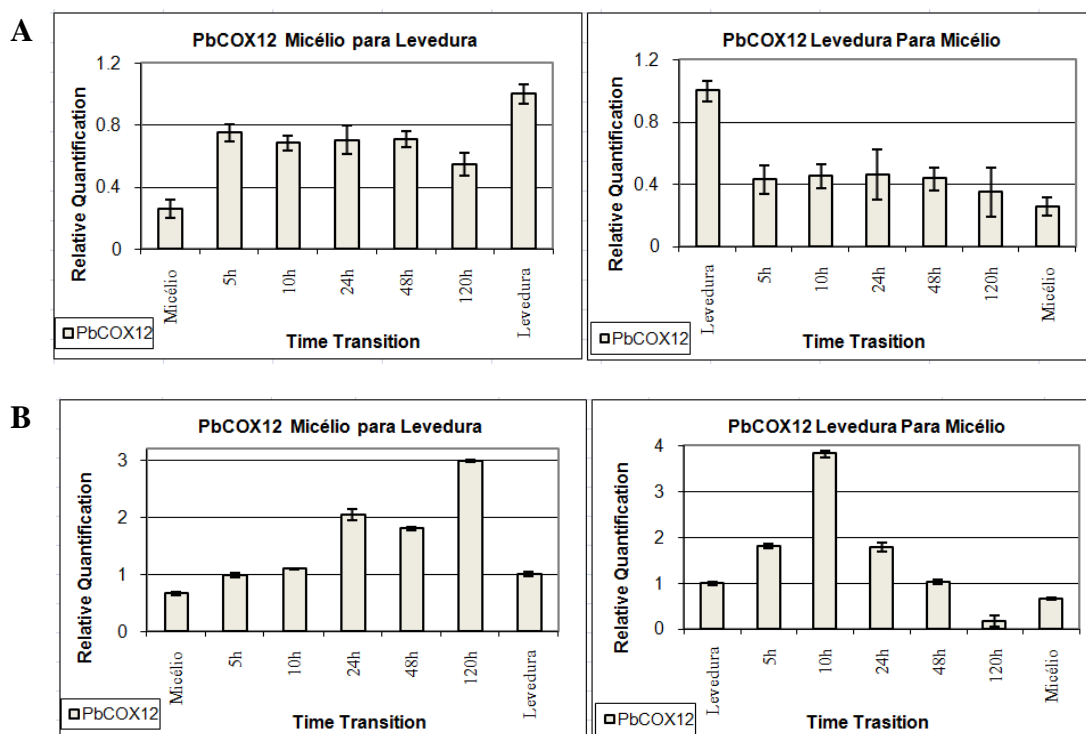


FIGURA 55: Expressão do gene *PbCOX12* durante a transição morfológica de *P. brasiliensis*, induzida pela mudança da temperatura. **A:** Com controle endógeno. **B:** Sem controle endógeno.

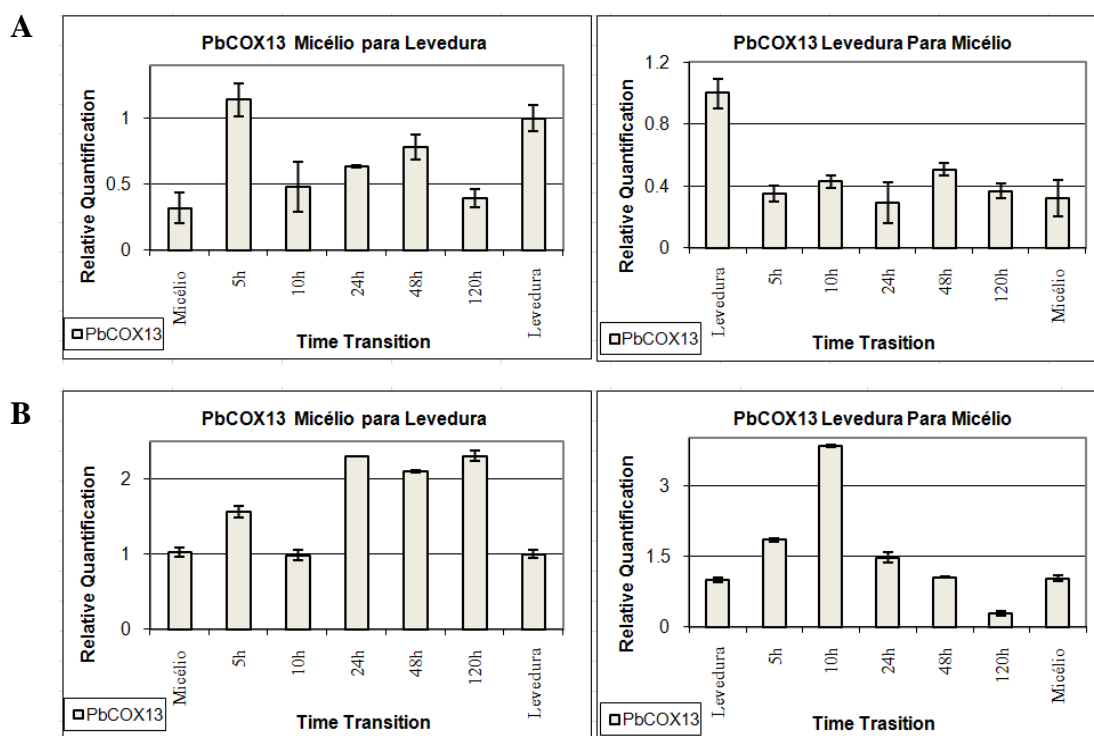


FIGURA 56: Expressão do gene *PbCOX13* durante a transição morfológica de *P. brasiliensis*, induzida pela mudança da temperatura. **A:** Com controle endógeno. **B:** Sem controle endógeno.

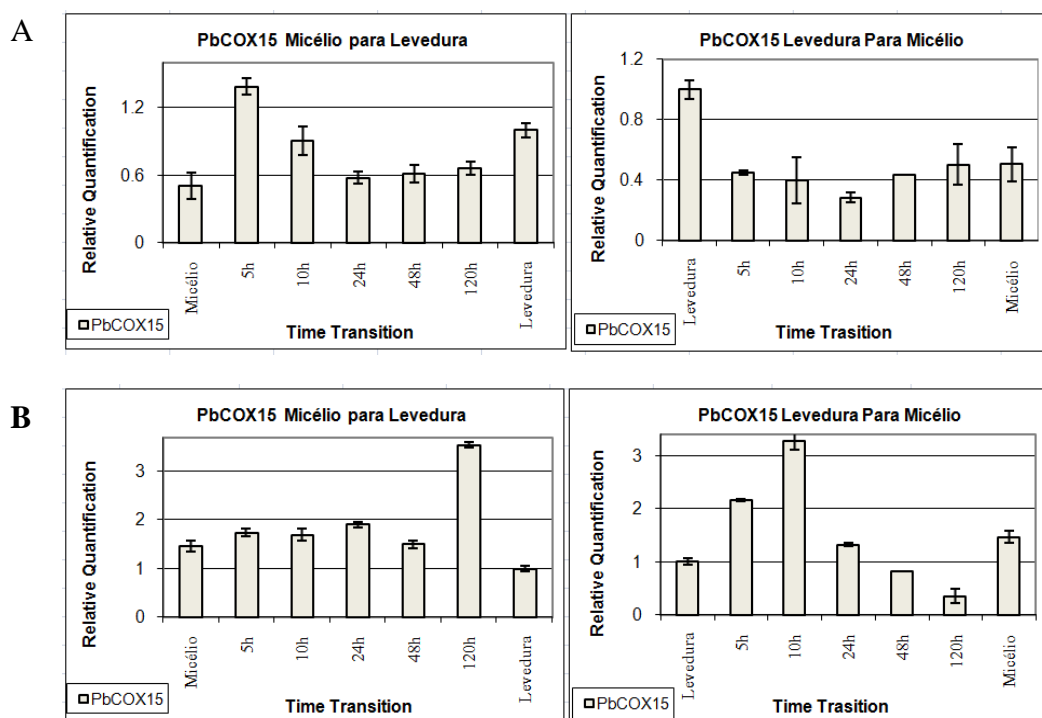


FIGURA 57: Expressão do gene *PbCOX15* durante a transição morfológica de *P. brasiliensis* induzida pela mudança da temperatura. **A:** Com controle endógeno. **B:** Sem controle endógeno.

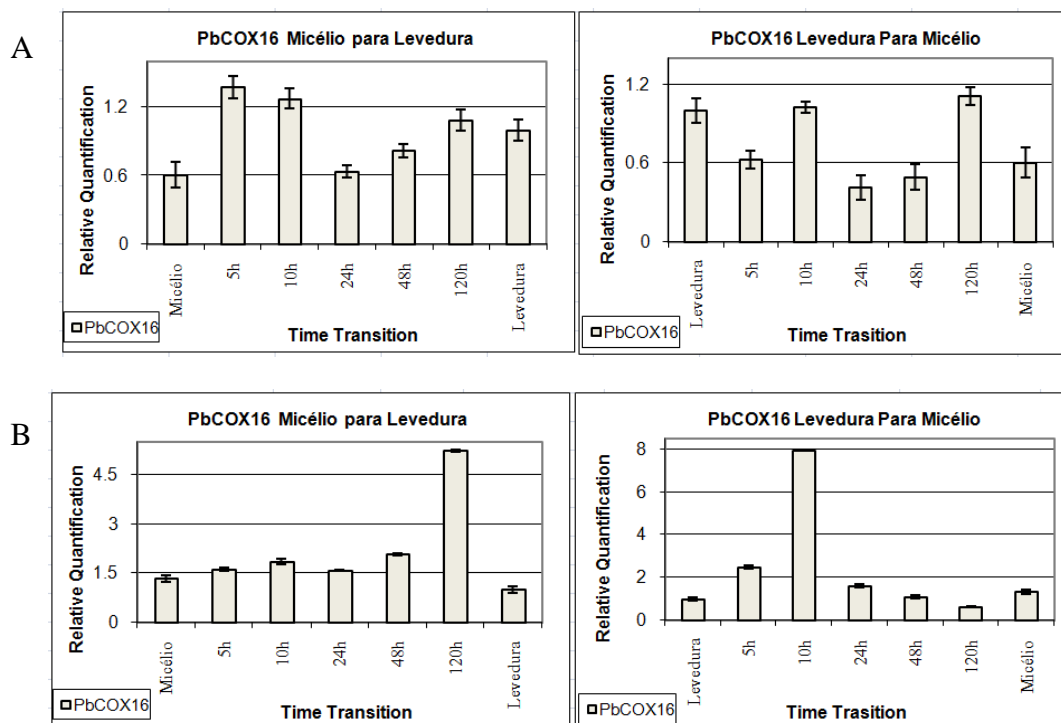


FIGURA 58: Expressão do gene *PbCOX16* durante a transição morfológica de *P. brasiliensis* induzida pela mudança da temperatura. **A:** Com controle endógeno. **B:** Sem controle endógeno.

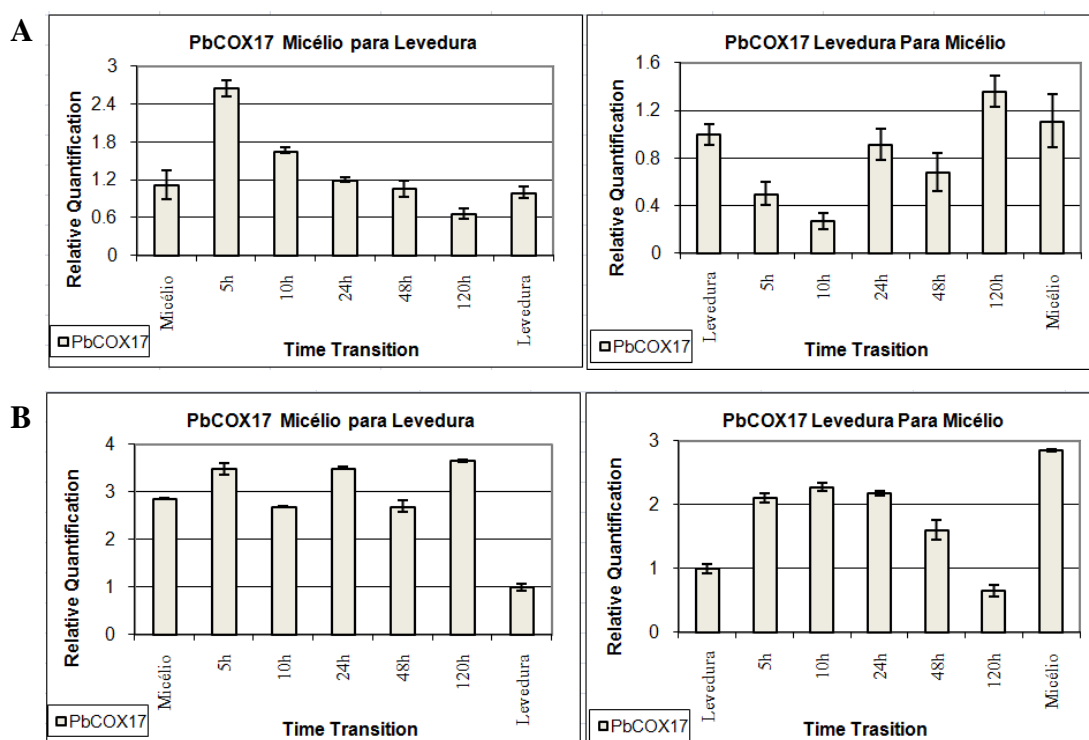


FIGURA 59: Expressão do gene *PbCOX11* durante a transição morfológica de *P. brasiliensis* induzida pela mudança da temperatura. **A:** Com controle endógeno. **B:** Sem controle.

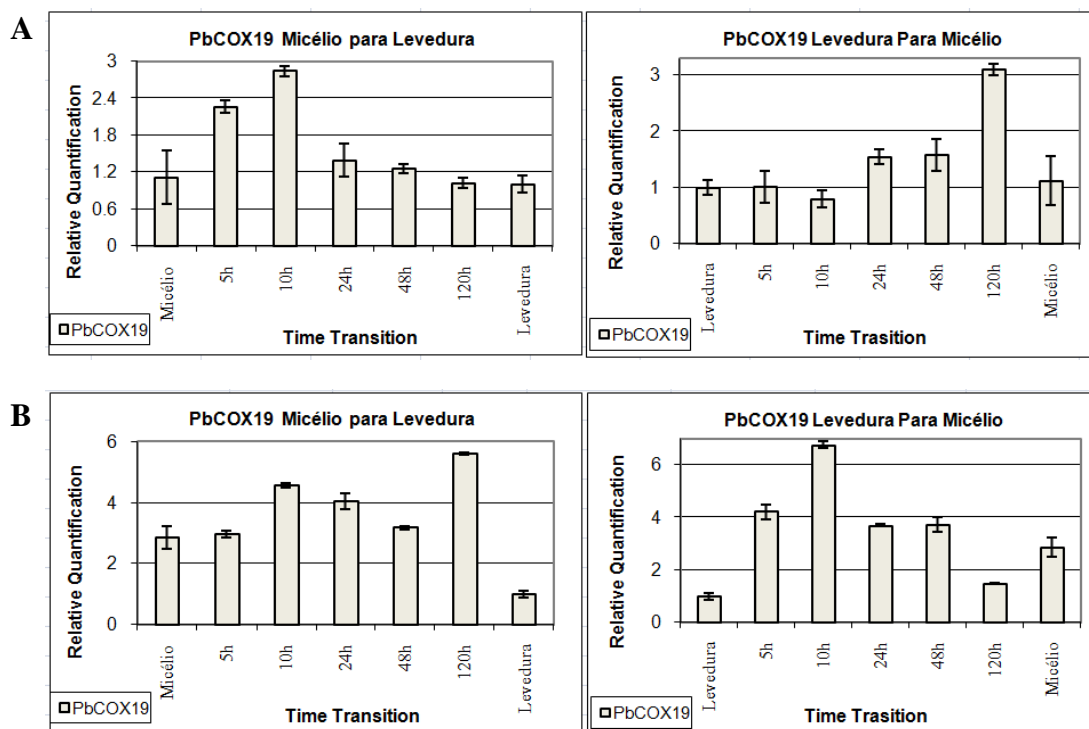


FIGURA 60: Expressão do gene *PbCOX19* durante a transição morfológica de *P. brasiliensis* induzida pela mudança da temperatura. **A:** Com controle endógeno. **B:** Sem controle endógeno.

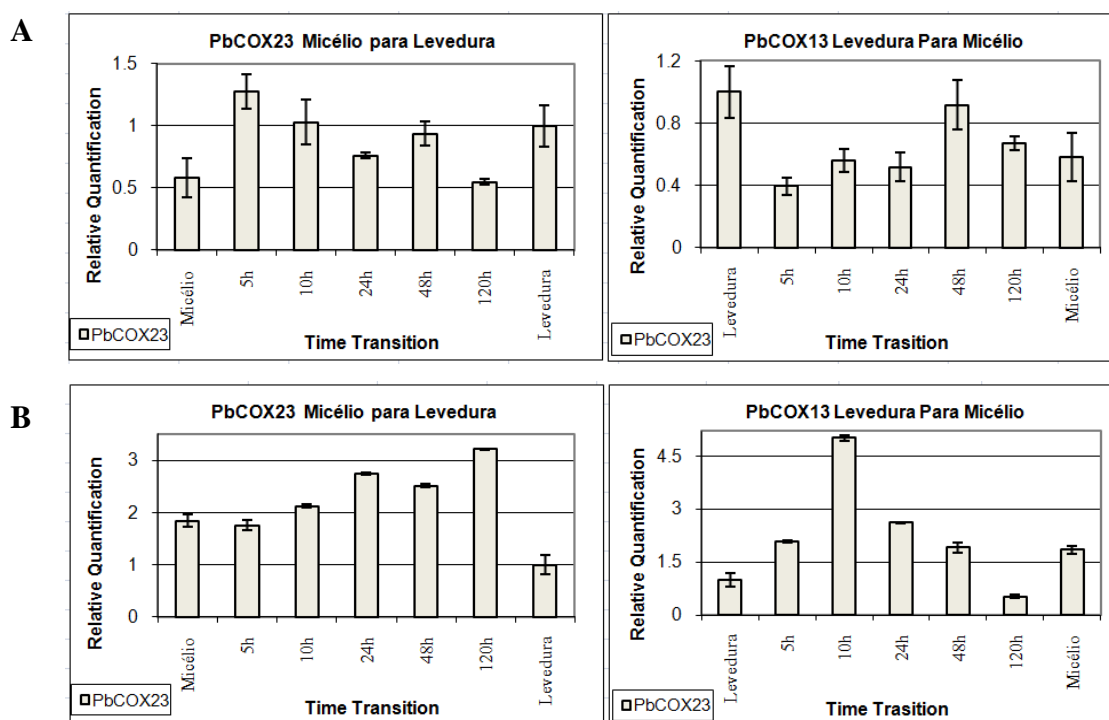


FIGURA 61: Expressão do gene *PbCOX11* durante a transição morfológica de *P. brasiliensis* induzida pela mudança da temperatura. **A:** Com controle endógeno. **B:** Sem controle endógeno.

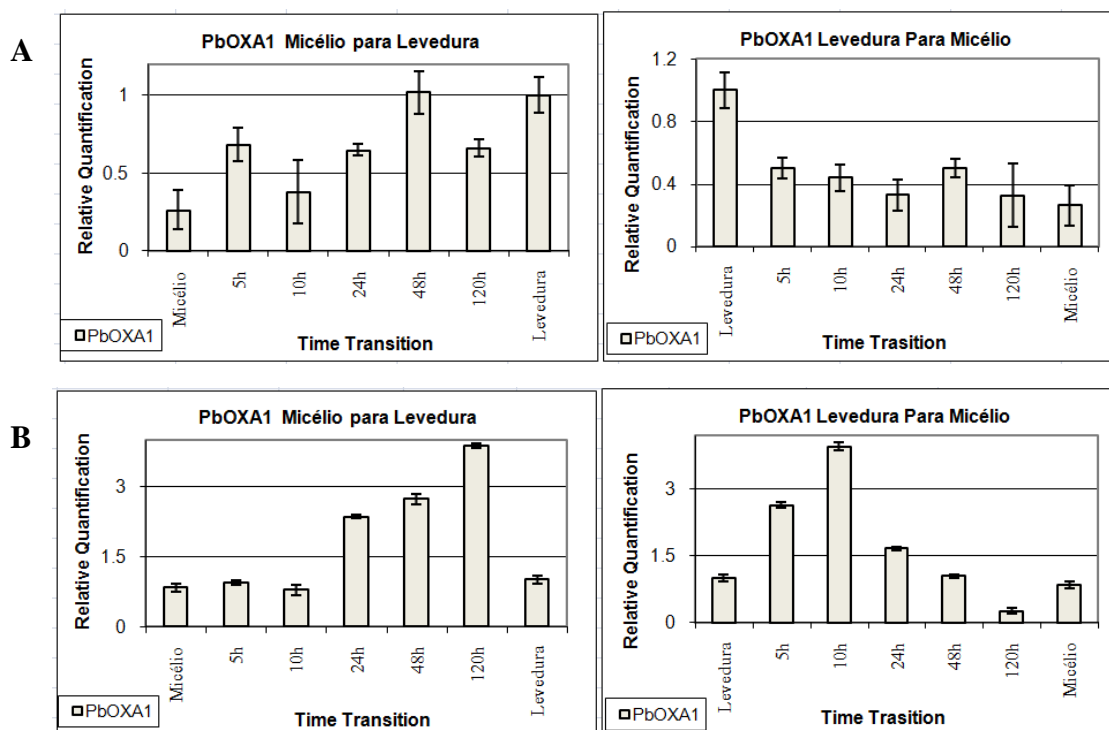


FIGURA 62: Expressão do gene *PbOXA1* durante a transição morfológica de *P. brasiliensis* induzida pela mudança da temperatura. **A:** Com controle endógeno. **B:** Sem controle endógeno.

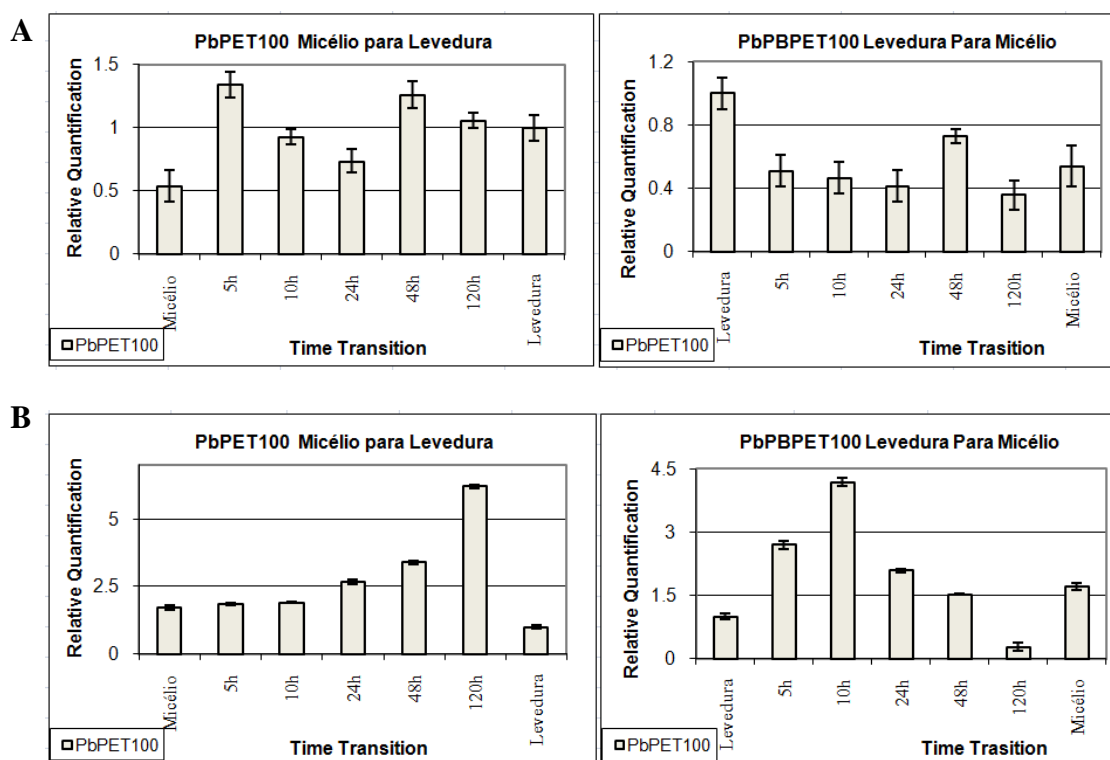


FIGURA 63: Expressão do gene *PbPET100* durante a transição morfológica de *P. brasiliensis* induzida pela mudança da temperatura. **A:** Com controle endógeno. **B:** Sem controle endógeno.

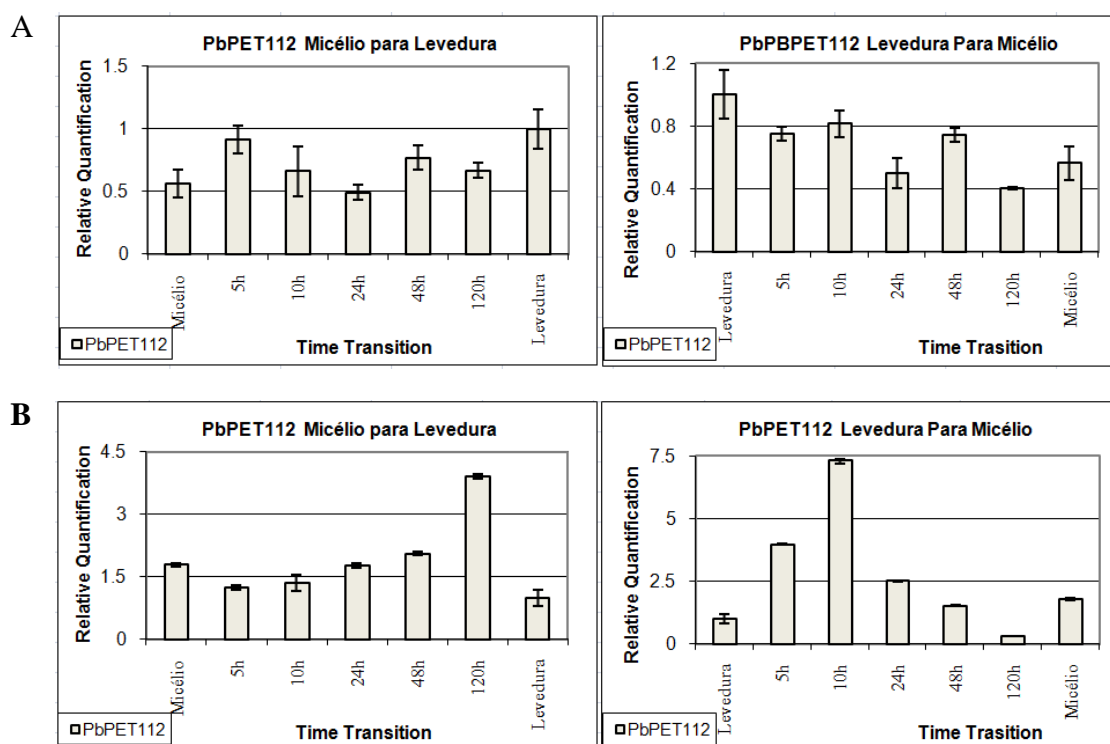


FIGURA 64: Expressão do gene *PbPET112* durante a transição morfológica de *P. brasiliensis* induzida pela mudança da temperatura. **A:** Com controle endógeno. **B:** Sem controle endógeno.

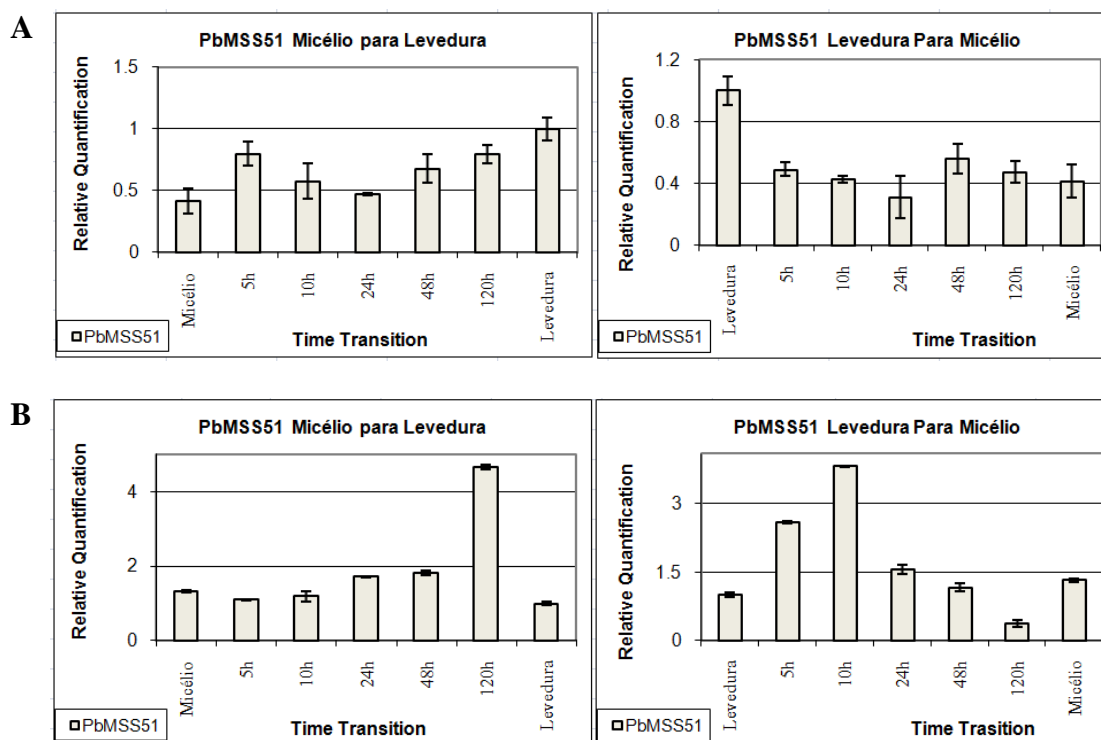


FIGURA 65: Expressão do gene *PbMSS51* durante a transição morfológica de *P. brasiliensis*, induzida pela mudança da temperatura. **A:** Com controle endógeno. **B:** Sem controle endógeno.

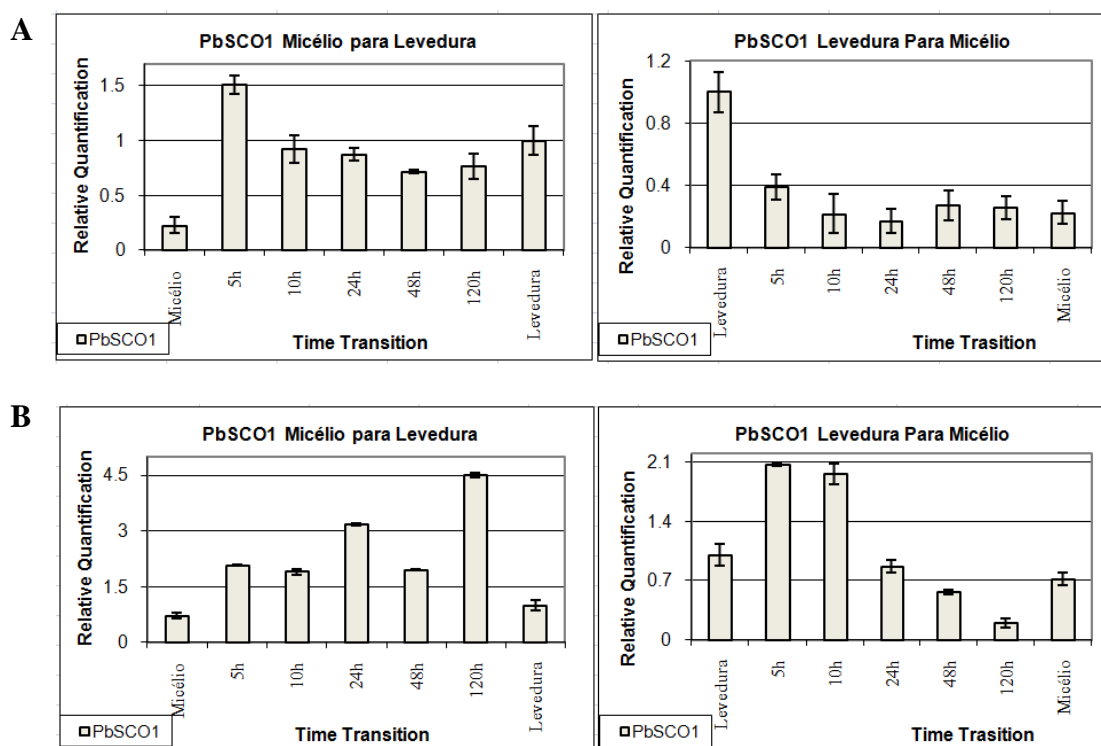


FIGURA 66: Expressão do gene *PbSCO1* durante a transição morfológica de *P. brasiliensis*, induzida pela mudança da temperatura. **A:** Com controle endógeno. **B:** Sem controle endógeno.

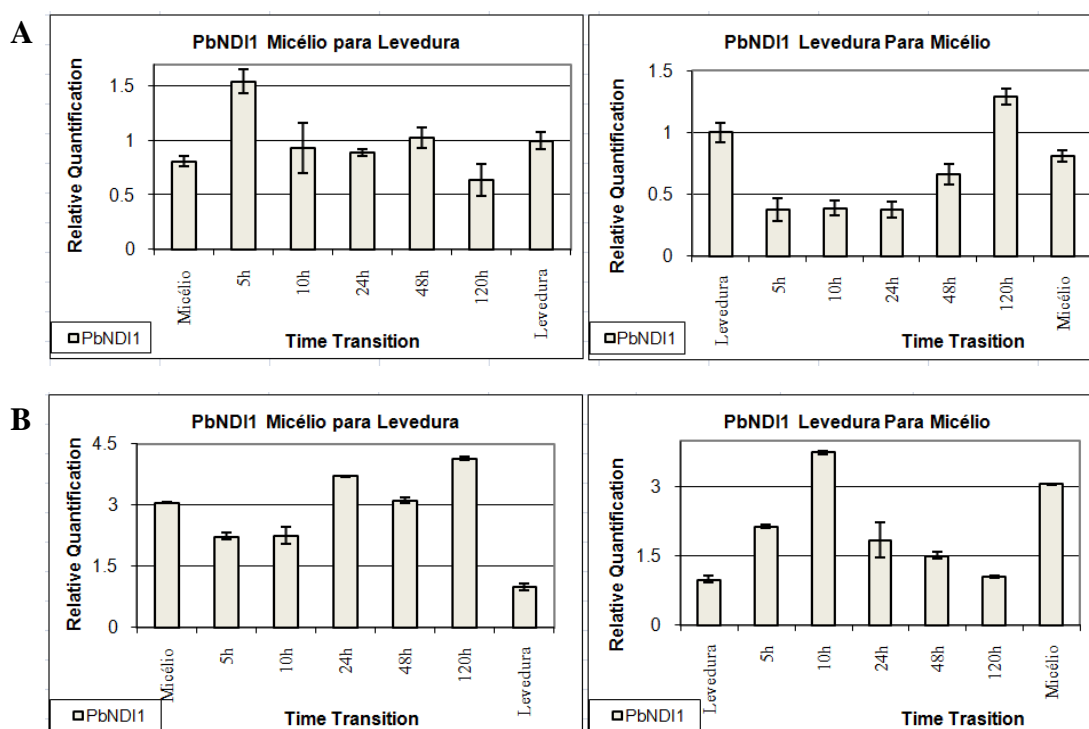


FIGURA 67: Expressão do gene *PbNDI1* durante a transição morfológica de *P. brasiliensis*, induzida pela mudança da temperatura. **A:** Com controle endógeno. **B:** Sem controle endógeno.

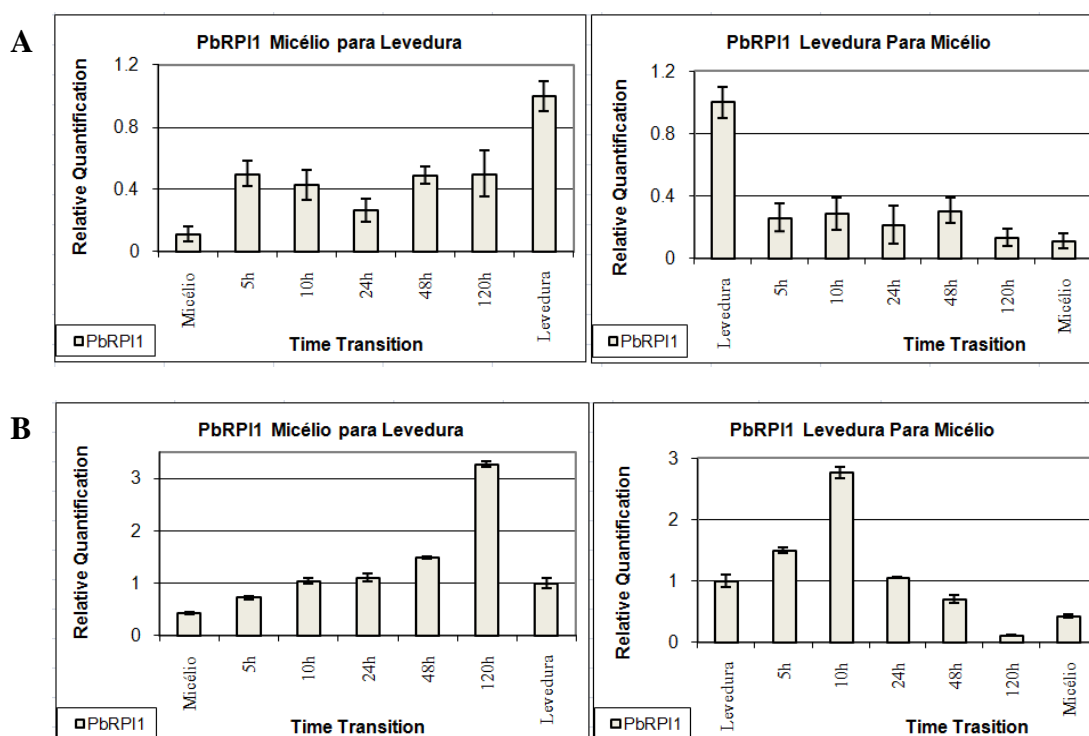
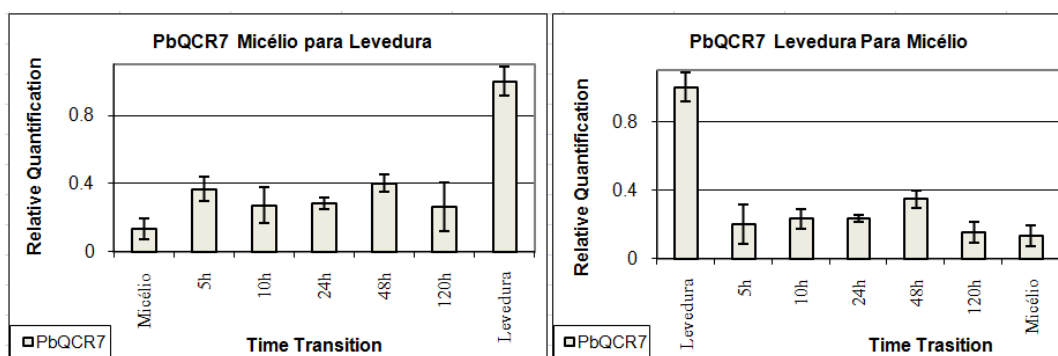


FIGURA 68: Expressão do gene *PbRIP1* durante a transição morfológica de *P. brasiliensis*, induzida pela mudança da temperatura. **A:** Com controle endógeno. **B:** Sem controle endógeno.

F

A



B

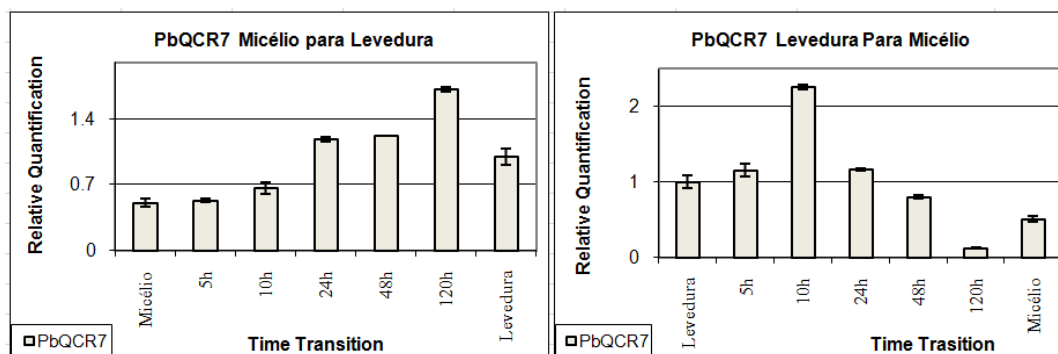
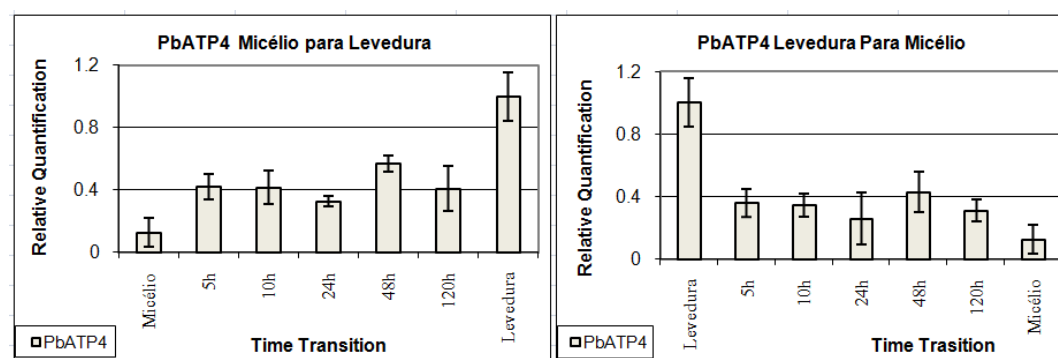


FIGURA 69: Expressão do gene *PbQCR7* durante a transição morfológica de *P. brasiliensis* induzida pela mudança da temperatura. A: Com controle endógeno. B: Sem controle endógeno.

A



B

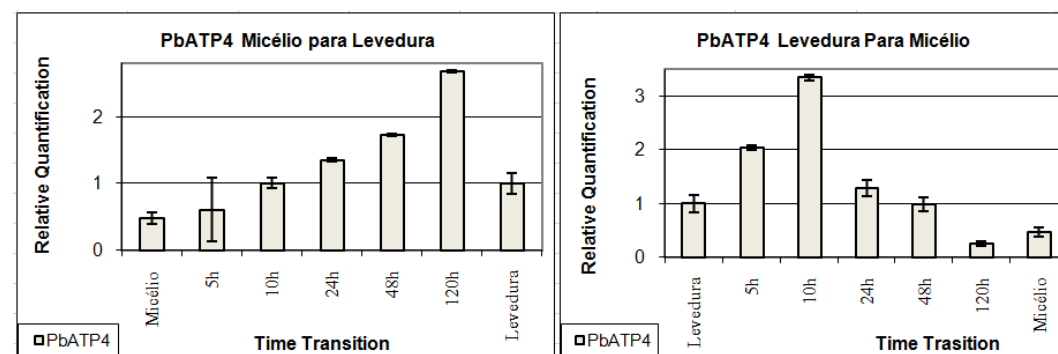
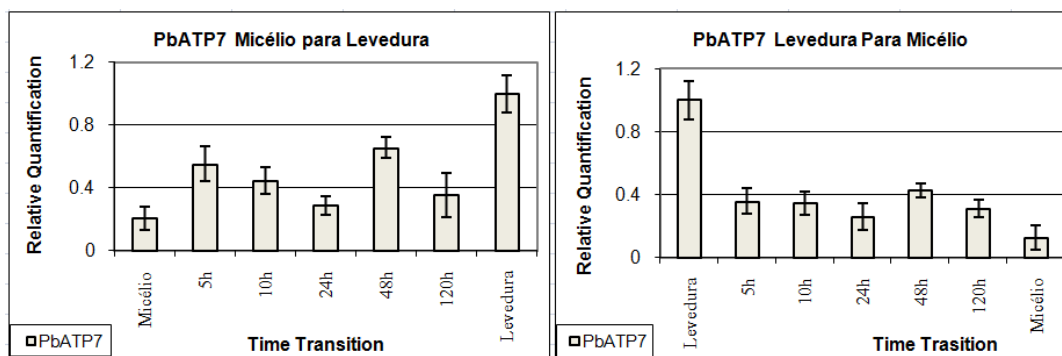


FIGURA 70: Expressão do gene *PbATP4* durante a transição morfológica de *P. brasiliensis* induzida pela mudança da temperatura. A: Com controle endógeno. B: Sem controle endógeno.

A



B

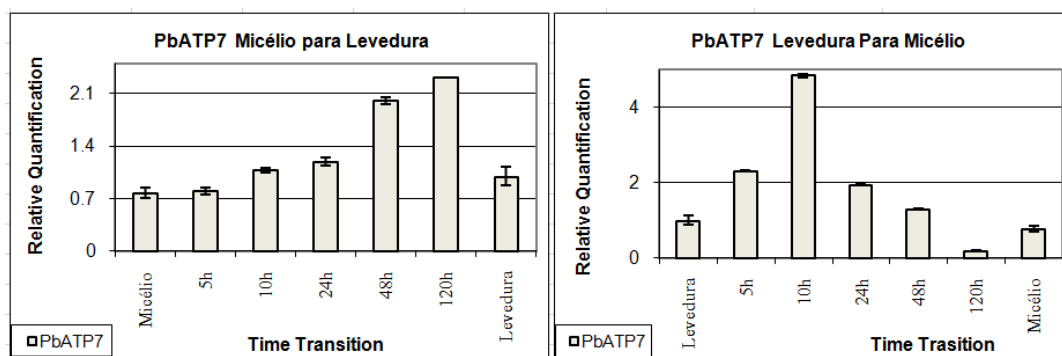


FIGURA 71: Expressão do gene *PbATP7* durante a transição morfológica de *P. brasiliensis* induzida pela mudança da temperatura. **A:** Com controle endógeno. **B:** Sem controle endógeno.

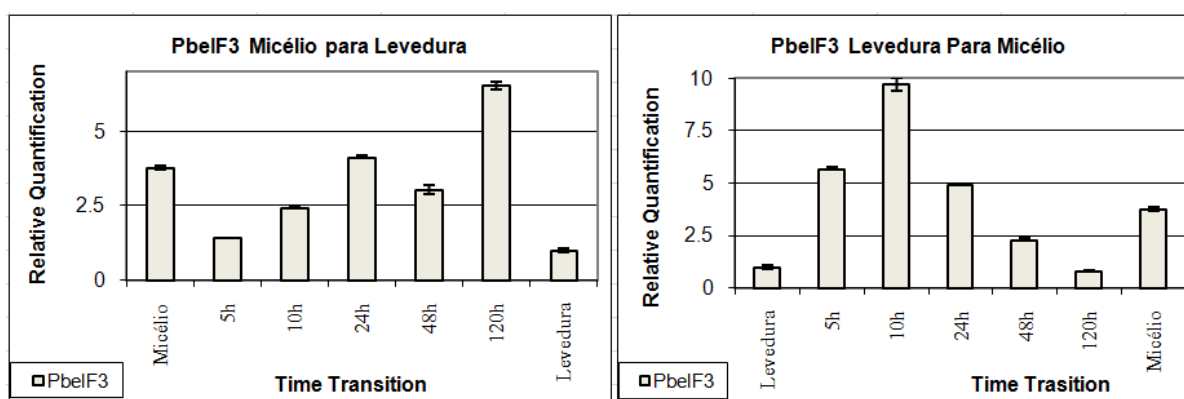


FIGURA 72: Expressão do gene *PbeIF3* durante a transição morfológica de *P. brasiliensis* induzida pela mudança da temperatura. **A:** Com controle endógeno. **B:** Sem controle endógeno.

4.5 Identificação de Siderófero em *Paracoccidioides brasiliensis*

O projeto de seqüenciamento genômico de *P.brasiliensis* foi iniciado em 2004 por Nobrega, M. e colaboradores no LGMG com a construção de várias bibliotécas de RSTs – “Random Sequence Tags” ou seqüência aleatória de fragmentos do genoma de *P. brasiliensis*. Para trabalhar com o genoma deste fungo foi necessário padronizar várias metodologias de extrações e purificação do DNA total, além da obtenção e purificação dos fragmentos genômicos, montagem das bibliotecas estocagem dos clones, padronização da reação de PCR de seqüenciamento de fragmentos longos bem como no seqüenciamento completo e análise *in silico* de clones contendo insertos grandes, ou seja, maiores que 5 kb.

Um clone denominado PbC08 foi inicialmente selecionado para o seqüenciamento completo devido aos resultados obtidos através da análise do padrão de bandejamento por digestão enzimática, que nos indicou a presença de um fragmento genômico maior de 5 kb. O seqüenciamento do inserto total deste clone foi realizado através da técnica de inserção de transposons e subclonagem. Como resultado obtivemos a seqüência de um fragmento genômico de aproximadamente 7.865bp. Uma análise de agrupamento de seqüências contra o banco de dados de seqüências de RSTs de *P. brasiliensis* resultou no agrupamento de mais 1856bp constituindo um fragmento genômico conhecido de 9721bp.

A análise *in silico*, por comparação de seqüências contra o banco de dados do GenBank/NCBI, utilizando a ferramenta BLASTx, indica a presença de pelo menos dois genes completos e parte de um terceiro. Um dos genes que estava aparentemente completo no fragmento apresentou similaridade com uma NRPS (Nonribosomal Peptide Synthetase) de *Aspergillus fumigatus* (GeneID: XP_751389.1). Esta observação foi um dos pontos iniciais de motivação que nos levou a investir na identificação e caracterização de sideróferos bem como a identificação de genes relacionados à biosíntese deste composto quelante de ferro em *P.brasiliensis*.

Para identificação de sideróferos em *P.brasiliensis* estamos utilizando o método universal para detecção de sideróferos descrito por Schwyn e Neilands em 1987. O método envolve a utilização de um corante Chrome Azurol S (CAS) complexado com hexadecyltrimethylammonium bromide (HDTMA) e ferro este complexo tem coloração azul. A remoção do ferro do complexo CAS-Fe/HDTMA por um siderófero torna o corante laranja. O corante quando incluído em um meio de cultura pode demonstrar a habilidade de um organismo de remover o ferro do complexo CAS-HDTMA e, portanto, de produzir siderófero através do cultivo direto. Para utilização deste método em *P. brasiliensis* foi

necessário fazermos a adaptação de um meio de crescimento específico para este organismo, como descrito em material e métodos.

Utilizando este método nos detectamos a produção de siderófero nos cinco isolados (Pb608, Pb18, Pb339, Pb1925 e PbAP) de *P. brasiliensis* testados. A detecção pode ser observada na figura 73. Uma breve comunicação sobre os resultados já obtidos foram apresentados no “**IX Encontro Internacional sobre Paracoccidioidomicose**” (**Fungal cell biology. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 2005, vol.47 suppl.14, p.43-47. ISSN 0036-4665**) realizado de 02 a 05 de outubro de 2005 em Águas de Lindóia São Paulo, Brazil.

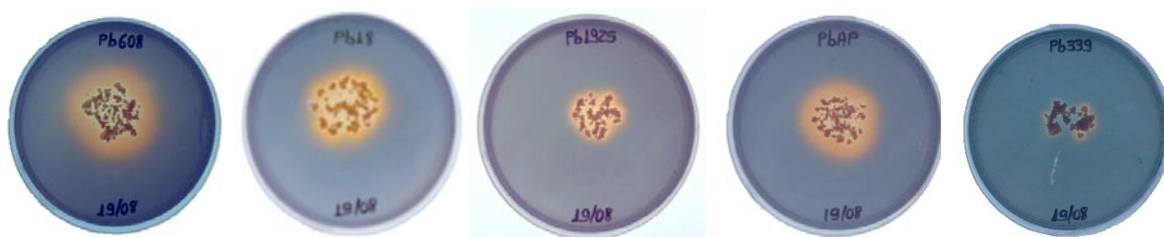


FIGURA 73: Detecção da produção de sideróferos em cinco isolados de *P. brasiliensis*. (Pb608, Pb18, Pb339, Pb1925 e PbAP). O halo alaranjado é decorrência da retirada do ferro complexado com CAS e HDTMA pelos sideróferos secretados.

Para a caracterização química do tipo (ou dos tipos) de siderófero secretado por *P. brasiliensis* foi necessário padronizar a identificação deste composto em meio líquido.

Foi utilizado um meio de cultura específico para *P. brasiliensis* mais as sugestões do método universal de Schwyn e Neilands (1987), que indica uma solução de detecção de sideróferos em meio líquido (tanto o meio específico quanto a solução de detecção estão descrito em “Material e Métodos”).

Após aproximadamente sete dias de crescimento neste meio contendo baixa concentração de ferro as células são recolhidas por centrifugação. O sobrenadante é filtrado e a detecção de sideróferos é feita através da mistura do sobrenadante de cultura com a solução de detecção (volume/volume). Novamente utilizando o mesmo princípio que no meio sólido, a solução de detecção tem coloração azul, devido ao complexo CAS-Fe/HDTMA e a remoção do ferro do complexo torna o corante laranja. O meio de crescimento controle foi utilizado e como esperado a mudança na coloração da solução só foi observada na mistura contendo o sobrenadante da cultura. O mesmo experimento foi realizado crescendo-se o fungo em meio contendo 0,5M FeCl₃ e neste meio em alta concentração de íons Fe a produção de sideróferos não é observada, fato que corrobora os nossos resultados obtidos pelo método universal de Schwyn e Neilands (1987) desde que a síntese de siderófero normalmente é inibida em altas concentrações do metal.

Embora já tenhamos obtido o sobrenadante concentrado com sideróferos de *P. brasiliensis* e também já termos as amostras parcialmente purificadas através de purificação em coluna AMBERLITE XAD16, a análise da estrutura química dos compostos presentes na solução ainda não foram realizadas, devido à falta de infraestrutura disponível para a realização das mesmas até o momento.

4.5.1 Identificação De Genes Associados À Biossíntese De Siderófero Em *Paracoccidioides brasiliensis*

Através de uma busca na literatura sobre as enzimas envolvidos na biossíntese sideróferos em fungos, constatou-se a importância da enzima L-ornithine N5-oxigenase, desde que a reação catalisada por ela (N5-hidroxilação da ornitina) é a primeira etapa da via metabólica de síntese de sideróferos em fungos.

Utilizando a sequência peptídica da proteína ornithine-N5-oxygenase (gi|67539306) de *Aspergillus nidulans* contra o banco de dados de ESTs e RSTs de *P. brasiliensis*, nos identificamos dois clones de ESTs (EST014201 e EST014545) e um clone de sequência genômica RST-VP1-Pb50004-009D06 de *P. brasiliensis* que apresentam um alto nível de similaridade com esta proteína de *A. nidulans*.

O inserto do clone RST-VP1-Pb50004-009D06 foi totalmente sequenciado utilizando-se a técnica de inserção de transposons. O fragmento de DNA genômico deste clone consiste de aproximadamente 3151 bp. Quando a sequência completa do inserto de 3151 bp contido no clone da RST-VP1-Pb50004-009D06 de *P. brasiliensis* é comparada contra o banco de dados do GenBank/NCBI, utilizando a ferramenta BLASTx, pode-se observar que este fragmento apresenta similaridade com a enzima L-ornithine-N5-oxygenase de vários fungos entretanto a região codificadora não está completa faltando aproximadamente trinta (30) resíduos de aminoácidos da região N-terminal e portanto o fragmento genômico analisado não contém a sequência codificadora completa para a L-ornithine-N5-oxygenase .

Nesta análise também podemos observar a presença de possíveis sequências intrônicas dentro da região correspondendo a região de similaridade com as homólogas (L-ornithine-N5-oxygenase). Através da comparação da sequência do fragmento genômico com a sequência da EST014545, identificou-se uma sequência com características do primeiro intron que inicia no nucleotídeo da posição 757 e termina no nucleotídeo 864, deduzindo um provável intron de 107 bp. E outro possível intron que se inicia no nucleotídeo 1364 e termina em 1445, constituindo um intron de 81bp que foi identificado através de análise variadas da sequência.

Retirando-se manualmente as duas regiões características de introns do fragmento obtêm-se uma fase aberta de leitura com 489 resíduos de aminoácidos. A análise por BLASTp/NCBI confirma a identidade com a proteína L-ornithine-N5-oxygenase e mostra que esta homóloga de L-ornithine-N5-oxygenase de *P. brasiliensis* apresenta o domínio conservado IucD (Lysine/ornithine N-monooxygenase) característico de enzimas envolvidas na biosíntese de metabólitos secundário, incluindo os sideróferos (Fig. 74).

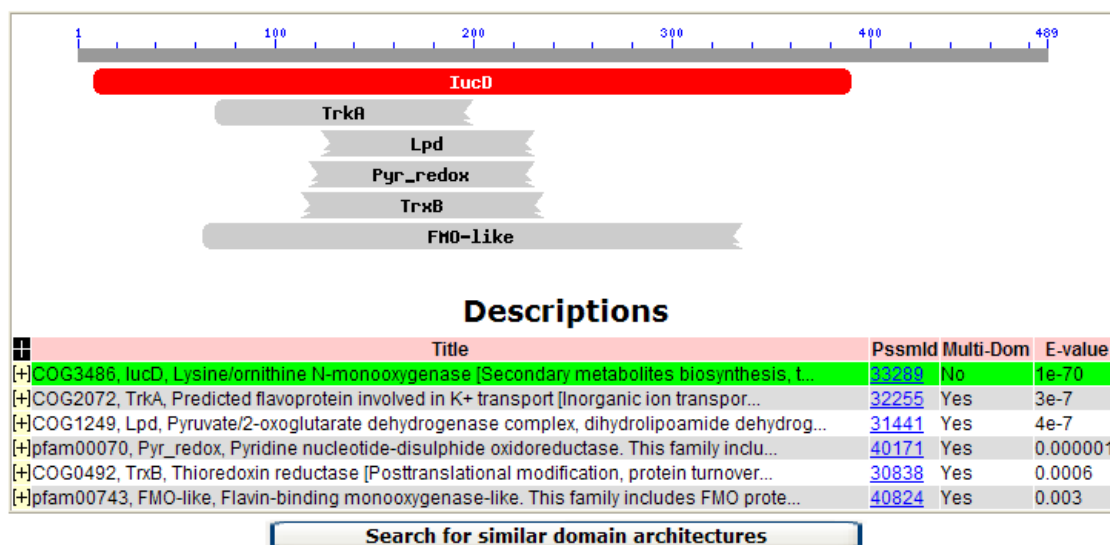


FIGURA 74: Alinhamento por BLASTp da proteína L-ornithine-N5-oxygenase de *P. brasiliensis*, identificada na ORF referente à RST-VP1-Pb50004-009D06. A figura mostra a presença do domínio conservado IucD (Lysine/ornithine N-monooxygenase) característico de enzimas envolvidas na biosíntese de metabólitos secundário, como no caso dos sideróferos.

As sequências dos dois clones de ESTs (EST014201 e EST014545) não foram analisadas entretanto, presença dos mesmos nos bancos de dados de *P. brasiliensis*, indica que esta proteína realmente é expressa neste fungo e que, portanto, identificando um dos genes envolvidos na biosíntese de sideróforos em *P. brasiliensis*.

Além da sequência codificadora para a L-ornithine-N5-oxygenase, também pode ser observado a presença de outra sequência codificadora no fragmento genômico do clone referente a RST-VP1-Pb50004-009D06. Esta segunda sequência codificadora possui similaridade com a enzima Peroxisomal Dehydratase de vários fungos inclusive de *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus nidulans*. Esta enzima contém os domínios conservados HDE_HSD – (“R-hydratase-like hot dog fold of the 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD), and Hydratase-Dehydrogenase-Epimerase (HDE) proteins; cd03448”). Como os genes que controlam o metabolismo secundário em fungos normalmente estão organizados em conjuntos (“clusters”), as expectativas sugerem que esta segunda enzima também possa estar envolvida na via de biosíntese de sideróforos.

A partir da disponibilização da sequência completa dos genomas dos três isolados de *P. brasiliensis* foi possível chegar à região codificadora completa do gene da L-ornithine-N5-oxygenase e, além disso, confirmar a presença da região codificadora do gene da enzima peroxisomal dehydratase bem como identificar a região codificadora do gene homólogo ao gene mirA, que codifica para um transportador de sideróforos. A confirmação da presença destes genes envolvidos com a via de biosíntese de sideróforos nesta região genômica de *P. brasiliensis* fortemente sugerem que realmente esta região representa um cluster de via biosintética de sideróforos neste fungo.

5 DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivos a identificação e caracterização funcional de genes de *P. brasiliensis* homólogos aos de levedura *Saccharomyces cerevisiae* envolvidos na biogênese do complexo da citocromo c oxidase mitocondrial, por meio da complementação funcional em mutantes de *S. cerevisiae*. Estudar a estrutura genômica destes genes observando a existência e localização de introns e, analisar a expressão dos mesmos nas fases micelial, leveduriforme e durante a o processo de transição morfológica induzida por temperatura. Além disso, verificar se para este fungo a clonagem direta (a partir de seqüência genômica) permite a expressão funcional na levedura *S. cerevisiae*.

Neste trabalho estudamos 15 novos genes de *P. brasiliensis* envolvidos na biogênese da haloenzima COX totalizando dezenove genes identificados deste complexo em *P. brasiliensis*. A seqüências obtidas foram depositados no banco de dados do GenBank/NCBI. Como para o fungo *P. brasiliensis* ainda não existe técnica de deleção de genes e nem de transformação padronizados, os genes foram estudados quanto à capacidade de restaurar a atividade da citocromo c oxidase por meio da complementação funcional em mutantes de *S. cerevisiae*. A primeira iniciativa de utilização desse procedimento para o estudo funcional de genes de *P. brasiliensis* foi com o estudo do gene da ornitina descarboxilase (ODC) que complementou com sucesso os transformantes do mutante nulo *odc* de *S. cerevisiae* com o gene *PbODC* de *P. brasiliensis* (Niño-Vega et al., 2004). Atualmente já existe publicação de vários outros genes estudados com esta técnica, como o gene *PbURA3* (Reinoso et al., 2005) e inclusive o gene *PbCOX9* que complementou a capacidade respiratória da linhagem mutante *cox9* de levedura de *S. cerevisiae* (Bandeira e Nobrega, 2008).

Dos 15 novos genes estudados de *P. brasiliensis* tivemos sucesso na complementação funcional apenas com os genes *PbCOX6*, *PbCOX17*, *PbCOX19* e *PbOXA1*. O gene *PbCOX6* é uma subunidade estrutural da COX enquanto que os genes *PbCOX17*, *PbCOX19* estão envolvidos no transporte de íons Cu para os centros ativos CuA e CuB deste complexo. O gene *PbOXA1* codifica para uma insertase que está envolvida na inserção da subunidade *Cox2p* durante a montagem da holoenzima (He e Fox, 1997; Hell et al., 1997).

O gene *PbOXA1* de *P. brasiliensis* foi capaz de substituir a função de seu homólogo em linhagem mutante da levedura *S. cerevisiae* entretanto quando testamos o recombinante construído com o incerto genômico, contendo dois íntrons, a complementação funcional não ocorreu, provavelmente porquê a maquinaria de “splicing” da levedura não reconheceu os íntrons de *P. brasiliensis*. Este resultado nos leva a concluir que a clonagem direta do genoma

de *P. brasiliensis* não permite a expressão funcional na levedura *S. cerevisiae*, como é possível com o genoma do fungo *C. albicans* (Ueda et al., 1997).

Através do alinhamento entre proteínas homólogas de vários organismos para um determinado gene, pode-se observar além das regiões conservadas, ausência ou inserção de pequenos trechos da proteína, ou ainda acréscimo de seqüência nas porções N-terminal e/ou C-terminal provavelmente interferindo na estrutura tridimensional da proteína impedindo a perfeita interação com suas parceiras. Esta hipótese poderia ser utilizada para argumentar porque não obtivemos sucesso na complementação funcional com vários genes estudados. Entretanto, ainda não fomos capazes de estabelecer nenhum padrão, que poderiam explicar ou prever, através da análise de seqüências, determinado resultado, uma vez que obtivemos complementações funcionais com proteínas apresentando relativamente baixo grau de similaridade de seqüência como no caso do gene *PbOX1*.

Quanto às análises da expressão relativa dos genes estudados (*PbCOX2*, *PbCOX4*, *PbCOX5A*, *PbCOX6*, *PbCOX8*, *PbCOX9*, *PbCOX11*, *PbCOX12*, *PbCOX15*, *PbCOX16*, *PbCOX17*, *PbCOX19*, *PbCOX23*, *PbPET100*, *PbPET112*, *PbOX1*, *PbMSS51* e *PbSCO1*, *PbND11*, *PbQCR7*, *PbRIP1*, *PbATP4* e *PbATP7*), durante a transição dimórfica de *P. brasiliensis* tanto de micélio para levedura (M-Y) quanto de levedura para micélio (Y-M), os resultados indicam que estes genes são modulados e que existe expressão ativa das subunidades do complexo da citocromo c oxidase, indicando atividade mitocondrial e respiração durante o processo de transição dimórfica.

Embora exista pequenas diferenças no perfil de expressão entre os vários genes estudados, pode-se observar um padrão bem definido de aumento da expressão deste genes durante todo o período da transição de micélio para levedura. Já na transição de levedura para micélio observamos nas primeiras 10 horas um perfil mais ou menos constante de aumento da expressão seguido de declínio até o término (120h) da transição.

O aumento da expressão dos genes que participam da biosíntese dos complexos respiratórios é consistente com a maior demanda de energia necessária para que o processo de transição dimórfica ocorra. Enquanto que o declínio da expressão na transição de levedura para micélio após as 10 horas iniciais é consistente com menor atividade de respiração aeróbica observada no fungo na forma de micélio.

A ocorrência de atividade respiratória do fungo *P. brasiliensis* durante o processo de transição é corroborado pelos relatos de Campos et al., 2008, que demonstra a ocorrência de respiração mitocondrial acoplada à fosforilação oxidativa durante o processo de transição do fungo da fase micelial para a forma patogênica de levedura e de Martins et al. (2008) de que

inibidores da cadeia transportadora de elétrons retardaram a transição de micélio para levedura em culturas de *P. brasiliensis*.

Considerando os dados de expressão comparativa das subunidades da citocromo c oxidase mitocondrial de *P. brasiliensis*, o presente resultado sugere que o metabolismo do fungo na fase de levedura pode ser mais aeróbico do que na fase filamentosa. Entretanto, Felipe *et al.*, 2005 através de uma análise do padrão de expressão de genes centrais de metabolismo do fungo tal como os genes das enzimas isocitrato desidrogenase e succinil-CoA sintetase, relacionadas ao ciclo do citrato, sugere um metabolismo mais aeróbico para a forma micelial de *P. brasiliensis* e pelo menos um potencial mais fermentativo na forma de levedura entretanto as observações dos autores se restringiu às formas de micélio e de levedura, não sendo observadas durante o período de transição. Além disso, as análises foram realizadas com um isolado diferente (Pb01) crescendo também em meio diferente do que o utilizado em nossos estudos com o isolado Pb18. Em estudos mais recentes Costa *et al.*, 2007, mostrou através de análise de RT-PCR semi-quantitativo, que apesar de existir maior expressão de genes relacionados ao metabolismo fermentativo na forma de levedura, também pode se observar uma super expressão da subunidade FOF1 da ATP-sintetase nesta forma do fungo.

A interpretação de Felipe e colaboradores também é compartilhada da pelos dados de PCR quantitativo em tempo real da expressão do gene que codifica para a enzima (ADH1) álcool desidrogenase I (Nunes *et al.*, 2005) que está mais expressa na fase de levedura. Em uma tentativa de esclarecer melhor estas observações, também acessamos a expressão do gene da álcool desidrogenase I durante a transição dimórfica de *P. brasiliensis* e, os resultados obtidos confirmam que o gene que codifica esta enzima é super expresso na forma de levedura (dados não mostrados). Entretanto, a expressão do gene da álcool desidrogenase I também foi acessada durante a transição de levedura para micélio sendo também detectado considerável expressão deste gene na forma de micélio embora em menor proporção. A disparidade entre os resultados obtidos em relação aos dados de Medoff *et al.*, 1997, também podem ser justificados considerando-se que os experimento de Medoff foram realizados utilizando-se um isolado (Pb60) bem como meios de crescimento diferente do que estamos estudando. A linhagem com a qual este estudo foi realizado, Pb18, é capaz de atingir a completa transição dimórfica no período de aproximadamente cinco (05) dias enquanto que o Pb60, utilizado por Medoff completa a transição em 21 dias. Além disso, como também já observado e relatado por Campos *et al.*, 2008, diferentemente dos experimentos realizados neste trabalho, Medoff e colaboradores realizaram seus experimentos em presença de um inibidor (SHAM) de oxidase alternativa (AOX), uma oxidase terminal relatada somente em

plantas e fungos que também reduz O_2 em H_2O , que como consequência reduz o potencial de membrana reduzindo também a fosforilação oxidativa. Portanto, apesar da inibição da AOX por Medoff, de certa forma devesse prevenir a inibição da fosforilação oxidativa está não é a real situação do fungo quando em presença do estresse de temperatura, seja durante a invasão do hospedeiro ou em caso de aumento de temperatura do meio de cultura e, portanto, a inibição da AOX pode ser considerada inapropriada para os estudos em questão. Estas observações, portanto, podem ser consideradas quando comparamos os resultados de Medoff et al., 1997 com os obtidos neste estudo. Muito embora, possamos justificar e preciso notar que em nossos estudos estamos inferindo resultados a partir da análise de quantitativa de mRNAs que nem sempre se reflete em efetiva tradução dessa moléculas, além da respiração também pode ser modulada em eventos pós-traducionais.

Ainda pode ser considerado que o aumento da expressão seja causado meramente pela mudança da temperatura em período de adaptação à nova condição ambiental. Dados não mostrados indicam que mesmo quando a transição dimórfica é inibida, verifica-se aumento da expressão dos genes respiratórios quando a temperatura é aumentada de 25 para 37 °C em níveis relativamente comparáveis aos observados durante a transição.

Considerando todos os relatos sobre os resultados obtidos com estudo de respiração do fungo *P. brasiliensis*, podemos inferir que este fungo utiliza-se tanto de respiração aeróbica como anaeróbica em ambas as formas morfológicas, muito embora, parece haver predominância de respiração aeróbica na forma patogênica de levedura.

Neste trabalho foi analisado estrutura genômicas dos dezenove (19) genes de *P. brasiliensis*. Os genes *PbCOX11*, *PbPET191*, *PbSCO1*, *PbMSS51* e *PbOXA1* foram seqüenciados a partir de bibliotecas construídas durante o trabalho ou a partir de amplificação por reação de PCR direta do genoma. O restante dos genes foram estudados a partir da seqüência genômica dos isolados Pb01, Pb03 e Pb18, disponibilizados publicamente pelo Fungal Genome Initiative – FGI.

A quantidade de introns nos genes estudados varia de um (01) a sete (07), sendo mais frequente a média de dois (02) a três (03) introns em cada genes. Todos os introns identificados nos genes de *P. brasiliensis* apresentam os domínios característicos de borda intrônica (Reinoso et al., 2005). Em muito dos genes observa-se variações do número de introns nos diferentes isolados indicando a possibilidade de splicing alternativo.

Para o isolado Pb18 foi possível identificar, com exceção do *PbCOX5A*, o cromossomo de origem de cada gene. A maior parte dos genes estudados estão localizados no cromossomo 01 (*PbCOX6*, *PbCOX13*, *PbCOX16*, *PbCOX17*, *PbPET191*, *PbOXA1* e

PbSCO1), no cromossomo 02 identificamos somente os genes *PbCOX8* e *PbPET100*. O gene *PbCOX19* está isolado no cromossomo 03. No cromossomo 04 identificamos os genes *PbCOX4*, *PbCOX15*, *PbCOX23* e o *PbMSS51* e finalmente no cromossomo 05 encontra-se os genes *PbCOX9*, *PbCOX11* e *PbCOX12*. Embora haja uma concentração de genes no cromossomo 01, não há evidências de formação de “clusters” contendo os genes do complexo da COX.

Apesar de termos interrompido o sequenciamento depois da liberação dos bancos de dados da FGI, identificamos todos os clones selecionados na biblioteca genômica construídas em fosmídeo através dos experimentos de hibridização com as super-membranas. Estes clones estão disponíveis para qualquer estudo específico que se venha fazer destes genes.

Foi recentemente mostrado que os mutantes *cox11* (Banting e Glerum, 2006; Khalimonchuc et al., 2007) e *sco1* (Williams et al., 2005) de *S. cerevisiae* são hipersensíveis ao peróxido de hidrogênio. Sendo estas proteínas ligantes de íons Cu esta sensibilidade ou função estaria restrita a esta classe de proteínas, desde que outras linhagens mutantes de outros genes envolvidos na biosíntese da COX não apresentaram esta característica (Banting e Glerum, 2006). Os autores sugeriram que a perda da atividade do complexo não constitui em pré-requisito para a sensibilidade ao H₂O₂. Explorando esta informação verificamos neste trabalho que os mutantes Δ *cox17*, Δ *cox19* e Δ *cox23* de *S. cerevisiae* também apresentam sensibilidades ao peróxido de hidrogênio em diferentes concentrações fortalecendo a relação da resistência ao peróxido de hidrogênio à família das proteínas ligantes de cobre (Banting e Glerum, 2006; Williams et al., 2005). Estudos anteriores (Banting e Glerum, 2006) mostravam que o mutante Δ *cox17* não apresenta sensibilidade à concentração de 6 mM de H₂O₂ entretanto em nossos trabalhos quando submetemos o mutante *cox17* ao estresse de altas concentrações (8 mM e 10 mM) de peróxido observamos melhor a expressão desta sensibilidade.

Portanto quanto a esta função temos quatro genes de *P. brasiliensis* (*PbCOX11*, *PbCOX17*, *PbCOX19* e *PbSCO1*) que são capazes de restabelecer a função de seus homólogos nas linhagens mutantes de *S. cerevisiae*. Lembrando que somente com *PbCOX17*, *PbCOX19* obtivemos sucesso quanto a complementação funcional da capacidade respiratória dos mutantes de *S. cerevisiae*.

A parcial funcionalidade do gene *COX11* de *S. cerevisiae* já foi demonstrado ser suficiente para promover a resistência ao peróxido de hidrogênio (Banting e Glerum, 2006) e isto pode explicar o fato de que os genes de *P. brasiliensis*, *PbCOX11* e *PbSCO1* embora não sejam funcionalmente equivalentes na função respiratória aos homólogos de *S. cerevisiae*

sejam equivalentes na função de resistência ao peróxido de hidrogênio. A equivalência em uma das duas possíveis funções destas proteínas de *P. brasiliensis* aos homólogos de *S. cerevisiae* pode, neste caso, validar a caracterização funcional destes dois novos genes de *P. brasiliensis*.

Dos dezenove genes do complexo da COX de *P. brasiliensis* estudados, quatorze não são funcionalmente equivalentes na função respiratória muito embora conservem alto grau de similaridades na seqüência primária. Portanto, supõe-se que a não equivalência se deva aos arranjos de estrutura terciária dessas proteínas maturadas.

O trabalho aqui exposto apresenta um avanço qualitativo e quantitativo de informações até então desconhecidas sobre a via metabólica de síntese da haloenzima citocromo c oxidase mitocondrial no fungo patogênico *P. brasiliensis*. O entendimento da atividade deste complexo durante a transição do fungo para a forma patogênica é de grande importância visto que todos os genes analisados têm sua expressão modulada neste processo. Um estudo mais aprofundado, principalmente das subunidades do complexo da COX de *P. brasiliensis* que não são capazes de substituir a função de suas homólogas nos mutantes de *S. cerevisiae*, pode ser uma fonte de descoberta de novos alvos terapêuticos, visto que a função de respiração é vital para todos os eucariotos, inclusive para o fungo e encontrar diferenças significativas entre genes respiratórios de *P. brasiliensis* e principalmente dos genes humano, é evidentemente importante.

Acrescentamos dados importantes (“clusters”) sobre genes envolvidos em vias metabólicas secundárias (biosíntese de sideróferos). Outro aspecto importante é a nossa abordagem sobre estes quelantes de íons Fe^{3+} (sideróferos) nestas células demonstrando por ensaios bioquímicos a secreção de sideróferos por este fungo. Destacamos o fato de que estas moléculas são conhecidas na literatura como moléculas que atuam como fatores de virulência em fungos patogênicos. Assim iniciamos também os estudos em *P. brasiliensis* nesta importante área de moléculas consideradas como uma alternativa de alvo quimioterápico.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho estudamos 15 novos genes de *P. brasiliensis* envolvidos na biogênese da haloenzima citocromo c oxidase mitocondrial, totalizando 19 genes (*PbCOX4*, *PbCOX5A*, *PbCOX6*, *PbCOX8*, *PbCOX9*, *PbCOX11*, *PbCOX12*, *PbCOX13*, *PbCOX15*, *PbCOX16*, *PbCOX17*, *PbCOX19*, *PbCOX23*, *PbMSS51*, *PbPET100*, *PbPET112*, *PbOXA1*, *PbSCO1*) identificados deste complexo em *P. brasiliensis*. As seqüências obtidas foram depositados no banco de dados do GenBank/NCBI.

Trabalhamos também na identificação de genes envolvidos na biosíntese de sideróferos, bem como na verificação da ocorrência de secreção destes compostos em cultura de *P. brasiliensis*.

Dos novos genes estudados tivemos sucesso na complementação funcional heteróloga em mutantes de *S. cerevisiae* com os genes *PbCOX6*, *PbCOX17*, *PbCOX19* e *PbOXA1*.

O gene *PbOXA1* também foi testado quanto à capacidade de complementação a partir da seqüência do fragmento genômico. Neste ensaio não obtivemos sucesso na complementação indicando que a complementação direta de genes entre estes dois fungos não ocorre.

Neste trabalho foi analisada a estrutura genômica dos dezenove (19) genes de *P. brasiliensis*. Os genes *PbCOX11*, *PbPET191*, *PbSCO1*, *PbMSS51* e *PbOXA1* foram seqüenciados a partir de bibliotecas construídas durante o trabalho ou a partir de amplificação por reação de PCR direta do genoma. O restante dos genes foi estudado a partir da seqüência genômica dos isolados Pb01, Pb03 e Pb18, disponibilizados publicamente pelo Fungal Genome Initiative – FGI. Todos os genes são analisados apresentam íntrons, como discutidos anteriormente e há evidências de ocorrência de splicing alternativo em alguns destes genes.

A análise da expressão relativa dos genes de *P. brasiliensis* através de reação de PCR em tempo real indicou que estes genes são modulados durante a transição dimórfica de *P. brasiliensis* tanto de micélio para levedura (M-Y) quanto de levedura para micélio (Y-M) e que existe expressão ativa das subunidades do complexo da citocromo c oxidase, indicando atividade respiratória durante o processo de transição dimórfica.

Verificamos neste trabalho que além dos mutantes *cox11* (Banting e Glerum, 2006; Khalimonchuc et al., 2007) e *sco1* (Williams et al., 2005), os mutantes nulos Δ *cox17*, Δ *cox19* e Δ *cox23* de *S. cerevisiae* também apresentam sensibilidade ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em altas concentrações fortalecendo a relação da resistência ao peróxido de hidrogênio à família das proteínas ligantes de cobre (Banting e Glerum, 2006). Quatro genes de *P.*

brasiliensis (*PbCOX11*, *PbCOX17*, *PbCOX19* e *PbSCO1*) são capazes de substituir a função de seus homólogos em linhagens mutantes de *S. cerevisiae* restabelecendo a resistência ao peróxido. Lembrando que destes, obtivemos sucesso quanto a complementação funcional da capacidade respiratória somente com os genes *PbCOX17* e *PbCOX19*.

REFERÊNCIAS*

Aggeler R, Capaldi RA. Yeast cytochrome c oxidase subunit VII is essential for assembly of an active enzyme. Cloning, sequencing, and characterization of the nuclear-encoded gene. *J Biol Chem.* 1990; 265:16389-93.

Altamura N, Capitanio N, Bonnefoy N, Papa S, Dujardin G. The *Saccharomyces cerevisiae* *OXA1* gene is required for the correct assembly of cytochrome c oxidase and oligomycin-sensitive ATP synthase. *FEBS Lett.* 1996; 382(1-2):111-5.

Amaravadi R, Glerum DM, Tzagoloff A. Isolation of a cDNA encoding the human homolog of *COX17*, a yeast gene essential for mitochondrial copper recruitment. *Hum Genet.* 1997; 99(3):329-33.

Antonicka H, Mattman A, Carlson CG, Glerum DM, Hoffbuhr KC, Leary SC, Kennaway NG, Shoubridge EA. Mutations in *COX15* produce a defect in the mitochondrial heme biosynthetic pathway, causing early-onset fatal hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Hum Genet.* 2003; 72(1):101-14.

Arnesano F, Balatri E, Banci L, Bertini I, Winge DR. Folding studies of Cox17 reveal an important interplay of cysteine oxidation and copper binding. *Structure.* 2005; 13(5):713-22.

Attallah CV, Welchen E, Pujol C, Bonnard G, Gonzalez DH. Characterization of Arabidopsis thaliana genes encoding functional homologues of the yeast metal chaperone *Cox19p*, involved in cytochrome c oxidase biogenesis. *Plant Mol Biol.* 2007; 65(3):343-55.

Ausubel F, Brent R, Kingston ER, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Stuhlfeld K. *Short Protocols in Molecular Biology*. Madison: John Wiley, 1995.

Balandin T, Castresana C. *AtCOX17*, an Arabidopsis homolog of the yeast copper chaperone *COX17*. *Plant Physiol.* 2002; 129(4):1852-7.

Bandeira SCB, Nóbrega MP. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* *COX9*, *COX12*, and *COX16* respiratory genes. *Mycol Res.* 2008; 112:1414-20.

Banting GS, Glerum DM. Mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome c oxidase assembly protein Cox11p. *Eukaryot Cell.* 2006; 5(3):568-78.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Barrientos A, Barros MH, Valnot I, Rotig A, Rustin P, Tzagoloff A. Cytochrome oxidase in health and disease. *Gene*. 2002; 286(1):53-63.

Barrientos A, Zambrano A, Tzagoloff A. *Mss51p* and *Cox14p* jointly regulate mitochondrial *Cox1p* expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*. 2004; 23(17):3472-82.

Barrientos A, Korr D, Tzagoloff A. *Shy1p* is necessary for full expression of mitochondrial *COX1* in the yeast model of Leigh's syndrome. *EMBO J*. 2002; 21(1-2):43-52.

Barros MH, Carlson CG, Glerum DM, Tzagoloff A. Involvement of mitochondrial ferredoxin and *Cox15p* in hydroxylation of heme O. *FEBS Lett*. 2001; 492(1-2):133-8.

Barros MH, Nobrega FG, Tzagoloff A. Mitochondrial ferredoxin is required for heme A synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 2002; 277(12):9997-10002.

Barros MH, Johnson A, Tzagoloff A. *COX23*, a homologue of *COX17*, is required for cytochrome oxidase assembly. *J Biol Chem*. 2004; 279(30):31943-7.

Barros MH, Myers AM, Van Driesche S, Tzagoloff A. *COX24* codes for a mitochondrial protein required for processing of the *COX1* transcript. *J Biol Chem*. 2006; 281(6):3743-51.

Bauer M, Behrens M, Esser K, Michaelis G, Pratje E. *PET1402*, a nuclear gene required for proteolytic processing of cytochrome oxidase subunit 2 in yeast. *Mol Gen Genet*. 1994; 245(3):272-8.

Beauvoit B, Bunoust O, Guerin B; Rigoulet M. ATP-regulation of cytochrome oxidase in yeast mitochondria: role of subunit VIa. *Eur J Biochem*. 1999; 263(1):118-27.

Beers J, Glerum DM, Tzagoloff A. Purification, characterization, and localization of yeast *Cox17p*, a mitochondrial copper shuttle. *J Biol Chem*. 1997; 272(52):33191-6.

Beers J, Glerum DM, Tzagoloff A. Purification and characterization of yeast *Sco1p*, a mitochondrial copper protein. *J Biol Chem*. 2002; 277(25):22185-90.

Bonnefoy N, Chalvet F, Hamel P, Slonimski PP, Dujardin G. *OXA1*, a *Saccharomyces cerevisiae* nuclear gene whose sequence is conserved from prokaryotes to eukaryotes controls cytochrome oxidase biogenesis. *J Mol Biol*. 1994a; 239(2):201-12.

Bonnefoy N, Kermorgant M, Groudinsky O, Minet M, Slonimski PP, Dujardin G. Cloning of a human gene involved in cytochrome oxidase assembly by functional complementation of an *oxa1*- mutation in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci USA. 1994b; 91(25):11978-82.

Borges-Walmsley MI, Chen D, Shu X, Walmsley AR. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. Trends Microbiol. 2002; 10:80-7.

Brendel M, Henriques JA. The *pso* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* comprise two groups: one deficient in DNA repair and another with altered mutagen metabolism. Mutat Res. 2001; 489:79-96.

Broadley SA, Demlow CM, Fox TD. Peripheral mitochondrial inner membrane protein, *Mss2p*, required for export of the mitochondrially coded Cox2p C tail in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol. 2001; 22:7663-72.

Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. Clin Microbiol Rev. 1993; 6(2):89-117. Review.

Bryan AC, Rodeheffer MS, Wearn CM, Shadel GS. Sls1p is a membrane-bound regulator of transcription-coupled processes involved in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial gene expression. Genetics. 2002; 60(1):75-82.

Buchwald P, Krummeck G, Rodel G. Immunological identification of yeast SCO1 protein as a component of the inner mitochondrial membrane. Mol Gen Genet. 1991; 229(3):413-20.

Campos CB, Di Benedette JP, Morais FV, Ovalle R, Nobrega MP. Evidence for the role of calcineurin in morphogenesis and calcium homeostasis during mycelium-to-yeast dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. Eukaryot Cell. 2008; 7(10):1856-64.

Cano MI, Cisalpino PS, Galindo I, Ramirez JL, Mortara RA, Da Silveira JF. Electrophoretic Karyotypes and genome sizing of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. J Clin Microbiol. 1998; 36(3):742-7.

Cardoso MA, Tambor JH, Nobrega FG. The mitochondrial genome from the thermal dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Yeast. 2007; 24(7):607-16.

Carlson CG, Barrientos A, Tzagoloff A, Glerum DM. *COX16* encodes a novel protein required for the assembly of cytochrome oxidase in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem. 2003; 278(6):3770-5.

Carr HS, Carr HS, George GN, Winge DR. Yeast *Cox11*, a protein essential for cytochrome c oxidase assembly, is a Cu(I)-binding protein. *J Biol Chem*. 2002; 277(34):31237-42.

Carr HS, Maxfield AB, Horng YC, Winge DR. Functional Analysis of the Domains in *Cox11*. *J Biol Chem*. 2005; 280:22664-9.

Celebi N, Yi L, Facey SJ, Kuhn A, Dalbey RE. Membrane biogenesis of subunit II of cytochrome bo oxidase: contrasting requirements for insertion of N-terminal and C-terminal domains. *J Mol Biol*. 2006; 357(5):1428-36.

Cisalpino OS, Puccia R, Yamauchi LM, Cano MIN, Silveira JF, Travassos LR. Cloning, characterization, and epitope expression of the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Biol Chem*. 1996; 271:4553-60.

Church C, Chapon C, Poyton RO. Cloning and characterization of *PET100*, a gene required for the assembly of yeast cytochrome c oxidase. *J Biol Chem*. 1996; 271(31):18499-507.

Church C, Goehring B, Forsha D, Wazny P, Poyton RO. A role for *Pet100p* in the assembly of yeast cytochrome c oxidase: interaction with a subassembly that accumulates in a *pet100* mutant. *J Biol Chem*. 2005; 280(3):1854-63.

Coyne HJ 3rd, Ciofi-Baffoni S, Banci L, Bertini I, Zhang L, George GN, Winge DR. The characterization and role of zinc binding in yeast *Cox4*. *J Biol Chem*. 2007; 282(12):8926-34.

Colby G, Wu M, Tzagoloff A. MTO1 codes for a mitochondrial protein required for respiration in paromomycin-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 1998; 273(43):27945-52.

Conrad-Webb H, Perlman PS, Zhu H, Butow RA. The nuclear SUV3-1 mutation affects a variety of post-transcriptional processes in yeast mitochondria. *Nucleic Acids Res*. 1990; 18(6):1369-76.

Costa M, Borges CL, Bailão AM, Meirelles GV, Mendonça YA, Dantas SF, de Faria FP, Felipe MS, Molinari-Madlum EE, Mendes-Giannini MJ, Fiuza RB, Martins WS, Pereira M, Soares CM. Transcriptome profiling of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast-phase cells recovered from infected mice brings new insights into fungal response upon host interaction. *Microbiology*. 2007; 153:4194-207.

Costanzo MC, Fox TD. Specific translational activation by nuclear gene products occurs in the 5' untranslated leader of a yeast mitochondrial mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988; 85(8):2677-81.

Costanzo MC, Seaver EC, Fox TD. At least two nuclear gene products are specifically required for translation of a single mitochondrial mRNA. *EMBO J.* 1986a; 5:3637.

Costanzo MC, Mueller PP, Strick CA, Fox TD. Primary structure of wild-type and mutant alleles of the *PET494* gene of *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol Gen Genet.* 1986b; 202(2):294-301.

Costanzo MC, Seaver EC, Fox TD. The *PET54* gene of *Saccharomyces cerevisiae*: Characterization of a nuclear gene encoding a mitochondrial translational activator and subcellular localization of its product. *Genetics.* 1989;122(2):297-305.

Decoster E, Simon M, Hatat D, Faye G. The *MSS51* gene product is required for the translation of the *COX1* mRNA in yeast mitochondria. *Mol Gen Genet.* 1990; 224(1):111-8.

Decoster E, Vassal A, Faye G. *MSS1*, a nuclear-encoded mitochondrial GTPase involved in the expression of *COX1* subunit of cytochrome c oxidase. *J Mol Biol.* 1993; 232(1):79-88.

Dowhan W, Bibus CR, Schatz G. The cytoplasmically-made subunit IV is necessary for assembly of cytochrome c oxidase in yeast. *EMBO J.* 1985; 4:179.

du Plessis DJ, Nouwen N, Driessen AJ. Subunit a of cytochrome o oxidase requires both YidC and SecYEG for membrane insertion. *J Biol Chem.* 2006; 281(18):12248-52.

Eisendle M, Oberegger H, Zadra I, Haas H. The siderophore system is essential for viability of *Aspergillus nidulans*: functional analysis of two genes encoding l-ornithine N 5-monooxygenase (*sidA*) and a non-ribosomal peptide synthetase (*sidC*). *Mol Microbiol.* 2003; 49(2):359-75.

Ernest JF. Regulation of dimorphism in *Candida Albicans* In: Ernest JF, Schindyt A, editors. *Dimorphism in human pathogenic and pathogenic yeast.* Basel: Karger; 2000. p. 98-111.

Errington J, Appleby L, Daniel RA, Goodfellow H, Partridge SR, Yudkin MD. Structure and function of the *spoIIIJ* gene of *Bacillus subtilis*: a vegetatively expressed gene that is essential for sigma G activity at an intermediate stage of sporulation. *J Gen Microbiol.* 1992; 138(12):2609-18.

Faye G, Simon M. Analysis of a yeast nuclear gene involved in the maturation of mitochondrial pre-messenger RNA of the cytochrome oxidase subunit I. *Cell.* 1983; 32(1):77-87.

Feitosa Ldos S, Cisalpino PS, dos Santos MR, Mortara RA, Barros TF, Morais FV, Puccia R, da Silveira JF, de Camargo ZP. Chromosomal polymorphism, syntenic relationships, and ploidy in the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol*. 2003; 39(1):60-9.

Felipe MS, Andrade RV, Arraes Fb, Nicola AM, Maranhao AQ, Torres FA, Silva-Pereira I, Pocas-Fonseca MJ, Campos EG, Moraes LM, Andrade PA, Tavares AH, Silva SS, Kyaw CM, Souza DP, Network P, Pereira M, Jesuino RS, Andrade EV, Parente JA, Oliveira GS, Barbosa MS, Martins Nf, Fachin Al, Cardoso Rs, Passos Ga, Almeida Nf, Emilia M T Walter M, Soares CM, Jose A, Carvalho M, Brigido MM. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *J Biol Chem*. 2005; 280(26):24706–14.

Felipe MSS, Andrade RV, Petrofeza SS, Maranhão AQ, Torres FAG, Albuquerque P, Arraes FBM, Arruda M, Azevedo MO, Baptista AJ, Bataus LAM, Borges CL, Campos EG, Cruz MR, Daher BS, Dantas A, Ferreira MASV, Ghil GV, Jesuino RSA, Kyaw CM, Leitão L, Martins CRL, Moraes MP, Neves EO, Nicola AM, Alves ES, Parente JA, Pereira M, Poças-Fonseca MJ, Resende R, Ribeiro BM, Saldanha RR, Santos SC, Silva-Pereira I, Silva MAS, Silveira E, Simões IC, Soares RBA, Souza DP, De-Souza MT, Andrade EV, Xavier MAS, Veiga HP, Venancio EJ, Carvalho MJA, Oliveira AG, Inoue MK, Almeida NF, Walter MEMT, Soares CMA, Brýgido MM. Transcriptome Characterization Of The Dimorphic And Pathogenic Fungus *Paracoccidioides Brasiliensis* By Est Analysis. *Yeast*. 2003; 20:263-71.

Forsha D, Church C, Wazny P, Poyton RO. Structure and function of *Pet100p*, a molecular chaperone required for the assembly of cytochrome *c* oxidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Soc Trans*. 2001; 29:436-41.

Goldani LZ, Sugar AM. Paracoccidioidomycosis and AIDS: an overview. *Clin Infect Dis*. 1995; 21:1275-81.

Goldman GH, Dos Reis Marques E, Duarte Ribeiro DC, De Souza Bernardes LA, Quiapin AC, Vitorelli PM, Savoldi M, Semighini CP, De Oliveira RC, Nunes LR, Travassos LR, Puccia R, Batista WL, Ferreira LE, Moreira JC, Bogossian AP, Tekaiia F, Nobrega MP, Nobrega FG, Goldman MH. Expressed sequence tag analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence and pathogenicity genes. *Eukaryot Cell*. 2003; 2(1):34-48.

Glerum DM, Shtanko A, Tzagoloff A. Characterization of *COX17*, a yeast gene involved in copper metabolism and assembly of cytochrome oxidase. *J Biol Chem*. 1996a; 271(24):14504-9.

Glerum DM, Shtanko A, Tzagoloff A. SCO1 and SCO2 act as high copy suppressors of a mitochondrial copper recruitment defect in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 1996b; 271(34):20531-5.

Glerum DM, Tzagoloff A. Isolation of a human cDNA for heme A:farnesyltransferase by functional complementation of a yeast *cox10* mutant. Proc Natl Acad Sci USA. 1994; 91(18):8452-6.

Glerum DM, Muroff I, Jin C, Tzagoloff A. *COX15* codes for a mitochondrial protein essential for the assembly of yeast cytochrome oxidase. J Biol Chem. 1997; 272(30):19088-94.

Glerum DM, Koerner TJ, Tzagoloff A. Cloning and characterization of *COX14*, whose product is required for assembly of yeast cytochrome oxidase. J Biol Chem. 1995; 270(26):15585-90.

Grant CM, Maciver FH, Dawes IW. Mitochondrial function is required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett. 1997; 410(2-3):219-222.

Grant SGN, Jessee J, Bloom FR, Hanahan D. Differential Plasmid Rescue From Transgenic Mouse DNAs Into Escherichia coli Methylation-Restriction Mutants. Proc Natl Acad Sci USA. 1990; 87:4645-9.

Green-Willms NS, Butler CA, Dunstan HM, Fox TD. *Pet111p*, an inner membrane-bound translational activator that limits expression of the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial gene *COX2*. J Biol Chem. 2001; 276(9):6392-7.

Guerinot ML. Microbial iron transport. Annu Rev Microbiol. 1994; 48:743-72.

Haas H. Molecular genetics of fungal siderophore biosynthesis and uptake: the role of siderophores in iron uptake and storage. Appl Microbiol Biotechnol. 2003; 62(4):316-30.

Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochem J. 1984; 219(1):1-14.

Hamel P, Sakamoto W, Wintz H, Dujardin G. Functional complementation of an *oxal1*- yeast mutation identifies an Arabidopsis thaliana cDNA involved in the assembly of respiratory complexes. Plant J. 1997; 12(6):1319-27.

Hatefi Y. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system Annu Rev Biochem. 1985; 54:1015-69.

He S, Fox TD. Membrane translocation of mitochondrially coded *Cox2p*: distinct requirements for export of N and C termini and dependence on the conserved protein *Oxal1p*. Mol Biol Cell. 1997; 8:1449-60.

He S, Fox TD. Mutations Affecting a Yeast Mitochondrial Inner Membrane Protein, Pnt1p, Block Export of a Mitochondrially Synthesized Fusion Protein from the Matrix. *Mol Cell Biol.* 1999; 19(10):6598-6607.

Hell K, Herrmann J, Pratje E, Neupert W, Stuart RA. *Oxa1p* mediates the export of the N- and C-termini of *pCoxII* from the mitochondrial matrix to the intermembrane space. *FEBS Lett.* 1997; 418:367-70.

Hell K, Tzagoloff A, Neupert W, Stuart RA. Identification of *Cox20p*, a novel protein involved in the maturation and assembly of cytochrome oxidase subunit 2. *J Biol Chem.* 2000; 275(7):4571-8.

Herbert CJ, Dujardin B, Labouesse M, Slonimski PP. Divergence of the mitochondrial leucyl tRNA synthetase genes in two closely related yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces douglasii*: A paradigm of incipient evolution. *Mol Gen Genet.* 1988a; 213:297.

Herbert CJ, Labouesse M, Dujardin B, Slonimski PP. The NAM2 proteins from *S. cerevisiae* and *S. douglasii* are mitochondrial leucyl-tRNA synthetases, and are involved in mRNA splicing. *EMBO J.* 1988b; 7:473.

Herrmann JM, Funes S. Biogenesis of cytochrome oxidase-sophisticated assembly lines in the mitochondrial inner membrane. *Gene.* 2005; 354:43-52.

Herrmann JM, Neupert W, Stuart RA. Insertion into the mitochondrial inner membrane of a polytopic protein, the nuclear-encoded *Oxa1p*. *EMBO J.* 1997; 6(9):2217-26.

Heymann P, Gerads M, Schaller M, Dromer F, Winkelmann G, Ernst JF. The siderophore iron transporter of *Candida albicans* (Sit1p/Arn1p) mediates uptake of ferrichrome-type siderophores and is required for epithelial invasion. *Infect Immun.* 2002; 70(9):5246-55.

Hiser L, Di Valentin M, Hamer AG, Hosler JP. *Cox11p* is required for stable formation of the Cu(B) and magnesium centers of cytochrome c oxidase. *J Biol Chem.* 2000; 275(1):619-23.

Hissen AH, Chow JM, Pinto LJ, Moore MM. Survival of *Aspergillus fumigatus* in serum involves removal of iron from transferrin: the role of siderophores. *Infect Immun.* 2004; 72(3):1402-8.

Hornig YC, Cobine PA, Maxfield AB, Carr HS, Winge DR. Specific copper transfer from the *Cox17* metallochaperone to both *Sco1* and *Cox11* in the assembly of yeast cytochrome c oxidase. *J Biol Chem.* 2004; 279(34):35334-40.

Hu CJ, Bai C, Zheng XD, Wang YM, Wang Y. Characterization and functional analysis of the siderophore-iron transporter CaArn1p in *Candida albicans*. *J Biol Chem.* 2002; 277(34):30598-605.

Jaksch M, Ogilvie I, Yao J, Kortenhaus G, Bresser HG, Gerbitz KD, Shoubbridge EA. Mutations in *SCO2* are associated with a distinct form of hypertrophic cardiomyopathy and cytochrome c oxidase deficiency. *Hum Mol Genet.* 2000; 9:795-801.

Johnson CH, McEwen JE. Mitochondrial protein synthesis is not required for efficient excision of intron aI5 beta from *COX1* pre-mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet.* 1997; 256(1):88-91.

Khalimonchuk O, Ostermann K, Rödel G. Evidence for the association of yeast mitochondrial ribosomes with *Cox11p*, a protein required for the Cu(B) site formation of cytochrome c oxidase. *Curr Genet.* 2005; 47(4):223-33.

Khalimonchuk O, Bird A, Winge DR. Evidence for a Pro-oxidant Intermediate in the Assembly of Cytochrome Oxidase. *J Biol Chem.* 2007; 282(24):17442-9.

Kim SI, Stange-Thomann N, Martins O, Hong KW, Soll D, Fox TD. A nuclear genetic lesion affecting *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial translation is complemented by a homologous *Bacillus* gene. *J Bacteriol.* 1997; 179(17):5625-7.

Kleinkauf H, Von Dohren H. A nonribosomal system of peptide biosynthesis. *Eur J Biochem.* 1996; 236(2):335-1.

Koemer TJ, Hill J, Tzagoloff A. Cloning and characterization of the yeast nuclear gene for subunit 5 of cytochrome oxidase. *J Biol Chem.* 1985; 260:9513-15.

Krummeck G, Rodel G. Yeast *SCO1* protein is required for a post-translational step in the accumulation of mitochondrial cytochrome c oxidase subunits I and II. *Curr Genet.* 1990; 18:13-15.

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC. Paracoccidiodomicose. *Micologia Medica.* 8. ed. São Paulo: Sarvier; 1991. p. 248-97.

Lamarche AEP, Abate MI, Chant SHP, Trumpower BL. Isolation and characterization of *COX12*, the nuclear gene for a previously unrecognized subunit of *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome c oxidase. *J Biol Chem*. 1992; 267:22473-80.

Leary SC, Cobine PA, Kaufman BA, Guercin GH, Mattman A, Palaty J, Lockitch G, Winge DR, Rustin P, Horvath R, Shoubridge EA. The human cytochrome c oxidase assembly factors SCO1 and SCO2 have regulatory roles in the maintenance of cellular copper homeostasis. *Cell Metab*. 2007; 5(1):9-20. Erratum in: *Cell Metab*. 2007; 5(5):403.

Leary SC, Kaufman BA, Pellecchia G, Guercin GH, Mattman A, Jaksch M, Shoubridge EA. Human SCO1 and SCO2 have independent, cooperative functions in copper delivery to cytochrome c oxidase. *Hum Mol Genet*. 2004; 13:1839-48.

Leong SA, Winkelmann G. Molecular biology of iron transport in fungi. *Met Ions Biol Syst*. 1998; 35:147-86.

Lesuisse E, Simon-Casteras M, Labbe P. Siderophore-mediated iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: the SIT1 gene encodes a ferrioxamine B permease that belongs to the major facilitator superfamily. *Microbiology*. 1998; 144(Pt 12):3455-62.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-DDCt} method. *Methods*. 2001; 25:402-8.

Lode A, Paret C, Rodel G. Molecular characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Sco2p reveals a high degree of redundancy with Sco1p. *Yeast*. 2002; 19(11):909-22.

Loose DS, Prince Stover E, Restrepo A, Stevens DA, Feldman D. Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Sci*. 1983; 80:7659-63.

Ludewig G, Staben C. Characterization of the PNT1 pentamidine resistance gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994; 38(12):2850-6.

Maarse AC, Van Loon AP, Riezman H, Gregor I, Schatz G, Grivell LA. Subunit IV of yeast cytochrome c oxidase: cloning and nucleotide sequencing of the gene and partial amino acid sequencing of the mature protein. *EMBO J*. 1984; 3(12):2831-7.

Manthey GM, McEwen JE. The product of the nuclear gene *PET309* is required for translation of mature mRNA and stability or production of intron-containing RNAs derived from the mitochondrial *COXI* locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*. 1995; 14:4031-43.

Manthey GM, Przybyla-Zawislak BD, McEwen JE. The *Saccharomyces cerevisiae* Pet309 protein is embedded in the mitochondrial inner membrane. *Eur J Biochem.* 1998; 255(1):156-61.

Marathe SV, McEwen JE. Expression of the divergent transcription unit containing the yeast *PET122* and *OXA1* genes. *Biochem Mol Biol Int.* 1999; 47(6):971-7.

Martins VP, Soriani FM, Magnani T, Tudella VG, Goldman GH, Curti C, Uyemura SA. Mitochondrial function in the yeast form of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bioenerg Biomembr.* 2008; 40(4):297-305.

Mashkevich G, Repetto B, Glerum DM, Jin C, Tzagoloff A. SHY1, the yeast homolog of the mammalian SURF-1 gene, encodes a mitochondrial protein required for respiration. *J Biol Chem.* 1997; 272(22):14356-64.

Matzanke BF, Bill E, Trautwein AX, Winkelmann G. Role of siderophores in iron storage in spores of *Neurospora crassa* and *Aspergillus ochraceus*. *J Bacteriol.* 1987; 169(12):5873-6.

Maxfield AB, Heaton DN, Winge DR. *Cox17* is functional when tethered to the mitochondrial inner membrane. *J Biol Chem.* 2004; 279(7):5072-80.

McEwen JG, Garcia AM, Ortiz BL, Botero S, Restrepo A. In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Arch Med Res.* 1995; 26(3):305-6.

McEwen JG, Bedoya V, Patiño MM, Salazar ME, Restrepo A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. *J Med Vet Mycol.* 1987; 25(3):165-75.

McEwen JE, KO C, Kioeckener-Gruissem B, Poyton RO. Nuclear functions required for cytochrome c oxidase biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Characterization of mutants in 34 complementation groups. *J Biol Chem.* 1986; 261(25):11872-9.

McEwen JE, Hong KH, Park S, Preciado GT. Sequence and chromosomal localization of two PET genes required for cytochrome c oxidase assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet.* 1993; 23(1):9-14.

Medoff G, Kobayashi GS, Painter A, Travis S. Morphogenesis and pathogenicity of *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun.* 1987; 55(6):1355-8.

Mei B, Budde AD, Leong SA. *sid1*, a gene initiating siderophore biosynthesis in *Ustilago maydis*: molecular characterization, regulation by iron, and role in phytopathogenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90(3):903-7.

Michel H. The mechanism of proton pumping by cytochrome *c* oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 27(95):12819-24.

Minczuk M, Dmochowska A, Palczewska M, Stepień PP. Overexpressed yeast mitochondrial putative RNA helicase *Mss116* partially restores proper mtRNA metabolism in strains lacking the Suv3 mtRNA helicase. *Yeast*. 2002; 19(15):1285-93.

Montoya AE, Alvarez AL, Moreno MN, Restrepo A, McEwen JG. Electrophoretic Karyotype of environmental isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol*. 1999; 37:219-222.

Mulero JJ, Rosenthal JK, Fox TD. *PET112*, a *Saccharomyces cerevisiae* nuclear gene required to maintain rho⁺ mitochondrial DNA. *Curr Genet*. 1994; 25(4):299-304.

Muller PP, Fox TD. Molecular cloning and genetic mapping of the *PET494* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*. 1984; 195(1-2):275-80.

Myers AM, Pape LK, Tzagoloff A. Mitochondrial protein synthesis is required for maintenance of intact mitochondrial genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*. 1985; 8:2087-92.

Naithani S, Saracco SA, Butler CA, Fox T.D. Interactions among *COX1*, *COX2*, and *COX3* mRNA-specific translational activator proteins on the inner surface of the mitochondrial inner membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*. 2003; 14(1):324-33.

Neilands JB, Konopka K, Schwyn B, Coy M, Francis, RT, Paw BH, Bagg, A. Comparative biochemistry of microbial iron assimilation. In: Winkelmann G, Van der Helm D, Neilands JB, editors. *Iron Transport in Microbes, Plants and Animals*. New York: Weinheim, VCH; 1987. p. 3–34.

Neilands JB. Iron absorption and transport in microorganisms. *Annu Rev Nutr*. 1981; 1:27-46. Review.

Niemer I, Schmelzer C, Borner GV. Overexpression of DEAD box protein *pMSS116* promotes ATP-dependent splicing of a yeast group II intron in vitro [corrected and republished with original paging in *Nucleic Acids Res*. 1995; 23(15):2966-72.

Nino-Vega GA, Soares F, Calcagno AM, Ruiz-Herrera J, Martinez-Espinoza AD, San-Blas G. Cloning and expression analysis of the ornithine decarboxylase gene (PbrODC) of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast*. 2004; 3:211-18.

Nobrega MP, Bandeira SCB, Beers J; Tzagoloff A. Characterization of *COX19*, a widely distributed gene required for expression of mitochondrial cytochrome oxidase. *J Biol Chem*. 2002; 277(43):40206-11.

Nobrega MP, Graminha MA, Troitskaya EN, Nobrega FG. Study of a region on yeast chromosome XIII that complements pet G199 mutants (*COX7*) and carries a new non-essential gene. *Braz J Med Biol Res*. 1998; 31(3):355-63.

Nobrega MP, Nobrega FG, Tzagoloff A. *COX10* codes for a protein homologous to the ORF1 product of *P. denitrificans* and is required for the synthesis of yeast cytochrome oxidase. *J Biol Chem*. 1990; 265:14220-6.

Nunes LR, Costa de Oliveira R, Leite DB, da Silva VS, dos Reis Marques E, da Silva Ferreira ME, Ribeiro DC, de Souza Bernardes LA, Goldman MH, Puccia R, Travassos LR, Batista WL, Nobrega MP, Nobrega FG, Yang DY, de Braganca Pereira CA, Goldman GH. Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. *Eukaryot Cell*. 2005; 4(12):2115-28.

Oberegger H, Schoeser M, Zadra I, Abt B, Haas H. SREA is involved in regulation of siderophore biosynthesis, utilization and uptake in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol*. 2001; 41(5):1077-89.

Ohmen JD, Kloeckener-Gruissem B, McEwen JE. Molecular cloning and nucleotide sequence of the nuclear *PET122* gene required for expression of the mitochondrial *COX3* gene in *S. cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*. 1988; 16(22):10783-802.

Ong DE, Emery TF. Ferrichrome biosynthesis: enzyme catalyzed formation of the hydroxamic acid group. *Arch Biochem Biophys*. 1972; 148(1):77-83.

Oquendo CE, Antonicka H, Shoubbridge EA, Reardon W, Brown GK. Functional and genetic studies demonstrate that mutation in the *COX15* gene can cause Leigh syndrome. *J Med Genet*. 2004; 41:540-44.

Orlando C, Pinzani P, Pazzagli M. Developments in quantitative PCR. *Clin Chem Lab Med*. 1998; 36:255-69.

Ott M, Prestele M, Bauerschmitt H, Funes S, Bonnefoy N, Herrmann JM. Mba1, a membrane-associated ribosome receptor in mitochondria. *EMBO J*. 2006; 25(8): 1603-10.

Paret C, Ostermann K, Krause-Buchholz U, Rentzsch A, Rodel G. Human members of the SCO1 gene family: complementation analysis in yeast and intracellular localization. FEBS Lett. 1999; 447(1): 65-70.

Patterson TE, Poyton RO. COX8, the structural gene for yeast cytochrome c oxidase subunit VIII. DNA sequence and gene disruption indicate that subunit VIII is required for maximal levels of cellular respiration and is derived from a precursor which is extended at both its NH₂ and COOH termini. J Biol Chem. 1986; 261(36):17192-7.

Perez-Martinez X, Broadley SA, Fox TD. *Mss51p* promotes mitochondrial *Cox1p* synthesis and interacts with newly synthesized *Cox1p*. EMBO J. 2003; 22(21):5951-61.

Petruzzella V, Tiranti V, Fernandez P, Ianna P, Carrozzo R, Zeviani M. Identification and characterization of human cDNAs specific to *BCS1*, *PET112*, *SCO1*, *COX15*, and *COX11*, five genes involved in the formation and function of the mitochondrial respiratory chain. Genomics. 1998; 54(3):494-504.

Plattner HJ, Diekmann H. Enzymology of siderophore biosynthesis in fungi. In: Winkelmann G, Winge DR, editors. Metal ions in fungi. New York: Decker; 1994. p. 99-117.

Poutre CG, Fox TD. *PET111* a *Saccharomyces cerevisiae* nuclear gene required for translation of the mitochondrial mRNA encoding cytochrome c oxidase subunit II. Genetics. 1987; 115(4):637-47.

Power SD, Lochrie MA, Patterson TE, Poyton RO. The nuclear-coded subunits of yeast cytochrome c oxidase. II. The amino acid sequence of subunit VIII and a model for its disposition in the inner mitochondrial membrane. J Biol Chem. 1984; 259:6571-4.

Poyton RO, Schatz G. Cytochrome c oxidase from bakers' yeast. IV. Immunological evidence for the participation of a mitochondrially synthesized subunit in enzymatic activity. J Biol Chem. 1975; 250(2):762-66.

Pungartnik C, Picada J, Brendel M, Henriques JA. Further phenotypic characterization of *pso* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with respect to DNA repair and response to oxidative stress. Genet Mol Res. 2002; 1(1):79-89.

Pungartnik C, Kern MF, Brendel M, Henriques JA. Mutant allele *pso7-1*, that sensitizes *Saccharomyces cerevisiae* to photoactivated psoralen, is allelic with *COX11*, encoding a protein indispensable for a functional cytochrome c oxidase. Curr Genet. 1999; 36(3):124-9.

Reissbrodt R, Erler W, Winkelmann G. Iron supply of *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica*. J Basic Microbiol. 1994; 34(1):61-3.

Reinoso C, Niño-Veja G, San-Blas G, Dominguez A. Random sequencing of *Paracoccidioides brasiliensis* genes. *Med Mycol.* 2005; 43:681-9.

Reinoso C, Sorais F, Niño-Vega GA, Fermeñán E, San-Blas G, Domínguez A. Cloning and functional analysis of the orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene (PbrURA3) of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast.* 2005; 22(9):739-43.

Rentzsch A, Kru mMeck-Weiss G, Hofer A, Bartuschka A, Ostermann K, Rödel G. Mitochondrial copper metabolism in yeast: mutational analysis of Sco1p involved in the biogenesis of cytochrome c oxidase. *Curr Genet.* 1999; 35(2):103-8.

Restrepo A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *J Med Vet Mycol.* 1985; 23:323-34.

Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover EP, Feldman D, Stevens DA. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect Immun.* 1984; 46(2):346-53.

Restrepo-Moreno A. Paracoccidioidomycosis. In: Murphy JW, Friedman H, Bendinelli M, editors. *Fungal Infections and Immune Responses*. New York: Plenum Press, 1993. p. 251-76.

Rho SB, Martinis SA. The bI4 group I intron binds directly to both its protein splicing partners, a tRNA synthetase and maturase, to facilitate RNA splicing activity. *RNA.* 2000; 6(12):1882-94.

Rodeheffer MS, Boone BE, Bryan AC, Shadel GS. Nam1p, a protein involved in RNA processing and translation, is coupled to transcription through an interaction with yeast mitochondrial RNA polymerase. *J Biol Chem.* 2001; 276(11): 8616-22.

Rodeheffer MS, Shadel GS. Multiple interactions involving the amino-terminal domain of yeast mtRNA polymerase determine the efficiency of mitochondrial protein synthesis. *J Biol Chem.* 2003; 278(20):18695-701.

Rooney PJ, Klein BS. Linking fungal morphogenesis with virulence. *Cell Microbiol.* 2002; 4:127-37.

Roosenberg JM 2nd, Lin YM, Lu Y, Miller MJ. Studies and syntheses of siderophores, microbial iron chelators, and analogs as potential drug delivery agents. *Curr Med Chem.* 2000; 7(2):159-97.

Salazar ME, Restrepo A, Stevens DA. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect Immun*. 1988; 56(3):711-13.

Samuelson JC, Chen M, Jiang F, Moller I, Wiedmann M, Kuhn A, Phillips GJ, Dalbey RE. YidC mediates membrane protein insertion in bacteria. *Nature*. 2000; 406(6796):637-41.

San-Blas G, Ninõ-Vega G. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and host response In: Cihlar RL, Calderone RA, editors. *Fungal pathogenesis: principles and clinical applications*. New York: Marcel Dekker; 2001. p. 205-26.

Saracco SA, Fox TD. *Cox18p* Is Required for Export of the Mitochondrially Encoded *Saccharomyces cerevisiae Cox2p* C-Tail and Interacts with *Pnt1p* and *Mss2p* in the Inner Membrane. *Mol Biol Cell*. 2002; 13(4):1122-31.

Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem*. 1987; 160(1):47-56.

Schulze M, Rodel G. Accumulation of the cytochrome c oxidase subunits I and II in yeast requires a mitochondrial membrane-associated protein, encoded by the nuclear *SCO1* gene. *Mol Gen Genet*. 1989; 216:37-43.

Schulze M, Rodel G. *SCO1*, a yeast nuclear gene essential for accumulation of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit II. *Mol Gen Genet*. 1988; 211(3):492-8.

Seraphin B, Simon M, Faye G. *MSS18*, a yeast nuclear gene involved in the splicing of intron aI5 beta of the mitochondrial *cox1* transcript. *EMBO J*. 1988; 7(5):1455-64.

Simon M, Seraphin B, Faye G. The nuclear-encoded *MSS2* gene is involved in the expression of the mitochondrial cytochrome-c oxidase subunit 2 (*Cox2*). *Biochim Biophys Acta*. 1995; 1228(1):95-8.

Souza RL, Green-Willms S, Fox TD, Tzagoloff A, Nobrega FG. Cloning and characterization of *COX18*, a *Saccharomyces cerevisiae PET* gene required for the assembly of cytochrome oxidase. *J Biol Chem*. 2000; 275:14898-902.

Sylvestre J, Margeot A, Jacq C, Dujardin G, Corral-Debrinski M. The role of the 3' untranslated region in mRNA sorting to the vicinity of mitochondria is conserved from yeast to human cells. *Mol Biol Cell*. 2003; 14(9):3848-56.

Taanman J, Capaldi RA. Purification of yeast cytochrome c oxidase with a subunit composition resembling the mammalian enzyme. *J Biol Chem*. 1992; 267:22481-5.

Taanman J, Capaldi RA. Subunit VIa of yeast cytochrome c oxidase is not necessary for assembly of the enzyme complex but modulates the enzyme activity. Isolation and characterization of the nuclear-coded gene. *J Biol Chem*. 1993; 268(25):18754-61.

Tay SK, Nesti C, Mancuso M, Schon EA, Shanske S, Bonilla E, Davidson MM, Dimauro S. Studies of *COX16*, *COX19*, and *PET191* in human cytochrome-c oxidase deficiency. *Arch Neurol*. 2004; 61(12):1935-7.

Trueblood CE, Poyton RO. Differential effectiveness of yeast cytochrome c oxidase subunit genes results from differences in expression not function. *Mol Cell Biol*. 1987; 7(10):3520-6.

Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Tomizaki T, Yamaguchi H, Shinzawa-Itoh K, Nakashima R, Yaono R, Yoshikawa S. The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science*. 1996; 272(5265):1136-44.

Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Tomizaki T, Yamaguchi H, Shinzawa-Itoh K, Nakashima R, Yaono R, Yoshikawa S. Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science*. 1995; 269(5227): 1069-74.

Tzagoloff A, Akai A, Needleman RB, Zulch G. Assembly of the mitochondrial membrane system. Cytoplasmic mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with lesions in enzymes of the respiratory chain and in the mitochondrial ATPase. *J Biol Chem*. 1975; 250(20):8236-42.

Tzagoloff A, Nobrega M, Gorman N, Sinclair P. On the functions of the yeast *COX10* and *COX11* gene products. *Biochem Mol Biol Int*. 1993; 31(3):593-8.

Tzagoloff A. Assembly of inner membrane complexes. *Ann NY Acad Sci*. 1974; 227:521-6.

Tzagoloff A, Myers AM. Genetics of mitochondrial biogenesis, *Ann Rev Biochem*. 1986; 55:249.

Tzagoloff A, Capitanio N, Nobrega MP, Gatti D. Cytochrome oxidase assembly in yeast requires the product of *COX11*, a homolog of the *P.denitrificans* protein encoded by ORF3. *EMBO J*. 1990; 9:2759-64.

Tzagoloff A, Dieckmann CL. PET genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev*. 1990; 54:211-25.

Ueda M, Sanuki S, Kawachi H, Shimizu K, Tanaka A. Characterization of the intron-containing citrate synthase gene from the alkanotrophic yeast *Candida tropicalis*: cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol.* 1997; 168:8-15.

Valencik ML, Kloeckener-Gruissem B, Poyton RO, McEwen JE. Disruption of the yeast nuclear *PET54* gene blocks excision of mitochondrial intron al5 beta from pre-mRNA for cytochrome c oxidase subunit I. *EMBO J.* 1989; 8:3899-904.

Valnot I, Osmond S, Gigarel N, Mehaye B, Amiel J, Cormier-Daire V, Munnich A, Bonnefont JP, Rustin P, Rotig A. Mutations of the *SCO1* gene in mitochondrial cytochrome c oxidase deficiency with neonatal-onset hepatic failure and encephalopathy. *Am J Hum Genet.* 2000; 67:1104-9.

Van der Helm D, Winkelmann G. Hydroxixamates and polycarbonates as iron transport agents (siderophore) in fungi. In: Winkelmann G, Winge DR, editors. *Metal ions in fungi*. New York: Decker; 1994. p. 39-148.

Waterland RA, Basu A, Chance B, Poyton RO. The isoforms of yeast cytochrome c oxidase subunit V alter the in vivo kinetic properties of the holoenzyme. *J Biol Chem.* 1991; 266(7):4180-6.

Weber T, Marahiel MA. Exploring the domain structure of modular nonribosomal peptide synthetases. *Structure.* 2001; 9(1):R3-9.

Weinberg ED. The role of iron in protozoan and fungal infectious diseases. *J Eukaryot Microbiol.* 1999; 46(3):231-8.

Wiesenberger G, Waldherr M, Schweyen RJ. The nuclear gene *MRS2* is essential for the excision of group II introns from yeast mitochondrial transcripts in vivo. *J Biol Chem.* 1992; 267(10):6963-9.

Williams JC, Sue C, Banting GS, Yang H, Glerum DM, Hendrickson WA, Schon EA. Crystal structure of human *SCO1*: implications for redox signaling by a mitochondrial cytochrome c oxidase "assembly" protein. *J Biol Chem.* 2005; 280:15202-11.

Winkelmann G. Microbial siderophore-mediated transport. *Biochem Soc Trans.* 2002; 30(4):691-6.

Wright RM, Christine KO, Cumsy MG, Poyton RO. Isolation and Sequence of the Structural Gene for Cytochrome c Oxidase Subunit VI from *Saccharomyces cerevisiae* *J Biol Chem.* 1984; 259(24):15401-7.

Wright RM, Dircks LK, Poyton RO. Characterization of *COX9*, the nuclear gene encoding the yeast mitochondrial protein cytochrome c oxidase subunit VIIa. Subunit VIIa lacks a leader peptide and is an essential component of the holoenzyme. *J Biol Chem*. 1986; 261(36):17183-91.

Wright RM, Rosenzweig B, Poyton RO. Organization and expression of the *COX6* genetic locus in *Saccharomyces cerevisiae*: multiple mRNAs with different 3' termini are transcribed from *COX6* and regulated differentially. *Nucleic Acids Res*. 1989; 17(3):103-20.

Yuan WM, Gentil GD, Budde AD, Leong SA. Characterization of the *Ustilago maydis* *sid2* gene, encoding a multidomain peptide synthetase in the ferrichrome biosynthetic gene cluster. *J Bacteriol*. 2001; 183(13):4040-51.

Zsurka G, Gregan J, Schweyen RJ. The human mitochondrial Mrs2 protein functionally substitutes for its yeast homologue, a candidate magnesium transporter. *Genomics*. 2001; 72(2):158-68.