UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

FREDERICO MARIANETTI SORIANI

**Caracterização de uma cálcio ATPase
PMR1 de *Aspergillus fumigatus*.**

RIBEIRÃO PRETO
2006

FREDERICO MARIANETTI SORIANI

**Caracterização de uma cálcio ATPase
PMR1 de *Aspergillus fumigatus*.**

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor
em Biociências Aplicadas à
Farmácia

Área de concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia
Orientador: Prof. Dr. Sérgio Akira
Uyemura

RIBEIRÃO PRETO
2006

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Soriani, Frederico Marianetti
Caracterização de uma cálcio ATPase PMR1 de
Aspergillus fumigatus - SP. Ribeirão Preto, 2006.

161 p. il.; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP - Área
de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Uyemura, Sérgio Akira.

1. *Aspergillus fumigatus*. 2. cálcio ATPase. 3.
PMR1. 4. RNAi.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Frederico Marianetti Soriani

Caracterização de uma cálcio ATPase PMR1 de

Aspergillus fumigatus.

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Biociências Aplicadas à Farmácia

Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

SUMÁRIO

Lista de Figuras	i
Lista de Tabelas	iii
Lista de Abreviaturas	iv
Resumo	vi
Abstract	viii
1. INTRODUÇÃO	01
<i>Aspergillus fumigatus</i>	02
Características macro e microscópicas	03
Patogênese	03
Regulação dos níveis de cálcio intracelular	07
Ca ²⁺ -ATPase	12
PMR1	17
Potencial quimioterapêutico	23
Validação do alvo quimioterapêutico	27
2. OBJETIVOS	34
3. MATERIAL e MÉTODOS	36
3.1. Soluções e tampões	37
3.1.1. Salina fosfato tamponada (PBS)	37
3.1.2. Tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE)	38
3.1.3. Tampão de lise para extração de plasmídeos	38
3.1.4. Tampão de carregamento	38
3.1.5. Tampão Tris-EDTA (TE)1X	39
3.1.6. Acetato de Lítio 1X	39
3.1.7. Solução de Elementos Traço	39
3.1.8. Solução de sais para meio mínimo	40
3.1.9. Solução 1	40
3.1.10. Solução 2	41
3.1.11. Solução 3	41
3.1.12. Solução 4	42
3.1.13. Solução 5	42
3.2. Meios de cultivo	43
3.2.1. SC (meio mínimo)	43
3.2.2. LB (Lúria Bertani)	44
3.2.3. SOC	44
3.2.4. Meio Mínimo	45
3.2.5. YPD ou YPG	45
3.3. Organismos	46
3.3.1. <i>Aspergillus fumigatus</i>	46
3.3.2. Bactérias	46
3.3.3. <i>S. cerevisiae</i>	46
3.4. Gene da cálcio ATPase de <i>A. fumigatus</i>	47
3.4.1. Desenho dos iniciadores oligonucleotídeos (<i>primers</i>)	47

3.4.2.	Reações em cadeia da polimerase	48
3.4.3.	Eletroforese em gel de agarose	48
3.4.4.	Inserção dos fragmentos de DNA em plasmídeo	49
3.4.5.	Preparo de células competentes	50
3.4.6.	Transformação de células competentes	51
3.4.7.	Preparação em pequena escala de DNA plasmideal	52
3.4.8.	Digestão do plasmídeo com enzima de restrição	53
3.4.9.	Preparo e seqüenciamento das amostras selecionadas	53
3.4.10.	Preparo de células competentes de <i>S. cerevisiae</i> e transformação	54
3.4.11.	Complementação funcional	55
3.4.12.	Análise da distribuição de quitina na parede celular de <i>S. cerevisiae</i>	57
3.5.	Validação do gene <i>Afpmr1</i> como alvo quimioterapêutico	57
3.5.1.	Amplificação das seqüências invertidas	57
3.5.2.	Clonagem no vetor pALB1	58
3.5.3.	Produção de esferoplastos de <i>A. fumigatus</i>	60
3.5.4.	Transformação de <i>A. fumigatus</i>	61
3.5.5.	Seleção dos clones positivos para a RNAi	62
3.5.6.	Real-Time PCR	62
3.5.6.1.	Extração de RNA, quantificação e eletroforese	62
3.5.6.2.	RT-PCR	63
3.5.6.3.	Real Time-PCR	65
3.5.7.	Ensaio de fagocitose	68
3.5.8.	<i>Killing</i> de macrófagos	70
3.5.9.	Análise estatística	71
4.	RESULTADOS	73
4.1.	Expressão heteróloga do gene da cálcio ATPase de <i>A. fumigatus</i>	74
4.2.	Interferência de RNA	85
4.3.	Validação do alvo quimioterapêutico	90
5.	DISCUSSÃO	97
6.	CONCLUSÃO	117
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119

Lista de Figuras

1.	Representação esquemática do ciclo reacional das ATPases	15
2.	Mecanismos de silenciamento por RNA	30
3.	Construção utilizada na RNAi	59
4.	Fotografia do gel de eletroforese em agarose 1,0% (w/v), em tampão TAE, dos produtos da digestão dos clones pYES-2-Afpmr1 com enzimas de restrição Bam HI e Eco RI	75
5.	Fotografia de uma cultura de 48 horas de diferentes clones de <i>S. cerevisiae</i> cepa K616 em meio SC-Ura ⁻ suplementado com EGTA 10 mmol/L....	77
6.	Fotografia de uma cultura de 48 horas de diferentes clones de <i>S. cerevisiae</i> cepa K616 em meio SC-Ura ⁻ suplementado com MnCl ₂ 4 mmol/L....	78
7.	Complementação funcional do <i>S. cerevisiae</i> pela AfPMR1 após 24 horas	79
8.	Complementação funcional do <i>S. cerevisiae</i> pela AfPMR1 após 48 horas	80
9.	Complementação funcional do <i>S. cerevisiae</i> pela AfPMR1 após 96 horas	81
10.	Fotografias de células de <i>S. cerevisiae</i> cultivadas em meio SC-URA ⁻ por 24 horas a 30°C, marcadas com calcoflúor e visualizadas em microscópio de fluorescência com filtro de ultravioleta	82
11.	Fotografias de células de <i>S. cerevisiae</i> cultivadas em meio YPG por 24 horas a 30°C, marcadas com calcoflúor e visualizadas em microscópio de fluorescência com filtro de ultravioleta	84
12.	Seqüência nucleotídica da região 5' terminal do gene <i>Afpmr1</i> selecionada na RNAi	86
13.	Esquema da estrutura <i>stem-loop</i> para a RNAi	87
14.	Fotografias dos clones cultivados em meio mínimo contendo xilose ou maltose	88
15.	Nível de expressão do gene <i>Afpmr1</i> nos clones CEA 17 <i>pyrG+</i> (WT) e pALB1/ <i>Afpmr1</i> (RNAi) cultivados em meio indutor de RNAi	90
16.	Ensaio de fagocitose	92
17.	Fotografia do ensaio de fagocitose	93
18.	Número médio de conídios fagocitados por macrófago	95

19. Avaliação da eficiência da fagocitose	96

Lista de Tabelas

1.	<i>Primers</i> utilizados na amplificação do gene <i>Afpml1</i> para clonagem em plasmídeo pYES-2®	47
2.	<i>Primers</i> utilizados na amplificação das seqüências repetidas invertidas do gene <i>Afpml1</i> para clonagem em plasmídeo pALB-1	58
3.	<i>Primers</i> para o gene do fragmento 18S do RNA ribossômico de <i>A. fumigatus</i>	64
4.	<i>Primers</i> utilizados nos experimentos de real-time PCR	66
5.	Diluições do DNA genômico presentes na curva de calibração dos <i>primers</i>	68
6.	Identidade entre o fragmento do gene <i>Afpml1</i> , selecionado para a RNAi, e diferentes Cálcio ATPases	85

Lista de abreviaturas

1 Kb Plus	marcador de peso molecular de 1000 pares de bases
Afpmr1	gene da cálcio ATPase de <i>A. fumigatus</i>
AfPMR1	produto de gene <i>Afpmr1</i>
ATP	adenosina 3'-trifosfato
BSA	albumina de soro bovino
cDNA	DNA complementar
DEPC	dietilpirocarbonato
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxiribonucleico
dNTP	desoxiribonucleotídeos (dCTP, dATP, dTTP, dGTP)
DO_{600nm}	densidade ótica em comprimento de onda 600 nm
DTT	ditiotreitol
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EROs	espécies reativas de oxigênio
IPTG	isopropiltio- β -D-galactosídeo
kb	Kilo bases
kDa	Kilo Daltons
LiAc	acetato de lítio
MTT	brometo de (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium

PCR	reação em cadeia da polimerase
PEG	polietilenoglicol
PMCA	cálcio ATPase de Membrana Plasmática
PMR1	cálcio ATPase localizada no Complexo de Golgi (Ca ²⁺ , Mn ²⁺ -ATPase)
RE	retículo endoplasmático
RNA	ácido ribonucléico
RNAI	interferência de RNA
RNA_m	ácido ribonucléico mensageiro
RNA_r	ácido ribonucléico ribossômico
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS
SERCA	cálcio ATPase do retículo sarcoendoplasmático
TCA	ácido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N'- tetrametiletilenodiamina
Tris	tris-(hidroximetil)aminoetano

RESUMO

SORIANI, FMS. **Caracterização de uma cálcio ATPase PMR1 de *Aspergillus fumigatus***. 2006. 161f., Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

Os conhecimentos sobre a regulação dos níveis de cálcio e manganês no *Aspergillus fumigatus* são bastante limitados, sendo que a homeostase destes íons pode ser diretamente controlada pela ação de ATPases específicas, dentre elas as cálcio ATPases da subfamília PMR1. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi a expressão, caracterização e validação como alvo quimioterapêutico do gene *Afpmr1* de *A. fumigatus*.

Inicialmente, foi realizada a complementação funcional, de uma cepa de *S. cerevisiae* nocaute para a PMR1, em meios de cultura suplementados com EGTA ou manganês, revertendo o fenótipo da cepa nocaute. Além disto, após expressão do gene *Afpmr1*, foi verificada uma reversão na intensa distribuição de quitina na parede celular da cepa nocaute.

Paralelamente, para a RNAi, um fragmento do gene *Afpmr1* apresentando baixa identidade com outros genes de cálcio ATPases de diferentes espécies foi clonado em vetor de expressão em *A. fumigatus* (pALB1).

Após indução da expressão, a construção de RNA dupla fita para RNAi silenciou tanto o gene *alb1* isoladamente (clone controle), quanto o duplo silenciamento com o gene de interesse *Afpmr1*, conferindo à ambas construções coloração branca às colônias.

Uma vez confirmado o silenciamento gênico, por técnicas de RT-PCR quantitativo, os clones selecionados foram utilizados em ensaios de fagocitose e *killing* de macrófagos. O clone com o gene *Afpmr1* silenciado apresentou diminuição na porcentagem de fagocitose, no número médio de conídios fagocitados e na eficiência de eliminação destes conídios quando comparados com seus controles.

Estes resultados mostram que o gene *Afpmr1* pode ser expresso funcionalmente em sistemas heterólogos e seu silenciamento, em *A. fumigatus*, influencia processos celulares que podem estar relacionados à manutenção da estrutura e composição da parede celular, além de desencadear alterações na fagocitose e *killing* de macrófagos.

Palavras-chave: 1. *Aspergillus fumigatus*; 2. cálcio ATPase; 3. PMR1; 4. RNAi.

ABSTRACT

SORIANI, FMS. **Characterization of an *Aspergillus fumigatus* PMR1 calcium ATPase**. 2006. 161p., Thesis (Doctoral) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

The knowledge about the regulation of *Aspergillus fumigatus* calcium and manganese levels are very limited, while these ions homeostasis could be directly controlled by the function of specific ATPases, like the PMR1 calcium ATPase. In this way, the aim of the present work was the expression, characterization e validation, as chemotherapeutic target, of the *A. fumigatus Afpmr1* gene.

Initially, the functional complementation of a PMR1 knock-out strain phenotype was analyzed in EGTA or manganese supplemented culture media. Besides, after *Afpmr1* expression, an intense distribution of chitin through the cell wall of the knock-out strain was reversed.

At the same time, a fragment of the *Afpmr1* gene, showing low identity values for another calcium ATPase genes, was cloned in an *A. fumigatus* expression vector (pALB1) for RNAi.

After the induction of gene expression, a double strand RNA construct for RNAi has properly silenced either the *alb1* gene alone (control clone), or the double silencing with the gene of interest *Afpmr1*, leading to both constructions white colored colonies.

After confirmation of the gene silencing by quantitative RT-PCR techniques, the selected clones were used in macrophages killing and phagocytosis assays. The *Afpmr1* silenced clone showed a decrease in the phagocytosis percentage, in the mean number of internalized conidia and in the killing percentage when compared with control groups.

These results show that the *Afpmr1* gene can be functionally expressed in eukaryotic heterologous systems and its silencing, in *A. fumigatus*, alters cellular processes that can be related with the maintenance of the cell wall structure and composition, as well as promote alterations in the macrophages phagocytosis and killing.

Key-Words: 1. *Aspergillus fumigatus*; 2. calcium ATPase; 3. PMR1; 4. RNAi.

1. Introdução

Aspergillus fumigatus

O *Aspergillus fumigatus* é um fungo saprofítico de grande importância no meio ambiente por reciclar carbono e nitrogênio. Este fungo pode ser encontrado em todas as regiões do mundo e acredita-se que o seu nicho ecológico natural seja o solo, onde o fungo sobrevive e cresce em vegetais em decomposição; portanto, áreas rurais representam a maior fonte deste microrganismo (DENNING, 1998; BRAKHAGE & LANGFELDER, 2002).

Nos últimos 20 anos, com a disseminação da AIDS, bem como o desenvolvimento de novas drogas imunossupressoras e de técnicas de transplantes, este ascomiceto deixou de ser apenas um fungo saprofítico de menor importância para se tornar um dos principais agentes patogênicos (LATGÉ, 1999).

Embora as hospitalizações relacionadas com aspergiloses representem pequena parcela do total de hospitalizações, estatísticas mostram que, nos Estados Unidos, o custo total com aspergiloses foi de aproximadamente 633 milhões de dólares em 1996 (STEVENS, 2004).

Características macro e microscópicas

As colônias de *A. fumigatus* se desenvolvem rapidamente em ágar glicose-peptona a 37°C. Nestas condições, as colônias possuem coloração verde-acinzentada, geralmente são granulares e formam abundantes conídios. A micromorfologia desta espécie apresenta hifas hialinas e septadas com paredes paralelas; as cabeças conidiais apresentam, ao microscópio ótico, aspecto de vesículas em forma de frasco, com uma série de fiálides uniseriadas, recobrando dois terços superiores de sua superfície. Os conídios, de coloração verde, possuem 2,5 - 3,0 µm de diâmetro e são produzidos em cadeias paralelas. O *A. fumigatus* é uma espécie termófila e pode crescer em temperaturas superiores a 55°C, sendo esta uma característica que torna mais fácil a sua diferenciação das outras espécies (HAINES, 1995).

Patogênese

A patogenicidade entre os fungos, com raras exceções, não é necessária para a manutenção ou disseminação das espécies. A capacidade de fungos em causar doença parece ser um fenômeno relacionado ao estado imunológico do hospedeiro (WANKE et al., 2000). Desta forma, o estabelecimento de uma infecção fúngica, bem como seu

desenvolvimento em tecidos hospedeiros, requer uma agressividade do fungo sobre o sistema imune do hospedeiro quando este estiver debilitado (LATGÉ & CALDERONE, 2002), o que pode acontecer em portadores de doenças que afetam o sistema imunológico ou aqueles submetidos a terapias imunossupressoras (BODEY & VARTIVARIAN, 1989; ITO & LYONS, 2002; PETER et al., 2002; PEGUES et al., 2002; DUCHINI et al., 2002).

Em *A. fumigatus*, o conhecimento genômico bem como evidências biológicas sugerem que a virulência deste fungo está mais relacionada ao imunocomprometimento ou deficiência genética do hospedeiro que a um determinante fúngico específico. Desta forma, mais que tentar identificar fatores de virulência específicos, o *A. fumigatus* deveria ser considerado apenas um fungo saprofítico, que se torna patogênico devido a razões biológicas simples como a sua presença em grandes concentrações na atmosfera, a sua alta taxa de crescimento e viabilidade à temperatura de 37°C e, principalmente, devido ao fato de o hospedeiro colonizado possuir um sistema imunológico deficiente (TEKAIA & LATGÉ, 2005).

A aspergilose é o termo geral que designa uma doença que pode ser causada por agentes etiológicos pertencentes ao gênero *Aspergillus*. Este gênero compreende várias

espécies oportunistas que podem causar doenças invasivas, dentre elas, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. terreus* e *A. nidulans*. Entretanto, aproximadamente 90% dos casos de aspergilose invasiva são causadas pelo *A. fumigatus* (HOGAN et al., 1996; LOUDON et al., 1994).

A presença de espécies de *Aspergillus* no meio ambiente é o principal fator de risco para as aspergiloses invasivas nosocomiais. Surtos de infecções hospitalares têm sido associados com a construção ou reformas em hospitais, sistemas de ar-condicionado contaminados, entre outros reservatórios no meio ambiente hospitalar (PEGUES et al., 2002).

O *A. fumigatus* possui algumas características que contribuem para sua patogenicidade. Além das características microbiológicas do fungo, como rápido crescimento e o tamanho reduzido dos conídios, inúmeros outros fatores de virulência foram caracterizados. Dentre eles pode-se destacar a identificação de um vasto sistema de *turnover* de radicais livres, compreendendo sistemas enzimáticos como: superóxidos dismutases, catalases, ascorbato peroxidase, tioredoxina peroxidase, glutational S-transferase que podem proteger as células do fungo contra os diferentes radicais livres produzidos pelos macrófagos do hospedeiro; além de proteases, ribotoxinas,

fosfolipases, hemolisinas, gliotoxina e outros fatores (STEVENS, 2004; TEKAIA & LATGÉ, 2005).

Para muitos pacientes, a principal porta de entrada e sítio de infecção do *A. fumigatus* é o trato respiratório, o qual é infectado por inalação de conídios. Entretanto, outros locais de infecção como pele, peritônio, ossos e olhos, dentre outros, têm sido descritos em pacientes saudáveis e imunocomprometidos (PITT, 1994; DENNING, 1998, LATGÉ, 1999).

Em pacientes imunocompetentes, as formas clínicas que se desenvolvem durante a infecção pelo gênero *Aspergillus* incluem as doenças alérgicas como asma, sinusite alérgica e alveolite, devido à exposição aos conídios ou antígenos do *Aspergillus sp.* Nestes pacientes, a colonização pelo micélio é ausente e a manifestação clínica é facilmente revertida pela remoção do agente causal. Nas formas mais graves, como a aspergilose alérgica bronco-pulmonar, aspergiloma e aspergilose invasiva envolvem o crescimento e colonização pelo micélio e geralmente requerem intervenção terapêutica (BODEY & VARTIVARIAN, 1989, SHIBUYA et al., 2004).

A aspergilose alérgica bronco-pulmonar é a complicação alérgica mais severa causada pelo *A. fumigatus*. Ocorre principalmente em pacientes

portadores de asma atópica ou fibrose cística. Seus efeitos variam desde asma até uma destruição dos pulmões, com evidências clínicas, sorológicas, radiológicas e patológicas características (LATGÉ, 1999).

O aspergiloma, também chamado de “bola fúngica”, ocorre em pacientes com histórico de doenças pulmonares pré-existentes. Consiste de uma massa esferóide de hifas embebidas em uma matriz protéica, células e fibrina, com estruturas esporulantes na periferia (LATGÉ, 1999).

A aspergilose invasiva é a forma mais severa da doença. Após a inalação dos conídios, a aspergilose invasiva provoca lesões granulomatosas nos pulmões ou nos brônquios, que podem se disseminar do tecido pulmonar para os vasos sangüíneos que irrigam estes órgãos, afetando o encéfalo, trato gastrointestinal e rins, sendo a forma disseminada geralmente aguda e fatal (LATGÉ, 1999).

Regulação dos níveis de cálcio intracelular

Em organismos unicelulares, cada célula é capaz de realizar todos os processos biológicos necessários para a sua sobrevivência. Embora os organismos unicelulares possam regular sua atividade em resposta a estímulos extracelulares, seu relacionamento com outras células é essencialmente baseado na competição por nutrientes. Desta

forma, a sinalização intracelular nestes organismos apresenta importante função no controle dos processos bioquímicos e de manutenção da viabilidade celular. Esta sinalização celular é realizada por segundos mensageiros variados, dentre eles os íons cálcio (CARAFOLI et al., 2001, CARAFOLI, 2002; SARIS & CARAFOLI, 2005).

O processo de transdução de sinal por íons cálcio apresenta características muito peculiares que fazem desta via de sinalização um sistema único, como por exemplo, a capacidade do cálcio de atuar como primeiro ou segundo mensageiro e a freqüente ativação de mecanismos autoregulatórios de sistemas enzimáticos (CARAFOLI, 2005).

Existem inúmeras evidências de que os íons cálcio possuam uma importância crucial no controle de vários processos biológicos sendo, portanto, a regulação precisa dos seus níveis de extrema importância.

Alterações na concentração citosólica de íons cálcio em leveduras são responsáveis por uma variedade de processos fisiológicos, incluindo controle do ciclo celular (HARTLEY et al., 1996; IIDA et al., 1990), a saída da fase quiescente (G_0/G_1) após limitação da fonte de carbono (EILAM & OTHMAN, 1990), sensibilidade à glicose e galactose (TOKES-FUZESI et al., 2002), processamento de proteínas na via secretória (DÜRR et al., 1998) e

adaptação ao estresse relacionado ao meio ambiente (DENIS & CYERT, 2002).

Em *Saccharomyces cerevisiae*, a sinalização de cálcio parece ser bastante semelhante aos mecanismos descritos para células de mamíferos. O cálcio ativa a via calmodulina/calcineurina que desencadeia alterações na transcrição de diferentes genes (YOSHIMOTO et al., 2002). Tem sido descrito que um número relativamente pequeno de transportadores de íons cálcio são responsáveis pela homeostase deste íon em leveduras. Entre estes transportadores pode-se destacar a cálcio ATPase vacuolar (CUNNINGHAM & FINK, 1994), o trocador $\text{Ca}^{2+}/\text{nH}^{+}$ vacuolar (CUNNINGHAM & FINK, 1996), a Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoendoplasmático (BONILLA et al., 2002) e a Ca^{2+} -ATPase do complexo de Golgi (ANTEBI & FINK, 1992; RUDOLPH et al., 1989; SORIN et al., 1997).

A atuação deste pequeno grupo de transportadores mantém os níveis de cálcio citosólico livre nas leveduras entre 50 e 200 nmol/L, enquanto, as concentrações deste íon no fluído extracelular podem tanto assumir valores menores que 1 $\mu\text{mol/L}$ quanto valores maiores que 100 mmol/L.

Em *A. fumigatus*, pouco se conhece sobre a regulação dos níveis intracelulares de cálcio. O controle da

homeostase do cálcio neste fungo pode ter uma função crítica na sinalização e na prevenção dos danos celulares, devido à exposição prolongada a elevadas concentrações do cátion durante infecções. Assim, durante o seu ciclo de vida, o fungo deve adaptar-se em hospedeiros mamíferos às mudanças do meio ambiente nesse hospedeiro.

A modulação da concentração de cálcio citosólico livre ocorre através da abertura de canais para cálcio voltagem ou receptores dependentes, com internalização de íons cálcio. Esta modulação ocorre ainda através de sistemas de transporte específicos, presentes na membrana plasmática, retículo endoplasmático, complexo de Golgi, mitocôndrias e vacúolos ácidos, que catalisam o efluxo de cálcio do citoplasma (NICHOLLS, 1986; IRVINE, 1986; ENGLAND, 1986; MILLER et al., 1990; RODRÍGUEZ-NAVARRO et al., 2000; GREEN, 2000). O rompimento da homeostase do cálcio durante traumas celulares pode significar a perda da viabilidade da célula (SCHANNE et al., 1979; CASINI & FARBER, 1991; FARISS et al., 1985; MORGAN et al., 1986; RUBEN & HAGHGAT, 1991).

Existem evidências do envolvimento do cálcio no desenvolvimento de toxicidade celular em diversos sistemas modelo. Por exemplo, a elevação dos níveis citosólicos causada por toxinas químicas, resulta em alteração da

função mitocondrial e ativação de inúmeras enzimas catabólicas dependentes do cátion, tais como fosfolipases, proteases e endonucleases, as quais contribuem para a morte celular (BELLOMO et al., 1984; DI MONTE et al., 1984; NICOTERA et al., 1985; LONG & MOORE, 1986).

Um grande número de estudos em leveduras e células de mamíferos tem demonstrado que o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) no citoplasma contribui de forma decisiva para a ativação do processo apoptótico (GREENLUND et al., 1995; SLATER et al., 1995; LIGR et al., 1998; MADEO et al., 1999). Estudos sugerem que o tratamento com pequenas concentrações de anfotericina B pode desencadear um processo apoptótico em *A. fumigatus* por meio da produção de EROs (AMIN et al., 2004) e que o estresse oxidativo desencadeado pelo acúmulo de EROS no citoplasma promove alterações nos níveis intracelulares de cálcio (GREENE et al., 2002).

Desta forma, a presença de organelas intracelulares, capazes de armazenar cálcio, efetivamente contribui para o controle da sinalização mediada por este íon (SANDERS et al., 1999).

Ca²⁺-ATPases

Os ciclos de síntese e hidrólise do ATP devem ser capazes de responder à demanda de energia da célula e funcionar de uma maneira coordenada com o metabolismo celular. Estes processos são realizados principalmente por ATPases que se subdividem em três classes: as ATPases da classe "V" localizam-se principalmente em vacúolos e estão relacionadas com a captação de íons H⁺. As "P" ATPases são aquelas que formam intermediários covalentemente fosforilados durante o ciclo reacional e as "F" ATPases estão localizadas na membrana interna mitocondrial e são responsáveis pela síntese de ATP (PEDERSEN, 1987).

As características bioquímicas que são comuns entre as ATPases da superfamília "P" são a estabilidade em meios acídicos, um resíduo de ácido aspártico fosforilado que se forma durante o ciclo reacional da enzima e a inibição destas enzimas pelo ortovanadato (PO₄).

Estruturalmente, as ATPases do tipo "P" possuem 4 domínios principais que são nomeados de acordo com sua função e posição. O domínio de fosforilação (P) corresponde à região catalítica da enzima e contém a sequência de aminoácidos DKTGTLT, na qual o sítio de fosforilação é representado pelo ácido aspártico (D). O domínio de ligação a nucleotídeos (N) corresponde a uma

grande região da enzima inserida no domínio "P" que apresenta uma lisina conservada, definindo o sítio de ligação ao nucleotídeo. O domínio "A" amino terminal é o menor domínio citoplasmático da enzima e apresenta regiões altamente conservadas. Este domínio é dividido em 3 fragmentos citoplasmáticos por duas hélices transmembrânicas e é responsável por promover a estabilização da enzima durante o ciclo reacional. Finalmente, o domínio membrânico (M) é constituído por 10 hélices (M1-M10) que atravessam a membrana formando os sítios de ligação aos íons a serem transportados. Os sítios de translocação de íons são definidos por cadeias laterais iônicas e polares dos resíduos de aminoácidos das hélices M4, M5, M6 e M8 (KÜHLBRANDT, 2004; TOYOSHIMA & INESI, 2004).

A Ca^{2+} -ATPase é uma enzima que pertence à superfamília das ATPases do tipo "P" que, juntamente com outros transportadores de cálcio, são responsáveis pela homeostase deste íon em células eucarióticas, podendo estar localizada na membrana plasmática (PMCA), retículo endoplasmático (SERCA), no complexo de Golgi (PMR1) e evidências sugerem a existência de um novo subgrupo de PMCAs localizado em vacúolos, como as cálcio ATPases descritas em *Saccharomyces cerevisiae* (CUNNINGHAM & FINK,

1994), *Dictyostelium discoideum* (MONIAKIS et al., 1995), *Trypanosoma cruzi* (LU et al., 1998), *Trypanosoma brucei* (LUO et al., 2004) e *Toxoplasma gondii* (LUO et al., 2005).

O ciclo reacional das ATPases (figura 1) foi revisado por MACLENNAN et al. (1997), CARAFOLI & BRINI (2000), KÜHLBRANDT (2004) e TOYOSHIMA & INESI (2004). Os íons a serem transportados interagem com a enzima em seu estado conformacional de alta afinidade (E_1). A coordenação dos cátions, que interagiram com os sítios de alta afinidade da enzima, pelas cadeias laterais acídicas e polares dos resíduos de aminoácidos transfere energia ao sistema e induz as hélices M4, M5, M6 e o domínio "P" a se arranjam na conformação E_1 . O ATP-Mg²⁺ se liga ao domínio "N" e causa uma mudança conformacional nas cadeias β , fazendo com que este domínio se aproxime do domínio "P". Esta oscilação do domínio "N" assegura que o fosfato γ do ATP se aproxime do sítio de fosforilação no estado E_1 -P, que é caracterizado pela manutenção do íon no sítio de alta afinidade. Estudos proteolíticos mostram que o íon Mg²⁺ facilita o ataque nucleofílico do aspartato, no domínio "P", ao fosfato γ do ATP, reduzindo a repulsão eletrostática e estabilizando o estado de transição pentavalente.

Durante a transição do estado $E_1\text{-P}$ para o $E_2\text{-P}$ o domínio “A” gira no plano aproximando-se e estabilizando a esfera de coordenação do íon magnésio, com a liberação do ADP.

Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figura 1 - Representação esquemática do ciclo reacional das ATPases (KÜHLBRANDT, 2004).

Nesta sequência de eventos, a inclinação do domínio “P” dispara uma movimentação reversa das hélices transmembrânicas. As cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos responsáveis pela coordenação dos íons se reorientam, diminuindo assim a afinidade por estes íons, resultando na sua liberação para a região extracitoplasmática. Neste momento, ocorre a hidrólise do

resíduo de aspartato fosforilado com alterações conformacionais em todos os domínios da proteína, liberação do cofator magnésio e reorientação para o estado E_2 . Do estado E_2 a enzima altera sua conformação para o estado E_1 com a abertura dos sítios de ligação ao íon no lado citoplasmático.

O mecanismo pelo qual as cálcio ATPases transportam os íons cálcio é semelhante ao descrito anteriormente e considera as características do processo de transporte e a estrutura da enzima. São dois os sítios de ligação e translocação do cálcio em mamíferos. Foi proposto que estes sítios de ligação ao cálcio estão lado a lado, próximos ao centro dos quatro domínios transmembrânicos e são formados pela justaposição apropriada dos aminoácidos acídicos e com alto conteúdo de oxigênio. O acesso à cavidade é controlado por interações entre os resíduos de aminoácidos vizinhos às terminações citoplasmáticas das hélices transmembrana. Os movimentos do domínio de fosforilação, quando fosforilado, fecharão o acesso citoplasmático com alteração da precisa disposição dos resíduos que formam os sítios de alta afinidade pelo cálcio. Após a oclusão do acesso citoplasmático, a alta afinidade dos dois íons cálcio à enzima diminui e estes são transportados. Concomitantemente, estes movimentos do

domínio de fosforilação também abrirão o acesso de saída da enzima, permitindo a liberação do cálcio fracamente ligado para o interior de organelas ou para o meio extracelular. Posteriormente, alterações conformacionais vão resultar na defosforilação da enzima que retorna ao seu estado fundamental (MACLENNAN et al., 1997; MACLENNAN & GREEN, 2000; TOYOSHIMA et al., 2000; TOYOSHIMA & INESI, 2004).

PMR1

Em células eucarióticas superiores, a maior parte do cálcio intracelular é seqüestrada para reservatórios que mantêm as concentrações citoplasmáticas deste íon a níveis submicromolares e os liberam em resposta a sinais fisiológicos. O principal reservatório intracelular de cálcio é o retículo endoplasmático (ER) que libera cálcio para o citoplasma pela ação de canais de cálcio ativados por inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), rianodina e/ou cafeína e capta cálcio do citoplasma pela ação de cálcio ATPases sensíveis à tapsigargina (SERCA), uma lactona sesquiterpênica com potente atividade inibitória de SERCAs.

Existem evidências da existência de outro reservatório de cálcio, não mitocondrial, insensível à

IP₃, rianodina ou cafeína que capta íons cálcio por uma Ca²⁺-ATPase insensível à tapsigargina. Um possível candidato para esta função é o complexo de Golgi, visto que análises de raios-X e microscopia iônica têm mostrado que esta organela seqüestra íons cálcio a concentrações de 1-2 mmol/L, correspondendo a cerca de 5% do total de cálcio intracelular armazenado (SORIN et al., 1997). Além disto, foi demonstrado em células COS-1, pré-tratadas com tapsigargina, que um reservatório de cálcio contendo cálcio ATPases do tipo PMR1, provavelmente pertencente ao complexo de Golgi, pode manter as ondas de cálcio responsáveis pela sinalização intracelular de eucariotos superiores (MISSIAEN et al., 2001).

A tradução e as modificações pós-traducionais de proteínas secretadas, proteínas de membrana e aquelas da via secretória são dependentes da presença de concentrações de cálcio livre no lúmen das organelas da via secretória (retículo endoplasmático, complexo de Golgi e vesículas secretórias) variando de 0,1 a 1 mmol/L. Além disto, o tráfico de proteínas do complexo de Golgi para o ER e a agregação de proteínas secretórias na rede trans-Golgi dependem de cálcio livre nestas organelas. Desta forma, os compartimentos de Golgi e as vesículas

secretórias podem atuar como reservatórios dinâmicos de cálcio.

A clonagem, identificação e expressão de cálcio ATPases em diferentes organismos eucariotos inferiores têm permitido uma maior compreensão sobre a homeostase deste íon, sua função biológica na adaptação destes organismos ao meio em que se desenvolvem e nas alterações morfológicas durante seus ciclos de vida.

O isolamento de um gene que codifica a cálcio ATPase do complexo de Golgi (PMR1), no fungo *S. cerevisiae* (RUDOLPH et al., 1989) permitiu uma abordagem genética na função do complexo de Golgi como reservatório intracelular de cálcio. Foi proposto um modelo do fluxo de cálcio intracelular em *S. cerevisiae*, no qual o cálcio entra na célula por meio de canais de cálcio da membrana plasmática e outros mecanismos não conhecidos. Depois de estabelecido, o estado de equilíbrio é mantido através da ação combinada de uma cálcio ATPase no complexo de Golgi (PMR1), de um contra-transportador de $\text{Ca}^{2+}/\text{nH}^{+}$, uma PMCA no vacúolo e outros transportadores não identificados em outras organelas (CUNNINGHAM & FINK, 1994).

Diferentes cepas de *S. cerevisiae* com alelos *null* para o gene da PMR1 apresentaram problemas de glicosilação, secreção e transporte de proteínas no

complexo de Golgi quando semeadas em meios de cultura com baixos níveis de cálcio (ANTEBI et al., 1992). Estes fenótipos podem ser revertidos pela adição de cálcio aos meios, determinando uma função direta do Ca^{2+} no complexo de Golgi (SORIN et al., 1997).

Desta forma, a PMR1 parece contribuir de forma decisiva na manutenção das concentrações citoplasmáticas de íons cálcio em fungos (DÜRR et al., 1998).

Além de auxiliar na manutenção da homeostase de íons cálcio, a PMR1 também é responsável pelo controle da concentração intracelular de íons manganês. Desta forma, esta enzima contribui tanto na prevenção das lesões tóxicas causadas por estes íons como na manutenção de suas concentrações fisiológicas citoplasmáticas, uma vez que estes são cofatores enzimáticos.

O Mn^{2+} é um cofator essencial no citoplasma (COTTRELL et al., 2000), mitocôndria (HEARN et al., 2001) e complexo de Golgi (LOUKIN & KUNG, 1995) em baixas concentrações. Por outro lado, concentrações milimolares de Mn^{2+} no citoplasma são bastante tóxicas, podendo gerar problemas na glicosilação e de secreção de proteínas, interferir com a interação dos íons magnésio com diferentes proteínas que necessitem deste cofator e induzir apoptose (HIRATA, 2002).

Foi descrito que o manganês interfere na fosforilação oxidativa de preparações mitocondriais (GAVIN et al., 1992; CHENG et al., 2003). Além disto, foi demonstrada a inibição da NADPH desidrogenase e NADH citocromo c redutase de preparações de células PC12 pelo manganês (GALVANI et al., 1995). Recentemente, foi demonstrado que o manganês reduz o cálcio e o conteúdo intracelular de ATP (CHENG et al., 2005). Desta forma, o acúmulo deste íon na mitocôndria, com posterior disfunção desta organela, pode representar a principal via de toxicidade do manganês.

A PMR1 parece ser o principal transportador intracelular de manganês, o qual é acumulado no interior do complexo de Golgi e eliminado da célula por extrusão via exocitose (via secretória) (DÜRR et al., 1998).

Desde a clonagem do gene da PMR1 de *S. cerevesiae* por RUDOLPH et al. (1989), outras enzimas classificadas nesta mesma subclasse das ATPases do tipo "P" têm sido clonadas, identificadas e expressas em diferentes sistemas modelo.

Em humanos, existem duas isoformas de ATPases homólogas à PMR1 (hSPCA1 e hSPCA2) que estão amplamente distribuídas pelos tecidos, incluindo queratinócitos, músculo esquelético, rins, e glândulas mamárias (REINHARDT et al., 1999; HU et al., 2000). Além disto, foi descrito em células de aorta, que a proteína hSPCA1 possui uma

importante função na captação de cálcio, contribuindo com até 50% do transporte deste íon (WOOTTON et al., 2004).

Esta enzima apresenta 49% de identidade à PMR1 de *S. cerevisiae* e mutações nesta enzima causam a doença de Hailey-Hailey que se caracteriza por erosões na epiderme decorrentes de problemas com desmosossomos (LEINONEN et al., 2005; MAYUZUMI et al., 2005).

Em eucariotos inferiores, inúmeros estudos envolvendo *S. cerevisiae* e a PMR1 já foram realizados. A caracterização bioquímica da PMR1 de *S. cerevisiae* já foi amplamente descrita (SORIN et al., 1997; MANDAL et al., 2000; DÜRR et al., 1998; OLIVERO et al., 2003). Além disto, cálcio ATPases do tipo PMR1 de outros organismos como *Yarrowia lipolytica* (PARK, et al., 1998), *A. niger* (YANG et al., 2001), *Kluyveromyces lactis* (UCCELLETTI et al., 1999), *Caenorhabditis elegans* (VAN BAELEN et al., 2001) entre outras, foram clonadas, identificadas e caracterizadas.

Recentemente, foi clonado o gene de uma cálcio ATPase da subclasse PMR1 de *A. fumigatus* (SORIANI et al., 2005) cuja seqüência deduzida de aminoácidos apresentou identidade de 86% com o gene *pmrA* de *A. niger* (YANG et al., 2001; Número de acesso GenBank: AF232827), 48% de identidade com o gene *pmr1* de *S. cerevisiae* (RUDOLPH

et al., 1989; Número de acesso GenBank: P13586); 56% de identidade com o gene de uma cálcio ATPase de *Neurospora crassa* (Número de acesso GenBank: AJ243518) e 49% de identidade com o gene de uma PMR1 de *Cândida albicans* (Número de acesso GenBank: AJ277171).

Potencial quimioterapêutico

O tratamento da aspergilose invasiva, assim como de outras micoses, é restrito a um número limitado de drogas, dentre elas, os azóis (itraconazol) e a anfotericina B. Ambos representam as principais drogas utilizadas nestas infecções, atuando na via biossintética do esterol, (LATGÉ & CALDERONE, 2002). Recentemente, estudos *in vitro* têm demonstrado o potencial antifúngico do voriconazol, um azól de segunda geração, cujo uso terapêutico foi liberado pelo FDA (Food and Drug Administration, EUA) para o tratamento de infecções fúngicas, em especial por espécies do gênero *Aspergillus* (KRISHNAN et al., 2005).

Entretanto, apesar de pequenos avanços no tratamento de infecções por fungos filamentosos, a aspergilose invasiva permanece como uma doença oportunista devastadora, presente em cerca de 15% dos pacientes transplantados e com taxa de letalidade variando entre 60

e 90% em pacientes imunocomprometidos (DENNING, 1998; TEKAIA & LATGÉ, 2005).

O aumento do número de infecções fúngicas resistentes a drogas corresponde a um desafio para o tratamento destas infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos. A descoberta de novos agentes quimioterapêuticos, particularmente aqueles que atuem em diferentes vias metabólicas, juntamente com o melhor entendimento de seus mecanismos de ação, apresenta grande importância na terapêutica.

Existem inúmeras evidências de que os íons cálcio possuam uma importância crucial no controle de vários processos biológicos sendo, portanto, a regulação precisa dos seus níveis de extrema importância. Alterações na concentração citosólica de íons cálcio em leveduras são responsáveis por uma variedade de processos fisiológicos e adaptação a situações de estresse celular (CRUZ et al., 2002; MATSUMOTO et al., 2002; BONILLA et al., 2002; EDLIND et al., 2002).

Em *S. cerevisiae*, foi demonstrado que a atividade antifúngica dos azóis é modulada pela sinalização intracelular de cálcio (EDLIND et al., 2002). Além disto, foi descrita a atividade inibitória da cálcio ATPase de retículo sarcoplasmático por miconazol (LAX et al., 2002).

EILAM et al. (1985) demonstrou o mecanismo de estimulação da captação de cálcio em leveduras após estímulo com miconazol e a relação do transporte dependente de ATP deste íon nos vacúolos. EDLIND et al. (2002), ainda propôs um modelo de tolerância de *S. cerevisiae* a azóis e terbinafina, os quais atuariam na membrana plasmática através de inibição da síntese de esterol, promovendo o aumento da concentração citoplasmática de íons cálcio, que por sua vez interagem com a calmodulina. O complexo cálcio-calmodulina atua na calcineurina que ativa fatores de transcrição para os genes glucana sintase e cálcio ATPase de vacúolos e complexo de Golgi, promovendo assim, tolerância a estas drogas.

Além disto, foi demonstrada a atividade antifúngica do antiarrítmico amiodarona contra *Saccharomyces* e também contra gêneros patogênicos como *Candida*, *Cryptococcus*, *Fusarium* e *Aspergillus* (COURCHESNE, 2002). Esta atividade antifúngica da amiodarona foi relacionada com a perda a homeostase de cálcio em *S. cerevisiae* (GUPTA et al., 2003).

Desta forma, a perda da homeostase de íons cálcio ou o processo de tolerância a quimioterápicos estão relacionados com a atividade de cálcio ATPases. Por

exemplo, foi descrito que a captação de cálcio em células de neuroblastoma humano foi inibida por lactonas macrocíclicas (BULTYNCK et al., 2000). Vários compostos estão incluídos nesta classe de lactonas e dentre eles os imunossupressores FK-506, ciclosporina A e rapamicina, e ivermectina, utilizada em parasitoses, os quais foram descritos como inibidores do transporte de cálcio dependente de ATP, pela inibição de cálcio ATPases (BILMEN et al., 2002).

A inativação de PMR1 em diferentes fungos também tem sido avaliada com relação a alterações na glicosilação e secreção de proteínas, composição de paredes celulares e virulência destes organismos. Na levedura *Y. lipolytica*, foi descrito que a inativação do gene *Ylpmr1* alterou o padrão de processamento e secreção de diferentes proteínas homólogas e heterólogas (SOHN et al., 1998). Em *K. lactis*, o mutante *pmr1Δ* apresentou-se como células maiores e mais redondas com grande anormalidade na espessura e composição da parede celular, principalmente na deposição de quitina e na fração álcali insolúvel (α e β 1,3-glucanas), e que, houve um aumento no consumo de oxigênio e na atividade da succinato desidrogenase nesta cepa mutada com relação à cepa selvagem (UCCELLETTI et al., 1999; FARINA et al., 2004). Estes resultados demonstram que a homeostase de

cálcio e/ou manganês, controlada pela PMR1 contribuem de forma significativa na morfogênese da parede celular de fungos, bem como nos processos de produção de energia.

Recentemente, foi demonstrado que em *C. albicans*, a perda do gene da PMR1 acarreta em problemas de O- e N-glicosilação de proteínas, levando estas células a uma hipersensibilidade ao estresse da parede celular. Esta alteração na composição da parede celular atenuou severamente a virulência da cepa nocaute (BATES et al., 2005).

Estas evidências demonstram que a perda da atividade de cálcio ATPases do tipo PMR1 representa um potente alvo quimioterapêutico para o tratamento de doenças fúngicas.

Validação do alvo quimioterapêutico

O desenvolvimento de novas drogas, mais específicas para os microrganismos oportunistas e que apresentem menor toxicidade para o paciente, necessita de um melhor entendimento das interações patógeno-hospedeiro, bem como no estabelecimento e validação de novos alvos quimioterapêuticos (COTTRELL et al., 2003).

Inúmeros modelos, *in vitro* ou *in vivo*, baseados em estudos de perda de função de diferentes genes têm provado ser muito úteis no entendimento das bases moleculares das

doenças e na identificação de possíveis alvos quimioterapêuticos. Com o crescente número de publicações de projetos genoma, incluindo o recém publicado genoma do *Aspergillus fumigatus* (NIERMAN et al., 2005), uma grande lista de possíveis fatores de virulência tem surgido. Análises funcionais destes genes dependem completamente de metodologias eficientes para sua inativação. Dentre estes modelos, têm sido desenvolvidas técnicas para o silenciamento gênico e a inativação epigenética de genes através da introdução de RNA dupla fita (dsRNA) homólogo ao locus alvo, um processo denominado RNAi (VERMA et al., 2004).

Silenciamento por RNA é um termo geral para fenômenos nos quais pequenas moléculas de RNA dupla fita desencadeiam um processo de repressão da expressão de seqüências homólogas. Este fenômeno está relacionado com a supressão da transcrição, ou com a ativação de um processo seqüência específico de degradação de RNA, supressão pós-transcripcional.

Este processo foi denominado de silenciamento gênico pós-transcripcional (PTGS) em plantas, RNAi em mamíferos, *quelling* em fungos ou silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS) e em todos os casos o mecanismo de silenciamento envolve uma molécula indutora de RNA dupla

fita (dsRNA), uma molécula homóloga de RNA alvo e uma maquinaria de degradação com várias proteínas acessórias (AGRAWAL et al., 2003).

O processo de silenciamento gênico mediado por RNAi pode ser didaticamente dividido em duas etapas: a primeira envolve a ligação de uma RNA nuclease (DICER) à um grande fragmento de dsRNA e sua clivagem em pequenos fragmentos de 21 a 25 nucleotídeos (siRNA); na segunda etapa, estes siRNAs interagem com um complexo multinuclease denominado RISC (Complexo de silenciamento induzido por RNA) que degrada as moléculas de RNA mensageiro homólogas diminuindo a expressão gênica. Além disto, o RITS (complexo de silenciamento transcripcional induzido por RNA), uma variante do RISC, juntamente com siRNAs, pode atuar na atividade de diferentes enzimas responsáveis pela metilação de histonas (DNA de novo metiltransferase, histona acetilase e histona metiltransferase) alterando a disposição destas histonas sobre o gene alvo, impedindo sua transcrição (Figura 2) (BETZ, 2003; COTTRELL et al., 2003; TIJSTERMAN et al., 2002).

Figura 2 - Mecanismos de silenciamento por RNA. a) moléculas de dsRNA provenientes de transcritos complementares ou estruturas em grampo (stem-loop) são reconhecidas pelo DICER e clivadas em pequenos RNAs (siRNA). A RNA polimerase dependente de RNA (RdRP) atua na amplificação do sinal de interferência por produzir fitas complementares da molécula de RNA alvo utilizando os siRNAs como primers e produzindo mais cópias de dsRNA homólogo. b) O complexo RISC, associado com um siRNA, promove o silenciamento de diversas formas. Em todas elas, o siRNA confere especificidade, enquanto as proteínas do RISC atuam ou recrutam efetores para o silenciamento. c) O RISC associa-se ao RNAm alvo e o “quebra”. d) Uma variante do RISC pode induzir TGS utilizando a especificidade do siRNA para silenciar diretamente a cromatina por modificações nos loci homólogos. e) O RISC com o siRNA associado interage com a região UTR do transcrito alvo, bloqueando sua tradução (mecanismo desconhecido) (ALMEIDA & ALLSHIRE, 2005).

A RNAi ainda possui um processo de amplificação de sinal mediado por uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRP). Esta enzima utiliza os siRNAs como *primers* para a síntese da dupla fita de RNA e o próprio RNA alvo como

molde. Desta maneira, as RdRPs formam novos dsRNAs que sofrem a ação do DICER , formando um ciclo e amplificando o efeito de silenciamento gênico.

Desde a descoberta da RNAi, inúmeros estudos têm sido desenvolvidos com diferentes patógenos. A primeira demonstração de RNAi em tripanossomatídeos foi descrita por NGO e colaboradores (1998), com o silenciamento do gene da α -tubulina. Desde então, a RNAi tem sido utilizada no estudo de diferentes aspectos da biologia deste organismo como ontogenia flagelar (BASTIN et al., 2000), caracterização da função de uma RNA polimerase mitocondrial (GRAMS et al., 2002), compartimentalização enzimática em glicossomos (GUERRA-GIRALDEZ et al., 2002), entre outros.

Outros estudos têm sido desenvolvidos com *Plasmodium falciparum* com o silenciamento de serina-treonina fosfatases (KUMAR et al., 2002) e dihidroorotato desidrogenase (McROBERT & McCONKEY, 2002), entre outras enzimas. Além destes organismos, outros estudos têm sido realizados em *Toxoplasma gondii* (AL-ANOUTI et al., 2002), *Leishmania major* (ROBINSON et al., 2003), *T. cruzi* (Da ROCHA et al., 2004), *T. brucei* (LUO et al., 2004) e *Entamoeba histolytica* (KAUR et al., 2004).

Em fungos, após os primeiros estudos em *N. crassa* (COGONI, 1997), outros fungos foram utilizados para estudos de silenciamento gênico através de RNAi. Em *N. crassa*, foi demonstrado uma inibição do crescimento após silenciamento do gene da glucana sintase 1 (TENTLER et al., 1997).

Em *C. neoformans*, estudos de RNAi demonstram que esta ferramenta molecular possui um vasto potencial para o entendimento biológico de diversos genes como os da calcineurina e da lacase, que quando silenciados demonstram fenótipos de sensibilidade à temperatura e diminuição da produção de melanina, respectivamente (LIU et al., 2002; GORLACH et al., 2002).

Em *C. albicans*, estudos genômicos baseados em metodologias *antisense* selecionaram 86 genes essenciais para o crescimento do fungo, sendo que deste total, cerca de 45 genes apresentaram função desconhecida (De BACKER et al., 2001). Em *H. capsulatum*, a inativação do gene da α -(1,3)-glucana sintase por RNAi foi caracterizada através da expressão episomal de RNAs longos *stem-loop* (formato de grampo). Este silenciamento gênico promoveu um fenótipo idêntico àquele gerado em cepas nocaute, ou seja, cepas com virulência atenuada (RAPPEYE et al., 2004).

O silenciamento gênico por RNAi tem sido utilizado também na caracterização de genes envolvidos na virulência do *A. fumigatus*, como o silenciamento simultâneo de 3 genes de isoenzimas *ppo* (psi-produtoras de oxigenases) cujos produtos atuam ativando o sistema imunológico do hospedeiro e retardando a patogênese do fungo (TSITSIGIANNIS et al., 2005).

Recentemente, foi descrita a construção de um sistema plasmideal de expressão de RNAs dupla fita construídos através da inserção de seqüências repetidas inversas em *A. fumigatus* (MOUYNA et al., 2004).

Desta forma, o silenciamento de genes relacionados à sobrevivência do *A. fumigatus* em situações de estresse, seja no meio ambiente ou no hospedeiro mamífero, representa uma grande ferramenta para a validação destes genes como alvos quimioterapêuticos.

2. Objetivos

Os conhecimentos sobre a regulação dos níveis de cálcio e manganês no *Aspergillus fumigatus* são bastante limitados e a homeostase destes íons pode ser diretamente controlada pela ação de ATPases específicas que transportam estes cátions. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi a expressão, caracterização e validação como alvo quimioterapêutico de uma cálcio ATPase da subfamília PMR1 de *A. fumigatus*, com o intuito de se verificar o envolvimento desta proteína na regulação dos níveis intracelulares de cálcio e manganês deste fungo.

3. Material e Métodos

Os vetores PCR®2.1-TOPO® e pYES-2®, enzimas de restrição, Taq DNA polimerase, RT-PCR, T₄ DNA ligase, DNA de esperma de salmão, higromicina B e Trizol® foram adquiridos da Invitrogen Co. (Carlsbad, CA - EUA). A enzima DNase I livre de RNase foi adquirida da Promega, Co. (Madison WI - EUA). Todos os outros reagentes de grau analítico utilizados foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO - EUA) ou Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha).

3.1 - Soluções e tampões

3.1.1- Salina fosfato tamponada (PBS)

NaCl.....	8,00 g
KCl.....	0,20 g
Na ₂ HPO ₄	1,15 g
KH ₂ PO ₄	0,20 g
Água destilada qsp.....	1000,00 mL

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em água destilada e o pH foi ajustado para 7,4. O tampão foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos.

3.1.2 - Tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE)

EDTA.....	10 mmol/L
Tris-acetato pH 8,0.....	40 mmol/L

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em água destilada e o tampão foi ajustado para pH 8,0. O tampão foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos.

3.1.3 - Tampão de lise para extração de plasmídeos

EDTA.....	10 mmol/L
Tris-HCl pH 8,0.....	25 mmol/L
Glucose.....	50 mmol/L

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em água destilada e o tampão foi ajustado para pH 8,0. O tampão foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos.

3.1.4 - Tampão de carregamento

EDTA.....	10,00 mmol/L
Tris-HCl pH 7,5.....	10,00 mmol/L
Azul de bromofenol.....	0,25% (w/v)
Xileno cianol FF.....	0,25% (w/v)
Orange G.....	0,25% (w/v)
Sacarose.....	65,00% (w/v)

3.1.5 - Tampão Tris-EDTA (TE)1X

EDTA.....	1 mmol/L
Tris-HCl pH 7,5.....	10 mmol/L

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em água destilada, o tampão foi ajustado para pH 7,5 e esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos.

3.1.6 - Acetato de Lítio 1X

Acetato de Lítio pH 7,5.....	100 mmol/L

O reagente foi dissolvido em água destilada, a solução foi ajustada para pH 7,5 e esterilizada por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos.

3.1.7 - Solução de Elementos Traço

ZnSO ₄ .7H ₂ O	11,00 g
H ₃ BO ₃	5,50 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	2,50 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	2,50 g
CoCl ₂ .5H ₂ O	0,80 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,80 g
(NH ₄)Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,55 g
EDTA.....	25,00 g
Água destilada qsp.....	100,00 mL

As substâncias que compõem a solução foram adicionadas e dissolvidas na ordem listada, em água

destilada. A solução foi fervida e após resfriamento foi ajustada para pH entre 6,5 e 6,8 com KOH e o volume ajustado para 100 mL.

3.1.8 - Solução de sais para meio mínimo

NaNO ₃	120,0 g
KCl	10,4 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	10,4 g
KH ₂ PO ₄	30,0 g
Água destilada qsp.....	1000,00 mL

As substâncias foram dissolvidas em água deionizada e tampão foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos.

3.1.9 - Solução 1 (protocolo esferoplastização *A. fumigatus*)

(NH ₄) ₂ SO ₄	0,8 mol/L
Ácido cítrico	0,1 mol/L

As substâncias foram dissolvidas em água deionizada, o tampão foi ajustado para pH 6,0 com hidróxido de amônio e esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 Kgf/cm² por 20 minutos.

3.1.10 - Solução 2 (protocolo esferoplastização

***A. fumigatus*)**

Extrato de levedura..... 2% (w/v)
Sacarose..... 2% (w/v)

As substâncias foram dissolvidas em água deionizada e a solução foi esterilizada por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 Kgf/cm² por 20 minutos.

3.1.11 - Solução 3 (protocolo esferoplastização

***A. fumigatus*)**

(NH₄)₂SO₄..... 0,40 mol/L
Ácido cítrico..... 0,05 mol/L
Sacarose..... 1,00% (w/v)

As substâncias foram dissolvidas em água deionizada, o tampão foi ajustado para pH 6,0 com hidróxido de amônio e esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 Kgf/cm² por 20 minutos.

3.1.12 - Solução 4 (protocolo esferoplastização

***A. fumigatus*)**

Polietileno glicol 6000.....	25% (w/v)
CaCl ₂	100 mmol/L
KCl.....	600 mmol/L
Tris-HCl.....	10 mmol/L

As substâncias foram dissolvidas em água deionizada, o tampão foi ajustado para pH 7,5 com hidróxido de amônio e esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 Kgf/cm² por 20 minutos.

3.1.13 - Solução 5 (protocolo esferoplastização

***A. fumigatus*)**

CaCl ₂	50 mmol/L
KCl.....	600 mmol/L
MES.....	10 mmol/L

As substâncias foram dissolvidas em água deionizada, o tampão foi ajustado para pH 6,0 com hidróxido de amônio e esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 Kgf/cm² por 20 minutos.

3.2- Meios de cultivo

3.2.1 - SC (meio mínimo)

Base de nitrogênio para levedura		
Difco™)		0,67% (w/v)
Fonte de carbono:		
(ou) Glucose.....		2,0% (w/v)
(ou) Rafinose.....		2,0% (w/v)
(ou) Galactose.....		2,0% (w/v)
Adenina	Arginina	} 0,01% (w/v)
Lisina	Leucina	
Cisteína	Treonina	
Triptofano	Uracila	
Ácido aspártico	Fenilalanina	} 0,005% (w/v)
Histidina	Tirosina	
Isoleucina	Serina	
Metionina	Valina	
Prolina		
H ₂ O deionizada qsp.....		1.000 mL

O meio SC é definido como um meio mínimo de cultura de leveduras. Os reagentes foram dissolvidos em 900 mL de água deionizada (800 mL se for preparar o meio contendo rafinose como fonte de carbono) e esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos. Em seguida foi adicionado 100 mL de uma solução estoque estéril de dextrose 20% (w/v) ou 200 mL de solução estoque estéril de rafinose 10% (w/v). Para o meio SC seletivo foi omitido o aminoácido uracila.

3.2.2 - LB (Lúria Bertani)

Bactotripton	10 g
Extrato de Levedura	5 g
NaCl	10 g
Ágar	18 g
Água	1.000 mL

As substâncias que compõem o meio foram dissolvidas em água destilada e a mistura foi ajustada para pH 7,5. O meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos.

3.2.3 - SOC

Tripton	20 g
Extrato de levedura	5 g
NaCl	10 mmol/L
KCl	2 mmol/L
MgCl ₂	10 mmol/L
Glicose	20 mmol/L
Água destilada qsp	1.000 mL

As substâncias que compõem o meio foram dissolvidas em água destilada e a mistura foi ajustada para pH 7,5. O meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos.

3.2.4 - Meio Mínimo

Solução de sais.....	5,0% (w/v)
Dextrose.....	1,0% (w/v)
Elementos traço.....	0,1% (w/v)

As substâncias foram dissolvidas em água destilada e o meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos. No protocolo de transformação foi adicionado ágar 1% ou 2% (w/v) para os meios sólidos. De forma semelhante, sacarose 1 mol/L foi adicionada a estes meios como estabilizante osmótico, mas neste caso a esterelização foi realizada a 110°C por 30 minutos para se evitar a caramelização da sacarose.

3.2.5 - YPD ou YPG

Peptona (Oxoid)	20 g
Extrato de levedura (Oxoid)	10 g
Dextrose (YPD) ou Galactose (YPG) ..	40 g
Agar	15 g
Água destilada qsp.....	1000 mL

As substâncias que compõem o meio foram dissolvidas em água destilada (90% do volume final) e o meio de cultura foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos. Em seguida foi adicionado a este meio 100 mL de uma solução estoque estéril de glicose 20% (w/v).

3.3 - Organismo

3.3.1 - *Aspergillus fumigatus*

A cepa CEA 17 *pyrG*⁺ foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman da FCFRP-USP.

3.3.2- Bactérias

As bactérias *Escherichia coli* das linhagens **DH5α**, genótipo: *supE44ΔlacU169(φ80lacZΔM15)hsdR17recA1endA1gyrA96thi-1relA1*, e **XL₁-Blue**, genótipo: *supE44hsdR17recA1endA1gyrA46thi^rrelA1lac⁻F'[proAB⁺lacI^qlacZΔM15Tn10(tet^r)]*, foram utilizadas como receptoras para transformação, clonagem e propagação de plasmídeos.

3.3.3- *S. cerevisiae*

As leveduras de *S. cerevisiae* da linhagem **INVSc1**, genótipo: *MATα his3Δ1 leu2 trp1-289 ura3-52/ MATα his3Δ1 leu2 trp1-289 ura3-52* foram utilizadas nos experimentos de marcação de quitina da parede celular; e **K616**, genótipo: *MATα pmr1::HIS3 pmc1::TRP1 cnb1::LEU2* e fenótipo auxotrófico: His⁻, Leu⁻, Trp⁻, Ura⁻ foram utilizadas para a expressão do gene *Afpmr1*.

3.4 - Gene da cálcio ATPase de *A. fumigatus*

3.4.1 - Desenho dos iniciadores oligonucleotídeos (*primers*)

O gene da cálcio ATPase de *A. fumigatus* (Afu2g05860) foi clonado em plasmídeo de manutenção PCR®2.1-TOPO® e, posteriormente, em plasmídeo de expressão em leveduras pYES-2®.

Os *primers* utilizados para estas clonagens estão representados na tabela 1.

Tabela 1 - *Primers* utilizados na amplificação do gene *Afpmr1* para clonagem em plasmídeo pYES-2®.

Primer	Seqüência
AfCaYES3	5'-CAGAGGATCC AAGATGG CAAGGTCCGCAACGCCTGC-3'
AfCaYES4	5'-GGTGAATTCCGTAT TCAA ACATTGACACTGTACC-3'

Os sítios de restrição estão sublinhados (AfCaYES3 - *Bam* HI; AfCaYES4 - *Eco* RI). A seqüência consenso KOZAK (AfCaYES3) e o STOP códon (AfCaYES4) estão em negrito.

A expressão da proteína recombinante no plasmídeo pYES-2 está sob o controle do promotor da galactose. Além disto, o plasmídeo apresenta o gene *URA3* que supri a auxotrofia de uracila das cepas de *S. cerevisiae* utilizadas.

3.4.2 - Reações em cadeia da polimerase (PCR)

As amplificações foram realizadas de acordo com SAIKI et al. (1985) e MEZEI & STORTS (1994), utilizando-se um Controlador Termal Programável (Mastercycler Gradient Eppendorf). O DNA plasmideal contendo o gene *AfCa* clonado (50 ng) foi incubado em um meio contendo $MgCl_2$, *primer forward* 1,6 $\mu\text{mol/L}$, *primer reverse* 1,6 $\mu\text{mol/L}$, dNTP 0,2 mmol/L, KCl 50 mmol/L, Tris-HCl 20 mmol/L pH 8,4 (volume final de 50 μL), em seguida desnaturado através da incubação a 94°C, durante 2 minutos. A reação foi iniciada pela adição da enzima *Taq* DNA polimerase 2,5 U e realizada com temperatura de desnaturação de 94°C por 1 minuto, temperatura de anelamento de 61°C por 1 minuto e extensão à 72°C por 1 minuto, com repetição de 30 ciclos.

3.4.3 - Eletroforese em gel de agarose

As eletroforeses em gel de agarose foram realizadas de acordo com SAMBROOK et al. (1989). Os géis de agarose foram preparados com tampão TAE. As amostras foram preparadas adicionando-se uma mistura contendo azul de bromofenol 0,25% (w/v), xileno cianol FF 0,25% (w/v), orange G 0,25% (w/v), sacarose 65% (w/v), EDTA 10 mmol/L e Tris-HCl 10 mmol/L pH 7,5. As corridas eletroforéticas foram processadas em uma cuba contendo tampão TAE, sob

tensão e período de tempo variáveis. Os géis foram corados por imersão em uma solução contendo brometo de etídeo (0,25 µg/mL) por 15 minutos, e em seguida foram lavados com água deionizada.

3.4.4 - Inserção dos fragmentos de DNA em plasmídeo

Os fragmentos de DNA amplificados foram extraídos do gel de agarose por meio de filtração em colunas centrifugáveis com membranas de 0,45 µm (Durapore® - MILLIPORE) e precipitados a -20°C por 12 horas com 10% (v/v) de acetato de sódio 3 mol/L pH 5,4 e 2 vezes o volume de etanol absoluto (v/v). O sedimento foi lavado com etanol 70% (v/v) gelado e seco. Em seguida, o DNA foi ressuspenso em água deionizada estéril.

Os fragmentos de DNA foram clonados em diferentes plasmídeos conforme descrito por MEZEI & STORTS (1994).

Na clonagem em plasmídeo PCR®2.1-TOPO® o fragmento amplificado foi incubado por 12 horas à temperatura ambiente com 10 ng/µL do plasmídeo e uma solução contendo Tris-HCl 16,6 mmol/L pH 8,3; KCl 83,3 mmol/L; MgCl₂ 4,16 mmol/L; gelatina 0,01% (w/v), NaCl 200 mmol/L e MgCl₂ 10 mmol/L, volume final de 3 µL.

Na clonagem no plasmídeo pYES-2®, após digestão do vetor e do fragmento amplificado com as enzimas de restrição apropriadas, estes foram incubados à 10°C por 48 horas com T₄ DNA ligase e tampão contendo Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,6; MgCl₂ 10 mmol/L, ATP 1 mmol/L, DTT 1 mmol/L, polietileno glicol-8000 5% (w/v).

3.4.5 - Preparo de células competentes

As células competentes foram produzidas de acordo com LENDERBERG & COHEN (1974) e MORRISON (1977). Células das cepa XL₁-Blue e DH5- α de *E. coli* foram semeadas, de estoques a -70°C ou de placas conservadas na geladeira, em 5 mL de meio LB e incubadas a 37°C sob agitação 150 rpm por 12 horas. Em seguida os 5 mL foram adicionados a 500 mL do mesmo meio LB e novamente incubadas nas mesmas condições anteriores até uma DO_{600nm} entre 0,6 e 0,7.

A cultura foi mantida no gelo por 5 minutos, centrifugada a 1000 *g* por 10 minutos a 4°C. As células foram lavadas com 100 mL de MgCl₂ 0,1 mol/L gelado, centrifugadas novamente por 10 minutos, ressuspensas em 100 mL de CaCl₂ 0,1 mol/L gelado, mantidas no gelo por 20 minutos, centrifugadas por 10 minutos, ressuspensas em 21,2 mL de CaCl₂ 0,1 mol/L gelado e 3,8 mL de glicerol 80% (v/v) estéril.

As células foram aliquotadas em volumes de 0,2 mL e armazenadas a -70 °C.

3.4.6 - Transformação de células competentes

A transformação das células competentes de *E. coli* XL₁-Blue e DH5- α foi realizada por choque térmico, de acordo com SAMBROOK et al. (1989). As células foram retiradas do freezer a -70°C e deixadas descongelar no gelo. Um volume de 50 μ L das células foi adicionado de 2 μ L da reação de ligação do plasmídeo, sem agitação.

A mistura foi incubada no gelo por 30 minutos, seguida do choque térmico a 42°C por 1-2 minutos. Após este tempo, as células foram colocadas em gelo novamente e adicionadas de 250 μ L do meio SOC. A suspensão de células foi agitada horizontalmente a 37°C a 225 rpm por 1 hora. As células foram semeadas em meio LB sólido contendo os antibióticos necessários para a seleção das bactérias (ampicilina 75 μ g/mL), juntamente com 40 μ L de IPTG 100 mmol/L e 20 μ L de X-Gal 40 mg/mL. Essas placas foram incubadas a 37°C por 12 horas e após o crescimento foram incubadas por 2 horas a 10°C para o desenvolvimento de cor nas colônias.

3.4.7 - Preparação em pequena escala de DNA plasmideal

A extração do plasmídeo foi realizada de acordo com SAMBROOK et al. (1989). Cada colônia selecionada foi semeada separadamente em tubos contendo 5 mL de meio LB líquido adicionado do antibiótico apropriado e cultivada sob agitação de 150 rpm por 12 horas a 37°C. Cerca de 1,5 mL da suspensão de células de cada tubo foram transferidos para tubos de microcentrífuga e centrifugados a 20.400 *g* por 1 minuto a 4°C. O sedimento foi ressuspenso em 100 µL de tampão de extração contendo glicose 50 mmol/L, EDTA 10 mmol/L e Tris-HCl 25 mmol/L pH 8,0 e foram adicionados 1 µL RNase A (10 µg/mL) e 200 µL de uma solução de NaOH 0,2 N/SDS 0,1% (w/v). A mistura foi homogeneizada gentilmente por 4-5 vezes. Foram adicionados 150 µL de acetato de sódio 3,0 mol/L pH 5,4. A suspensão foi centrifugada a 20.400 *g* por 15 minutos a 4°C. Ao sobrenadante, foram adicionados 400 µL de clorofórmio e a mistura foi homogeneizada em agitador mecânico. Após centrifugação a 20.400 *g* por 4 minutos a 4°C, a fase aquosa foi coletada e o DNA plasmideal foi precipitado com 1,0 mL de etanol absoluto. A mistura foi centrifugada a 20.400 *g* por 15 minutos a 4°C. O sedimento contendo o DNA

plasmídeo foi então lavado de etanol 75% (v/v), seco e ressuspenso em água deionizada estéril.

3.4.8 - Digestão do plasmídeo com enzima de restrição

A digestão do plasmídeo com enzima de restrição foi realizada de acordo com SAMBROOK et al. (1989). Cada µg de DNA foi digerido com 4 U de enzima de restrição *Eco* RI para garantir a digestão de todo plasmídeo da reação. A reação de digestão foi realizada a 37°C por 2 horas. A análise da digestão foi verificada por eletroforese em gel de agarose.

3.4.9 - Preparo e seqüenciamento das amostras selecionadas

As amostras selecionadas para seqüenciamento foram submetidas à nova extração de DNA plasmídeo utilizando-se o Kit QIAprep® Miniprep (QIAGEN). Foram então preparadas para a reação de seqüenciamento utilizando o kit BigDye™ Cycle Sequencing versão 3.11 (Abi Prism). Cerca de 250 - 500 ng do DNA plasmídeo, 2 µL do reagente BigDye, contendo os dideoxiribonucleotídeos marcados, 3,2 pmoles do *primer* apropriado e água deionizada estéril (q.s.p. 20 µL) foram submetidos a uma reação de amplificação com o

seguinte perfil termal: 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos, 60°C por 4 minutos, repetidos 35 ciclos. O produto do PCR foi precipitado pela adição de 2 µL de tampão acetato de sódio 3,0 mol/L pH 5,2 e 50 µL de etanol absoluto, incubando-se a 0°C por 15 minutos. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 20.400 g por 20 minutos a 4°C e após lavagem do precipitado com etanol 70% (v/v) a amostra foi seca e ressuspensa em tampão de carregamento (fornecido pelo fabricante). A reação de seqüenciamento foi realizada segundo SANGER et al. (1977) em um seqüenciador automático Applied Biosystems, modelo 3100.

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

Uma colônia isolada de *S. cerevisiae* da cepa K616 foi inoculada em 10 mL de meio YPD e incubadas a 30°C sob agitação constante por 12 horas.

Após este período foi determinada a DO_{600nm} da cultura, a qual foi diluída para 50 mL de meio YPD para uma DO_{600nm} final de 0,4 e incubada por mais 2 horas. As células foram centrifugadas a 600 g por 2 minutos e lavadas com 40 mL de tampão TE 1x. Em seguida foram novamente centrifugadas por 2 minutos, ressuspensas em 2 mL de solução TE 0,5x/LiAc 1x e incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos.

Para cada reação de transformação foram misturados 100 μ L de suspensão de células, 1 μ g de DNA plasmideal e 100 μ g de DNA de esperma de salmão desnaturado (Invitrogen). A esta mistura foi adicionado 700 μ L de solução contendo LiAc 1x/PEG-3640 40% (w/v)/TE 1x. Após homogeneização, a mistura foi incubada por 30 minutos a 30°C. Em seguida foram adicionados 88 μ L de DMSO e a suspensão foi incubada por 7 minutos a 42°C. Após a incubação, as células foram centrifugadas a 2.500 g por 10 segundos, lavadas com 1 mL de TE 1x, precipitadas novamente e ressuspensas em 50-100 μ L de TE 1x. Finalmente, as células transformadas foram semeadas em placas contendo meio de cultura seletivo SC-URA⁻.

3.4.11 - Complementação funcional

A complementação funcional do crescimento da cepa K616 de *S. cerevisiae* em meio suplementado com EGTA ou MnCl₂ foi realizada pelo método descrito por TON et al. (2002) com algumas modificações.

Uma colônia da cepa K616 transformada positivamente com o plasmídeo pYES-2-Afpmr1 foi semeada em meio SC-Ura⁻ contendo glicose 2% (w/v), CaCl₂ 10 mmol/L, base de nitrogênio para leveduras 0,7% (w/v) e ácido succínico-

Tris 50 mmol/L pH 5,5 e incubada por 12 horas a 30°C sob agitação constante.

Para os ensaios em meio de cultura sólido as células foram sedimentadas por centrifugação a 1000 *g* por 5 minutos a 4°C e lavadas por duas vezes com água estéril. As células foram ressuspensas em água estéril a uma DO_{600nm} de 1,0. Desta suspensão estoque de células foram realizadas diluições seriadas com fator de diluição de 10 vezes.

Cerca de 5 µL de cada diluição foram semeados em meio SC-Ura⁻ sólido contendo galactose 2% (w/v), rafinose 1% (w/v), base de nitrogênio para leveduras 0,7% (w/v), ácido succínico-Tris 50 mmol/L pH 5,5 e EGTA 10 mmol/L ou MnCl₂ 4 mmol/L e as placas foram incubadas a 30°C por 48 horas.

Para a realização dos ensaios em meio de cultura líquido, o pré-inóculo foi utilizado para semear 7 mL do meio SC-Ura⁻ líquido contendo galactose 2% (w/v), rafinose 1% (w/v), base de nitrogênio para leveduras 0,7% (w/v), ácido succínico-Tris 50 mmol/L pH 5,5 a uma DO_{600nm} inicial de 0,01. Foram utilizadas concentrações crescentes de EGTA e MnCl₂ nos diferentes tubos e a DO_{600nm} foi acompanhada em intervalos de 24 horas por um período de 3 dias.

3.4.12 - Análise da distribuição de quitina na parede celular de *S. cerevisiae*

A análise da distribuição e da quantidade de quitina na parede celular do *S. cerevisiae* foi realizada pelo método descrito por UCCELLETTI et al. (1999).

Alíquotas de 1×10^7 células de diferentes culturas expressando o gene *Afpmr1* foram lavadas por 2 vezes com PBS. Os sedimentos celulares foram ressuspensos em 100 μL de solução contendo calcoflúor 1 mg/mL e incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente. As células foram lavadas novamente por 2 vezes com PBS e ressuspensas em 500 μL de água destilada. As células foram visualizadas entre lâmina e lamínula em um microscópio ótico de fluorescência com filtro ultravioleta.

3.5 - Validação do gene *Afpmr1* como alvo quimioterapêutico

3.5.1 - Amplificação das seqüências invertidas

As amplificações dos fragmentos de DNA a serem utilizados para a clonagem no vetor de indução de RNAi foram realizadas de acordo com SAIKI et al. (1985) e MEZEI & STORTS (1994), utilizando-se um Controlador Termal Programável (Gradient Mastercycler Eppendorf). O DNA genômico (50 ng) foi incubado em um meio contendo MgCl_2 , *primer forward* 1,6 $\mu\text{mol/L}$, *primer reverse* 1,6 $\mu\text{mol/L}$, dNTP

0,2 mmol/L, KCl 50 mmol/L, Tris-HCl 20 mmol/L pH 8,4 (volume final de 50 µL), em seguida desnaturado através da incubação a 94°C, durante 2 minutos. A reação foi iniciada pela adição da enzima *Taq* DNA polimerase 2,5 U e os ciclos de amplificação seguiram o seguinte perfil termal: 95°C por 1 minutos, 65°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos, com 30 ciclos.

Tabela 2 - *Primers* utilizados na amplificação das seqüências repetidas invertidas do gene *Afpmr1* para clonagem em plasmídeo pALB-1.

PRIMERS RNAi	
Forward	5'-CGGCAGAGGG GTCGACAT AAGCTTATTG-3'
Reverse	5'-CTCGTCGAGGGCCCAGTCT TCTAGA TG-3'

Os sítios de restrição estão em negrito: GTCGAC - *Sal I*, AAGCTT - *Hind III*, GGGCCC - *Apa I*, TCTAGA - *Xba I*.

3.5.2 - Clonagem no vetor pALB1

Os fragmentos de DNA amplificados foram purificados por eletroforese em gel de agarose, extraídos do gel por meio de filtração em colunas centrifugáveis com membranas de 0,45 µm (Durapore® - MILLIPORE) e precipitados a -20°C por 12 horas com 10% (v/v) de acetato de sódio 3 mol/L

pH 5,4 e 2 vezes o volume de etanol absoluto (v/v). O sedimento foi lavado com etanol 70% (v/v) gelado. Em seguida, o DNA foi ressuspensão em água deionizada estéril.

Estes fragmentos, juntamente com o plasmídeo pALB1 foram submetidos à digestão com enzimas de restrição apropriadas, purificados e posteriormente, clonados. O plasmídeo pALB1 foi gentilmente cedido pela Dra. Isabelle Mouyna do Instituto Pasteur, Paris (MOUYNA et al., 2004).

Figura 3 - Construção utilizada na RNAi. A construção foi realizada clonando seqüências de 500 pb repetidas invertidas do gene *Afpmr1*. O vetor utiliza o promotor do gene da glucoamilase de *A. niger* (pGla), o terminador do gene *alb1* (*pksp*) e seqüências do próprio gene *alb1* como marcador para a transformação.

A clonagem foi realizada conforme descrito por MEZEI & STORTS (1994). Os fragmentos de DNA de 500 pb foram clonados invertidos para a produção de um RNA mensageiro dupla fita (Figura 3). Os fragmentos foram incubados com o vetor à 10°C por 48 horas com T₄ DNA ligase e tampão contendo Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,6; MgCl₂ 10 mmol/L, ATP 1 mmol/L, DTT 1 mmol/L, polietileno glicol-8000 5% (w/v).

3.5.3 - Produção de esferoplastos de *A. fumigatus*

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

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

3.5.4 - Transformação de *A. fumigatus*

A transformação foi realizada de acordo com o método descrito por TILBURN et al. (1983) com modificações.

Os esferoplastos foram ressuspensos em 1 mL de Solução 5 e incubados no gelo por 10 minutos. Após este período, cerca de 100 µL da suspensão de células foram adicionados de 4-20 µg de DNA (DNA ressuspenso em no máximo 20 µL) e misturados gentilmente. Cerca de 50 µL de Solução 4 foram adicionados à suspensão de esferoplastos e a mistura foi incubada no gelo por 10 minutos. Após este período, 1 mL da mesma Solução 4 foi adicionado e homogeneizado na suspensão, que foi incubada à temperatura ambiente por 20 minutos. Toda a suspensão foi diluída em 30 mL de meio mínimo TOP ÁGAR [ágar 1% (w/v)] contendo sacarose 1 mol/L e higromicina B 200 µg/mL. Os 30 mL da suspensão de conídios diluída foram distribuídos sobre 3 placas de Petri contendo meio mínimo [ágar 2% (w/v)] adicionado de sacarose 1 mol/L e higromicina B 200 µg/mL. As placas foram incubadas por 4 a 5 dias a 30°C para se verificar o crescimento dos clones transformados.

3.5.5 - Seleção dos clones positivos para a RNAi

A seleção dos clones positivos para a RNAi foi realizada através da indução do silenciamento do gene *reporter* (*alb1*) com diferentes fontes de carbono no meio de cultura (MOUYNA et al., 2004).

Os clones foram semeados pontualmente e separadamente em placas de Petri contendo meio mínimo com xilose (repressor) ou maltose (indutor) 2% (w/v) como fonte de carbono e higromicina B 200 µg/mL. Após incubação por 4 a 5 dias a 30°C, as colônias brancas ou verde claras crescidas em meio mínimo contendo maltose e verde escuras crescidas no mesmo meio contendo xilose foram consideradas positivas para a transformação e para a RNAi.

3.5.6 - Real-Time PCR

3.5.6.1 - Extração de RNA, quantificação e eletroforese

Os RNAs de diferentes culturas foram extraídos pelo método do Trizol®. Cerca de 5×10^6 a 1×10^7 conídios foram congelados em nitrogênio líquido e macerados em gral e pistilo. Após a maceração foi adicionado 1 mL de reagente Trizol® e a mistura foi homogeneizada. O homogenato foi incubado por 5 minutos à temperatura ambiente, em seguida foram adicionados 200 µL de clorofórmio e a mistura foi

homogeneizada vigorosamente. A mistura foi centrifugada a 12.000 *g* por 10 minutos a 4°C e a fase aquosa superior foi transferida para outro tubo contendo 500 µL de isopropanol. Novamente, a mistura foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugada a 12.000 *g* por 10 minutos a 4°C. O precipitado foi lavado com etanol 75% (w/v) preparado com água-DEPC, seco à temperatura ambiente e ressuspenso em água-DEPC.

O RNA foi quantificado espectrofotometricamente em comprimento de onda de 260 nm e sua integridade foi verificada por eletroforese em gel de agarose, em condições desnaturantes (SAMBROOK et al., 1989).

3.5.6.2 - RT-PCR

Os RNAs extraídos foram tratados com DNase para eliminar possíveis contaminações com DNA.

Cerca de 20 µg de RNA foram incubados a 37°C por 2 horas com 5 U de DNase I livre de RNase em um volume final de 100 µL contendo DTT 5 mmol/L, 1 µL de RNase OUT (inibidor de RNase recombinante) e o tampão apropriado da enzima (Tris-HCl pH 8,0 40 mmol/L; MgSO₄ 10 mmol/L e CaCl₂ 1 mmol/L). Para verificar a eficiência do tratamento com DNase I, foi realizada PCR para o gene constitutivo do

fragmento 18S do RNA ribossômico de *A. fumigatus* utilizando os *primers* descritos na tabela 3.

Tabela 3 - *Primers* para o gene do fragmento 18S do RNA ribossômico de *A. fumigatus*.

PRIMERS 18S	
Forward	5'-ATTGGAGGGCAAGTCTGGTG-3'
Reverse	5'-CCGATCCCTAGTCGGCATAG-3'

O RNA foi extraído na proporção de 1:1 com a mistura de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (SAMBROOK et al., 1989) e precipitado com isopropanol conforme descrito anteriormente.

O RNA livre de DNA foi ressuspenso em 12 µL de água-DEPC e submetido à reação de RT-PCR para a síntese de cDNA pelo kit comercial SuperScript® first-strand synthesis system. O RNA foi incubado por 5 minutos a 65°C com dNTP 0,5 mmol/L e *primer* oligo(dT)₁₂₋₁₈ 0,5 µg. Após este período a mistura foi incubada por 1 minuto em banho de gelo e adicionada de MgCl₂ 5 mmol/L, DTT 10 mmol/L, 1 µL de RNase OUT, e tampão contendo Tris-HCl 20 mmol/L pH 8,4; KCl 50 mmol/L. Novamente, a mistura foi incubada a 42°C por 2 minutos e então adicionada de 50 U de transcriptase

reversa SuperScript®. Após a adição da enzima, a mistura foi a foi incubada a 42°C por 50 minutos seguidos de 15 minutos a 75°C. A reação foi terminada com adição de 1 µL de RNase H e incubação a 37°C por 20 minutos.

3.5.6.3 - Real Time-PCR

A quantificação do nível de expressão do gene *Afpml1* foi realizada no laboratório de Biologia Molecular do Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman (FCFRP-USP) em um aparelho de PCR em tempo real ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystem) utilizando *primers* LUX (Invitrogen).

Os *primers* utilizados foram desenhados no programa D-LUX® Designer Software (<http://www.invitrogen.com/content.cfm?pageid=11263>) e suas seqüências estão representados na tabela 4.

Tabela 4 - *Primers* utilizados nos experimentos de real-time PCR

PRIMERS <i>Afpmr1</i>	
Forward	5'-GTCCACATCGGCATACTCCCTA-3'
Reverse	5'-CGGACCCTCTGCCGGTGTAAGTC [FAM] G-3'
PRIMERS β-tubulina	
Forward	5'-GTCGTACAGAGCCTCGTTGTCG-3'
Reverse	5'-CGAGCCCTCTCCGTTACCAGCT [FAM] G-3'
FAM - 6-carboxifluoresceína	

As possíveis variações na concentração inicial de RNAm entre as amostras foram corrigidas através da normalização com o gene constitutivamente expresso da β -tubulina.

Todas as reações de PCR foram realizadas em duplicata com um volume final de 10 μ L contendo 5 μ L do reagente Taq-Man® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 2 μ L dos *primers* a uma concentração de 1 μ mol/L cada e 1 μ L do cDNA. O perfil termal utilizado para as reações de PCR foi de 50°C por 2 minutos seguido de 40 repetições de 95°C por 10 minutos e 60°C por 1 minuto. Foram realizadas reações controle contendo apenas o reagente Master Mix e

os *primers* para se verificar contaminações e a autofluorescência do *primers* marcados.

Inicialmente, foram realizadas curvas de calibração para os dois pares de *primers* com diferentes concentrações de DNA genômico. A quantidade inicial do número de cópias dos genes de interesse utilizada na construção das curvas de calibração foi determinada através de duas considerações: o *A. fumigatus* é um organismo haplóide e, portanto os genes investigados são representados uma única vez em seu genoma. Além disto, considerando que o tamanho do genoma do *A. fumigatus* é igual a 29,4 Mb (NIERMAN et al., 2005), um genoma corresponde a aproximadamente 30 fg (10^{-15} gramas). Portanto, teoricamente, cada 30 fg de DNA genômico de *A. fumigatus* correspondem a uma cópia de cada um dos genes do fungo.

Desta forma, foram realizadas reações com diferentes diluições (tabela 5) do DNA genômico do fungo e por meio de regressão linear foi determinada a equação da reta correspondente à curva de calibração para cada par de *primers*.

Tabela 5 – Diluições do DNA genômico presentes na curva de calibração dos *primers*.

Nº de cópias/μL	Concentração do DNA
1	30 fg/ μ L
10	300 fg/ μ L
10^2	3 pg/ μ L
10^3	30 pg/ μ L
10^4	300 pg/ μ L
10^5	3 ng/ μ L
10^6	30 ng/ μ L
10^7	300 ng/ μ L

Uma vez estabelecidas as equações das curvas de calibração e, considerando um coeficiente de correlação linear (R^2) maior que 0,99, as amostras provenientes dos diferentes tratamentos foram analisadas.

3.5.7 – Ensaio de fagocitose

O ensaio de fagocitose de conídios por macrófagos foi adaptado de PHILIPPE et al. (2003).

Os macrófagos foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos C57 Black 6 (animais isogênicos) provenientes do biotério II da FCFRP-USP. Os animais foram

sacrificados em câmara de CO₂ e as células coletadas por lavagem peritoneal com PBS estéril. As células foram ressuspensas em meio RPMI-1640 (Gibco-brl) completo [Soro bovino fetal 10% (v/v) e penicilina 0,1 mg/mL] na concentração de 4×10^6 cél/mL. Cerca de 250 µL da suspensão foram distribuídos em placas de polipropileno de 24 poços e adicionados de mais 250 µL do meio de cultivo. As células foram incubadas por 12 horas a 37°C em estufa de CO₂. Após este período, o sobrenadante foi retirado e os macrófagos permaneceram aderidos à placa. Cerca de 250 µL de uma suspensão de conídios, provenientes de uma cultura em meio sólido de 48 horas, contendo $1,2 \times 10^8$ conídios/mL foram adicionados em cada poço e a mistura de conídios e macrófagos foi incubada por 30 minutos, 2 e 4 horas em estufa de CO₂. Após cada tempo de incubação o sobrenadante foi retirado e cerca de 150 µL de PBS estéril gelado foram adicionados a cada poço. Os macrófagos foram retirados da placa por raspagem com alça estéril. A suspensão de células foi recuperada e cerca de 50 µL foram aplicados em uma centrífuga de células. As células foram centrifugadas a 500 rpm por 3 minutos à temperatura ambiente e as lâminas foram coradas por Giemsa. Para cada lâmina foram contadas 50 células e dois parâmetros foram avaliados: 1.

nº de células com pelo menos 1 conídio fagocitado (% de fagocitose); 2. média do nº de conídios por macrófago. Cada tempo de incubação foi realizado em triplicata.

3.5.8 - *Killing* de macrófagos

O ensaio de *killing* de conídios por macrófagos foi adaptado de SMAIL et al. (1992).

Os macrófagos foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos C57 Black 6 da mesma forma como descrito anteriormente.

Cerca de 4×10^5 células foram incubadas em cada poço de uma placa de 96 poços, em meio RPMI completo, por 12 horas a 37°C em estufa de CO₂. Após este período, o sobrenadante foi descartado e foram adicionadas as suspensões de conídios ($1,2 \times 10^6$ células por poço) que foram preparadas a partir de placas incubadas por 48 horas e posteriormente incubadas por mais 16 horas a 30°C para a ativação metabólica dos conídios (*swelling*). A mistura de células foi incubada por 30 minutos, 2 e 4 horas, sendo que ao final de cada tempo as placas foram centrifugadas a 2000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 100 µL de solução contendo Triton X-100 1% (w/v). A mistura foi incubada a temperatura ambiente por 10 minutos e posteriormente centrifugada a 2000 g por

10 minutos. O precipitado foi lavado por duas vezes com 100 μ L de água deionizada estéril e posteriormente, ressuspenso em 100 μ L de meio RPMI sem o vermelho fenol, contendo MTT 0,5 mg/mL. As placas foram protegidas da luz e incubadas a 37°C por 2 horas. Após este período, o sedimento foi recuperado com centrifugação a 2000 g por 10 minutos. As placas foram invertidas sobre papel de filtro para se eliminar o excesso de MTT e posteriormente, o pellet foi ressuspenso em 200 μ L de isopropanol e incubado à temperatura ambiente por pelo menos 12 horas com proteção da luz. Após este período, as placas foram submetidas à leitura em comprimento de onda de 570 nm. Como branco foi utilizado isopropanol, como controle negativo foram utilizados apenas os macrófagos e como controle positivo, apenas os conídios.

Para cada tempo analisado foram realizadas reações em triplicata.

A porcentagem de atividade microbicida foi avaliada pela fórmula abaixo:

$$\% = 1 - [\text{DO}_{570\text{nm}} \text{ da amostra} / \text{DO}_{570\text{nm}} \text{ controle positivo}] \times 100$$

3.5.9 - Análise estatística

A análise estatística utilizada para comparação entre os valores de nível de expressão do gene *Afpmr1* após RNAi

foi o teste t não pareado e para a comparação entre os valores de porcentagem de fagocitose ou número médio de conídios em cada macrófago foi a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls. Ambos foram realizados pelo programa GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., versão 4.00, 2003).

4. RESULTADOS

4.1 - Expressão heteróloga do gene da cálcio ATPase de *A. fumigatus*

Com o intuito de caracterizar o gene da cálcio ATPase de *A. fumigatus*, a sequência do gene foi clonada em plasmídeo de expressão em leveduras pYES-2® e este transformado em *S. cerevisiae* cepa K616.

A amplificação do gene da cálcio ATPase foi realizada com os *primers* AfCaYES3 e AfCaYES4 contendo sítios de restrição para as enzimas *Bam* HI e *Eco* RI. O fragmento de amplificação de aproximadamente 3.195 nucleotídeos apresentou-se como uma banda única, bem definida e de tamanho esperado. Este produto de PCR foi inserido em plasmídeo PCR®2.1-TOPO® e enviado para seqüenciamento para se verificar a possibilidade de mutações indesejadas na sequência.

Uma vez confirmada a sequência amplificada, este fragmento foi submetido à digestão com enzimas de restrição apropriadas (*Bam* HI e *Eco* RI) para a produção de extremidades coesivas e posterior clonagem em vetor de expressão em leveduras pYES-2®.

A inserção do fragmento amplificado foi confirmada através da eletroforese em gel de agarose dos produtos da digestão do vetor pYES-2® recombinante. Pode-se observar que após a digestão, a presença de duas bandas de tamanhos

distintos, uma em torno de 3 kb, correspondendo ao gene amplificado (*Afpmr1*) e outra em torno de 6 kb, representando o vetor.

O vetor pYES-2-*Afpmr1* foi novamente enviado para seqüenciamento para se confirmar a correta fase de leitura.

Figura 4 - Fotografia do gel de eletroforese em agarose 1,0% (w/v) em tampão TAE dos produtos da digestão dos clones pYES-2-*Afpmr1* com enzimas de restrição *Bam* HI e *Eco* RI.

Uma vez confirmada a correta fase de leitura, o vetor pYES-2-*Afpmr1* foi transformado em células de *S. cerevisiae*, cepa K616. Os clones positivos da transformação foram isolados e utilizados em ensaios de expressão da proteína AfPMR1.

Com o objetivo de verificar o padrão de expressão em função do tempo de incubação com galactose, alíquotas de células em diferentes tempos de indução foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE (resultados não apresentados).

Com o passar do tempo de indução, a expressão da proteína alvo (AfPMR1) não pôde ser visualizada pelos géis, uma vez que não se evidencia uma banda de peso molecular em torno de 114 kDa (tamanho esperado para a proteína recombinante AfPMR1) com concentrações crescentes no decorrer do tempo.

Como não foi possível acompanhar o perfil de expressão do gene da Ca^{2+} -ATPase em sistema heterólogo pelo gel de SDS-PAGE, foram realizados ensaios de complementação funcional em meios de cultura seletivos. As figuras 5 e 6 são ilustrativas de uma série de experimentos realizados para a padronização da complementação funcional. A complementação funcional da cepa K616 de *S. cerevisiae* foi observada em meio de cultivo suplementado com EGTA ou MnCl_2 .

A figura 5 mostra a diferença de crescimento da cepa K616 contendo o plasmídeo pYES-2® quando comparada com diferentes clones transformados com o mesmo plasmídeo contendo o gene clonado (pYES-2-Afpmr1), em meio de cultura suplementado com EGTA 10 mmol/L. As colunas 2 e 3 representam diferentes clones. As suspensões de células com $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$ 0,01 e 0,001 apresentam uma grande diferença de crescimento, sendo que os clones contendo o gene *Afpmr1*

mantêm o crescimento quando comparados com o respectivo controle (coluna 1).

Figura 5 - Fotografia de uma cultura de 48 horas de diferentes clones de *S. cerevisiae* cepa K616 em meio SC-Ura⁻ suplementado com EGTA 10 mmol/L. 1.Cepa K616 contendo pYES-2®; 2 e 3.Cepa K616 contendo pYES-2-Afpmr1. As colunas 2 e 3 representam diferentes clones.

A figura 6 mostra a diferença de crescimento, em meio de cultura suplementado com MnCl₂ 4 mmol/L, da cepa K616 contendo o plasmídeo pYES-2 quando comparada com diferentes clones transformados com o mesmo plasmídeo contendo o gene clonado (pYES-2-Afpmr1). As colunas 2 e 3 representam diferentes clones. As suspensões de células com DO_{600nm} 0,01 e 0,001 apresentam uma grande diferença de crescimento, sendo que os clones contendo o gene *Afpmr1*

mantêm o crescimento quando comparados com o respectivo controle (coluna 1).

Figura 6 - Fotografia de uma cultura de 48 horas de diferentes clones de *S. cerevisiae* cepa K616 em meio SC-Ura⁻ suplementado com MnCl₂ 4 mmol/L. 1.Cepa K616 contendo pYES-2®; 2 e 3.Cepa K616 contendo pYES-2-Afpmr1. As colunas 2 e 3 representam diferentes clones.

Com o objetivo de verificar a complementação funcional da cepa K616 em diferentes tempos de crescimento e concentração de EGTA, a DO_{600nm} dos diferentes transformantes foi acompanhada por 24, 48 e 96 horas.

A figura 7 relaciona o crescimento das diferentes cepas, em 24 horas de incubação a 30°C, com concentrações de EGTA de 5, 10 e 20 mmol/L. A cepa contendo apenas o vetor de expressão permaneceu na DO_{600nm} inicial de 0,01,

enquanto a cepa contendo o gene *Afpmr1* expresso manteve o crescimento (DO_{600nm} 0,02).

Figura 7 - Complementação funcional do *S. cerevisiae* pela *AfPMR1* após 24 horas. Os clones transformados foram incubados em meio Sc-Ura⁻, contendo diferentes concentrações de EGTA, por 24 horas a 30°C.

Com o aumento do tempo de incubação para 48 horas, ambas as cepas cresceram, mantendo uma diferença de crescimento entre a cepa contendo o vetor e a cepa contendo o gene expresso nas diferentes concentrações de EGTA analisadas (Figura 8). Nesta figura, pode ser observado que conforme a concentração de EGTA aumenta, ocorre uma diminuição do crescimento da cepa controle (pYES-2®) e uma manutenção do crescimento da cepa transformada (pYES-2-*Afpmr1*), sendo que na concentração de 20 mmol/L de EGTA, a cepa complementada apresentou um crescimento 3 vezes maior que a cepa controle.

Figura 8 - Complementação funcional do *S. cerevisiae* pela *AfPMR1* após 48 horas. Os clones transformados foram incubados em meio Sc-Ura⁻, contendo diferentes concentrações de EGTA, por 48 horas a 30°C.

Com o aumento no tempo de incubação (96 horas), foi mantida a diferença de crescimento entre as duas cepas em todas as concentrações. No entanto, esta diferença foi minimizada e nas concentrações de 10 e 20 mmol/L de EGTA a diferença de crescimento permaneceu bastante evidente (figura 9). Com 10 mmol/L de EGTA a cepa complementada apresentou um crescimento 34% maior que a cepa controle e, com 20 mmol/L de EGTA esta diferença foi de 105%.

Figura 9 - Complementação funcional do *S. cerevisiae* pela *AfPMR1* após 96 horas. Os clones transformados foram incubados em meio Sc-Ura⁻, contendo diferentes concentrações de EGTA, por 96 horas a 30°C.

Os resultados apresentados nas figuras 5 a 9 mostram que a expressão do gene *Afpmr1* foi eficiente na reversão da sensibilidade a baixas concentrações de cálcio e altas concentrações de manganês, da cepa mutante K616, fazendo com que esta cepa se apresentasse tolerante ao EGTA e ao MnCl₂.

Além disto, tem sido demonstrado que alterações na homeostase de íons cálcio pode alterar a composição da parede celular, modificando a proporção de quitina e alterando os níveis de glucanas álcali insolúveis (β -1,3 e β -1,6-glucanas).

Desta forma, com o intuito de verificar se a composição da parede celular dos diferentes clones

permanecia semelhante à parede celular da cepa selvagem, foi realizado ensaio para a determinação da distribuição de quitina através da marcação com calcoflúor.

A figura 10 mostra fotografias de diferentes células de *S. cerevisiae* cultivadas em meio SC-Ura⁻, marcadas com calcoflúor.

Figura 10 - Fotografias de células de *S. cerevisiae* cultivadas em meio SC-URA⁻ por 24 horas a 30°C, marcadas com calcoflúor e visualizadas em microscópio de fluorescência com filtro de ultravioleta. A. cepa INVSc1-pYES-2®; B. cepa K616-pYES-2®; C. cepa K616-pYES-2-Afpmr1. As células foram observadas sob aumento de 400x.

Na figura 10A, uma célula da cepa INVSc1 (cepa não relacionada e sem mutações em genes do metabolismo de cálcio e manganês), transformada com o vetor pYES-2®,

apresenta uma leve marcação na parede celular distribuída de forma polar. Na figura 10B as células da cepa K616 transformadas com o vetor pYES-2® apresentam-se intensamente marcadas, com leve aumento de fluorescência nos brotamentos, indicando uma grande deposição de quitina na parede celular. Por outro lado, na figura 10C, a mesma cepa K616 foi transformada com o vetor de expressão contendo o gene *Afpmr1* e a distribuição de quitina volta aos níveis mostrados na figura 10A.

Estas evidências mostram que a presença do gene da cálcio ATPase do tipo PMR1 em células mutantes para este gene revertem a distribuição de quitina nestas células a níveis encontrados na cepa INVSc1.

A figura 11 mostra as fotografias do cultivo das cepas de *S. cerevisiae* em meio completo YPG incluindo a cepa mutada K616 não transformada com o vetor de expressão. As figuras 11A, C e D apresentam o mesmo padrão de marcação que o apresentado na figura 10, mostrando que a expressão do gene *Afpmr1* (figura 11D) reverte a distribuição de quitina na cepa K616 aos níveis encontrados na cepa não relacionada INVSc1 (figura 11A), mesmo em meio de cultivo completo. Além disto, na figura 11B pode-se visualizar a distribuição de quitina na cepa K616 sem o plasmídeo de expressão. Nesta cepa, a marcação

de quitina pelo calcoflúor apresentou alta intensidade e igual distribuição pela célula, exceto um pequeno acúmulo na região de brotamento. A figura 11B mostra ainda uma parede celular muito espessa, o que sugere uma alteração na composição da parede celular.

Figura 11 - Fotografias de células de *S. cerevisiae* cultivadas em meio YPG por 24 horas a 30°C, marcadas com calcoflúor e visualizadas em microscópio de fluorescência com filtro de ultravioleta. A. cepa INVSc1-pYES-2®; B. cepa K616; C. cepa K616-pYES-2®; D. cepa K616-pYES-2-Afp*mr1*. As células foram observadas sob aumento de 400x.

Tanto em meio de cultura seletivo (SC-Ura⁻), quanto em meio completo (YPG), as células deficientes no gene *pmr1* apresentam intensa deposição e uma distribuição homogênea de quitina, evidenciando que a deleção do gene

da Ca^{2+} , Mn^{2+} -ATPase pode alterar a composição da parede celular.

4.2 - Interferência de RNA

A amplificação de um fragmento para a construção do vetor de interferência foi realizada selecionando uma região de 500 pb do gene *Afpmr1*. Esta região do gene foi selecionada por análises de alinhamentos com cálcio ATPases de diferentes espécies. A tabela 6 mostra a identidade entre o fragmento selecionado para a RNAi e várias cálcio ATPases de diferentes organismos.

Tabela 6 - Identidade entre o fragmento do gene *Afpmr1*, selecionado para a RNAi, e diferentes Cálcio ATPases.

<i>Organismo</i>	<i>Classe da</i> <i>Ca^{2+}-ATPase</i>	<i>Identidade</i> <i>(%)</i>
<i>T. cruzi</i>	SERCA	15
<i>A. fumigatus</i>	PMCA	7
<i>S. cerevisiae</i>	PMCA	3
<i>D. discoideum</i>	PMCA	6
<i>K. lactis</i>	PMR1	27
<i>N. crassa</i>	PMR1	57
<i>A. niger</i>	PMR1	70

A tabela mostra que entre Ca^{2+} -ATPases da classe PMR1 a identidade é elevada (27, 57 e 70% com os genes de *K. lactis*, *N. crassa* e *A. niger*, respectivamente). No entanto, comparando com genes de outras cálcio ATPases, a identidade apresenta-se bastante pequena, inclusive com uma cálcio ATPase do tipo PMCA de *A. fumigatus* (7%). Com relação ao gene da cálcio ATPase do tipo SERCA de *T. cruzi*, a identidade foi de 15%.

A figura 12 mostra a sequência de nucleotídeos utilizada para a produção dos fragmentos a serem clonados no plasmídeo pALB1.

```

1  ATGTCAAGGTCCGCAACGCCTGCGCTACCTTTGCATAATGCCCAGGCCCCCGATTTCGAGA
61  CATCATCCAGAGCCCCTGTAGACAGGCGTGCGGTACCATCAATGACACGTCCACATCGA
121 CATACTCCCTATTAGGTCCTGAAGAAACCGCGGAACGCCTACAGACATCTCTCCTTCACG
181 GACTTACACCGGCAGAGGTCGACATAAGCTTATTGCGAGATGGTCCAAACGAACGACCGC
241 ATGAGGAACCGGAGCCCTTGTGGCTTCGGTTTTCTCAAACAGTTCAAGGAGACACTAATCC
301 TTCTTCTGTTGGCGTCCGCGGCCATCTCATTTTTTATGGGCAATTACGATGACGCCGTCA
361 GCATTACCCCTCGCTGTGACTATTGTGGTGACCGTCGGGTTCGTTTCAGGAGTACAGGTCTG
421 AAAAGTCCTTGGAGGCATTAAACCGTCTCGTGCCCCATCACGCACACCTCATCCGCGACG
481 TTCCCCCGTCGAGCGCTCCTCTTATGAATAACTCTACAACCTGCTGCTTTAGGGCCGGATA
541 TCGAACTGGAGGATCTTGCGAGCAAGAGCCCCAGCTCGGCATCGGCGGCTATCAAAGCGT
601 CGAGTACGGTCTTGGCCTCCGAACCTGTGCGCCGGGGATTGTTCTTTTTACCACAGGCG
661 ACCGCATTCCCGCGGACATACGGATTACTGCATCTAGAGACTGGGCCCTCGACGAGTCGA
721 ACTTGACTGGCGAGAACGAGCCTGTGGCCAAATATCCCGAGGCACTTCGCAGCACCAAGG

```

Figura 12 - Sequência nucleotídica da região 5' terminal do gene *Afpmr1* selecionada para RNAi. Os *primers* utilizados na amplificação do fragmento para RNAi estão em negrito. Os nucleotídeos sublinhados foram mutados para a inserção dos sítios de restrição.

O fragmento do gene *Afpmr1* foi clonado em duas regiões do plasmídeo, em orientações invertidas, para permitir a formação de uma estrutura *stem-loop*, que permite o reconhecimento de um RNA dupla fita pela maquinaria de interferência do *A. fumigatus*. A figura 13 ilustra o RNA dupla fita formado após transcrição do plasmídeo pALB1/*Afpmr1*.

Figura 13 - Esquema da estrutura *stem-loop* para a RNAi. O esquema mostra a dupla fita de RNA formada após transcrição do plasmídeo pALB1/*Afpmr1*.

Após transformação e integração ectópica do vetor de interferência no genôma, os clones foram selecionados em meio contendo higromicina B, uma vez que o plasmídeo pALB1 apresenta o gene de resistência ao antibiótico (higromicina B fosfotransferase). Os clones resistentes à higromicina foram semeados individualmente em meio contendo xilose e maltose. Foram considerados positivos para a RNAi os clones que assumiram coloração branca (fenótipo completo) ou verde clara (fenótipo intermediário) em meio contendo maltose e coloração verde escura em meio contendo xilose.

O clone contendo apenas o plasmídeo pALB1 transformado foi utilizado como controle, uma vez que o silenciamento do gene *Afpmr1* foi realizado juntamente com o gene *alb1*. Estes clones controle apresentaram coloração branca e verde escura quando semeados em meio contendo maltose e xilose, respectivamente (dados não mostrados).

Figura 14 - Fotografias dos clones cultivados em meio mínimo contendo xilose ou maltose. 1. clone pALB1/*Afpml* com fenótipo completo (A.maltose; B.xilose). 2. clone pALB1/*Afpml* com fenótipo intermediário (A.maltose; B.xilose).

A figura 14 é representativa de vários clones obtidos após a transformação da cepa CEA 17 *pyrG*⁺ de *A. fumigatus*. Em ambos os clones, o crescimento foi observado após 5 dias de incubação a 30°C ou 2 dias de incubação a 37°C. Na figura 14.1, a colônia crescida em meio contendo xilose (B) apresentou coloração verde escura, enquanto, em meio indutor da RNAi a coloração da colônia foi branca (A),

evidenciando um clone com fenótipo completo. Na figura 14.2, o clone submetido à indução de RNAi apresentou coloração verde clara (A) e quando cultivado em meio repressor da RNAi, apresentou coloração verde escura no centro da colônia e branca nas bordas (B), sendo considerado fenótipo intermediário.

Uma vez estabelecido o fenótipo dos transformantes, um clone de fenótipo completo foi selecionado aleatoriamente para a quantificação do nível de expressão do gene *Afpmr1* após indução da RNAi.

Para a extração do RNAm, o clone foi submetido a diferentes condições de crescimento, considerando a disponibilidade da fonte de carbono e o tempo de incubação em meio indutor de RNAi. A figura 15 mostra a comparação do nível de expressão do gene *Afpmr1* entre o transformante submetido à RNAi e o controle CEA 17 *pyrG+* quando cultivados em meio mínimo contendo maltose a 2% (w/v) por 16 horas a 30°C. O nível de expressão do gene *Afpmr1* no clone submetido à RNAi apresentou uma diminuição de 98,4% quando comparado à expressão do clone controle (WT).

A condição de crescimento analisada na figura 15 é representativa de diversas outras condições analisadas.

Figura 15 - Nível de expressão do gene *Afpmr1* nos clones CEA 17 *pyrG+* (WT) e pALB1/*Afpmr1* (RNAi) cultivados em meio indutor de RNAi. Os resultados foram normalizados pelo nível de expressão do gene constitutivo β -tubulina. * indica diferença significativa ($p < 0,0001$) quando comparado ao grupo WT. Os valores são representativos de 3 repetições.

4.3 - Validação do alvo quimioterapêutico

Uma vez estabelecidas condições nas quais o nível de expressão do gene *Afpmr1* apresentou-se bastante reduzido, o clone submetido à RNAi foi utilizado em ensaios que pudessem verificar alterações fenotípicas importantes para a validação da proteína AfPMR1 como alvo quimioterapêutico.

Para tanto, foram utilizados ensaios de fagocitose e *killing* de conídios por macrófagos de camundongos.

O ensaio de fagocitose foi acompanhado por diferentes tempos de incubação dos conídios e macrófagos peritoniais de camundongos isogênicos (figura 16).

Nos ensaios de fagocitose, as cepas foram divididas em quatro grupos. As cepas ALB Xil, com o plasmídeo pALB1 cultivada em meio contendo xilose; ALB Malt, com o plasmídeo pALB1 cultivada em meio contendo maltose e Ca Xil, com o plasmídeo pALB1/*Afpmr1* cultivada em meio com xilose, foram utilizadas como controles; e a cepa Ca Malt, com o plasmídeo pALB1/*Afpmr1* cultivada em meio contendo maltose (RNAi do gene *Afpmr1*).

Os gráficos mostram o índice de fagocitose dos clones cultivados em meios contendo xilose (repressor da RNAi) ou maltose (indutor da RNAi) como fonte de carbono. Este índice representa a porcentagem de macrófagos que fagocitaram pelo menos 1 conídio durante o tempo de incubação. Em 30 minutos (Figura 16A) houve uma diminuição significativa da fagocitose das cepas ALB Malt e Ca Malt, quando comparadas com seus respectivos controles cultivados em meio contendo xilose (ALB Xil e Ca Xil). Com o aumento do tempo de incubação para 2 horas (Figura 16B), os níveis de fagocitose para o clone ALB Malt foram de $92,0 \pm 4,1\%$, semelhantes aos observados para seu controle, cultivado em meio contendo xilose (ALB Xil - $96,0 \pm 4,0\%$).

No entanto, o clone Ca Malt permaneceu com um percentual de fagocitose baixo ($39,3 \pm 5,9\%$) quando comparado com seu respectivo controle (Ca Xil - $89,3 \pm$

5,7%) e com o clone ALB Malt ($92,0 \pm 4,1\%$). Resultados semelhantes foram observados no tempo de 4 horas ($60,0 \pm 3,0\%$ para Ca Malt; $86,6 \pm 7,4\%$ para Ca Xil e $96,0 \pm 1,1\%$ para ALB Malt) (Figura 16C).

Figura 16 - Ensaio de fagocitose. A. 30 minutos; B. 2 horas; C. 4 horas de incubação. ALB representa o clone pALB1 e Ca representa o clone pALB1/*Afpml1*. Xil (xilose) e Malt (maltose) indicam a fonte de carbono do meio de cultivo. # indica diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao respectivo grupo controle (Xil). * indica diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo ALB Malt. Os valores são representativos de 3 repetições.

A figura 17 é representativa dos experimentos de fagocitose e podem ser observados macrófagos em estado ativado ou sensibilizados com a presença dos conídios, nos quais o citoplasma apresenta vários vacúolos e o tamanho das células é bastante aumentado. Nestas células, o volume nuclear também está aumentado, indicando intensa atividade transcripcional. Além destes, outros macrófagos que iniciaram o processo de fagocitose e apresentam conídios em seu interior podem ser visualizados.

Figura 17 - Fotografia do ensaio de fagocitose. Imagem capturada em microscópio ótico, sob aumento de 100x (imersão), de uma lâmina contendo os macrófagos e conídios corados com Giemsa. A seta branca indica um macrófago sensibilizado ou ativado. As setas pretas largas representam macrófagos com conídios fagocitados. A seta preta fina representa um conídio não fagocitado.

Outro índice que foi avaliado no ensaio de fagocitose foi o número médio de conídios fagocitados por cada macrófago. A figura 18 representa o número médio de conídios por macrófago, avaliado em função do tempo de incubação.

No tempo de 30 minutos de incubação entre os macrófagos e os conídios, o número médio de conídios fagocitados das cepas ALB Malt ($3,8 \pm 0,6$) e Ca Malt ($3,1 \pm 0,2$) é maior quando comparado com os resultados observados para as respectivas cepas controle ALB Xil ($2,9 \pm 0,2$) e Ca Xil ($2,1 \pm 0,2$). A partir de 2 horas de incubação, ocorreu um aumento no número médio de conídios

fagocitados por cada macrófago para os clones ALB Malt ($3,3 \pm 0,5$), ALB Xil ($3,7 \pm 0,7$) e Ca Xil ($3,9 \pm 0,8$), enquanto ocorreu uma diminuição, não estatisticamente significativa ($p>0,05$), para o clone Ca Malt ($3,9 \pm 0,8$). Esta diminuição é acentuada no tempo de incubação de 4 horas, sendo que neste tempo, o número médio de conídios fagocitados da cepa Ca Malt ($1,6 \pm 0,1$) foi estatisticamente diferente do seu respectivo controle Ca Xil ($3,6 \pm 0,7$) e da cepa ALB Xil ($4,3 \pm 0,6$) e ALB Malt ($4,7 \pm 0,5$).

Figura 18 - Número médio de conídios fagocitados por macrófago. ALB representa o clone pALB1 e Ca representa o clone pALB1/*Afpmr1*. Xil (xilose) e Malt (maltose) indicam a fonte de carbono do meio de cultivo. * indica diferença significativa ($p<0,05$) quando comparado aos grupos ALB Xil, ALB Malt e Ca Xil. Os valores são representativos de 3 repetições.

Outro parâmetro avaliado foi a eficiência da fagocitose em eliminar os conídios fagocitados. Neste

ensaio os conídios foram incubados com os macrófagos por 4 horas e após este período a viabilidade dos conídios foi verificada colorimetricamente, pela oxidação do MTT.

A figura 19 representa a porcentagem microbicida, após 4 horas de incubação com os macrófagos, para o clone *pALB1-Afpmr1* submetido à RNAi (Ca Malt) comparado com os controles *pALB1*, também submetido à RNAi (ALB Malt), e CEA17 *pyrG+* (WT Malt) cultivados em meio mínimo adicionado de maltose a 2% (w/v). A porcentagem de eficiência na eliminação dos conídios do clone Ca Malt apresentou-se diminuída ($60 \pm 2,7\%$) quando comparada com os clones controle ($95 \pm 2,99\%$ para o clone ALB Malt e $98 \pm 0,38\%$ para o clone WT Malt).

Figura 19 - Avaliação da eficiência da fagocitose. Ca representa o clone pALB1/*Afpmr1*, ALB representa o clone pALB1, e WT representa a cepa selvagem CEA 17 *pyrG+*. Malt (maltose) indica a fonte de carbono do meio de cultivo. * indica diferença significativa ($p < 0,001$ quando comparado aos grupos ALB Malt e WT Malt). Os valores são representativos de 3 repetições.

5. DISCUSSÃO

Inúmeros trabalhos têm mostrado que uma das principais atividades dos antifúngicos da classe dos azóis ocorre pelo rompimento da homeostase citosólica de íons cálcio, que se difundem pela membrana plasmática danificada pela inibição da síntese de esteróis (EDLIND et al., 2002).

Existem evidências do envolvimento do cálcio no desenvolvimento de toxicidade celular em diversos organismos sendo que esta perda da homeostase de íons cálcio está relacionada com a atividade de diferentes cálcio ATPases. Desta forma, o controle da homeostase deste íon em *A. fumigatus* pode ter uma função crítica na sinalização e prevenção de danos celulares.

Neste contexto, a caracterização de uma cálcio ATPase do tipo PMR1 de *A. fumigatus* e a sua validação como alvo quimioterapêutico foram realizadas.

Inicialmente, o gene da cálcio ATPase de *A. fumigatus* foi clonado em plasmídeo de expressão em leveduras pYES-2®. A expressão de genes neste plasmídeo está sob o controle do promotor da galactose e, desta forma, a indução da expressão é realizada pela adição de galactose ao meio de cultura. O plasmídeo possui ainda o gene *URA3* que codifica a enzima orotidina 5'-monofosfato decarboxilase, responsável pela conversão da orotidina 5'-

fosfato em uridina 5'-fosfato, o passo final da via biosintética das pirimidinas. Este gene funciona como um marcador auxotrófico para a cepa K616 de *S. cerevisiae*. As cepas de *S. cerevisiae* utilizadas neste estudo são auxotróficas para a uracila e após transformação, vários clones foram identificados.

A expressão do gene *Afpmr1* na cepa K616 não pôde ser visualizada por SDS-PAGE. Em *S. cerevisiae* o principal reservatório de íons cálcio é o vacúolo, correspondendo com aproximadamente 2 mmol/L do total de cálcio livre intracelular (STRAYLE et al., 1999). Outras organelas também contribuem na manutenção da homeostase deste íon e, dentre elas, o complexo de Golgi que é responsável por cerca de 5% do armazenamento intracelular de íons cálcio (SORIN et al., 1999). Esta pequena contribuição na captação deste íon sugere uma baixa expressão da Ca^{2+} -ATPase PMR1 nesta organela, o que pode explicar a baixa expressão da cálcio ATPase AfPMR1 em *S. cerevisiae*.

Apesar destas evidências, STRAYLE et al. (1999) descreveram que as concentrações de cálcio no retículo endoplasmático (RE) de cepas $\Delta pmr1$ de *S. cerevisiae* estão intensamente diminuídas, sugerindo que esta cálcio ATPase possa ser a principal responsável pelo armazenamento deste íon nesta organela.

Desta forma, com o intuito de se verificar a funcionalidade do produto do gene *Afpmr1*, foram realizados ensaios de complementação funcional dos fenótipos celulares $\Delta pmr1$, em cepas mutantes de *S. cerevisiae*.

As cepas mutantes para o gene *pmr1* apresentam problemas de crescimento associados à perda do transporte de cálcio e manganês para a via secretória que podem ser complementados pela expressão de genes ortólogos de outros organismos.

Neste sentido, a complementação da cepa tripla mutante, nocaute para os genes das cálcio ATPases do complexo de Golgi (PMR1) e do vacúolo (PMCA), e para a proteína quinase ativada por cálcio, calcineurina (CNB1), revelou que a proteína *AfPMR1* reverteu o fenótipo de crescimento em meio de cultura suplementado com EGTA ou Mn^{2+} .

A alta sensibilidade da cepa K616 a altos níveis de Mn^{2+} está relacionada ao acúmulo deste íon no citoplasma. O manganês é um elemento traço essencial, necessário para o crescimento de leveduras a uma concentração variando entre 2 a 10 $\mu\text{mol/L}$ (JONES & GADD, 1990). Entretanto, elevadas concentrações deste íon tornam-se tóxicas levando à perda do tráfico celular pela via secretória (HIRATA, 2002) e a uma alteração da composição e espessura da

parede celular de fungos (UCCELLETTI et al., 1999), entre outros fatores.

A captação de manganês, em altas concentrações citoplasmáticas, para o interior do complexo de Golgi com posterior exocitose pela via secretória é o principal fator de detoxificação celular deste íon (LAPINSKAS et al., 1995) e esta captação é realizada ativamente pela ATPase PMR1.

Sendo assim, a presença de elevadas concentrações de manganês no meio de cultura aumenta as concentrações citoplasmáticas deste íon, o que requer das células processos ativos de transporte para retomar as concentrações citoplasmáticas fisiológicas. A cepa tripla mutante utilizada nos experimentos não apresenta estes sistemas de transporte e a expressão heteróloga de uma cálcio ATPase (AfPMR1) permitiu seu crescimento em meio contendo alta concentração de manganês.

De maneira semelhante, o cálcio também participa de diferentes processos fisiológicos essenciais para a manutenção da viabilidade celular. Dentre eles, foi descrito que o acúmulo de íons cálcio no complexo de Golgi está relacionado à glicosilação de proteínas secretadas (RUDOLPH et al., 1989), ao controle do tráfico e distribuição de proteínas (CARNELL & MOORE, 1994), à

agregação seletiva de proteínas (CHANAT & HUTTNER, 1991) e processamento de precursores protéicos em leveduras (FULLER et al., 1989) e eucariotos superiores (ODA, 1992).

Desta forma, a presença de EGTA, um quelante de íons cálcio, no meio de cultura diminui a biodisponibilidade destes íons para a célula, que necessita de processos ativos de transporte de cálcio para repor os estoques intracelulares. Nos experimentos, a expressão do gene *Afpmr1* permitiu o crescimento da cepa mutante em meio contendo baixa concentração de cálcio.

Além disto, tem sido descrito que a homeostase citosólica de íons cálcio e manganês realizada pela cálcio ATPase PMR1 está relacionada com alterações na composição da parede celular de leveduras (UCCELLETTI et al., 1999).

A parede celular de leveduras e outros fungos determina o formato celular e a integridade do organismo durante o crescimento e divisão celular. Esta estrutura é dinâmica e pode se adaptar a alterações fisiológicas e morfológicas, além de possuir um mecanismo compensatório que é ativado em resposta a agentes perturbadores desta estrutura, o que permite seu remodelamento e combate à lise celular (ORLEAN, 1998; KLIS et al., 2002).

A parede celular é formada por 3 grupos principais de polissacarídeos: polímeros de manose (40% do peso seco da

massa celular), polímeros de glicose (β -glucana, 58% do peso seco da massa celular) e polímeros de N-acetil-glucosamina (quitina, 2% do peso seco da massa celular) (AGUILAR-USCANGA et al., 2003; KLIS et al., 2002).

Uma das principais alterações na composição da parede celular durante o processo de adaptação é um grande aumento da quantidade de quitina que pode alcançar níveis da ordem de 20% do peso seco da massa celular. Outro parâmetro que está envolvido neste processo é o conteúdo de β -1,6-glucana. Este pequeno polissacarídeo faz ligações com β -1,3-glucanas, manoproteínas e quitina, e estas ligações cruzadas podem contribuir para a estrutura alterada da parede celular (KOLLAR et al., 1995).

Além disto, a homeostase de íons também pode influenciar na estrutura da parede celular. Estudos mostraram que a homeostase de cálcio promovida pela PMR1 está envolvida com a morfogênese da parede celular em *K. lactis*, sendo que a ausência desta proteína resulta em um acúmulo de células arredondadas e grandes com parede celular anormalmente fina (UCCELLETTI et al., 1999).

A complementação funcional de *S. cerevisiae* pelo gene *Afpmr1* foi eficiente na reversão da distribuição de quitina, que voltou aos níveis da cepa selvagem. Entretanto, de acordo com os resultados apresentados por

UCCELLETTI et al. (1999), apesar de a composição da parede celular da cepa mutante para a PMR1, quando cultivada em meio contendo cálcio (10 mmol/L), voltar aos níveis encontrados para as cepas selvagens, a relação entre as frações álcali solúvel e álcali insolúvel continua baixa quando comparada com a mesma razão determinada para a cepa selvagem. Estas evidências mostram que quando há disponibilidade de cálcio para as células, há uma reversão morfológica total da parede celular, mas uma reversão parcial quando se avalia sua composição.

Juntamente à complementação funcional, foram realizadas técnicas de interferência de RNA para o gene *Afpmr1* em *A. fumigatus*, com o objetivo de diminuir os níveis de expressão deste gene e analisar possíveis alterações fenotípicas nas células do fungo.

Para a RNAi, foi selecionado um fragmento do gene *Afpmr1*, que foi amplificado e clonado em vetor de expressão em *A. fumigatus* para a produção de um RNA mensageiro dupla fita, utilizado na RNAi.

Este fragmento foi selecionado através da comparação da sequência de nucleotídeos do gene *Afpmr1* com outros genes de cálcio ATPases. A sequência não apresenta identidade entre as ATPases da classe PMCA, mesmo quando comparada com o gene da cálcio ATPase do tipo PMCA do

próprio *A. fumigatus*. Apesar da identidade de 15% entre o fragmento selecionado para RNAi do gene *Afpmr1* e o gene da cálcio ATPase do tipo SERCA de *T. cruzi*, não foi encontrado um gene homólogo no genôma do *A. fumigatus* (NIERMAN et al., 2005). Como controle da análise, quando a comparação foi realizada entre os genes das cálcio ATPases do tipo PMR1 de outras espécies, a identidade foi bastante elevada.

Desta forma, foi considerado que a região selecionada para RNAi produziria uma interferência específica para o gene alvo.

Inúmeros processos de silenciamento gênico mediado por RNA constituem as bases para o controle do nível de expressão de diferentes genes e têm sido utilizados em estudos que visam o entendimento de mecanismos e aplicações no descobrimento de novas drogas, biomedicina, agricultura e genômica funcional (De BACKER et al., 2002).

A importância do RNA dupla fita no desenvolvimento do silenciamento gênico pós-transcricional foi proposto por WATERHOUSE et al. (1998). Os autores demonstraram que construções que produzem RNAs capazes de formar dupla fita, realizadas pela mistura dos fragmentos *sense* e *antisense* ou pela transcrição de um RNA em forma de grampo (*panhandle* ou *hairpin*), são mais potentes no silenciamento

gênico que construções que produzem RNAs complementares fita simples.

Desta forma, foi utilizada a estratégia de produção de dsRNA do tipo *hairpin* correspondente ao gene *Afpml1*. Esta metodologia tem sido amplamente utilizada em inúmeros estudos realizados com eucariotos inferiores, como o silenciamento do gene da β -galactosidase em *Schizosacharomyces pombe* (RAPONI et al., 2003); dos genes *cap59* (responsável pela cápsula do fungo) e *ade2* (responsável por pigmentação nas células) em *C. neoformans*, com conseqüências fenotípicas semelhantes às observadas em sistemas nocaute (LIU et al., 2002) e, recentemente, o silenciamento do gene da calcineurina B em *D. discoideum* (BOECKELER et al., 2006).

O estabelecimento de RNAi em um organismo necessita de um método robusto, com precisa regulação do início do processo de interferência. Desta forma, várias metodologias podem ser utilizadas para a indução de uma RNAi. Nas RNAis transientes, o silenciamento gênico acontece pela introdução das fitas *sense* e *antisense*, do dsRNA já formado ou de siRNAs na célula (ELBASHIR et al., 2001). No entanto, em outros organismos, construções que produzam dsRNAs na célula alvo podem ser utilizadas para uma interferência estável. Nestes casos, a expressão deve

estar sob o controle de um promotor e um terminador, e desta forma, controlada (VERMA et al., 2004).

O plasmídeo utilizado na indução da RNAi (pALB1) apresenta algumas características bastante convenientes para o estudo de diversos genes em *A. fumigatus*. A expressão do RNA de interferência está sob o controle do promotor da glucoamilase de *A. niger*, que pode ser induzido através da fonte de carbono presente no meio de cultivo do fungo (FOWLER et al., 1990; VERDOES et al., 1994). Esta característica do plasmídeo de expressão permite que a interferência seja desencadeada apenas no momento em que a fonte de carbono for alterada, permitindo um controle do processo. A terminação da transcrição do plasmídeo é controlada pelo terminador do próprio gene *alb1*.

Além destas características, o plasmídeo também possui como marcador de transformação, o gene *hph* (higromicina B fosfotransferase) de *E. coli* que vai conferir resistência à higromicina B aos transformantes.

A indução da interferência pode ser monitorada através de um gene marcador que, quando silenciado, permite alterações fenotípicas visíveis. Desta forma, o plasmídeo possui seqüências repetidas invertidas para o gene *alb1*, que vão conferir coloração branca à colônia

após indução da RNAi. O gene *alb1* é responsável pela síntese da proteína *polyketide synthase* que atua na síntese de pigmentos em *A. fumigatus* (LANGFELDER et al., 1998).

A investigação de novos genes por RNAi necessita de análises de expressão dos níveis de RNAm em vários transformantes, antes que os fenótipos sejam avaliados com confiabilidade. Uma forma de se selecionar transformantes que exibem interferência está no duplo silenciamento gênico, no qual um gene marcador é silenciado juntamente com o gene de interesse.

Na construção utilizada nos experimentos, foram silenciados simultaneamente os genes *Afpml1* e *alb1*. Após análise de vários transformantes, foram obtidos clones que desenvolveram coloração branca e outros que desenvolveram coloração verde claro.

Estes resultados corroboram o descrito por MOUYNA et al. (2004), no qual foi realizado o duplo silenciamento do gene essencial *fks1* e do gene marcador *alb1* em *A. fumigatus*, resultando em 4% de transformantes silenciados para os dois genes e outros clones parcialmente silenciados. Por outro lado, em outros fungos como *C. neoformans*, estudos de RNAi mostraram que cerca de

80% dos transformantes apresentaram interferência de dois genes concomitantemente (LIU et al., 2002).

Após a transformação e seleção do clone positivo para o duplo silenciamento gênico (resultado avaliado pelo desenvolvimento de coloração branca no clone pALB1/*Afpmr1*), a monitorização dos níveis de expressão gênica foi realizada por PCR quantitativo.

Mesmo em diferentes condições de crescimento, os níveis de expressão do gene *Afpmr1* após silenciamento permaneceram bastante reduzidos quando comparados com o controle, permitindo o estudo de alterações fenotípicas. Estes resultados corroboram os descritos na literatura nos quais construções plasmidiais que produzem dsRNA do tipo *hairpin* em fungos como *Magnaporthe oryzae* e *Colletotrichum lagenarium* produzem um silenciamento de genes endógenos da ordem de 70 a 90% na maioria dos transformantes e um silenciamento semelhante a nocaute em cerca de 10 a 15% dos transformantes (NAKAYASHIKI et al., 2005).

A avaliação de possíveis alterações fenotípicas em organismos mutantes ou que apresentem silenciamento gênico constitui uma ferramenta para se verificar a importância do referido gene em diferentes vias metabólicas. Dentre os diversos ensaios utilizados nesta avaliação, os estudos

relacionados à perda da virulência do organismo estudado ajudam na validação dos genes como possíveis alvos quimioterapêuticos. Desta forma, os clones obtidos pela transformação com os vetores controle (pALB1) e de interferência do gene alvo (pALB1/*Afpml1*) foram utilizados para se avaliar possíveis alterações fenotípicas que possam validar o gene *Afpml1* como alvo quimioterapêutico.

Inúmeros modelos experimentais que avaliam o sistema de defesa do hospedeiro mamífero frente a patógenos eucariotos, como fungos, têm sido desenvolvidos para uma avaliação do perfil de resposta do sistema imune, bem como um parâmetro para se avaliar diferenças de sensibilização deste sistema por cepas mutantes ou silenciadas (MARR et al. 2001; VONK et al., 2002; AKPOGHENETA et al., 2003).

As células fagocíticas são componentes essenciais da resposta imune em infecções fúngicas e a avaliação da atividade destas células pode ser realizada por ensaios de fagocitose e *killing* de macrófagos.

Na cepa contendo o plasmídeo pALB1, a indução do silenciamento do gene *alb1* altera o índice de fagocitose em 30 minutos de incubação. Estes resultados corroboram estudos realizados com neutrófilos humanos, nos quais os conídios provenientes da cepa mutante para o gene *alb1* são mais fagocitados, em 30 minutos de incubação, que os

conídios da cepa selvagem utilizada nos ensaios (TSAI et al., 1998).

Em períodos maiores de incubação entre os macrófagos e os conídios não houve diferença entre as células com ou sem o silenciamento do gene *alb1*. Estudos realizados com a cepa nocaute para o gene *alb1* em *A. fumigatus* mostraram que não há diferença na fagocitose de conídios por macrófagos derivados de monócitos humanos em até 60 minutos de incubação (JAHN et al., 2002). Estas evidências podem estar relacionadas às diferentes linhagens celulares utilizadas nos experimentos, visto que é descrito que macrófagos provenientes de diferentes fontes apresentam índices de fagocitose bastante diferentes (SCHAFFNER et al. 1983).

Com relação aos conídios provenientes da cepa contendo o plasmídeo pALB/*Afpmr1*, a porcentagem de fagocitose se manteve sempre mais baixa nas células com o silenciamento do gene *Afpmr1* que nas cepas não induzidas. Esta diferença pode estar relacionada a alterações na composição polissacarídica da parede celular do fungo ou na alteração do nível de glicosilação de proteínas expostas ao meio extracelular e, portanto, modificando o reconhecimento por parte dos fagócitos.

Estudos realizados com a deleção do gene *pmr1* demonstram que, em *C. albicans*, as cepas mutantes apresentam severas alterações na glicosilação de proteínas, uma sensibilidade maior a agentes que promovam estresse na parede celular e uma atenuação na virulência da cepa mutante em relação à cepa selvagem (BATES et al., 2005), além de alterações nos níveis de glucanas álcali insolúveis (β -1,3 e β -1,6-glucanas) na parede celular em *K. lactis* (UCCELLETTI et al., 1999).

Além disto, já foi descrito no fungo dimórfico, *H. capsulatum*, que a β -glucana da parede celular da forma miceliana deste fungo é o fator responsável por um maior recrutamento de leucócitos para o local da infecção quando comparado com a forma leveduriforme, que possui menor conteúdo de β -glucanas (MEDEIROS et al., 1999). Em *A. fumigatus*, foi descrito que a β -glucana da parede celular do fungo é o fator preponderante para a indução da resposta inflamatória através de sua exposição na superfície de conídios germinantes, e que esta indução da resposta imune é mediada por receptores, denominados dectinas-1, que são recrutados para os fagosossomos e reconhecem especificamente as moléculas de β -glucana da parede celular do fungo (HOHL et al., 2005).

Com base nestas evidências, a diminuição dos níveis de fagocitose observada em nossos experimentos pode ser explicada por uma alteração nos níveis de β -glucana da parede celular do fungo com o gene *Afpmr1* silenciado.

Além da fagocitose, outro parâmetro avaliado foi a capacidade dos macrófagos de eliminar os conídios já fagocitados (*killing*). Neste ensaio foram utilizados conídios metabolicamente ativos (*swelling*) uma vez que já é descrito que nesta fase os conídios apresentam níveis crescentes de β -glucana na parede celular, o que é essencial para a sensibilização dos macrófagos e produção de EROs nos fagossomos (LEVITZ et al., 1985). Além disto, foi descrito que conídios latentes de *A. fumigatus* estimulam menos a produção de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso, assim como, uma menor iodinação dependente de mieloperoxidase, por neutrófilos que os conídios metabolicamente ativados (LEVITZ et al., 1986).

Desta forma, considerando que os conídios latentes demoram cerca de 4 ou mais horas para se ativarem metabolicamente (*swelling*) nos macrófagos, a porcentagem microbicida para este tempo de incubação seria muito baixa e não poderia ser avaliada como parâmetro de defesa destas células (PHILIPPE et al., 2003).

Neste contexto, os ensaios de *killing* demonstraram que ocorreu uma diminuição da porcentagem de atividade microbicida dos macrófagos frente aos conídios metabolicamente ativos após 4 horas de incubação, o que pode ser explicado por alterações celulares causadas no fungo após a indução da RNAi do gene *Afpmr1* e rompimento da homeostase de íons cálcio e manganês, ou simplesmente porque há uma diminuição da fagocitose dos conídios.

Como mencionado anteriormente, em *K. lactis*, a perda da atividade PMR1 promove uma depleção de íons cálcio no complexo de Golgi que promove graves defeitos na parede celular, os quais podem estar relacionados com os níveis e a distribuição de polissacarídeos, afetando o comportamento das células frente a estímulos agressivos, como os macrófagos (UCCELLETTI et al., 2005).

De acordo com estas evidências, o *A. fumigatus* com RNAi para o gene *Afpmr1* poderia se tornar mais sensível à fagocitose. No entanto, considerando que após a RNAi o gene *Afpmr1* ainda estava sendo expresso a um nível bem baixo e que o *A. fumigatus* é um fungo filamentoso, diferentemente do *K. lactis*, os resultados apresentados neste trabalho podem sugerir funções distintas para a Ca^{2+} -ATPase PMR1 em *A. fumigatus*.

Além da porcentagem de fagocitose, outro índice avaliado foi o número médio de conídios por macrófago. Este parâmetro avalia a atividade dos macrófagos e a capacidade de sensibilização dos fagócitos quando em contato com o estímulo (conídios).

Os resultados observados mostram que para as células da cepa transformada com o plasmídeo pALB1 com silenciamento induzido ou não, ocorreu um aumento no número médio de conídios fagocitados em função do tempo de incubação. Este resultado também foi observado para a cepa transformada com o vetor de silenciamento para o gene *Afpmr1*, mas não induzido.

No entanto, a cepa com o gene *Afpmr1* silenciado apresentou um número médio de conídios fagocitados menor. Este resultado corrobora o observado anteriormente na porcentagem de fagocitose, mas por outro lado, estes resultados divergem de estudos semelhantes realizados com cepas selvagens de *A. fumigatus*, nos quais o número médio de conídios fagocitados por macrófagos alveolares foi de 2 conídios por célula (PHILIPPE et al., 2003). Novamente, os autores relatam que a fonte dos fagócitos (peritoneal, alveolares, etc.), bem como a heterogeneidade destes na eficiência de fagocitose podem alterar os resultados. Cabe ressaltar ainda que, diferentemente de cepas selvagens, as

alterações celulares provenientes do silenciamento gênico também podem influenciar os índices avaliados.

Desta forma, os resultados funcionais apresentados ressaltam a participação da cálcio ATPase do tipo PMR1 em processos celulares que, quando interrompidos, alteram o reconhecimento e a atividade de fagócitos frente a células de *Aspergillus fumigatus*.

6. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados nos permitem concluir que:

1.0 gene *Afpmr1* de *A. fumigatus* codifica uma cálcio ATPase da subclasse PMR1 que complementa o fenótipo da cepa $\Delta pmr1$ de *S. cerevisiae* em meios seletivos, sendo expressa funcionalmente neste sistema heterólogo.

2.0 silenciamento gênico promovido por RNAi através da expressão de dsRNA do tipo *hairpin* é uma ferramenta eficiente no estudo da função de cálcio ATPases em *A. fumigatus*.

3.0 silenciamento do gene *Afpmr1* em *A. fumigatus* influencia processos celulares que desencadeiam alterações na resposta de macrófagos na fagocitose e *killing* dos conídios.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL N; DASARADHI PV; MOHAMMED A; MALHOTRA P; BHATNAGAR RK; MUKHERJEE SK. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev* (Washington) 2003;67:657-685.
- AKPOGHENETA O; GIL-LAMAINIERE C; MALOUKOU A; ROILIDES E; EUROFUNG NETWORK. Antifungal activity of human polymorphonuclear and mononuclear phagocytes against non-fumigatus *Aspergillus* species. *Mycoses* (Berlin) 2003;46:77-83.
- AL-ANOUTI F; ANANVORANICH S. Comparative analysis of antisense RNA, double-stranded RNA, and delta ribozyme-mediated gene regulation in *Toxoplasma gondii*. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* (Larchmont) 2002;12:275-281.
- ALMEIDA R; ALLSHIRE RC. RNA silencing and genome regulation. *Trends Cell Biol* (Cambridge) 2005; 15:251-258.
- AMIN S; MOUSAVI A; ROBSON GD. Oxidative and amphotericin B-mediated cell death in the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus* is associated with an apoptotic-like phenotype. *Microbiology* (Washington) 2004;150:1937-1945.
- ANTEBI A; FINK GR. The yeast Ca(2+)-ATPase homologue, PMR1, is required for normal Golgi function and localizes in a novel Golgi-like distribution. *Mol Biol Cell* (Bethesda) 1992;3:633-654.
- BASTIN P; ELLIS K; KOHL L; GULL K. Flagellum ontogeny in trypanosomes studied via an inherited and regulated RNA interference system. *J Cell Sci* (Londres) 2000;113:3321-3328.
- BATES S; MACCALLUM DM; BERTRAM G; MUNRO CA; HUGHES HB; BUURMAN ET; BROWN AJP; ODDS FC; GOW NAR. *Candida albicans* Pmr1p, a Secretory Pathway P-type Ca²⁺/Mn²⁺-ATPase, Is Required for Glycosylation and Virulence. *J Biol Chem* (Baltimore) 2005;280:23408-23415.
- BELLOMO G; THOR H; ORRENIUS S. Increase in cytosolic Ca²⁺ concentration during t-butyl hydroperoxide metabolism by isolated hepatocytes involves NADPH oxidation and mobilization of intracellular Ca²⁺ stores. *FEBS Lett* (Amsterdam) 1984;168:38-42.

- BETZ N. RNAi: RNA interference. Promega Notes (Madison) 2003; n.83.
- BILMEN JG; WOOTTON LL; MICHELANGELI F. The inhibition of the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase by macrocyclic lactones and cyclosporin A. Biochem J (Londres) 2002;366:255-263.
- BODEY GP & VARTIVARIAN S. Aspergillosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis (Berlim) 1989;8:413-437.
- BOECKELER K; TISCHENDORF G; MUTZEL R; WEISSENMAYER B. Aberrant stalk development and breakdown of tip dominance in *Dictyostelium* cell lines with RNAi-silenced expression of calcineurin B. BMC Dev Biol (Londres) 2006;6:12.
- BONILLA M; NASTASE KK; CUNNINGHAM KW. Essential role of calcineurin in response to endoplasmic reticulum stress. EMBO J (Oxford) 2002;21:2343-2353.
- BRAKHAGE AA & LANGFELDER K. Menacing mold: the molecular biology of *Aspergillus fumigatus*. Annu Rev Microbiol (Palo Alto) 2002;56:433-455.
- BULTYNCK G; DE SMET P; WEIDEMA AF; VER HEYEN M; MAES K; CALLEWAERT G; MISSIAEN L; PARYS JB; DE SMEDT H. Effects of the immunosuppressant FK506 on intracellular Ca^{2+} release and Ca^{2+} accumulation mechanisms. J Physiol (Cambridge) 2000;525:681-693.
- CARAFOLI E. Calcium signaling: a tale for all seasons. Proc Natl Acad Sci U S A (Washington) 2002;99:1115-1122.
- CARAFOLI E. Calcium - a universal carrier of biological signals. FEBS J (Oxford) 2005;272:1073-1089.
- CARAFOLI, E; BRINI, M. Calcium pumps: structural basis for and mechanism of calcium transmembrane transport. Curr Opin Chem Biol (Londres) 2000;4:152-161.
- CARAFOLI E; SANTELLA L; BRANCA D; BRINI M. Generation, control, and processing of cellular calcium signals. Crit Rev Biochem Mol Biol (Philadelphia) 2001;36:107-260.

- CARNELL L & MOORE HP Transport via the regulated secretory pathway in semi-intact PC12 cells: role of intracisternal calcium and pH in the transport and sorting of secretogranin II. J Cell Biol (Nova Iorque) 1994;127:693-705.
- CASINI AF & FARBER JL. Dependence of the carbon-tetrachloride-induced death of culture hepatocytes on the extracellular calcium concentration. Am J Pathol (Bethesda) 1991;105:138-148.
- CHANAT E & HUTTNER WB. Milieu-induced, selective aggregation of regulated secretory proteins in the trans-Golgi network. J Cell Biol (Nova Iorque) 1991;115:1505-1519.
- CHENG J; FU JL; ZHOU ZC. The inhibitory effects of manganese on steroidogenesis in rat primary Leydig cells by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. Toxicology (Amsterdam) 2003;187:139-148.
- CHENG J; FUA J; ZHOUA Z. The mechanism of manganese-induced inhibition of steroidogenesis in rat primary Leydig cells. Toxicology (Amsterdam) 2005;211:1-11.
- COGONI C; MACINO G. Isolation of quelling-defective (qde) mutants impaired in posttranscriptional transgene-induced gene silencing in *Neurospora crassa*. Proc Natl Acad Sci USA (Washington) 1997;94:10233-10238.
- COTTRELL GS; HOOPER NM; TURNER AJ. Cloning, expression, and characterization of human cytosolic aminopeptidase P: a single manganese(II)-dependent enzyme. Biochemistry (Washington) 2000;39:15121-15128.
- COTTRELL TR; DOERING TL. Silence of the strands: RNA interference in eukaryotic pathogens. Trends Microbiol (Cambridge) 2003;11:37-43.
- COURCHESNE, WE. Characterization of a novel, broad-based fungicidal activity for the antiarrhythmic drug amiodarone. J Pharmacol Exp Ther (Bethesda) 2002;300:195-199.

- CRUZ MC; GOLDSTEIN AL; BLANKENSHIP JR; DEL POETA M; DAVIS D; CARDENAS ME; PERFECT JR; MCCUSKER JH; HEITMAN J. Calcineurin is essential for survival during membrane stress in *Candida albicans*. EMBO J (Oxford) 2002;21:546-559.
- CUNNINGHAM KW; FINK GR. Ca^{2+} transport in *Saccharomyces cerevisiae*. J Exp Biol (Londres) 1994;196:157-166.
- CUNNINGHAM KW; FINK GR. Calcineurin inhibits VCX1-dependent $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange and induces Ca^{2+} ATPases in *Saccharomyces cerevisiae*; Mol Cell Biol (Washington) 1996;16:2226-2237.
- Da ROCHA WD; OTSU K; TEIXEIRA SM; DONELSON JE. Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol (Amsterdam) 2004;133:175-186.
- DE BACKER MD; NELISSEN B; LOGGHE M; VIAENE J; LOONEN I; VANDONINCK S; DE HOOGT R; DEWAELE S; SIMONS FA; VERHASSELT P; VANHOOF G; CONTRERAS R; LUYTEN WH. An antisense-based functional genomics approach for identification of genes critical for growth of *Candida albicans*. Nat Biotechnol (Nova Iorque) 2001;19:235-241.
- DE BACKER MD; RAPONI M; ARNDT GM. RNA-mediated gene silencing in non-pathogenic and pathogenic fungi. Curr Opin Microbiol (Londres) 2002;5:323-329.
- DENIS V & CYERT MS. Internal $\text{Ca}(2+)$ release in yeast is triggered by hypertonic shock and mediated by a TRP channel homologue. J Cell Biol (Nova Iorque) 2002;156:29-34.
- DENNING DW. Invasive Aspergilosis. Clin Infect Dis (Chicago) 1998;26 :781-805.
- DI MONTE D; BELLOMO G; THOR H; NICOTERA P; ORRENIUS S. Menadione-induced cytotoxicity is associated with a protein thiol oxidation and alteration in intracellular Ca^{2+} homeostasis. Arch Biochem Biophys (Nova Iorque) 1984;235:343-350.

- DUCHINI A; REDFIELD DC; MCHUTCHISON JG; BRUNSON ME.; POCKROS PJ. Aspergillosis in liver transplant recipients: successful treatment and improved survival using a multistep approach. South Med J (Cebu City) 2002;95:897-899.
- DÜRR G; STRAYLE J; PLEMPER R; ELBS S; KLEE SK; CATTY, P; WOLF DH; RUDOLPH HK. The medial-Golgi ion pump Pmr1 supplies the yeast secretory pathway with Ca^{2+} and Mn^{2+} required for glycosylation, sorting, and endoplasmic reticulum-associated protein degradation. Mol Biol Cell (Washington) 1998;9:1149-1162.
- EDLIND T; SMITH L; HENRY K; KATTIYAR S; NICKELS J. Antifungal activity in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated by calcium signalling. Mol Microbiol (Boston) 2002;46:257-268.
- EILAM Y; LAVI H; GROSSOWICZ N. Mechanism of stimulation of Ca^{2+} uptake by miconazole and ethidium bromide in yeasts: role of vacuoles in Ca^{2+} detoxification. Microbios (Cambridge) 1985;44:51-66.
- EILAM Y; OTHMAN M. Activation of Ca^{2+} influx by metabolic substrates in *Saccharomyces cerevisiae*: role of membrane potential and cellular ATP levels. J Gen Microbiol (Reading) 1990;136:861-6.
- ELBASHIR SM; LENDECKEL W; TUSCHL T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. Genes Dev (Cold Spring Harbor) 2001;15:188-200.
- ENGLAND PJ. Intracellular calcium receptor mechanism. Brit Med Bull (Londres) 1986;42:375-383.
- FARINA F; UCCELLETTI D; GOFFRINI P; BUTOW RA; ABEIJON C; PALLESCHIA C. Alterations of O-glycosylation, cell wall, and mitochondrial metabolism in *Kluyveromyces lactis* cells defective in K1Pmr1p, the Golgi Ca^{2+} -ATPase. Biochem Biophys Res Commun (São Diego) 2004;318:1031-1038.
- FARISS FW; PASCOE GA; REED DJ. Vitamin E reversal of the effect of extracellular calcium on chemically induced toxicity in hepatocytes. Science (Washington) 1985;227:751-754.

- FOWLER T; BERKA RM; WARD M. Regulation of the *glaA* gene of *Aspergillus niger*. Curr Genet (Nova Iorque) 1990;18:537-545.
- FULLER RS; BRAKE A; THORNER J. Yeast pherohormone processing enzyme (KEX2 gene product) is a Ca^{2+} -dependent serine protease. Proc Natl Acad Sci USA (Washington) 1989;86:1434-1438.
- GALVANI P; FUMAGALLI P; SANTAGOSTINO A. Vulnerability of mitochondrial complex I in PC12 cells exposed to manganese. Eur J Pharmacol (Amsterdam) 1995;293:377-383.
- GAVIN CE; GUNTER KK; GUNTER TE. Mn^{2+} sequestration by mitochondria and inhibition of oxidative phosphorylation. Toxicol Appl Pharmacol (Nova Iorque) 1992;115:1-5.
- GORLACH JM; MCDADE HC; PERFECT JR; COX GM. Antisense repression in *Cryptococcus neoformans* as a laboratory tool and potential antifungal strategy. Microbiology (Washington) 2002;148:213-219.
- GRAMS J; MORRIS JC; DREW ME; WANG Z; ENGLUND PT; HAJDUK SL. A trypanosome mitochondrial RNA polymerase is required for transcription and replication. J Biol Chem (Chicago) 2002;277:16952-16959.
- GREEN NM; MACLENNAN DH. Pumping ions. Nature (Londres) 2000;405:633-634.
- GREENE V; CAO H; SCHANNE FA; BARTELT DC. Oxidative stress-induced calcium signalling in *Aspergillus nidulans*. Cell Signal (Oxford) 2002;14:437-443.
- GREENLUND LJ; DECKWERTH TL; JOHNSON EM. Superoxide dimutase delays neuronal apoptosis: a role for reactive oxygen species in programmed neuronal death. Neuron (Cambridge) 1995;14:303-315.
- GUERRA-GIRALDEZ C; QUIJADA L; CLAYTON CE. Compartmentation of enzymes in a microbody, the glycosome, is essential in *Trypanosoma brucei*. J Cell Sci (Londres) 2002;115:2651-2658.

- GUPTA SS; TON VK; BEAUDRY V; RULLI S; CUNNINGHAM K; RAO R. Antifungal activity of amiodarone is mediated by disruption of calcium homeostasis. J Biol Chem (Chicago) 2003;278:28831-28839.
- HAINES J. *Aspergillus* in compost: Straw man or fatal flaw. Biocycle (Emmaus) 1995;6:32-35.
- HARTLEY AD; BOGAERTS S; GARRETT S. cAMP inhibits bud growth in a yeast strain compromised for Ca^{2+} influx into the Golgi. Mol Gen Genet (Berlin) 1996;251:556-564.
- HEARN AS; STROUPE ME; CABELLI DE; LEPOCK JR; TAINER JA; NICK HS; SILVERMAN DN. Kinetic analysis of product inhibition in human manganese superoxide dismutase. Biochemistry (Washington) 2001;40:12051-12058.
- HIRATA Y. Manganese-induced apoptosis in PC12 cells. Neurotoxicol Teratol (Elmsford) 2002;24:639-653.
- HOGAN LH; KLEIN BS; LEVITZ SM. Virulence factors of medically important fungi. Clin Microbiol Rev (Washington) 1996;9:469-488.
- HOHL TM; VAN EPPS HL; RIVERA A; MORGAN LA; CHEN PL; FELDMESSER M; PAMER EG. *Aspergillus fumigatus* Triggers Inflammatory Responses by Stage-Specific beta-Glucan Display. PLoS Pathog (São Francisco) 2005;1:e30.
- HU YK; EISSES JF; KAPLAN JH. Expression of an active Na,K-ATPase with an alpha-subunit lacking all twenty-three native cysteine residues. J Biol Chem (Chicago) 2000;275:30734-10739.
- IIDA H; SAKAGUCHI S; YAGAWA Y; ANRAKU Y. Cell cycle control by Ca^{2+} in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem (Chicago) 1990;265:21216-21222.
- IRVINE RF. Calcium transients: mobilization of intracellular Ca^{2+} . Br Med Bull (Londres) 1986;42:369-374.
- ITO JI; LYONS JM. Vaccination of corticosteroid immunosuppressed mice against invasive pulmonary aspergillosis. J Infect Dis (Chicago) 2002;186:869-871.

- JAHN B; LANGFELDER K; SCHNEIDER U; SCHINDEL C; BRAKHAGE AA. PKSP-dependent reduction of phagolysosome fusion and intracellular kill of *Aspergillus fumigatus* conidia by human monocyte-derived macrophages. Cell Microbiol (Oxford) 2002;4:793-803.
- JONES RP & GADD GM. Ionic nutrition of yeast - physiological mechanism involved and implications for biotechnology. Enzyme Microb Technol (Nova Iorque) 1990;12:402-419.
- KAUR G; LOHIA A. Inhibition of gene expression with double strand RNA interference in *Entamoeba histolytica*. Biochem Biophys Res Commun (São Diego) 2004;320:1118-1122.
- KRISHNAN S; MANAVATHU EK; CHANDRASEKAR PH. A comparative study of fungicidal activities of voriconazole and amphotericin B against hyphae of *Aspergillus fumigatus*. J Antimicrob Chemother (Londres) 2005;55:914-920.
- KUHLBRANDT W. Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. Nat Rev Mol Cell Biol (Londres) 2004;5:282-295.
- KUMAR R; ADAMS B; OLDENBURG A; MUSIYENKO A; BARIK S. Characterisation and expression of a PP1 serine/threonine protein phosphatase (PfPP1) from the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*: demonstration of its essential role using RNA interference. Malar J (Londres) 2002;1:5.
- LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature (Londres) 1970;227:680-685.
- LANGFELDER K; JAHN B; GEHRINGER H; SCHMIDT A; WANNER G; BRAKHAGE AA. Identification of a polyketide synthase gene (*pksP*) of *Aspergillus fumigatus* involved in conidial pigment biosynthesis and virulence. Med Microbiol Immunol (Berlim) 1998;187:79-89.
- LAPINSKAS PJ; CUNNINGHAM KW; LIU XF; FINK GR; CULLOTA VC. Mutations in PMR1 suppress oxidative damage in yeast cells lacking superoxide dismutase. Mol Cell Biol (Washington) 1995;15:1382-1388.

- LATGÉ JP. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. Clin Microbiol Rev (Washington) 1999;12:310-350.
- LATGE JP; CALDERONE R. Host-microbe interactions: fungi invasive human fungal opportunistic infections. Curr Opin Microbiol (Londres) 2002;5:355-358.
- LAX A; SOLER F; FERNANDEZ-BELDA F. Inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase by miconazole. Am J Physiol Cell Physiol (Bethesda) 2002;283:C85-92.
- LEDERBERG EM & COHEN SN. Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. J. Bacteriol (Washington) 1974;119:1072-1074.
- LEINONEN PT; MYLLYLÄ RM; HAGG PM; TUUKKANEN J; KOIVUNEN J; PELTONEN S; OIKARINEN A; KORKIAMAKI T; PELTONEN J. Keratinocytes cultured from patients with Hailey-Hailey disease and Darier disease display distinct patterns of calcium regulation. Br J Dermatol (Oxford) 2005;153:113-117.
- LEVITZ SM; DIAMOND RD. Mechanisms of resistance of *Aspergillus fumigatus* Conidia to killing by neutrophils in vitro. J Infect Dis (Chicago) 1985;152:33-42.
- LEVITZ SM; SELSTED ME; GANZ T; LEHRER RI; DIAMOND RD. In vitro killing of spores and hyphae of *Aspergillus fumigatus* and *Rhizopus oryzae* by rabbit neutrophil cationic peptides and bronchoalveolar macrophages. J Infect Dis (Chicago) 1986;154:483-489.
- LIGR M; MADEO F; FROHLICH E; HILT W; FROHLICH KU; WOLF DH. Mammalian Bax triggers apoptotic changes in yeast. FEBS Lett (Amsterdam) 1998;438:61-65.
- LIU H; COTTRELL TR; PIERINI LM; GOLDMAN WE; DOERING TL. RNA interference in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. Genetics (Baltimore) 2002;160:463-470.
- LONG RM & MOORE L. Elevated cytosolic calcium in rat hepatocytes exposed to carbon tetrachloride. J Pharmacol Exp Ther (Bethesda) 1986;238:186-191.
- LOUDON KW; COKE AP; BURNIE JP; LUCAS GS; LIU YIN JA. Invasive aspergillosis: clusters and sources? J Med Vet Mycol (Abingdon) 1994;32:217-224.

- LOUKIN S & KUNG C. Manganese effectively supports yeast cell-cycle progression in place of calcium. *J Cell Biol* (Washington) 1995;131:1025-1037.
- LU HG; ZHONG L; DE SOUZA W; BENCHIMOL M; MORENO S; DOCAMPO R. Ca^{2+} content and expression of an acidocalcisomal calcium pump are elevated in intracellular forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Cell Biol* (Washington) 1998;18:2309-2323.
- LUO S; ROHLOFF P; COX J; UYEMURA SA; DOCAMPO R. *Trypanosoma brucei* plasma membrane-type Ca^{2+} -ATPase 1 (TbPMC1) and 2 (TbPMC2) genes encode functional Ca^{2+} -ATPases localized to the acidocalcisomes and plasma membrane, and essential for Ca^{2+} homeostasis and growth. *J Biol Chem* (Chicago) 2004;279:14427-14439.
- LUO S; RUIZ FA; MORENO SN. The acidocalcisome Ca^{2+} -ATPase (TgA1) of *Toxoplasma gondii* is required for polyphosphate storage, intracellular calcium homeostasis and virulence. *Mol Microbiol* (Oxford) 2005;55:1034-1045.
- MACLENNAN DH & GREEN NM. Structural biology. Pumping ions. *Nature* (Londres) 2000;405:633-634.
- MACLENNAN DH; RICE WJ; GREEN NM. The mechanism of Ca^{2+} transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases. *J Biol Chem* (Chicago) 1997;272:28815-28818.
- MADEO F; FROHLICH E; LIGR M; GREY M; SIGRIST SJ; WOLF DH; FROHLICH KU. Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *J Cell Biol* (Nova Iorque) 1999;145:757-767.
- MANDAL D; WOOLF TB; RAO R. Manganese selectivity of pmr1, the yeast secretory pathway ion pump, is defined by residue gln783 in transmembrane segment 6. Residue Asp778 is essential for cation transport. *J Biol Chem* (Chicago) 2000;275:23933-23938.
- MARR KA; KOUDADOUST M; BLACK M; BALAJEE SA. Early events in macrophage killing of *Aspergillus fumigatus* conidia: new flow cytometric viability assay. *Clin Diagn Lab Immunol* (Washington) 2001;8:1240-1247.

- MATSUMOTO TK; ELLSMORE AJ; CESSNA SG; LOW PS; PARDO JM; BRESSAN RA; HASEGAWA PM. An osmotically induced cytosolic Ca^{2+} transient activates calcineurin signaling to mediate ion homeostasis and salt tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem (Chicago) 2002;277:33075-33080.
- MAYUZUMI N; IKEDA S; KAWADA H; OGAWA H. Effects of drugs and anticytokine antibodies on expression of ATP2A2 and ATP2C1 in cultured normal human keratinocytes. Br J Dermatol (Oxford) 2005;152:920-924.
- MCCROBERT L; MCCONKEY GA. RNA interference (RNAi) inhibits growth of *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol (Amsterdam) 2002;119:273-278.
- MEDEIROS AI; SILVA CL; MALHEIRO A; MAFFEI CM; FACCIOLI LH. Leukotrienes are involved in leukocyte recruitment induced by live *Histoplasma capsulatum* or by the beta-glucan present in their cell wall. Br J Pharmacol (Londres) 1999;128:1529-1537.
- MEZEI LM, STORTS DR. PCR technology: current innovation. Flórida: CRC-Press; 1994.
- MILLER AJ; VOGG G; SANDERS D. Cytosolic calcium homeostasis in fungi: Role of plasma membrane transport and intracellular sequestration of calcium. Proc Natl Acad Sci USA (Washington) 1990;87:9348-9352.
- MISSIAEN L; VAN ACKER K; PARYS JB; DE SMEDT H; VAN BAELEN K; WEIDEMA AF; VANOEVEREN J; RAEYMAEKERS L; RENDERS J; CALLEWAERT G; RIZZUTO R; WUYTACK F. Baseline cytosolic Ca^{2+} oscillations derived from a non-endoplasmic reticulum Ca^{2+} store. J Biol Chem (Chicago) 2001;276:39161-39170.
- MONIAKIS J; COUKEL MB; FORER A. Molecular cloning of a intracellular P-type ATPase from *Dictyostelium* that is up-regulated in calcium-adapted cells. J Biol Chem (Chicago) 1995;270:28276-28281.
- MORGAN BP; LUZIO JP; CAMPBELL AK. Intracellular Ca^{2+} and cell injury: a paradoxical role of Ca^{2+} in complement membrane attack. Cell Calcium (Edimburgo) 1986;7:399-411.

- MORRISON DA. Transformation in *Escherichia coli* preservation of competent cells. J Bacteriol (Washington) 1977;132:349-351.
- MOUZYNA I; HENRY C; DOERING TL; LATGE JP. Gene silencing with RNA interference in the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. FEMS Microbiol Lett (Amsterdam) 2004;237:317-324.
- NAKAMURA N; RABOUILLE C; WATSON R; NILSSON T; HUI N; SLUSAREWICZ P; KREIS TE; WARREN G. Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130. J Cell Biol (Nova Iorque) 1995;131:1715-1726.
- NAKAYASHIKI H; HANADA S; NGUYEN BQ; KADOTANI N; TOSA Y; MAYAMA S. RNA silencing as a tool for exploring gene function in ascomycete fungi. Fung Genet Biol (Orlando) 2005;42:275-283.
- NGO H; TSCHUDI C; GULL K; ULLU E. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. Proc Natl Acad Sci USA (Washington) 1998;95:14687-14692.
- NICHOLLS DG. Intracellular calcium homeostasis. Brit Med Bull (Londres) 1986;42:353-358.
- NICOTERA P; MOORE M; MIRABELLI F; BELLOMO G; ORRENIUS S. Inhibition of hepatocyte plasma membrane Ca^{2+} -ATPase activity by menadione metabolism and its restoration by thiols. FEBS Lett (Amsterdam) 1985;181:149-153.

NIERMAN WC; PAIN A; ANDERSON MJ; WORTMAN JR; KIM HS; ARROYO J; BERRIMAN M; ABE K; ARCHER DB; BERMEJO C; BENNETT J; BOWYER P; CHEN D; COLLINS M; COULSEN R; DAVIES R; DYER PS; FARMAN M; FEDOROVA N; FEDOROVA N; FELDBLYUM TV; FISCHER R; FOSKER N; FRASER A; GARCIA JL; GARCIA MJ; GOBLE A; GOLDMAN GH; GOMI K; GRIFFITH-JONES S; GWILLIAM R; HAAS B; HAAS H; HARRIS D; HORIUCHI H; HUANG J; HUMPHRAY S; JIMENEZ J; KELLER N; KHOURI H; KITAMOTO K; KOBAYASHI T; KONZACK S; KULKARNI R; KUMAGAI T; LAFTON A; LATGE JP; LI W; LORD A; LU C; MAJOROS WH; MAY GS; MILLER BL; MOHAMOUD Y; MOLINA M; MONOD M; MOUYNIA I; MULLIGAN S; MURPHY L; O'NEIL S; PAULSEN I; PENALVA MA; PERTEA M; PRICE C; PRITCHARD BL; QUAIL MA; RABBINOWITSCH E; RAWLINS N; RAJANDREAM MA; REICHARD U; RENAULD H; ROBSON GD; RODRIGUEZ DE CORDOBA S; RODRIGUEZ-PENA JM; RONNING CM; RUTTER S; SALZBERG SL; SANCHEZ M; SANCHEZ-FERRERO JC; SAUNDERS D; SEEGER K; SQUARES R; SQUARES S; TAKEUCHI M; TEKAIA F; TURNER G; VAZQUEZ DE ALDANA CR; WEIDMAN J; WHITE O; WOODWARD J; YU JH; FRASER C; GALAGAN JE; ASAI K; MACHIDA M; HALL N; BARRELL B; DENNING DW. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. Nature (Londres) 2005;438:1151-1156.

OLIVERO I; CORBACHO I; HERNANDEZ LM. The *ldbl* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* is defective in *Pmr1p*, the yeast secretory pathway/Golgi $\text{Ca}(2+)/\text{Mn}(2+)\text{-ATPase}$. FEMS Microbiol Lett (Amsterdam) 2003;219:137-142.

PARK CS; KIM JY; CRISPINO C; CHANG CC; RYU DD. Molecular cloning of *YlPMR1*, a *S. cerevisiae* *PMR1* homologue encoding a novel P-type secretory pathway $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$, in the yeast *Yarrowia lipolytica*. Gene (Amsterdam) 1998;206:107-116.

PEDERSEN PL; WILLIAMS N; HULLIHEN J. Mitochondrial ATP synthase: dramatic Mg^{2+} -induced alterations in the structure and function of the *F1-ATPase* moiety. Biochemistry (Washington) 1987;26:8631-8637.

PEGUES DA; LASKER BA; MCNEIL MM; HAMM PM; LUNDAL JL; KUBAK BM. Cluster of cases of invasive aspergillosis in a transplant intensive care unit: evidence of person-to-person airborne transmission. Clin Infect Dis (Chicago) 2002;34:412-416.

- PETER E; BAKRI F; BALL DM; CHENEY RT; SEGAL BH. Invasive pulmonary filamentous fungal infection in a patient receiving inhaled corticosteroid therapy. Clin Infect Dis (Chicago) 2002;35:e54-e56.
- PHILIPPE B; IBRAHIM-GRANET O; PREVOST MC; GOUGEROT-POCIDALO MA; SANCHEZ PEREZ M; VAN DER MEEREN A; LATGE JP. Killing of *Aspergillus fumigatus* by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. Infect Immun (Washington) 2003;71:3034-3042.
- PITT JI. The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health. J Med Vet Mycol (Abingdon) 1994;32:17-32.
- RAPONI M; ARNDT GM. Double-stranded RNA-mediated gene silencing in fission yeast. Nucleic Acids Res (Londres) 2003;31:4481-4489.
- RAPPLEYE CA; ENGLE JT; GOLDMAN WE. RNA interference in *Histoplasma capsulatum* demonstrates a role for alpha-(1,3)-glucan in virulence. Mol Microbiol (Oxford) 2004;53:153-165.
- REINHARDT TA; HORST RL. Ca²⁺-ATPases and their expression in the mammary gland of pregnant and lactating rats. Am J Physiol (Bethesda) 1999;276:C796-802.
- ROBINSON KA; BEVERLEY SM. Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite *Leishmania*. Mol Biochem Parasitol (Amsterdam) 2003;128:217-228.
- RODRIGUEZ-NAVARRO A; BENITO B; GARCIADEBLÁS B. Molecular cloning of the calcium and sodium ATPases in *Neurospora crassa*. Mol Microbiol (Oxford) 2000;35:1079-1088.
- RUBEN L; HAGHGHAT N. In: O'DAY DH. Calcium as an intracellular messenger in eukaryotic microbes., Washington: American Cancer Society for Microbiology; 1991. p.317-342.
- RUDOLPH HK; ANTEBI A; FINK GR; BUCKLEY CM; DORMAN TE; LEVITRE J; DAVIDO LS; MAO JI; MOIR DT. The yeast secretory pathway is perturbed by mutations in PMR1, a member of a Ca²⁺ ATPase family. Cell (Cambridge) 1989;58:133-145.

- SAIKI RK; SCHARF S; FALOONA F; MULLIS KB; HORN GT; ERLICH HA; ARNHEIM N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* (Washington) 1985;230:1350-1354.
- SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Nova Iorque: Cold Spring Harbor; 1989.
- SANDERS D; BROWNLEE C; HARPER JF. Communicating with calcium. *Plant Cell* (Rockville) 1999;11:691-706.
- SANGER F; NICKLEN S; COULSON AR. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* (Washington) 1977;74:5463-5467.
- SARIS NEL & CARAFOLI E. A historical review of cellular calcium handling, with emphasis on mitochondria. *Biochemistry* (Moscou) 1005;70:187-194.
- SCHAFFNER A; DOUGLAS H; BRAUDE AI; DAVIS CE. Killing of *Aspergillus* spores depends on the anatomical source of the macrophage. *Infect Immun* (Washington) 1983;42:1109-1115.
- SCHANNE FAX; KANE AB; YOUNG EA; FARBER JL. Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. *Science* (Washington) 1979;206:700-702.
- SHIBUYA K; ANDO T; HASEGAWA C; WAKAYAMA M; HAMATANI S; HATORI T; NAGAYAMA T; NONAKA H. Pathophysiology of pulmonary aspergillosis. *J Infect Chemother* (Tóquio) 2004;10:138-145.
- SLATER AF; STEFAN C; NOBEL I; VAN DEN DOBBELSTEEN DJ; ORRENIUS S. Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. *Toxicol Lett* (Amsterdam) 1995;82:149-153.
- SMAIL EH; CRONSTEIN BN; MESHULAM T; ESPOSITO AL; RUGGERI RW; DIAMOND RD. *In vitro*, *Candida albicans* releases the immune modulator adenosine and a second, high-molecular weight agent that blocks neutrophil killing. *J Immunol* (Baltimore) 1992;148:3588-3595.

- SOHN Y; PARK CS; LEE S; RYU DDY. Disruption of *PMR1*, Encoding a Ca^{2+} -ATPase Homolog in *Yarrowia lipolytica*, affects secretion and processing of homologous and heterologous proteins J Bacteriol (Washington) 1998;180:6736-6742.
- SORIANI FM; MARTINS VP; MAGNANI T; TUDELLA VG; CURTI C; UYEMURA SA. A *PMR1*-like calcium ATPase of *Aspergillus fumigatus*: Cloning, identification and functional expression in *S. cerevisiae*. Yeast (Manchester) 2005;22:813-824.
- SORIN A; ROSAS G; RAO R. *PMR1*, a Ca^{2+} -ATPase in yeast Golgi, has properties distinct from sarco/endoplasmic reticulum and plasma membrane calcium pumps. J Biol Chem (Chicago) 1997;272:9895-9901.
- STEVENS DA. Vaccinate against aspergillosis. A call to arms of the immune system. Clin Infect Dis (Chicago) 2004;38:1131-1136.
- STRAYLE J; POZZAN T; RUDOLPH HK. Steady-state free Ca^{2+} in the yeast endoplasmic reticulum reaches only 10 μM and is mainly controlled by the secretory pathway pump *pmr1*. EMBO J (Eynsham) 1999;18:4733-4743.
- TEKAIA F & LATGÉ J. *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? Cur Opin Microbiol (Londres) 2005;8:1-8.
- TENTLER S; PALAS J; ENDERLIN C; CAMPBELL J; TAFT C; MILLER TK; WOOD RL; SELITRENNIKOFF CP. Inhibition of *Neurospora crassa* growth by a glucan synthase-1 antisense construct. Curr Microbiol (Nova Iorque) 1997;34:303-308.
- TIJSTERMAN M; KETTING RF; PLASTERK RH. The genetics of RNA silencing. Annu Rev Genet (Palo Alto) 2002;36:0489-519.
- TILBURN J; SCAZZOCCHIO C; TAYLOR GG; ZABICKY-ZISSMAN JH; LOCKINGTON RA; DAVIES RW. Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. Gene (Amsterdam) 1983;26:205-221.

- TOKES-FUSESI M; BEDWELL DM; REPA I; SIPOS K; SUMEGI B; RAB A; MISETA A. Hexose phosphorylation and the putative calcium channel component Midlp are required for the hexose-induced transient elevation of cytosolic calcium response in *S. cerevisiae*. *Mol Microbiol* (Oxford) 2002;44:1299-1308.
- TON VK; MANDAL D; VAHADJI C; RAO R. Functional expression in yeast of the human secretory pathway $\text{Ca}(2+)$, $\text{Mn}(2+)$ -ATPase defective in Hailey-Hailey disease. *J Biol Chem* (Chicago) 2002;277:6422-6427.
- TOYOSHIMA C; NAKASAKO M; NOMURA H; OGAWA H. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* (London) 2000;405:647-55.
- TOYOSHIMA C & INESI G. Structural basis of ion pumping by Ca^{2+} -ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* (Palo Alto) 2004;73:269-292.
- TSAI HF; CHANG YC; WASHBURN RG; WHEELER MH; KWON-CHUNG KJ. The developmentally regulated *alb1* gene of *Aspergillus fumigatus*: its role in modulation of conidial morphology and virulence. *J Bacteriol* (Baltimore) 1998;180:3031-3038.
- TSITSIGIANNIS DI; BOK JW; ANDES D; NIELSEN KF; FRISVAD JC; KELLER NP. *Aspergillus* cyclooxygenase-like enzymes are associated with prostaglandin production and virulence. *Infect Immun* (Washington) 2005;73:4548-4559.
- UCCELLETTI D; FARINA F; PALLESCHI C. The *KlPMR1* gene of *Kluyveromyces lactis* encodes for a P-type Ca^{2+} -ATPase. *Yeast* (Manchester) 1999;15:593-599.
- UCCELLETTI D; MANCINI P; FARINA F; MORONE S; PALLESCHI C. Inactivation of the *KlPMR1* gene of *Kluyveromyces lactis* results in defective cell wall morphogenesis. *Microbiology* (Washington) 1999;145:1079-1087.
- VAN BAELEN K; VANOEVELEN J; MISSIAEN L; RAEYMAEKERS L; WUYTACK F. The Golgi *PMR1* P-type ATPase of *Caenorhabditis elegans* identification of the gene and demonstration of calcium and manganese transport. *J Biol Chem* (Chicago) 2001;276:10683-10691.

- VERDOES JC; PUNT PJ; STOUTHAMER AH; VAN DEN HONDEL CA. The effect of multiple copies of the upstream region on expression of the *Aspergillus niger* glucoamylase-encoding gene. *Gene* (Amsterdam) 1994;145:179-187.
- VERMA NK; DEY CS. RNA-mediated gene silencing: mechanisms and its therapeutic applications. *J Clin Pharm Ther* (Oxford) 2004;29:395-404.
- VOLCHUK A; RAVAZZOLA M; PERRELET A; ENG WS; DI LIBERTO M; VARLAMOV O; FUKASAWA M; ENGEL T; SOLLNER TH; ROTHMAN JE; ORCI L. Countercurrent distribution of two distinct SNARE complexes mediating transport within the Golgi stack. *Mol Biol Cell* (Bethesda) 2004;15:1506-1518.
- VONK AG; WIELAND CW; NETEA MG; KULLBERG BJ. Phagocytosis and intracellular killing of *Candida albicans* blastoconidia by neutrophils and macrophages: a comparison of different microbiological test systems. *J Microbiol Methods* (Amsterdam) 2002;49:55-62.
- WANKE B; LAZERA MDOS S; NUCCI M. Fungal infections in the immunocompromised host. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (Rio de Janeiro) 2000;95:153-158.
- WATERHOUSE PM; GRAHAM MW; WANG MB. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* (Washington) 1998;95:13959-13964.
- WOOTTON LL; ARGENT CCH; WHEATLEY M; MICHELANGELI F. The expression, activity and localisation of the secretory pathway Ca^{2+} -ATPase (SPCA1) in different mammalian tissues. *Biochim Biophys Acta* (Amsterdam) 2004;1664:189-197.
- YANG J; KANG HA; KO SM; CHAE SK; RYU DD; KIM JY. Cloning of the *Aspergillus niger* pmrA gene, a homologue of yeast PMR1, and characterization of a pmrA null mutant. *FEMS Microbiol Lett* (Amsterdam) 2001;199:97-102.
- YOSHIMOTO H; SALTSMAN K; GASCH AP; LI HX; OGAWA N; BOTSTEIN D; BROWN PO; CYERT MS. Genome-wide analysis of gene expression regulated by the calcineurin/Crz1p signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* (Chicago) 2002;277:31079-31088.