UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Sistema de aquisição de fosfato inorgânico no fungo patogênico
humano *Aspergillus fumigatus***

Paula Fagundes de Gouvêa

Ribeirão Preto

2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Sistema de aquisição de fosfato inorgânico no fungo patogênico
humano *Aspergillus fumigatus***

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Biociências Aplicadas à Farmácia
para obtenção do Título de Mestre em
Biociências Aplicadas à Farmácia.

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia

Orientado: Paula Fagundes de Gouvêa

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman

Ribeirão Preto

2009

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

Gouvêa, Paula Fagundes

Sistema de aquisição de fosfato inorgânico no fungo patogênico humano *Aspergillus fumigatus*. Ribeirão Preto, 2009.

134 p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, Apresentada a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Goldman, Gustavo Henrique.

1. *Aspergillus fumigatus*. 2. pho80. 3. pho84. 4. pho85. 5. fosfato
6. microarray. 7. pkaC1

FOLHA DE APROVAÇÃO

Paula Fagundes de Gouvêa

Sistema de aquisição de fosfato no fungo patogênico humano *Aspergillus fumigatus*.

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Biociências Aplicadas à Farmácia
para obtenção do Título de Mestre em
Biociências Aplicadas à Farmácia.

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia

Orientador: Prof. Dr. Gustavo
Henrique Goldman

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico

Aos meus queridos pais Isabel e Sérgio, pelo exemplo de vida, confiança, amor,
apoio e dedicação concedidos a mim.

Ao Alexandre, meu noivo por me fazer acreditar e seguir sempre em frente.

Aos meus irmãos, Viviane e João Luis, eterna gratidão e carinho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman,
Obrigado pela grande oportunidade, pelo apoio e pelos ensinamentos
compartilhados ao longo do meu trabalho.

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

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dr. Maria Helena de Souza Goldman, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras USP, Ribeirão Preto pelo apoio e por todo suporte técnico.

Ao Prof. Dr. José Antunes Rodrigues, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP por permitir a utilização do aparelho cintilador.

À Prof^ª. Dr. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, Prof^ª. Dr. Lucia Maria Carareto Alves e Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, UNESP, pelo auxílio nas hibridizações de *microarray* e por permitir o uso dos equipamentos necessários nestes experimentos.

À TIGR (“The Institute for genomic Research”) pelo envio das lâminas de *microarray* de *A. fumigatus*.

Aos amigos do laboratório, deste e de outros tempos, Prof^ª. Dra. Márcia Eliana da Silva Ferreira Balieiro, Dra. Márcia Regina Von Zeska Kress Fagundes, Dr. Frederico Marianetti Soriani, Dr. Everaldo dos Reis Marques, Dr. André Mota Jr., Luciano Ângelo Bernardes, Érika do Nascimento, Joel Fernandes Lima, Ana Cristina Colabardini Barreiro, Patrícia Alves de Castro, Alan Oliveira e Silva, André Lopes, Álvaro Denis Vale, Davidson Duarte Custódio, Sara Raquel Carvalho, Bárbara de Castro Figueiredo, Carolina Morgon Guerreiro, Camila Matsumoto, Mônica Campiteli, Taisa Magnani. Obrigado por proporcionarem um ótimo convívio e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos técnicos do laboratório deste e de outros tempos, Dra. Marcela Savoldi e José Luis Capellaro, obrigado pela ajuda em inúmeras etapas do trabalho e pelo convívio sempre agradável.

Ao meu noivo Alexandre, a quem amo, por fazer os momentos difíceis se tornarem simples, pelo carinho, dedicação e por estar sempre me apoiando ao longo desta jornada.

Ao meu avô Álvaro, tios, tias, primos e primas, em especial meus padrinhos Ana Márcia e Vicente, pela torcida, apoio e incentivo durante mais esta etapa da minha vida.

À minha segunda família D. Wanda, Sr. Octávio, Reinaldo e Renata, Carlos e Cláudia e meus queridos sobrinhos Gustavo, Luis Guilherme, Carolina e Júlia. Obrigado pelo apoio e carinho.

Aos meus amigos Beto, Rose, Márcio, Aline, Saulo, Taís, José Octávio, Heitor, Rafael obrigado pelos momentos de alegria que passamos juntos e pelo carinho.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, juntamente com os funcionários e professores da seção de Pós-Graduação em Biociências aplicadas à Farmácia desta mesma unidade.

A todas as pessoas e instituições que de alguma forma contribuíram para realização deste projeto.

“A persistência é o caminho do êxito.”
Charles Chaplin

RESUMO

GOUVÊA, P. F. **O sistema de aquisição de fosfato inorgânico no fungo patogênico humano *Aspergillus fumigatus***. 2009. 134f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

A percepção e aquisição de nutrientes essenciais do meio ambiente estão associadas com o desenvolvimento do fungo saprófita *A. fumigatus* em um ambiente hostil. O fosfato inorgânico é um dos nutrientes essenciais para o desenvolvimento deste fungo. Os sistemas para aquisição de fosfato em células eucarióticas têm sido caracterizados como sistema de alta afinidade, o qual é ativado em resposta a ausência externa de fosfato e sistema de baixa afinidade, o qual assegura um suprimento de fosfato em concentrações normais ou altas de fosfato extracelular. Como um passo inicial para o entendimento da via *PHO* em *A. fumigatus*, caracterizou-se o homólogo PHO80, PHO84 e PHO85 aqui denominados *phoB*^{PHO80}, *phoD*^{PHO84} e *phoA*^{PHO85}, respectivamente. Resultados mostraram que o mutante $\Delta phoB^{PHO80}$ apresenta um defeito no crescimento polarizado e que existe uma interação entre o metabolismo de *PhoB*^{PHO80}, da calcineurina e do cálcio. As hibridações de *microarray* realizadas com RNA obtido das cepas mutante $\Delta phoB^{PHO80}$ e selvagem mostraram que os genes Afu4g03610 (*phoD*^{PHO84}), Afu7g06350 (*phoE*^{PHO89}), Afu4g06020 (*phoC*^{PHO81}) e Afu2g09040 (transportador vacuolar *Vtc4*) estão mais expressos no “background” do mutante $\Delta phoB^{PHO80}$ ou em concentração de 0.1 mmol/L de fosfato. Nossos resultados indicam que a mutação $\Delta phoB^{PHO80}$ pode afetar o acúmulo de polifosfato em vacúolos em alta ou baixa concentração de fosfato extracelular. Não obteve-se êxito na deleção da quinase *phoA*^{PHO85} desta forma pode-se levar em consideração que o gene *phoA*^{PHO85} parece ser essencial em *A. fumigatus*. Surpreendentemente, a cepa com a deleção de *phoD*^{PHO84} não apresentou nenhum fenótipo diferente da sua cepa selvagem. Além do mais, as cepas mutantes $\Delta phoB^{PHO80}$ e $\Delta phoD^{PHO84}$ não apresentaram redução na virulência em um modelo murino de aspergilose invasiva. Nossos resultados sugerem também, que a deleção da proteína quinase A está contribuindo para um decréscimo na expressão de genes *PHO* em *A. fumigatus*.

Palavras-chave: 1. *Aspergillus fumigatus*. 2. fosfato. 3. *pho80*. 4. *pho84*. 5. *pho85*. 6. *microarray*. 7. *pkaC1*

ABSTRACT

GOUVÊA, P. F. **System of inorganic phosphate acquisition in the human pathogen fungi *Aspergillus fumigatus***. 2009. 134f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto -Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Environmental sensing and retrieval of nutrients from the environment are associated with growth of *A. fumigatus* in inhospitable environments. Phosphate is an ion that is essential for fungal growth. The systems for inorganic phosphate (Pi) acquisition in eukaryotic cells (PHO) have been characterized as a low-affinity (that assures a supply of Pi at normal or high external Pi concentrations) and a high-affinity (activated in response to Pi starvation). Here, as an initial step to understand the PHO pathway in *Aspergillus fumigatus*, we characterized the PHO80, PHO84 and PHO85 homologues, here denominated *phoB*^{PHO80}, *phoD*^{PHO84} and *phoA*^{PHO85}, respectively. We show that the $\Delta phoB^{PHO80}$ mutant has a polar growth defect (i.e., a delayed germ tube emergence) and, by phenotypic and phosphate uptake analyses, establish a link between *PhoB*^{PHO80}, calcineurin and calcium metabolism. *Microarray* hybridizations carried out with RNA obtained from wild-type and $\Delta phoB^{PHO80}$ mutant cells identify Afu4g03610 (*phoD*^{PHO84}), Afu7g06350 (*phoE*^{PHO89}), Afu4g06020 (*phoC*^{PHO81}), and Afu2g09040 (vacuolar transporter *Vtc4*) as more expressed both in the $\Delta phoB^{PHO80}$ mutant background and under phosphate-limiting conditions of 0.1 mM Pi. Epi-fluorescence microscopy revealed accumulation of poly-phosphate in $\Delta phoB^{PHO80}$ vacuoles, which was independent of extracellular phosphate concentration. We also tried to isolate the $\Delta phoA^{PHO85}$ deletion strain without success after several times what raises the interesting possibility that the $\Delta phoA^{PHO85}$ null mutant might be essential in *Aspergillus fumigatus*. Surprisingly, *phoD*^{PHO84} deletion mutant is indistinguishable phenotypically from the corresponding wild-type strain. mRNA analyses suggest that protein kinase A absence supports the expression of PHO genes in *A. fumigatus*. Furthermore, $\Delta phoB^{PHO80}$ and $\Delta phoD^{PHO84}$ mutant are fully virulent in a murine low dose model for invasive aspergillosis.

Keywords: 1. *Aspergillus fumigatus*. 2. phosphate. 3. pho80. 4. pho84. 5. pho85. 6. microarray. 7. pkaC1

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01. Modelo ilustrativo da via <i>PHO</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
Figura 02. Representação esquemática do mecanismo de recombinação homóloga em leveduras.....	48
FIGURA 03. Representação esquemática do vetor pRS426 utilizado na recombinação homóloga em leveduras para a construção do cassete de deleção. .	49
FIGURA 04. Representação esquemática da estratégia de deleção do gene <i>phoB</i> ^{PHO80}	58
FIGURA 05. Representação esquemática da estratégia de deleção do gene <i>phoA</i> ^{PHO85}	59
FIGURA 06. Representação esquemática do mecanismo de recombinação homóloga do cassete de inserção do promotor <i>niiA</i> no DNA genômico do <i>A. fumigatus</i>	61
FIGURA 07. PCR mostrando a confirmação da inserção homóloga do cassete <i>alcA::phoA</i> ^{PHO85} no DNA genômico mediante a substituição do promotor endógeno do gene <i>phoA</i> ^{PHO85}	61
FIGURA 08. PCR mostrando a confirmação da inserção homóloga do cassete <i>niiA::phoA</i> ^{PHO85} no DNA genômico mediante a substituição do promotor endógeno do gene <i>phoA</i> ^{PHO85}	62
FIGURA 09. Fenótipo do transformante <i>alcA::phoA</i> ^{PHO85} obtido pela estratégia de substituição do promotor endógeno do gene <i>phoA</i> ^{PHO85}	62
FIGURA 10. Fenótipo do transformante <i>niiA::phoA</i> ^{PHO85} obtido pela estratégia de substituição do promotor endógeno do gene <i>phoA</i> ^{PHO85}	63
FIGURA 11. Análise da cinética de divisão nuclear na cepa mutante $\Delta phoB$ ^{PHO80} ...	65
FIGURA 12. Análise do crescimento polarizado em germinantes da cepa mutante $\Delta phoB$ ^{PHO80}	68
FIGURA 13. Atividade da fosfatase ácida no mutante $\Delta phoB$ ^{PHO80} em 0.1 mmol/L e 11 mmol/L de fosfato e o transporte de fosfato em 11mmol/L de fosfato.....	70
FIGURA 14. A sensibilidade do mutante $\Delta phoB$ ^{PHO80} à ciclosporina A.	73
FIGURA 15. Sensibilidade do mutante $\Delta phoB$ ^{PHO80} ao cálcio.	74
FIGURA 16. Expressão do mRNA de genes selecionados em resposta a diferentes concentrações de fosfato inorgânico	79
FIGURA 17. O acúmulo de polifosfato no mutante $\Delta phoB$ ^{PHO80}	81
FIGURA 18. Representação esquemática da estratégia de deleção do gene <i>pho84</i>	82
FIGURA 19. Atividade da fosfatase ácida no mutante $\Delta pkaC1$ em 0.1 e 11 mmol/L de fosfato.....	83
FIGURA 20. Expressão do mRNA de <i>phoC</i> ^{PHO81} e <i>phoD</i> ^{PHO84} em resposta a concentrações de fosfato no mutante da proteína quinase A ($\Delta pkaC1$).....	84
FIGURA 21. A virulência do mutante $\Delta phoB$ ^{PHO80} e $\Delta phoD$ ^{PHO84} de <i>A. fumigatus</i>	86

LISTA DE TABELAS

TABELA 01. Genótipos das linhagens de <i>A. fumigatus</i> utilizadas neste trabalho. ...	16
TABELA 02. Seqüência dos primers LUX utilizados nas reações de RT-PCR em tempo real.	38
TABELA 03. Seqüência dos primers utilizados para a produção do cassete de deleção do gene <i>pho80</i> pela técnica “PCR-mediated”.	43
TABELA 04. Seqüência dos primers utilizados para a produção do cassete de deleção dos genes <i>pho84</i> e <i>pho85</i>	49
TABELA 05. Seqüência dos primers utilizados para a produção do mutante condicional do gene <i>phoA</i> ^{PHO85} com o promotor <i>alcA</i>	51
TABELA 06. Seqüência dos primers utilizados para a produção do mutante condicional do gene <i>phoA</i> ^{PHO85} com o promotor <i>niiA</i>	53
TABELA 07. Genes relacionados e não relacionados ao metabolismo do fosfato inorgânico no mutante $\Delta phoB$ ^{PHO80}	78

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AMP cíclico	Adenosina monofosfato cíclico
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Albumina de soro bovino
CDK	Quinase dependente de ciclina
cDNA	DNA complementar
CPT	Camptotecina
DAPI	4,6-diamino-2-fenilindol
DEPC	dietil pirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade ótica
DTT	Ditiotreitol
dNTP	Desoxiribonucleotídeos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
EDTA	Ácido etilenodiamina tetraacético
<i>g</i>	Gravidade
HU	Hidroxiuréia
Kb	Kilo bases
MM	Meio Mínimo
Mb	Mega bases
Mm	Mili molar
mRNA	RNA mensageiro
ORF	Região aberta de leitura (“open reading frame”)
PBS	Salina fosfato tamponada
pyrG	Gene orotidina-5'-fosfato descarboxilase de <i>A. fumigatus</i>
p/v	Peso/volume
RT-PCR	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
rpm	Rotação por minuto
r^2	Coeficiente de correlação
SBF	Soro bovino fetal
SSC	Solução salina citrato

SDS	Dodecil sulfato de sódio
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TE	Tampão Tris-EDTA
TIGR	“The Institute for Genomic Research”
TRIS	Tris-(hidroximetil)-aminometano
U	Unidade
v/v	Volume/volume
4-NQO	óxido de 4-nitroquinolina

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	v
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Aspergillus fumigatus</i>	2
1.2 Características macroscópicas e microscópicas	2
1.3 Patogênese.....	3
1.4 CDKs e ciclinas.....	5
1.5 Metabolismo do fosfato.....	8
2. OBJETIVOS.....	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1 Linhagens de <i>A. fumigatus</i> utilizadas neste trabalho	16
3.2 Meios de cultivo.....	16
3.2.1 SC (meio mínimo)	16
3.2.2 YPD.....	17
3.2.3 LB (Lúria Bertani)	17
3.2.4 Meio Mínimo (MM)	18
3.2.5 Meio completo (YAG, YUU, YG e YG+UU).....	18
3.2.6 Meio mínimo modificado (AMM).....	19
3.3 Soluções e tampões	19
3.3.1 Salina fosfato tamponada (PBS)	19
3.3.2 Tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 50x concentrado	20
3.3.3 Tampão de ressuspensão para extração de plasmídios.....	20
3.3.4 Tampão de extração de DNA.....	20
3.3.5 Tampão de amostra para eletroforese de DNA.....	21
3.3.6 Tampão MOPS 10x concentrado	21
3.3.7 Tampão de amostra para eletroforese de RNA.....	21
3.3.8 Tampão Tris-EDTA (TE) 1X.....	22
3.3.9 Tampão Acetato de Sódio 100 mmol/L pH 4.6.....	22
3.3.10 Acetato de Lítio 1X.....	22
3.3.11 Solução de Elementos Traços	23

3.3.12 Solução de sais 20x para Meio Mínimo.....	23
3.3.13 Solução de Sais 20x para Meio Mínimo modificado (AMM).....	24
3.3.14 Solução 1 (protocolo esferoplastização <i>A. fumigatus</i>).....	24
3.3.15 Solução 2 (protocolo esferoplastização <i>A. fumigatus</i>).....	24
3.3.16 Solução 3 (protocolo esferoplastização <i>A. fumigatus</i>).....	25
3.3.17 Solução 4 (protocolo esferoplastização <i>A. fumigatus</i>).....	25
3.3.18 Solução 5 (protocolo esferoplastização <i>A. fumigatus</i>).....	26
3.3.19 Solução de Denhardt (100X concentrada)	26
3.3.20 Solução salina citrato (SSC) 20X concentrada	26
3.3.21 Solução de lise para extração de plasmídios	27
3.3.22 Solução de neutralização para extração de plasmídios	27
3.3.23 Solução SDS 10%.....	27
3.3.24 Solução de fixação para microscopia.....	28
3.3.25 Solução estoque de DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol).....	28
3.3.26 Solução estoque de calcoflúor	28
3.3.27 Solução estoque de filipina	28
3.4 Protocolos adotados	29
3.4.1 Isolamento do DNA	29
3.4.2 Eletroforese em gel de agarose	29
3.4.3 Preparo de células competentes de <i>S. cerevisiae</i> e transformação.....	30
3.4.4 Extração de DNA de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
3.4.5 Preparo de células eletrocompetentes	31
3.4.6 Eletrotransformação de bactérias.....	32
3.4.7 Preparação em pequena escala de DNA plasmidial	32
3.4.8 Produção de esferoplastos de <i>A. fumigatus</i>	33
3.4.9 Transformação de <i>A. fumigatus</i>	34
3.4.10 Southern Blot alcalino	34
3.4.11 Marcação de sonda radioativa	35
3.4.12 Hibridação das membranas de Southern blot	35
3.4.13 Extração e manipulação de RNA	36
3.4.14 Reação de PCR quantitativo em tempo real (“Real time RT-PCR”).....	37
3.4.15 Desenho experimental dos <i>microarrays</i>	38
3.4.15.1 Hibridização das lâminas de <i>microarray</i> de <i>A. fumigatus</i>	38
3.4.15.2 Captura e análise estatística das imagens de <i>microarray</i>	40
3.4.16 Deleção, mediada por PCR, do gene <i>pho80</i>	41
3.4.17 Análises fenotípicas do mutante $\Delta phoB^{PHO80}$	43
3.4.17.1 Análise do crescimento radial em diferentes meios de cultura	43
3.4.17.2 Análise do crescimento radial na presença de estresses	44
3.4.17.3 Análises microscópicas	44
3.4.17.4 Dosagem da Enzima Fosfatase Ácida no mutante $\Delta phoB^{PHO80}$	46
3.4.17.5 Transporte de fosfato no mutante $\Delta phoB^{PHO80}$	47
3.4.18 Deleção dos genes <i>pho84</i> e <i>pho85</i> pela técnica de recombinação “in vivo” em <i>S. cerevisiae</i>	47
3.4.19 Análise fenotípica do mutante $\Delta phoD^{PHO84}$	50
3.4.19.1 Análise do crescimento radial em diferentes meios de cultura	50
3.4.19.2 Análise do crescimento radial em situações de estresses.....	50
3.4.20 Construção de uma linhagem condicional do gene <i>phoA</i> ^{PHO85} , com o promotor <i>alcA</i>	50
3.4.20.1 Análise fenotípica do mutante condicional <i>alcA::phoA</i> ^{PHO85}	52

3.4.21 Construção de uma linhagem condicional do gene <i>phoA</i> ^{PHO85} , com o promotor <i>niiA</i>	52
3.4.21.1 Análise fenotípica do mutante condicional <i>niiA::phoA</i> ^{PHO85}	53
3.4.22 Infecção em modelo animal	53
3.4.23 Análise estatística	54
4. RESULTADOS.....	55
4.1 Identificação e deleção dos genes <i>pho80</i> e <i>pho85</i>	56
4.2 Construção e caracterização dos mutantes condicionais <i>alcA::phoA</i> ^{PHO85} e <i>niiA::phoA</i> ^{PHO85}	59
4.3 Análise da cinética de divisão nuclear no mutante Δ <i>phoB</i> ^{PHO80}	63
4.4 Análise da polarização do crescimento em conídios da linhagem Δ <i>phoB</i> ^{PHO80}	66
4.5 Atividade da Enzima Fosfatase Ácida e Transporte do Fosfato no mutante Δ <i>phoB</i> ^{PHO80}	68
4.6 Sensibilidade da cepa mutante Δ <i>phoB</i> ^{PHO80} à ciclosporina A e ao cálcio.....	71
4.7 Identificação de genes modulados pela deleção do gene <i>phoB</i> ^{PHO80} através de hibridações de <i>microarray</i> e validação por RT-PCR.....	75
4.8 Expressão de genes envolvidos na aquisição de fosfato no mutante com a deleção da proteína quinase A (Δ <i>pkc1</i>) de <i>A. fumigatus</i>	82
4.9 Virulência da cepa mutante Δ <i>phoB</i> ^{PHO80} e Δ <i>phoD</i> ^{PHO84} em modelo animal	85
5. DISCUSSÃO	87
6. CONCLUSÕES	92
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
8. APÊNDICE.....	104
8.1 Apêndice A - Artigo publicado: “Functional characterization of the <i>Aspergillus fumigatus</i> PHO80 homologue”. <i>Fungal Genet. Biol.</i> v. 45, p. 1135-1146, 2008.....	105

1.1 *Aspergillus fumigatus*

As doenças fúngicas invasivas são um sério problema de saúde pública e causa de mortalidade em todo o mundo. O desenvolvimento de drogas visando o controle de fungos patogênicos têm sido relativamente negligenciado. Consequentemente existe uma necessidade premente do desenvolvimento de novas medidas terapêuticas visando o tratamento destas doenças (Loudon et al., 1994; Hogan et al., 1996).

A aspergilose é o termo geral que designa a 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* (Loudon et al., 1994; Hogan et al., 1996).

Aspergillus fumigatus é um fungo saprófita 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 (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 de órgãos, este ascomiceto deixou de ser apenas um fungo saprofítico de menor importância para se tornar um dos principais agentes patogênicos humanos (Latgé, 1999). Embora as hospitalizações relacionadas com aspergiloses representem pequena parcela do total de hospitalizações, as estatísticas mostram que nos Estados Unidos o custo total com aspergiloses foi de aproximadamente 633 milhões de dólares em 1996 (Stevens, 2004).

1.2 Características macroscópicas 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; ao microscópio óptico, as cabeças conidiais mostram aspecto de vesículas em forma de frasco, com uma série de fiáldes 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. *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).

1.3 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 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 e as 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, *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 (Tekaiia & Latgé, 2005).

No entanto, *A. fumigatus* possui algumas características que contribuem para a sua patogenicidade. Além das características microbiológicas do fungo, como rápido crescimento e o tamanho reduzido dos conídios, inúmeros outros fatores de

virulência foram caracterizados e dentre eles pode-se destacar a identificação de um vasto sistema de “turnover” de radicais livres, componentes específicos da parede celular, além de metabólitos secundários do fungo que atuam como toxinas no organismo hospedeiro, entre outros (Stevens, 2004; Missall et al., 2004; Tekaia & Latgé, 2005; Rementeria et al., 2005).

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).

Para *A. fumigatus*, a principal porta de entrada e sítio de infecção em muitos pacientes 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).

As formas clínicas que se desenvolvem durante a infecção pelo gênero *Aspergillus*, em pacientes imunocompetentes, 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 há o crescimento e colonização pelo micélio e geralmente requerem a 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 e 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 e ocorre entre 5 a 10% em pacientes transplantados, sendo um problema clinicamente importante e comum (Rivera et al., 2006). Na aspergilose invasiva, após a inalação dos conídios, há surgimento de lesões granulomatosas nos pulmões ou nos brônquios, que podem se disseminar do tecido pulmonar para os vasos sanguíneos que irrigam estes órgãos, afetando o encéfalo, trato gastrointestinal e rins, sendo a forma disseminada geralmente aguda e fatal (Latgé, 1999).

1.4 CDKs e ciclinas

Todos os organismos devem interagir e responder às modificações do meio ambiente para manutenção da viabilidade, crescimento e proliferação. Por isso, a percepção e aquisição de nutrientes essenciais do meio ambiente estão associadas com o desenvolvimento do fungo saprófita *A. fumigatus* em um ambiente hostil (Fox & Heitman, 2002; Tekaia & Latgé, 2005).

O fosfato inorgânico é um dos nutrientes essenciais para o desenvolvimento de vários organismos, sendo requerido em muitos processos metabólicos como na biossíntese de diversos componentes celulares, incluindo os ácidos nucleicos, lipídeos e açúcares, no metabolismo energético e na transdução de sinais (Auesukaree et al., 2003).

A aquisição celular, armazenamento, liberação e integração metabólica do fosfato inorgânico está baseada na participação essencial de numerosas enzimas, tais como fosfatases extracelulares ácidas e alcalinas, fosfodiesterases, transportadores de fosfato, quinases de polifosfato e endopolifosfatases (Persson et al., 2003).

As quinases dependentes de ciclinas (CDKs) são uma grande família de proteínas reguladas positivamente por ciclinas. Elas regulam vários processos em células eucarióticas incluindo a transcrição, o metabolismo celular, a integridade da célula, adaptação ao stress e desenvolvimento (Wu et al., 2004).

Em organismos eucariotos, a expressão diferencial das ciclinas durante a divisão celular regula todo este processo (Li & Wang, 2003). Além disso, elas atuam como proteínas regulatórias interagindo com as CDKs alterando a conformação da subunidade catalítica destas, tornando-as ativas (Acosta et al., 2004).

Em *S. cerevisiae*, a ciclina Pho80, a primeira ciclina relacionada à quinase Pho85 identificada, atua formando um complexo com a CDK Pho85 sendo que este complexo regula negativamente a expressão de genes da via *PHO*, que é a via responsável pela ativação de genes necessários para percepção e aquisição do fosfato, e regula também a expressão de genes PHM/VTC, que codificam para proteínas vacuolares envolvidas no acúmulo de polifosfato (Wu et al., 2004). Um ortólogo da ciclina Pho80 de *S. cerevisiae* foi isolado em *A. nidulans* através da interação com a quinase dependente de ciclina PhoA (An-Pho80). Diferentemente de PhoA, a ciclina An-Pho80 de *A. nidulans* possui um papel negativo na via *PHO*, assim como em *S. cerevisiae*. Sob baixas condições de fosfato, a ciclina An-Pho80 regula o desenvolvimento celular independentemente da via *PHO*, enquanto que em altas concentrações de fosfato, ela afeta o desenvolvimento através desta via (Wu et al., 2004). Homólogos de Pho80 de *S. cerevisiae* têm sido caracterizados em outros organismos como, por exemplo, as ciclinas CYC2 e CYC6 de *Trypanosoma cruzi* e *T. brucei*, respectivamente, as quais são envolvidas no ciclo celular e na diferenciação celular. Em *Arabidopsis thaliana* sete ciclinas do tipo P ou CYCPs, que apresentam uma significativa similaridade com a proteína Pho80 de *S. cerevisiae* foram identificadas. Especificamente a ciclina CYCP4,2 participa da via de aquisição de fosfato neste organismo (Acosta et al., 2004). Em *Schizosaccharomyces pombe*, foi isolado um gene que codifica uma ciclina que possui homologia com as ciclinas de Pho85 de *S. cerevisiae*, denominada Pas1. Análises genéticas revelaram que esta ciclina participa do ciclo celular neste organismo, mas não está envolvida no metabolismo do fosfato (Tanaka & Okayama, 2000).

Em *Saccharomyces cerevisiae* existem seis CDKs: Cdc28, Pho85, Kin28, Srb10/Cdk8, Sgv1/Bur1 e Ctk1, onde duas destas CDKs, Cdc28 e Pho85, são ativadas por grandes famílias de ciclina, enquanto as outras CDKs aparecem associadas somente a uma única ciclina (Huang et al., 2007).

A quinase Cdc28 é a principal CDK específica do ciclo celular promovendo a transição deste ciclo quando interage com diferentes ciclinas (Bussink & Osmani, 1998). Em *S. cerevisiae*, ela é ativada por nove ciclinas, as Clns e as Clbs, as quais estão altamente relacionadas ao controle do ciclo celular, como por exemplo, as três ciclinas G1, sendo elas as Cln1, Cln2 e Cln3 que promovem os eventos em G1, como a ativação da transcrição, a germinação e a ativação de duas ciclinas da fase

S, sendo elas a Clb5 e Clb6, as quais estimulam a replicação do DNA. A quinase Cdc28 não parece estar envolvida no metabolismo do fosfato (Huang et al., 2007).

Já a quinase multifuncional Pho85 regula a progressão de G1, a polaridade da célula, a expressão gênica, o metabolismo do fosfato e glicogênio e a sinalização quando ocorrem mudanças no ambiente externo. Em *S. cerevisiae*, a quinase Pho85 associa-se com 10 diferentes ciclinas, onde somente algumas delas exibem expressão periódica no ciclo celular, diferentemente das ciclinas de Cdc28.

As ciclinas associadas à quinase Pho85 são divididas em duas subfamílias de acordo com a similaridade de suas seqüências e da relação funcional que possuem (Wu et al., 2004). A subfamília Pho80 consiste das ciclinas Pho80, Pcl6, Pcl7, Pcl8 e Pcl10 e possuem um papel na regulação do metabolismo e na percepção à mudanças no ambiente externo.

Especificamente a ciclina Pho80, associada com a quinase Pho85, atua regulando negativamente a expressão de genes do metabolismo do fosfato, como, por exemplo, o gene que codifica para a fosfatase ácida, responsável pela captação do fosfato do ambiente externo (Measday et al., 1997). As outras cinco ciclinas formam a subfamília Pcl1,2 e incluem as ciclinas Pcl1, Pcl2, Pcl9, Cgl1 e Pcl5. As ciclinas dessa subfamília associando-se com a CDK Pho85 possuem papel no controle do ciclo celular, na manutenção da parede celular e possivelmente regulam a composição do citoesqueleto (Wu et al., 2004). Como os membros da subfamília Pho80, Pcl5 possui função na percepção de nutrientes externos. As outras ciclinas da subfamília Pcl1,2 participam somente do ciclo celular. A deleção de Pho85, em *S. cerevisiae*, apresenta vários fenótipos e entre eles está a expressão constitutiva dos genes dependentes de uma baixa concentração de fosfato, além de atraso no crescimento em G1 em meio rico, pouco crescimento em fonte de carbono não fermentável, hiperacumulação de glicogênio, morfologia anormal, defeitos na esporulação, entre outros (Carrol & O'Shea, 2002; Huang et al., 2007).

Dois homólogos funcionais de Pho85 foram identificados em *Aspergillus nidulans*, sendo eles PhoA e PhoB. PhoA, possui 66.3% de identidade com a quinase Pho85 de *S. cerevisiae* e estudos mostram que diferentemente de Pho85 de *S. cerevisiae*, a quinase PhoA de *A. nidulans* não participa da regulação das enzimas envolvidas na aquisição de fosfato mas, contrariamente, está envolvida na modulação da diferenciação celular em resposta às condições ambientais, sob concentrações limitadas de fosfato (Bussink & Osmani, 1998). A deleção de *phoB*

não causa nenhum fenótipo, mesmo em condições de crescimento limitadas em fosfato (Dou et al., 2003).

Em mamíferos, a progressão do ciclo celular é caracterizada pela combinação específica de Cdk5 e suas ciclinas associadas, onde cada combinação participa de uma função específica (Hirst et al., 1994). Um homólogo funcional de Pho85, a Cdk5, foi caracterizado em mamíferos. Foi visto que a Cdk5 pode ser ativada pelas ciclinas de Pho85 de *S. cerevisiae* e formar complexos ativos os quais respondem similarmente aos sinais sentidos pelo complexo formado com a Cdk Pho85 de *S. cerevisiae*. A superexpressão da Cdk5 de mamíferos em *S. cerevisiae*, complementa muitos defeitos associados com a deleção de PHO85 neste organismo (Huang et al., 1999).

Um homólogo de PHO85, em *S. pombe*, chamado Pef1, forma um complexo com a ciclina Pcl, Pac1, que ativa o fator de transcrição Res1-Cdc 10-Rep durante a transição do ciclo celular de G1 para S, mas não participa no metabolismo do fosfato (Toh-e & Nishizawa, 2001).

1.5 Metabolismo do fosfato

Em *S. cerevisiae*, as membranas celulares, compostas primariamente por lipídeos e proteínas, não possuem função somente de separar o ambiente intracelular do extracelular e de compartimentalizar o interior em organelas funcionais especializadas, mas também participam na regulação de vários processos. Um grande número de proteínas transportadoras integrais da membrana tem sido identificadas e caracterizadas, as quais participam da interação e troca entre os compartimentos celulares, transmissão de sinais, transporte de nutrientes essenciais, íons e metabólitos e da comunicação entre as células e o ambiente ao seu redor (Persson et al., 2003).

O transporte de fosfato através da membrana plasmática é o primeiro passo para a utilização do mesmo. *S. cerevisiae* apresenta dois sistemas de internalização de fosfato (Persson et al., 2003; Auesukaree et al., 2003): (i) o sistema de alta afinidade, o qual é ativado em resposta a ausência externa de fosfato e (ii) o sistema de baixa afinidade, o qual assegura um suprimento de fosfato em concentrações normais ou altas de fosfato extracelular, sendo que ambos são compostos por

proteínas transportadoras. O sistema de alta afinidade consiste do transportador Pho84, o qual catalisa a aquisição de fosfato acoplado ao H^+ e o transportador Pho89, o qual catalisa a aquisição de fosfato acoplado ao Na^+ , sendo que o transportador Pho84 é o responsável pela maior parte da aquisição do fosfato nas células (Persson et al., 1999; Persson et al., 2003).

O sistema de baixa afinidade consiste dos transportadores Pho87, Pho90 e Pho91 (Auesukaree et al., 2003). Além de ser um transportador de fosfato, o Pho87 apresenta algumas similaridades com as seqüências de Pho81 e com seqüências de proteínas Vtc, indicando um possível papel na regulação transcricional de genes da via *PHO*. Estudos têm mostrado que os transportadores Pho90 e Pho91 possuem uma menor afinidade por fosfato que Pho84. A múltipla deleção de Pho84, Pho87, Pho89, Pho90 e Pho91 é letal para as células. Aproximadamente 25 proteínas presentes no genoma de leveduras possuem pelo menos 20% de identidade com Pho84 e é possível que muitas destas proteínas também possuam função de transportadores de fosfato (Persson et al., 2003), participando assim, do metabolismo do fosfato.

Em *S. cerevisiae*, a atividade das enzimas que participam da homeostase intracelular do fosfato está sujeita à regulação pela via de transdução de sinal, a via *PHO*, que consiste de um circuito genético regulatório, o qual permite uma resposta celular coordenada e adaptação à mudanças em relação à disponibilidade do fosfato externo livre, estando também envolvida na obtenção e percepção específica do fosfato de fontes extracelulares. O processo de assimilação do fosfato externo ocorre através da ativação de genes desta via, sendo que estes genes são regulados ao nível transcricional. Essa regulação é mediada pelo fator de transcrição Pho4 em cooperação com o co-ativador Pho2. Os genes alvo tipicamente ativados por Pho4 codificam para os transportadores de alta afinidade de fosfato, Pho84 e Pho89 e para fosfatase ácida secretada, Pho5 (Huang et al., 2007; Lenburg and O'Shea, 1996; Mouillon & Persson, 2006; Persson et al., 2003; Swinnen et al., 2005).

Em *S. cerevisiae*, os principais componentes da via *PHO* são: um complexo de uma quinase dependente de ciclina (CDK) Pho85, e uma de suas ciclinas, Pho80, sendo que este complexo regula negativamente a expressão de genes *PHO*; o inibidor do complexo, Pho81 e os fatores de transcrição Pho4 e Pho2, os quais atuam como reguladores positivos. O substrato mais bem caracterizado de Pho85 é

o fator de transcrição Pho4, o qual ativa a expressão de genes envolvidos no metabolismo do fosfato e na função vacuolar (Huang et al., 2007). Quando a concentração de fosfato externo é alta, o complexo Pho85-Pho80 torna-se ativo, fosforila e conseqüentemente inativa o fator de transcrição Pho4, o qual é transportado do núcleo para o citoplasma (Figura 01 A) (Persson et al., 2003). A ciclina Pho80, também é fosforilada pela Pho85 e essa fosforilação parece ser requerida para a função de Pho80 (Huang et al., 2007).

Em contraste, quando a célula encontra-se em um ambiente com uma baixa concentração de fosfato, ocorre a indução de uma série de genes como, por exemplo, o transportador de fosfato Pho84, a fosfatase ácida Pho5 e proteínas envolvidas no armazenamento de fosfato (Springer et al., 2003). O inibidor Pho81 interage com o complexo Pho85-Pho80 inativando-o e deste modo, permitindo a desfosforilação do fator transcripcional Pho4 que juntamente com Pho2, migra para o núcleo e induz a expressão dos genes da via *PHO* (Figura 01 B) (Person et al., 2003). Pho81 é também fosforilado pela Pho85 e essa fosforilação é essencial para a sua atividade como inibidor (Huang et al., 2007).

FIGURA 01. Modelo ilustrativo da via *PHO* de *Saccharomyces cerevisiae*. Extraído e adaptado de Persson et al., 2003.

O fator de transcrição Pho4 também ativa VTC1, 2, 3 e 4 que são genes envolvidos na acumulação de polifosfato em vacúolos (Huang et al., 2007). Os vacúolos de polifosfato podem ser encontrados em muitas células como, por exemplo, em bactérias, fungos, protozoários, plantas e animais (Kulaev, 1979; Kulaev & Vegabov, 1983). Os níveis de fosfato intracelular são altamente regulados e o excesso de fosfato é armazenado em vacúolos como polímeros de polifosfatos que podem ser utilizados quando há uma baixa concentração de fosfato na célula. O polifosfato possui várias funções como seqüestro e armazenamento de cátions,

transporte de fosfato, formação do envelope celular, controle da expressão gênica, regulação da atividade enzimática, adaptação ao estresse e ainda como fonte alternativa de energia (Kornenberg et al., 1999; Boyce et al., 2006).

Em *S. cerevisiae*, *Vtc4* é requerido durante a fusão das vesículas que armazenam o fosfato inorgânico com posterior formação do polifosfato (Muller et al., 2002). Recentemente, foi visto que o gene *vtc4* também influencia o armazenamento de polifosfato em vacúolos no fungo patogênico de milho *U. maydis* (Boyce et al., 2006).

A via *PHO* parece ser altamente conservada entre *S. cerevisiae* e *Neurospora crassa*, sendo que este último organismo possui componentes da via *PHO* homólogos em *S. cerevisiae*, os quais também ativam genes relacionados ao metabolismo do fosfato. Estes componentes são um inibidor de CDK, o NUC-2 que se interage com o complexo ciclina-CDK, denominado PGOV-PREG e o fator de transcrição NUC-1. Entretanto, *A. nidulans* possui genes como *Pho81* e *Pho85* (*PhoA* e *PhoB*), os quais não possuem a função conservada no metabolismo do fosfato (Wu et al., 2004).

Previamente, estudos mostraram que, em *A. fumigatus*, o mutante da calcineurina ($\Delta calA$), uma serina/treonina fosfatase regulada por Ca^{2+} /calmodulina, apresenta deficiência no crescimento em soro fetal bovino, o qual contém baixas concentrações de fosfato (Da Silva Ferreira et al., 2007). A adição de fosfato ao soro complementa o fenótipo defectivo de crescimento deste mutante. Estas evidências sugerem que, em *A. fumigatus*, a calcineurina é essencial na sinalização celular durante o crescimento em baixas concentrações de fosfato. Além disso, genes que codificam para transportadores de fosfato apresentaram sua expressão alterada com a inibição da calcineurina, sugerindo que a deficiência na aquisição do fosfato pode estar relacionada a uma diminuição no transporte deste íon (Da Silva Ferreira et al., 2007).

Em *A. fumigatus*, os conhecimentos sobre a via *PHO*, bem como a sinalização celular responsável pelo íon fosfato são bastante limitados. Desta forma, como uma maneira de se avaliar e entender melhor o metabolismo de fosfato no fungo patogênico *A. fumigatus*, os objetivos deste trabalho foram:

(i) isolar e caracterizar fenotipicamente os mutantes $\Delta phoA^{PHO85}$, $\Delta phoB^{PHO80}$ e $\Delta phoD^{PHO84}$; e

(ii) analisar, através de hibridações com *microarrays*, padrões de expressão gênica em diferentes condições de crescimento em presença de fosfato.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagens de *A. fumigatus* utilizadas neste trabalho

TABELA 01. Genótipos das linhagens de *A. fumigatus* utilizadas neste trabalho.

Linhagens	Genótipo	Referências
$\DeltaakuB^{ku80}$	$\Delta ku80::pyrG$	Da Silva Ferreira et al., 2006
$\Delta phoA^{PHO85}$	$\Delta pho85::pyrG$	este trabalho
$\Delta phoB^{PHO80}$	$\Delta pho80::pyrG$	este trabalho
$\Delta phoD^{PHO84}$	$\Delta pho84::pyrG$	este trabalho
$alcA:: phoA^{PHO85}$	$alcA:: phoA^{PHO85}::pyrG^+$	este trabalho
$niiA:: phoA^{PHO85}$	$NiiA:: phoA^{PHO85}::pyrG^+$	este trabalho
ATCC46645	Selvagem	ATCC
$\Delta pkaC1$	$pkaC1::hph \Delta pkaC1, Hig^f$	Liebmann et al., 2004

3.2 Meios de cultivo

3.2.1 SC-URA⁻ (meio mínimo)

Base de nitrogênio para levedura	0,67% (p/v)
Glicose	2,00% (p/v)
Lisina; Leucina; Triptofano	0,01% (p/v)
Histidina	0,005%(p/v)
Água destilada q.s.p	1.000 mL

O meio SC é definido como um meio mínimo de cultura de leveduras. As substâncias que compõe o meio foram dissolvidas em água destilada e o meio de cultura foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos.

3.2.2 YPD

Peptona	20 g
Extrato de levedura	10 g
Dextrose	40 g
Ágar	15 g
Água destilada q.s.p	1000 mL

As substâncias que compõem o meio foram dissolvidas em água destilada e o meio de cultura foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos.

3.2.3 LB (Lúria Bertani)

Bactotripton	10 g
Extrato de Levedura	5 g
Cloreto de Sódio	10 g
Ágar	18 g
Água destilada q.s.p	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 (MM)

Solução de sais	5,0% (p/v)
Dextrose	1,0% (p/v)
Solução de elementos traços	0,1% (p/v)
Agar (Difco)	2% (p/v)
Água destilada q.s.p	1000 ml

As substâncias que compõe o meio foram dissolvidas em água destilada, o pH foi ajustado para 6 e o meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos. Para MM com 0.1mmol/L de fosfato, os componentes da solução de sais foram acrescentados separadamente, adicionando-se assim 0.1mmol/L de fosfato. Para MM+Glicerol, a glicose foi substituída por 2% de glicerol (v/v). Para MM 2x glicose, acrescentou-se duas vezes a quantidade de glicose.

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

Extrato de levedura	0,5% (p/v)
Glicose	2,0% (p/v)
Ágar	2,0% (p/v)
Solução de elementos traços	0,1% (v/v)
Água destilada q.s.p	1000 ml

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. YUU indica o meio de cultura completo YAG suplementado com uridina 4 mmol/L e uracila 10 mmol/L. O meio de regeneração dos esferoplastos, utilizado na transformação de *A. fumigatus* consiste de meio completo adicionado de KCl 0,6 mmol/L. Os meios YG e YG+UU são iguais em composição, respectivamente, aos meios YAG e YUU,

entretanto sem a adição de ágar 2% (p/v). Para meio Top Agar, de regeneração dos esferoplastos, foi adicionado 1% (p/v) de ágar.

3.2.6 Meio mínimo modificado (AMM)

Solução de sais 20X para AMM	1x
Glicose	1% (p/v)
KCl	0,6M
Agar (Difco)	2% (p/v)

O pH foi ajustado para 6,5. Esterilizou-se em autoclave. Foi adicionado ao meio autoclavado $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ (Sigma) para 10mM ou Tartarato de amonio (Sigma) para 10mM.

3.3 Soluções e tampões

3.3.1 Salina fosfato tamponada (PBS)

NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
Na_2HPO_4	1,15 g
KH_2PO_4	0,20 g
Água destilada q.s.p	1000 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.

3.3.2 Tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 50x concentrado

Tris Base	242 g
Ácido Acético Glacial	57,1 ml
EDTA 0,5M pH 8,0	100 ml
Água destilada q.s.p.	1000 ml

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.

3.3.3 Tampão de ressuspensão para extração de plasmídios

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.

3.3.4 Tampão de extração de DNA

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

Dissolveu-se em água destilada.

3.3.5 Tampão de amostra para eletroforese de DNA

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

Dissolveu-se os componentes no volume necessário.

3.3.6 Tampão MOPS 10x concentrado

MOPS	0,2 mol/L
Acetato de sódio	0,5 mol/L
EDTA	0,01 mol/L

As substância foram dissolvidas em água destilada tratada com dietil pirocarbonato (DEPC) 0,1% e o tampão foi ajustado para pH 7.

3.3.7 Tampão de amostra para eletroforese de RNA

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

As substâncias foram dissolvidas no volume necessário.

3.3.8 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.

3.3.9 Tampão Acetato de Sódio 100 mmol/L pH 4.6

Acetato de sódio anidro	8,2 g
Água destilada q.s.p	1000 ml

A substância foi dissolvida em 800ml de água destilada e o tampão foi ajustado para pH 4,6 com ácido acético glacial.

3.3.10 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.

3.3.11 Solução de Elementos Traços

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 q.s.p	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.

3.3.12 Solução de sais 20x 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 q.s.p.	1000 ml

As substâncias foram dissolvidas em água destilada.

3.3.13 Solução de Sais 20x para Meio Mínimo modificado (AMM)

KCl	140mM
KH ₂ PO ₄	220mM
MgSO ₄ 7H ₂ O	40mM
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,09mM
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,02mM

O pH foi ajustado para 6,5.

3.3.14 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 destilada, a solução foi ajustada para pH 6,0 com hidróxido de amônio e esterilizada por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 Kgf/cm² por 20 minutos.

3.3.15 Solução 2 (protocolo esferoplastização *A. fumigatus*)

Extrato de levedura	2% (p/v)
Sacarose	2% (p/v)

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

3.3.16 Solução 3 (protocolo esferoplastização *A. fumigatus*)

(NH ₄) ₂ SO ₄	0,40 mol/L
Ácido cítrico	0,05 mol/L
Sacarose	1,00% (p/v)

As substâncias foram dissolvidas em água destilada, a solução foi ajustada para pH 6,0 com hidróxido de amônio e esterilizada por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 Kgf/cm² por 20 minutos.

3.3.17 Solução 4 (protocolo esferoplastização *A. fumigatus*)

Polietilenoglicol 6000	25% (p/v)
CaCl ₂	100 mmol/L
KCl	600 mmol/L
Tris-HCl	10 mmol/L

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

3.3.18 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, a solução foi ajustada para pH 6,0 com hidróxido de amônio e esterilizada por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 Kgf/cm² por 20 minutos.

3.3.19 Solução de Denhardt (100X concentrada)

BSA (Fração V, Sigma)	2% (p/v)
Ficoll PM.400	2% (p/v)
PVP	2% (p/v)

O Ficoll e o PVP foram dissolvidos em água destilada com calor suave. A solução foi resfriada e o BSA adicionado. O volume final foi ajustado e a solução permaneceu estocada à -20°C.

3.3.20 Solução salina citrato (SSC) 20X concentrada

NaCl	3 mol/L
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .2H ₂ O	300 mmol/L

As substâncias foram dissolvidas em água destilada e a solução foi ajustado para pH 7,0.

3.3.21 Solução de lise para extração de plasmídios

NaOH	0,2 mol/L
SDS	1% (v/v)

A solução foi preparada no momento do uso a partir de soluções estoques de NaOH 4mol/L e SDS 10%.

3.3.22 Solução de neutralização para extração de plasmídios

Acetato de potássio	3 mol/L
Ácido acético glacial	7,5 ml

O acetato de potássio foi dissolvido em água destilada e acrescentou-se o ácido acético. O volume da solução foi ajustado para 500 ml com água destilada, a solução foi esterilizada por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 Kg/cm² por 20 minutos.

3.3.23 Solução SDS 10%

SDS	10 g
Água destilada q.s.p	100 ml

A substância foi dissolvida em água e acertou-se o volume.

3.3.24 Solução de fixação para microscopia

Formaldeído	3,7% (v/v)
Tampão fosfato	50 mmol/L
Tween 80	0,2% (v/v)

As substâncias foram dissolvidas em água destilada.

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

DAPI	100 µg/ml
------	-----------

A solução foi mantida fora do alcance da luz à -20°C.

3.3.26 Solução estoque de calcoflúor

Cerca de 100 µg/ml de calcoflúor (Blankophor BBH, Standard SV-2460, Miles Organic Products Division) foram dissolvidos em uma gota de KOH 1 mol/L e a esta solução, foi adicionado o volume apropriado de água destilada. A solução foi mantida fora do alcance da luz a -20°C.

3.3.27 Solução estoque de filipina

A filipina obtida (Sigma, número do catálogo F9765) foi reconstituída na concentração de 25 mg/ml em DMSO e estocada fora do alcance da luz à -20 °C.

3.4 Protocolos adotados

3.4.1 Isolamento do DNA

Para a produção de biomassa de micélio, esporos de linhagens de *A. fumigatus* foram inoculados em meio de cultura apropriado e incubados por 16 horas a 37°C e 250 rpm. Os micélios foram coletados por filtração a vácuo e congelados imediatamente em nitrogênio líquido para serem triturados com pistilo e cadinho. Cerca de 40 mg de micélio foram adicionados de 500 µL de tampão de extração de DNA. Foi adicionado em cada amostra, um volume igual de fenol:clorofórmio (1:1) e agitado mecanicamente em agitador de tubos por 10 minutos. Para sedimentar as proteínas precipitadas e debris celulares as amostras foram centrifugadas a 20.800 g por 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga onde foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio. As amostras foram centrifugadas a 20.800 g por 5 minutos e a fase aquosa superior foi novamente transferida para outro tubo de microcentrífuga onde foi adicionado 540 µL de isopropanol para precipitar o DNA. A amostra foi centrifugada a 20.800 g por 10 minutos. O sedimento foi lavado com etanol 70% (v/v), mantido à temperatura ambiente por 30 minutos e ressuspenso em água milli-Q estéril. A concentração e pureza do DNA foram determinadas por espectrofotômetro, de acordo com Sambrook & Russel (2001).

3.4.2 Eletroforese em gel de agarose

As eletroforeses em gel de agarose foram realizadas de acordo com Sambrook & Russel (2001). Os géis de agarose foram preparados com tampão TAE 1x e neles foi acrescentado brometo de etídeo (0,25 µg/mL). As amostras foram preparadas adicionando-se uma mistura contendo tampão de amostras. As corridas eletroforéticas foram processadas em uma cuba contendo tampão TAE 1x, sob tensão e período de tempo variáveis. Para os procedimentos de transformação de leveduras e de *A. fumigatus*, os fragmentos de DNA corridos na eletroforese em gel

de agarose foram recortados e purificados do gel pelo kit PerfectPrep Gel cleanup (Eppendorf).

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

Uma colônia isolada de *S. cerevisiae* da cepa FGSC 9721, gentilmente cedida pelo Fungal Genetic Stock Center foi inoculada em 10 mL de meio YPD e incubada a 30°C sob agitação constante por 12 horas. Após este período, uma alíquota de aproximadamente 500 µL foi semeada em 50 mL de YPD e a cultura permaneceu a 30°C, sob agitação constante até alcançar uma DO_{600nm} entre 0,4 e 0,6. As células foram centrifugadas a 600 g por 2 minutos e lavadas com 10 mL de tampão TE 1x. Em seguida foram novamente centrifugadas por 2 minutos, ressuspensas em 1,5 mL de solução TE 1x/LioAc 1x e incubadas à 30°C por 60 minutos, sob leve agitação. Para cada reação de transformação foram misturados 200 µL de suspensão de células, cerca de 1-5 µg de DNA plasmidial (pRS426) linearizado com *EcoRI* e *Bam* HI, diferentes concentrações dos DNAs purificados, provenientes dos PCRs, para a construção dos cassetes de deleção e 200 µg de DNA de esperma de salmão desnaturado. A mistura foi incubada a 30°C por 30 minutos com leve agitação e posteriormente foi adicionado 1,2 mL de solução contendo LioAc 1x/PEG-3350 40% (p/v)/TE 1x. Após homogeneização, a mistura foi incubada por 30 minutos a 42°C. Após a incubação, as células foram centrifugadas a 2.500 g por 1 minuto, lavadas com 1 mL de TE 1x, precipitadas novamente e ressuspensas em 50-100 µL de TE 1x. Finalmente, as células transformadas foram semeadas em placas contendo meio de cultura seletivo SC-URA⁻.

3.4.4 Extração de DNA de *Saccharomyces cerevisiae*

Cerca de 10 transformantes de *S. cerevisiae* selecionados em meio SC-URA⁻ foram semeados em 10 mL do mesmo meio de cultivo e incubados a 30°C por 48 horas sob agitação constante. Após este período, as células foram recuperadas por centrifugação a 2.500 g por 5 minutos e ressuspensas em 1 mL de tampão de extração de DNA de leveduras. A esta suspensão foi adicionado o mesmo volume

de pérolas de vidro tratadas com ácido nítrico 1M para a retirada de impurezas. Os tubos contendo as células, o tampão e as pérolas de vidro foram acoplados em agitador mecânico e a ruptura celular procedeu-se por 10 minutos. Após este período, o material, sem as pérolas de vidro, foi transferido para um novo tubo contendo o mesmo volume de uma mistura de fenol:clorofórmio (1:1) e novamente o material foi agitado em agitador mecânico por 10 minutos. Após a extração, a mistura foi centrifugada a 20.800 g por 20 minutos e a fase aquosa contendo o DNA genômico foi recuperada. O DNA foi precipitado pela adição de 0,6 volumes de isopropanol e centrifugado por 20 minutos a 20.800 g. O DNA foi lavado com etanol 70% (v/v) gelado, seco à temperatura ambiente e ressuspenso em 50 µL de água deionizada estéril. Foi adicionado 1 µL de solução de RNase A (10 mg/mL) e a solução foi incubada a 37°C por 12 horas. A concentração e pureza do DNA foram determinadas espectrofotometricamente, de acordo com Sambrook & Russel (2001).

3.4.5 Preparo de células eletrocompetentes

Uma colônia isolada da linhagem de *E. coli* DH10B foi incubada em 10 mL de meio de cultura LB por 16 horas a 37°C e 200 rpm. Uma alíquota de 10 mL deste pré-inóculo foi adicionada a 1 L de LB e a cultura foi mantida a 37°C sob agitação de 250 rpm até que a densidade óptica da cultura a 600 nm atingisse 0,4 a 0,5. O frasco da cultura foi resfriado em banho de gelo por 30 minutos e as células foram recuperadas por centrifugação a 4000 g por 15 minutos a 4°C. As células foram cuidadosamente lavadas em 500 ml de água destilada estéril resfriada a 4°C por duas vezes e recuperadas por centrifugação. Em seguida, as células foram equilibradas em 10 mL de solução aquosa de glicerol 10% (v/v) resfriada a 4°C e centrifugadas. O precipitado foi ressuspenso em glicerol 10% (v/v) com volume necessário para atingir uma concentração de 1 a 3×10^{10} células/mL. A suspensão de células eletrocompetentes foi alíquotada em microtubos e estocada a -80°C até o momento do uso.

3.4.6 Eletrotransformação de bactérias

O DNA genômico das leveduras selecionadas foi submetido a PCR para se verificar a presença do vetor pRS426 com o cassete de deleção clonado. Os DNAs positivos para esta PCR foram dialisados contra água deionizada por 1 hora em membrana com poros de 0,45 μm (PVDF, Millipore) e, em seguida eletrotransformados em bactérias. O DNA foi acrescentado a 1 a 3×10^{10} células eletrocompetentes da linhagem DH10B, misturando-se gentilmente. A mistura foi transferida para cubetas de eletroporação (Biorad) previamente resfriadas a 0°C e submetida a 25 μF , 200 ω e 2,5 kV no aparelho Gene Pulser (Biorad, USA). A seguir, 800 μL de meio LB foi adicionado à mistura, que foi incubada sob agitação constante de 200 rpm por 1 hora a 37°C. Após este período, a cultura foi semeada em LB sólido acrescido da concentração adequada de antibiótico apropriado e incubada a 37°C por aproximadamente 16 horas. Todos os passos descritos foram feitos de maneira asséptica e em baixa temperatura, o que aumenta a eficiência da eletrotransformação (Sambrook & Russel, 2001).

3.4.7 Preparação em pequena escala de DNA plasmidial

A extração do plasmídio foi realizada de acordo com Sambrook & Russel (2001). 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 ressuspensionado em 100 μL do tampão de ressuspensão e foram adicionados 1 μL RNase A (10 $\mu\text{g/mL}$) e 200 μL da solução de lise. A mistura foi homogeneizada gentilmente por 4-5 vezes. Foram adicionados 150 μL de acetato de sódio 3 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 plasmidial foi precipitado com 1 mL de etanol absoluto. A mistura foi centrifugada a 20.400 g por 15 minutos a

4°C. O sedimento contendo o DNA plasmidial foi então lavado de etanol 75% (v/v), seco e ressuspensão em água deionizada estéril.

3.4.8 Produção de esferoplastos de *A. fumigatus*

Para as transformações a linhagem ΔkuB^{ku80} foi utilizada. Esta linhagem foi obtida em nosso laboratório e se trata de um mutante cujo gene ku80 homólogo de *A. nidulans* (nkuA) está inativado (Da Silva Ferreira et al., 2006). Como se sabe os produtos dos genes ku70 e ku80 são essenciais para o processo de “non homologous end joining” (NHEJ) no reparo do material genético. A exemplo do que foi verificado inicialmente para *Neurospora crassa* (Ninomiya et al., 2004), a inativação do gene ku70 e ku80 leva a ruptura do sistema de NHEJ e todo o DNA exógeno introduzido na célula durante o processo de transformação é direcionado para a via de recombinação homóloga, o que aumenta consideravelmente a eficiência da transformação e a inserção do cassete de deleção no locus do gene de interesse (Oakley, B. R.; dados não publicados)

A transformação seguiu metodologia descrita por Tilburn et al. (1983) com modificações. Um inóculo de aproximadamente 10^7 conídios da linhagem a ser transformada foi crescido a 37°C por 16 horas em 50 ml de meio YG acrescido de suplementos apropriados. 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. A enzima Glucanex apresenta uma mistura de atividades, incluindo glucanase, quinase e protease, utilizada na digestão da parede celular dos tubos germinativos, na presença do estabilizador osmótico BSA. 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 para se retirar o excesso de enzima. Os esferoplastos recuperados foram utilizados para transformações.

3.4.9 Transformação de *A. fumigatus*

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

Para equilibrar osmoticamente os esferoplastos estes foram ressuspensos em 1 mL de Solução 5 e incubados no gelo por 10 minutos. Após este período, cerca de 100 μ L da suspensão de células foram adicionados de 4-20 μ g de DNA (DNA ressuspenso em no máximo 20 μ L) e misturados gentilmente. Cerca de 50 μ L de Solução 4 foram adicionados à suspensão de esferoplastos contendo PEG para promover a fusão das membranas dos protoplastos, após 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 YAG TOP ÁGAR [ágar 1% (p/v)] contendo KCl 0,6 mol/L. Os 30 mL da suspensão de conídios diluída foram distribuídos sobre 3 placas de Petri contendo YAG [ágar 2% (p/v)] adicionado KCl 0,6 mol/L. As placas foram incubadas por 4 a 5 dias a 37°C para se verificar o crescimento dos clones transformados.

3.4.10 Southern Blot alcalino

O gel de agarose foi submetido a eletroforese para separação do DNA digerido com enzima de restrição apropriada e tratado com solução depurinizante (HCl 0,25 mol/L) por 15 minutos. Após este tratamento, o gel foi colocado sobre papel 3MM previamente embebido em NaOH 0,4 mol/L. Sobre o gel foi colocada a membrana de nylon (Hybond-N⁺, Amesham-Pharmacia, USA) e 3 papéis 3MM do tamanho do gel que foram também previamente umedecidos em NaOH 0,4 mol/L. O papel 3MM abaixo do gel estava conectado a um reservatório contendo NaOH 0,4 mol/L. Acima desse bloco foram colocadas várias folhas de papel absorvente e um peso de aproximadamente 0,5 Kg (400 cm³/Kg). Um plástico filme foi colocado entre as bordas do gel e do papel 3MM para evitar contato entre o reservatório de NaOH e os papéis acima do gel. Após aproximadamente 12 horas de transferência, o sistema foi desmontado e o filtro de nylon foi lavado em SSC 2X. O DNA foi fixado à

membrana utilizando-se a função "autocrosslink" do aparelho Stratalinker (UV Stratalinker 1800 Stratagene, USA) (Southern, 1975).

3.4.11 Marcação de sonda radioativa

As sondas para os Southern blots foram marcadas com ^{32}P conforme Feinburg & Vogelstein (1983) e Feinburg & Vogelstein (1984). Cerca de 25 ng da sonda foram desnaturados através da incubação a 94°C , por 5 minutos, e então incubados em um meio contendo MgCl_2 1 mmol/L, DTT 1 mmol/L, Tris-HCl 50 mmol/L pH 8,0, Hepes 200 mmol/L (pH 6,6), hexadeoxiribonucleotídeos 26 $\text{UA}_{260}/\text{mL}$, BSA livre de ácido graxo 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, dNTP 20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ e 50 μCi de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP 333 nmol/L (volume final de 50 μL). A reação foi iniciada pela adição de 5 U do Fragmento maior (Klenow) da DNA polimerase. Após 3 horas de incubação à 37°C , a sonda foi purificada através da remoção dos nucleotídeos radioativos não incorporados através de uma coluna de Sephadex G50 previamente estabilizada em tampão TE e desnaturada a 100°C por 5 minutos.

3.4.12 Hibridação das membranas de Southern blot

As membranas de nylon utilizadas (Hybond N⁺, GE) foram pré-hibridadas por 3 horas a 65°C em solução de hibridação adicionada de 5 mg de DNA de esperma de salmão fragmentado e desnaturado. A sonda foi marcada radioativamente sendo acrescentada diretamente à solução de hibridação após sua desnaturação. As membranas foram incubadas com a sonda a 65°C por aproximadamente 16 horas, sendo então lavadas com SSC 2X 0,1% SDS a 65°C por 15 minutos, SSC 1X 0,1% SDS a 65°C por 15 minutos e, em seguida, com SSC 0,2X 0,1% SDS. As membranas foram finalmente expostas a filmes autoradiográficos (XAR-5 X-Ray, Kodak) em intensificadores e mantidas a -80°C até a obtenção do sinal.

3.4.13 Extração e manipulação de RNA

Cerca de 1×10^{10} conídios das linhagens selvagem e mutantes foram inoculados em erlens de 500 ml contendo 200 ml de MM contendo 11 e 0.1mmol/L de fosfato, por 6 e 10 horas à 37° C, sob agitação constante de 200 rpm. Após, o micélio obtido foi filtrado à vácuo, congelado em nitrogênio líquido e em seguida triturados com auxílio de cadinho e pistilo esterilizados. O RNA foi extraído utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen, EUA), segundo as recomendações do fabricante. 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% (v/v) preparado com água-DEPC, seco à temperatura ambiente e ressuspensão 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 & Russel, 2001), tendo como critério a presença das bandas intactas correspondentes ao RNA ribossomal 28S e 18S.

Os RNAs que seriam utilizados nas reações de RT-PCR em tempo real foram tratados com DNase livre de RNase. O tratamento foi realizado num volume final de 50 µl, contendo: 1x Buffer DNase (40 mmol/L Tris-HCl pH 7,5 e 6 mmol/L MgCl₂), 2,5 µl de DTT (100mM), 10 µl de DNase (1U/µl) e 20 µg de RNA alvo. A reação foi incubada a 37° C por 60 minutos, seguindo-se a etapa de purificação pelo método fenol clorofórmio (1:1) e precipitação do RNA com acetato de sódio 0,3 mol/L. Para verificar a eficiência do tratamento com DNase I, foi realizada RT-PCR, das amostras tratadas, para o gene constitutivo da β-tubulina de *A. fumigatus*.

Para a produção do cDNA usados nas reações de RT-PCR em tempo real, foram utilizados 20 µg de RNA total livre de DNA contido num volume de 6 µl e 1,5 µl de Oligo dTV (100 mmol/L estoque). A mistura foi aquecida a 75 ° C por 10 minutos,

rapidamente centrifugada e acondicionada em gelo. A seguir foram adicionados 5 µl de First Strand Buffer (5x); 2,5 µl de DTT (100mmol/L estoque); 2,5 µl de dNTP (10mmol/L cada). O tubo foi aquecido a 42° C por 5 minutos para termostatizar a reação e a seguir 1 µl da enzima transcriptase reversa (Superscript II, Invitrogen EUA, 200U/µl) foi adicionado. A reação foi incubada a 42 ° C por 60 minutos.

3.4.14 Reação de PCR quantitativo em tempo real (“Real time RT-PCR”)

O Kit TaqMan® PCR Master Mix (Applied Biosystems, EUA) foi utilizado nas reações de PCR em tempo real, segundo as instruções do fabricante. Os primers e sondas fluorescentes foram desenhados utilizando-se a tecnologia LUX® (Invitrogen) seguindo-se as instruções do fabricante através do endereço eletrônico (<<http://orf.invitrogen.com/lux>>) e estão descritos na Tabela 02. Inicialmente, foram realizadas curvas de calibração para cada par de *primers* com diferentes concentrações de DNA genômico. As condições de termociclagem para as reações compreendem uma etapa inicial a 50°C por 2', seguido de 10' a 95°C e 40 ciclos de 15'' a 95°C e 1'a 60°C. 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. Diluições seriadas de 1 a 10^7 cópias do genoma da linhagem selvagem CEA17 foram utilizadas para construir as curvas padrão para cada gene investigado. A equação da reta obtida para cada curva padrão, bem como seu respectivo coeficiente de correlação linear (r^2) foram obtidos em cada experimento. As possíveis variações na concentração inicial de mRNA entre as amostras foram calculadas através da normalização com um gene constitutivamente expresso, neste caso, o gene da β -tubulina. O aparelho para detecção imediata da fluorescência utilizado nos experimentos de PCR em Tempo Real foi o 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

TABELA 02. Sequência dos primers LUX utilizados nas reações de RT-PCR em tempo real.

Primers Lux	Sequências
PHO81_2770FL – Afu3g03010	CGGCCTTGGTCTCGTCCTTGTAGC[FAM]G
PHO81_2770FL/2819RU – Afu3g03010	GACGCCCACCGTATCAGCAG
PHO84_853FL – Afu4g03610	CGGTCTGTTCGTGCCTATATGAC[FAM]G
PHO84_853FL/888RU – Afu4g03610	GCTTCTGGAGGACGGACTGG
Phosphate transporter Afu7g06350_1	CGGTACGTCCTGCTCGTGGAGTAC[FAM]G
Phosphate transporter Afu7g06350_1	CCATCGGTCTCATCACTTACGG
Vtc4 Afu2g09040_1029RL	CGGGCTTGACCGACTTCTCACC[FAM]G
Vtc4 Afu2g09040_1029RL/993FU	GGCATGGAAAGCGACCAGAT

3.4.15 Desenho experimental dos *microarrays*

Com o objetivo de se avaliar a modulação gênica que o fosfato promove tanto na cepa mutante $\Delta phoB^{PHO80}$ quanto na cepa selvagem, 1×10^{10} conídios foram inoculados em 200ml de MM contendo 11 e 0.1 mmol/L de fosfato em frascos erlenmeyers de 500 ml por 6 e 10 horas, a 37°C sob agitação constante de 250 rpm. Após este período, as culturas foram coletadas por centrifugação a 3000 g por 15 minutos, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C para posterior extração do RNA. Os RNAs foram extraídos de acordo com o método descrito no item 3.4.13.

3.4.15.1 Hibridização das lâminas de *microarray* de *A. fumigatus*

Para as hibridizações foram utilizados os arrays de oligonucleotídeos (70 mers, 11481 oligonucleotídeos) de *A. fumigatus*, versão 2 arranjados em lâminas com cobertura epóxi (para maiores informações sobre o *microarray* *A. fumigatus*, versão 2 ver <http://pgfrc.tigr.org/slide_html/microarray_descriptions.shtml>).

As lâminas de *microarrays* foram produzidas e distribuídas para a comunidade pela TIGR mediante competição internacional. Os RNAs destinados à hibridização de *microarrays* foram extraídos utilizando-se o método do Trizol (descrito anteriormente) e purificados com o auxílio do Kit RNAeasy (Qiagen), segundo especificações do fabricante. O RNA purificado através desta metodologia possui pureza suficiente para permitir eficiente marcação. A reação de síntese do cDNA modificado foi realizada por marcação direta com fluoróforos Cy3-dUTP ou Cy5-dUTP (Ge Health Care) partindo-se de 30 µg de RNA total purificado, 20 µg de Randon Primer Hexamer (Ge Health Care), 100 pmol de oligo dTV e 1 µl (40 U) de RNase Out (Invitrogen), num volume de 13 µl. A mistura foi incubada a 70°C por 5 minutos e por mais 4°C por 5 minutos. A seguir, adicionou-se à reação 5 µl de tampão Superscript (5X), 2 µl de DTT (0,1 mol/L), 2 µl da mistura de dNTPs (5 mmol/L de dATP, dGTP, dCTP, 2 mmol/L de dTTP) e 2 µl de Superscript II (Invitrogen). Em seguida adicionou-se 1 µl de Cy3-dUTP na reação referência e 1 µl Cy5 na reação teste. O material foi incubado por 5 minutos a 25°C e depois por mais 3 horas a 42°C. Após esse tempo, a reação foi inativada pela adição de 2,5 µl de EDTA 0,5 mol/L pH 8 e 5 µl de NaOH 1 mol/L. A reação foi incubada por adicionais 40 minutos a 37°C. O cDNA marcado produzido foi então purificado em colunas Microcon YM-50® (Millipore).

Os cDNAs marcados com Cy3-dUTP e Cy5-dUTP, provenientes das duas condições experimentais testadas foram misturados em quantidades equimolares e submetidos à hibridização com os *microarrays* em uma estação de hibridização GeneTac (Genomic Solutions, Inc.). A solução de hibridização foi composta de Líquido Bloqueador RPN 3601 Batch 24 (GE Health Care), 5,5 µl de SDS 2% e 19 µl de SSC 20X. O volume total de sonda foi ajustado para 110 µl para preencher o compartimento da estação de hibridização. A sonda foi desnaturada por 3 minutos a 95°C antes da colocação desta sobre as lâminas. A hibridização se processou por 20 horas a 42°C. Após esse tempo, as lâminas foram lavadas com 2 X SSC + 0,5% SDS, 0,5 X SSC e 0,05 X SSC. Todas as incubações na estação de hibridização foram realizadas com 1 minuto de fluxo a cada 5 minutos de incubação. Após a hibridização as lâminas foram centrifugadas a 163 g por 10 minutos para a secagem.

3.4.15.2 Captura e análise estatística das imagens de microarray

Imagens das hibridizações foram geradas para cada fluoróforo (Cy3 e Cy5) independentemente utilizando-se o detector GMS 418 Array Scanner (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA). Para cada leitura, a potência do laser e o ganho do fotomultiplicador foram ajustados para minimizar o “background” e evitar saturação de sinal em diferentes spots do *microarray*. A quantificação dos valores de intensidade de cada spot foi feita através de um processo de segmentação “Otsu thresholding” implementado no programa TIGR Spotfinder v 3.1.0. (disponível publicamente em <<http://www.tigr.org/software/tm4>>, Saeed et al., 2003) a partir das imagens TIFF geradas para cada lâmina. Para cada imagem, um “grid” de identificação foi definido de acordo com as dimensões do *microarray* utilizado, delimitando cada spot e extraíndo dados relativos à intensidade de sinal, assim como os valores de background local e de controle de qualidade. Esta análise levou ao cálculo dos valores referentes a cada spot, após utilizar um filtro implementado no programa Spotfinder que descartava todos os spots que não possuísem intensidade mediana equivalente ao “background” local mais dois desvios-padrão.

Dados relativos a cada experimento foram salvos em uma planilha gerada especificamente pelo TIGR Spotfinder (denominada arquivo.mev). Nesta planilha, estão compiladas todas as informações sobre as intensidades das leituras e “background” local para cada spot, assim como dados acerca da qualidade de cada um destes elementos. Os arquivos mev foram submetidos a diversos tipos de transformações matemáticas e normalização dos sinais com o auxílio do programa TIGR MIDAS v 2.19 (Multi-Experiment Viewer, disponível em <<http://www.tigr.org/software/tm4>>, Saeed et al., 2003). Primeiramente, os dados brutos contidos nos arquivos mev oriundos da quantificação das imagens foram submetidos a um segundo filtro de intensidade, que descartou todos os spots cujo valor mediano de sinal fosse inferior a 10.000 unidades análogo-digitais (a/d) para os valores gerados a partir dos sinais obtidos de ambos fluoróforos Cy3 e Cy5. A seguir, as intensidades totais dos dois canais (Cy3 e Cy5) foram normalizadas utilizando o método de LOWESS (LOcally WEighted Scatter plot Smoothing). Após isso, um novo filtro proporcionou que os valores da razão Cy5/Cy3 dos dados fossem equalizados em todos os setores da lâmina, de maneira a apresentar um mesmo desvio-padrão. Finalmente, os dados de cada experimento foram

submetidos a uma análise de consistência contra seu par invertido (“dye swap”). Em suma, para cada condição experimental estudada, foram obtidos 4 sinais independentes para cada spot presente nas lâminas de *microarray*. Esses sinais foram provenientes de duas hibridizações independentes (sendo uma delas “dye swap”) e levando-se em conta que cada spot apresentava-se representado em duplicata nas lâminas. Cada par de hibridizações foi realizado com amostras do mesmo material biológico. Após as etapas de normalização dos dados, os genes regulados positivamente ou negativamente durante as condições estudadas foram identificados com nível de confiança de 95% através de critérios estatísticos não paramétricos, utilizando limites de corte dependentes da razão da intensidade de fluorescência das hibridizações (“intensity dependent z-scores”) ($z=1,96$) usando parâmetros estridentes para a função “Slice Analysis” implementado no programa TIGR MIDAS, como descrito anteriormente (Cheadle et al., 2003; da Silva Ferreira et al., 2006). Os valores de razão das intensidades de cada experimento foram então carregados no programa TIGR MEV v 3.03 (disponível em <<http://www.tigr.org/software/tm4>>, Saeed et al., 2003). O programa TIGR MEV permite trabalhar simultaneamente com os resultados de várias hibridizações, sejam elas réplicas de um mesmo experimento, ou de múltiplos experimentos diferentes. Análises posteriores da variação de expressão gênica foram feitas com o auxílio de algoritmos de clusterização hierárquica ou de “K-means clustering”, também implementados no programa TIGR MEV utilizando a distância euclidiana como algoritmo aglomerativo (para uma revisão sobre estes métodos, ver Eisen et al., 1998).

3.4.16 Deleção, mediada por PCR, do gene *pho80*

A deleção dos genes utilizando a técnica “PCR-mediated” (Kuwayama et al., 2002) dispensa a necessidade da subclonagem do gene de interesse em um plasmídeo adequado, bem como a digestão do gene alvo com enzima de restrição apropriada para se inserir o gene de seleção. Em suma, neste procedimento, para a obtenção do cassete de deleção, três PCRs independentes são realizadas onde se amplificam respectivamente as regiões flangeadoras 5’ e 3’ do gene que será inativado e o gene marcador de auxotrofia, no caso, o gene *pyrG* de *Aspergillus*

fumigatus. A partir destes três fragmentos independentes é realizada uma PCR de fusão utilizando os primers mais distais. A técnica de geração de cassetes de deleção mediada por PCR já fora descrita em *S. cerevisiae*, entretanto nesse organismo, regiões flanqueadoras de apenas 50 pb já fornecem condições para uma alta taxa de integração homóloga na levedura (Baudin et al., 1993). Em *A. nidulans*, por outro lado, tem sido verificada a necessidade uma maior região flanqueadora de cerca de 1 Kb em cada lado do cassete para permitir maior eficiência de transformação (Yang et al., 2004)

A construção da cepa mutante para o gene *pho80* foi realizada de acordo com o descrito por Sambrook & Russel, 2001. As amplificações por PCR foram realizadas em um volume final de 50 µl de reação com a polimerase de alta fidelidade Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), seguindo as instruções descritas pelo fabricante. O DNA genômico da linhagem selvagem, de *Aspergillus fumigatus*, foi usado como molde para amplificar a região 5' e 3' que flanqueiam a região aberta de leitura (ORF) do gene *pho80* e cada uma destas regiões possuem o tamanho de 1987 e 2000 pb, respectivamente. O vetor pCDA21 foi utilizado para amplificar o fragmento contendo o marcador genético de auxotrofia, *pyrG* (*Aspergillus fumigatus*), este fragmento amplificado, além do gene *pyrG* (aproximadamente 1,9 kb), apresenta também o gene de resistência a zeocina (*zeo*) o que gera um fragmento de 2417 pb, por isso chamado de *zeo-pyrG*.

A amplificação das regiões flanqueadoras da ORF do *pho80* foi realizada com 1µg de DNA genômico e com 20 pmol dos primers PHO80-1 e PHO80-2, para a região 5' e PHO80-3 e PHO80-4, para a região 3'. A amplificação do fragmento contendo *pyrG* foi realizada com 200ng do plasmídio pCDA21 e 20 pmol dos primers PHO80 ZeoFw e PHO80 PyrRev. Vale ressaltar que os primers 2 e 3 são primers quiméricos, os quais apresentam homologia parcial com os genes *zeo* e *pyrG*, respectivamente. Da mesma forma os primers ZEO e PYR também são quiméricos apresentando homologia com as regiões flanqueadora 5' e 3' respectivamente. As regiões de homologia estão destacadas na Tabela 03.

Cada produto da PCR foi fracionado por tamanho em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X. As bandas, correspondentes ao tamanho esperado para cada amplificação, foram recortadas do gel e purificadas com Qiaex II Gel Extraction Kit (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante. A PCR final de fusão foi realizada com 50 µl de volume total usando-se quantidades equimolares dos fragmentos

purificados 5'-*pho80*, 3'-*pho80* e *pyrG* e 20pmol dos primers PHO80-1 e PHO80-4. O material total amplificado foi recortado do gel e purificado com o kit PerfectPrep Gel cleanup (Eppendorf), seguindo as instruções do fabricante. Os produto da PCR final foi utilizado para transformação na cepa selvagem $\DeltaakuB^{ku80}$. Os transformantes foram selecionados em meio YAG (prototrofia para uridina e uracila).

Para a comprovação da integração do cassete de deleção no locus do gene em questão e confirmação da inativação gênica, foi utilizada a técnica de Southern blot usando-se como sonda um fragmento de PCR amplificado a partir do DNA genômico da linhagem CEA17 para cada gene.

TABELA 03. Sequência dos primers utilizados para a produção do cassete de deleção do gene *pho80* pela técnica "PCR-mediated".

Primers	Sequências	pb
PHO80-1	5'- ACTCGATGCAACAAGCCGAA -3'	1987
PHO80- 2	5'- <u>GAGCAGGACTGAGAATCCC</u> GGTTATTTCCGCCACCGAA -3'	
PHO80 ZeoFw	5'- TTCGTTGGGCGGAAATAACCGGAATTCTCAGTCCTGCTC - 3'	2417
PHO80 pyrRev	5'- CATCGGTGCAGTGAAAGTACGAATTGCCTCAAACAATGC - 3'	
PHO80- 3	5'- <u>GCATTGTTTGAGGCGAATTC</u> GTACTTTCACTGCACCGATG - 3'	2000
PHO80- 4	5'- CGGAGCAACCGGAGCAAC - 3'	

* Regiões sublinhadas indicam homologia com o gene *zeo-pyrG* e regiões em negrito indicam homologia com as regiões flangeadoras 5' e 3', respectivamente, do gene de interesse.

* pb indica o tamanho de cada fragmento amplificado.

3.4.17 Análises fenotípicas do mutante $\Delta phoB^{PHO80}$

3.4.17.1 Análise do crescimento radial em diferentes meios de cultura

A cepa mutante, juntamente com a cepa selvagem, foram inoculados pontualmente em placas de petri contendo meio completo YAG, meio mínimo com

11 e 0.1 mmol/L de fosfato, incubados à 37°C e o diâmetro radial de cada cepa foi medido em 24, 48, 72 e 96 horas.

3.4.17.2 Análise do crescimento radial na presença de estresses

O mutante e sua cepa selvagem foram semeados pontualmente em meios de cultivo contendo as seguintes substâncias e incubados à 37°C, 4-NQO (óxido de 4-nitroquinolina): mimético de luz ultravioleta que promove quebra da dupla fita de DNA, bleomicina: causa a fragmentação do DNA, HU (hidroxiuréia): agente estressante da replicação por inibir a enzima ribonucleotídeo redutase, promovendo a parada do ciclo celular na fase S, CPT (camptotecina): agente inibidor da topoisomerase I, itraconazol, caspofungina, cálcio, zinco, cromo, ferro, cádmio, menadiona, paraquat, H₂O₂, t-butyl hidroperóxido, ciclosporina A e diferentes temperatura: 30°C, 37°C e 44°C.

3.4.17.3 Análises microscópicas

Em todas as análises microscópicas as cepas foram inoculadas sobre lamínulas esterilizadas dispostas no fundo de placas de Petri contendo meio de cultura líquido apropriado e incubadas em temperatura adequada para cada experimento.

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

a) Determinação da divisão nuclear no mutante $\Delta phoB^{PHO80}$

Cerca de 10^4 conídios foram inoculados como descrito em 5ml de MM contendo 11 e 0.1 mmol/L de fosfato e incubados por 2, 4, 6 e 8 horas a 37⁰ C para a determinação da cinética de divisão nuclear.

Após o tempo de incubação, as lamínulas foram retiradas das placas e fixadas por 30 minutos com a solução de fixação. As lamínulas foram lavadas em tampão PBS 1X e, em seguida, coradas por 5 minutos com 1,2 µg/ml de calcofluor e 0,1 µg/ml de DAPI. O calcofluor se liga às β-glucanas e à quitina, corando tanto a parede celular quanto os septos. O DAPI apresenta especificidade para o DNA, evidenciando os núcleos que se coram de azul brilhante. Os núcleos interfásicos apresentam uma cromatina característica, localizada em torno de um único nucléolo representado por um ponto escuro. Durante a mitose estas regiões não podem ser distinguidas, já que a cromatina se condensa e o nucléolo desaparece. Portanto, o núcleo passa a ser visualizado como um ponto azul brilhante durante a mitose.

Após o tempo de coloração, as lamínulas foram lavadas em tampão PBS 1X e em água destilada, sendo então montadas em lâminas contendo uma gota de glicerol 50% (v/v) para análise.

b) Determinação da polarização do crescimento em conídios após liberação do bloqueio com HU no mutante $\Delta phoB^{PHO80}$

Incubou-se cerca de 10^4 conídios das linhagens pertinentes à 37°C por 5 horas em 5ml de meio completo YAG contendo 50 mmol/L de hidroxauréia (HU). Após o tempo de sincronização dos germinantes na fase S, os mesmos foram lavados para a retirada da droga com água destilada estéril, pré-aquecida a 37°C, sendo então re-incubados com o mesmo meio de cultura, pré-aquecido à 37°C. Amostras dos germinantes foram retiradas nos tempos de 0, 60, 90, 120 e 150 minutos após liberação do bloqueio com HU. Os germinantes foram fixados, corados com DAPI e calcoflúor e observados em microscópio de fluorescência sob luz ultravioleta. Foram considerados conídios que apresentaram crescimento polarizado aqueles que mostravam protuberância (Harris, 1999) na superfície do esporo que o retirava da sua forma redonda característica. Foram analisados 100 germinantes em

cada experimento e os resultados apresentados indicam médias e desvios padrões de três experimentos independentes.

c) Verificação da reserva de polifosfato

Cerca de 1×10^6 conídios foram inoculados como descrito em 5ml de MM contendo 11 e 0.1 mmol/L de fosfato e incubados à 37°C por 8 horas. Após o tempo de incubação as lamínulas foram retiradas da placa, fixadas com etanol absoluto por 10 minutos, coradas com o corante Toluidine Blue O 0,05% (p/v) por 5 minutos e em seguida lavadas com água destilada, sendo então montadas em lâmina contendo uma gota de glicerol 50% (v/v) para análise.

d) Polarização do ergosterol de membrana

Para se verificar o padrão de distribuição do ergosterol na membrana do mutante $\Delta phoB^{PHO80}$, a cepa mutante e seu respectivo selvagem foram inoculadas em 5ml de MM contendo 0.1 e 11mmol/L de fosfato e incubadas à 37°C por 12 horas. Após o tempo de incubação, as lamínulas foram retiradas da placa e coradas com o corante filipina, em uma concentração final de 25 µg/ml, por 5 minutos. Em seguida foram lavadas com o mesmo meio de cultura em que foram incubadas, sendo então montadas em lâminas contendo uma gota de glicerol 50% (v/v) para análise.

3.4.17.4 Dosagem da Enzima Fosfatase Ácida no mutante $\Delta phoB^{PHO80}$

Conídios (1×10^8 /ml) foram inoculados em frascos erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml de MM contendo 0.1 e 11 mmol/L de fosfato e incubados à 37°C/150 rpm por 24 horas. O micélio obtido foi filtrado à vácuo, secado em estufa a 90°C por aproximadamente 2 horas e o seu peso seco foi medido. Cerca de 100 µl de cada sobrenadante das culturas foram adicionados à reação de mistura de 510 µl (250 µl de buffer Acetato de Sódio 100mmol/L pH 4.6, 10 µl de $MgCl_2$ 100mmol/L, 250 µl de p-nitrofenilfosfato 10mmol/L), que foram incubadas à 37°C por 100 minutos. Após este período de tempo, a reação foi interrompida pela adição de 1 ml

de NaOH 1mol/L e o p-nitrofenol formado foi determinado em 405nm. Cerca de 1 ml de cada reação foi utilizada para a leitura da atividade da fosfatase ácida no espectrofotômetro, com o comprimento de onda de 405nm. Foi feita uma curva padrão pela qual se obteve a equação da reta a qual foi utilizada para determinação da concentração de p-nitrofenol formado em cada amostra. Os resultados foram expressos em nmol de p-nitrofenol formado/min/mg de micélio seco (Método adaptado de Caddick and Arst, 1986).

3.4.17.5 Transporte de fosfato no mutante $\Delta phoB^{PHO80}$

O transporte de fosfato na cepa selvagem e na cepa mutante $\Delta phoB^{PHO80}$ foi avaliado utilizando-se ortofosfato marcado com ^{32}P . Cerca de 1×10^7 conídios/ml foram inoculados em frascos de 50ml contendo 10ml de MM contendo 11 mmol/L de fosfato e incubados à 37 °C, sob agitação constante de 250 rpm, por aproximadamente 16 horas. Os micélios obtidos foram lavados com água destilada estéril e transferidos de modo asséptico para falcons contendo 5 ml de MM contendo 11mmol/L de fosfato onde então acrescentou-se 1.0 μ Ci de ortofosfato marcado com ^{32}P (Amersham Bioscience, UK), após este procedimento, os falcons foram incubados por 2, 4 e 6 horas à 37 °C. Em cada tempo indicado retirou-se o material, o qual foi lavado três vezes com água destilada e colocado para secar na estufa à 65° C, após foram pesados e a incorporação de fosfato foi medida utilizando-se o aparelho cintilador (Beckman Liquid Scintillation Systems).

3.4.18 Deleção dos genes *pho84* e *pho85* pela técnica de recombinação “in vivo” em *S. cerevisiae*

A deleção dos genes foi realizada pelo método descrito por Colot et al. (2006). A figura 02 mostra um esquema da recombinação homóloga que acontece em *S. cerevisiae* e que foi utilizada na construção dos cassetes de deleção clonados em vetor pRS426.

FIGURA 02. Representação esquemática do mecanismo de recombinação homóloga em leveduras.

Para a construção dos cassetes de deleção, todas as reações de amplificação por PCR foram realizadas em um volume final de 50 μ l utilizando uma DNA polimerase de alta fidelidade (Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen)). O DNA genômico da linhagem selvagem juntamente com 20 pmol dos primers específicos foram utilizados para a amplificação de fragmentos de aproximadamente 2 kb das regiões 5' e 3' que flanqueiam a região aberta de leitura (ORF) dos genes *phoD*^{PHO84} e *phoA*^{PHO85}. Estes primers possuem regiões complementares aos fragmentos adjacentes (*primers* 5f e 3r com complementaridade ao vetor pRS426 e os *primers* 5r e 3f com complementaridade ao marcador auxotrófico *zeopyrG*) (Tabela 04). O vetor pCDA21, contendo o gene *zeopyrG* (*A. fumigatus*), juntamente com 20 pmol de primers específicos foram utilizados para amplificar o fragmento contendo o marcador genético de auxotrofia, com tamanho de 2,4 kb. Desta forma, os 3 fragmentos amplificados e purificados foram transformados em leveduras (URA⁻), juntamente com o vetor pRS426 linearizado, que apresenta marca para a supressão da auxotrofia para uracila. A levedura é responsável pela recombinação *in vivo* dos 4 fragmentos de DNA e ligação do vetor contendo o cassete de deleção (adaptado de Colot et al., 2006).

FIGURA 03. Representação esquemática do vetor pRS426 utilizado na recombinação homóloga em leveduras para a construção do cassete de deleção.

TABELA 04. Sequência dos primers utilizados para a produção do cassete de deleção dos genes *pho84* e *pho85*.

Primers	Sequência	pb
5 F <i>phoD</i>^{PHO84}	5'-gtaacgccagggttttcccagtcacgacgGGGAGCAGCATTGTGCCATT-3'	1692
5 R <i>phoD</i>^{PHO84}	5'-GTGCCTCCTCTCAGACAGAAT CCCGTCCCATCTTTCCTTTT-3'	
3 F <i>phoD</i>^{PHO84}	5'-GAGCATTGTTTGAGGCGAATTCATGAAAAGACAACGCCAGGC-3'	1770
3 R <i>phoD</i>^{PHO84}	5'-gcgataacaatttcacacaggaaacagcGGGCACGGGTTTAAGTAGCTT-3'	
Zeo <i>phoD</i>^{PHO84}	5'-GGAATTCTCAGTCCTGCTC-3'	2417
Pyr <i>phoD</i>^{PHO84}	5'-GAATTCGCCTCAAACAATGC-3'	
5 F <i>phoA</i>^{PHO85}	5'-gtaacgccagggttttcccagtcacgacgCCTCGATCCGTATACCGTTGACC-3'	1408
5 R <i>phoA</i>^{PHO85}	5'-GGAGCAGGACTGAGAATTCCGCTCTGTCAATCAAGGTATCCAGC-3'	
3 F <i>phoA</i>^{PHO85}	5'-GCATTGGAGGCGAATTCGGTGGGCACAATGAGATG-3'	2055
3 R <i>phoA</i>^{PHO85}	5'-gcgataacaatttcacacaggaaacagcGAGCCTCGGTTTCTATGAAG-3'	
Zeo <i>phoA</i>^{PHO85}	5'-GTTGCGATCAGATCACCTCGGAATTCTCAGTCCTGCTCCCT-3'	2417
Pyr <i>phoA</i>^{PHO85}	5'-CATCTCATTGTGCCACCGAATTCGCCTCAAACAATGC-3'	

* Regiões com letras minúsculas indicam homologia com o vetor pRS426 e regiões sublinhadas indicam homologia com o gene *zeopyrG*.

* pb indica o tamanho de cada fragmento amplificado.

3.4.19 Análise fenotípica do mutante $\Delta phoD^{PHO84}$

3.4.19.1 Análise do crescimento radial em diferentes meios de cultura

A cepa mutante, juntamente com a cepa selvagem, foram inoculadas pontualmente em placas de petri contendo meio completo, meio mínimo com 11mmol/L e 0.1mmol/L de fosfato, incubados à 37°C e o diâmetro radial de cada cepa foi medido em 48 horas.

3.4.19.2 Análise do crescimento radial em situações de estresses

O mutante e sua cepa selvagem foram semeados pontualmente em MM contendo 0.1 e 11mmol/L de fosfato e incubados por 48 horas à 37°C na presença dos seguintes agentes estressores:

- Ciclosporina A, $MnCl_2$ (cloreto de manganês), $CaCl_2$ (cloreto de cálcio), $ZnSO_4$ (sulfato de zinco), $CoCl_2$ (cloreto de cobalto), $CuSO_4$ (sulfato de cobre) e diferentes pHs (3, 6 e 9).

3.4.20 Construção de uma linhagem condicional do gene $phoA^{PHO85}$, com o promotor *alcA*

A construção de um mutante condicional do gene $phoA^{PHO85}$ com o promotor *alcA*, foi realizada pelo método descrito por Colot et al (2006). Todas as reações de amplificação por PCR foram realizadas em um volume final de 50 μ l utilizando-se uma DNA polimerase de alta fidelidade (Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity, (Invitrogen)). Nesta construção, utilizou-se o vetor pMCB17apx que contém o promotor do gene *alcA* (álcool desidrogenase) de *A. nidulans*. Esse plasmídeo permite a fusão N-terminal do gene de interesse sob o controle do promotor *alcA*. Para a construção, o DNA genômico da linhagem selvagem de *A. fumigatus* e 20 pmol dos primers específicos para cada região foram utilizados como molde para amplificação do fragmento de 1,4 Kb da região 5' que flanqueia a região aberta de leitura (ORF) do gene $phoA^{PHO85}$ e do fragmento de aproximadamente 1,1 Kb que codifica a região aberta de leitura (ORF) deste mesmo gene. A amplificação do

promotor *alcA* foi realizada com 200 ng do plasmídeo pMCB17apx e 20 pmol de primers específicos (Tabela 05). Desta forma, os 3 fragmentos amplificados e purificados foram transformados em leveduras (URA⁻), juntamente com o vetor pRS426 linearizado, que apresenta marca para a supressão da auxotrofia para uracila. Os fragmentos amplificados apresentam extremidades homólogas entre si para permitir a recombinação homóloga entre si e com o vetor pRS426 “in vivo” em *S. cerevisiae* (adaptado de Colot et al., 2006).

Após a comprovação de que houve a recombinação dos fragmentos de DNA pela levedura no plasmídeo pRS426 (por PCR e/ou análise de restrição), o clone positivo escolhido foi submetido a PCR utilizando-se os primers distais 5F e 3R para a amplificação do cassete completo de substituição gênica. Esse material foi fracionado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e a banda específica foi purificada do gel para ser usada nas reações de transformação em *Aspergilli*. A comprovação da integração do cassete de deleção ou substituição gênica no locus de interesse foi realizada por PCR, utilizando-se um par de primers onde pode-se observar a diferença do tamanho dos fragmentos entre a cepa selvagem e o mutante condicional do gene *phoA*^{PHO85}.

TABELA 05. Sequência dos primers utilizados para a produção do mutante condicional do gene *phoA*^{PHO85} com o promotor *alcA*.

Primers	Sequência	pb
5 F	5'- <u>GTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACG</u> CCTCGATCCGTATACCGTTGACC-3'	1408
5 R	5'-tcatcaccgaaacgcgcgaGCTCTGTCAATCAAGGTATCCAGC-3'	
ORF F	5'-agttaattagcggtagccgggATGGACTATCGGAATTCATACA-3'	1170
ORF R	5'- <u>GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGC</u> CTAGTATGTCTGCTGTGGTG-3'	
Pyr4	5'-TCGCGCGTTTCGGTGATGA-3'	2769
alcA	5'-CCCGGTACCGCTAATTAAC-3'	

* Regiões sublinhadas indicam homologia com o vetor pRS426

* Regiões com letras minúsculas indicam homologia com o promotor *alcA*.

3.4.20.1 Análise fenotípica do mutante condicional *alcA::phoA*^{PHO85}

A expressão dos genes sob controle do promotor *alcA* foi regulada pela fonte de carbono disponível no meio de cultura: 2% de glicose para repressão, 2% v/v de glicerol para expressão basal, e 100mM de treonina para indução.

A cepa mutante *alcA::phoA*^{PHO85}, juntamente com a cepa selvagem, foram inoculadas pontualmente em placas de petri contendo meio mínimo 2% glicerol, meio mínimo 2x glicose e meio mínimo 2% glicerol contendo 100mM de treonina, incubados à 37°C por 48 horas e após este tempo observou-se o crescimento de cada cepa.

3.4.21 Construção de uma linhagem condicional do gene *phoA*^{PHO85}, com o promotor *niiA*

A construção de um mutante condicional do gene *phoA*^{PHO85} com o promotor *niiA*, foi realizada pelo método descrito por Colot et al. (2006). Todas as reações de amplificação por PCR foram realizadas em um volume final de 50 µl utilizando-se uma DNA polimerase de alta fidelidade (Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity, (Invitrogen)). O DNA genômico da linhagem selvagem de *A. fumigatus* e 20 pmol dos primers específicos para cada região foram utilizados como molde para amplificação do fragmento de 1,5 Kb da região 5' que flanqueia a região aberta de leitura (ORF) do gene *phoA*^{PHO85} e do fragmento de aproximadamente 1,1 Kb que codifica a região aberta de leitura (ORF) do gene *phoA*^{PHO85}. A amplificação do promotor *niiA* foi realizada com 200 ng do plasmídeo pAB4-Arp cedido pelo Dr. Moore, M. M. (Amaar et al., 1998) e 20 pmol de primers específicos (Tabela 06). Os fragmentos amplificados apresentam extremidades homólogas entre si para permitir a recombinação homóloga entre si e com o vetor pRS426 "in vivo" em *S. cerevisiae*.

Após a comprovação de que houve a recombinação dos fragmentos de DNA pela levedura no plasmídeo pRS426 (por PCR e/ou análise de restrição), o clone positivo escolhido foi submetido a PCR utilizando-se os primers distais 5F e 3R para a amplificação do cassete completo de substituição gênica. Esse material foi fracionado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e a banda específica foi purificada do gel para ser usada nas reações de transformação em

Aspergilli. A comprovação da integração do cassete de deleção ou substituição gênica no locus de interesse foi realizada por PCR, utilizando-se um par de primers onde se pode observar a diferença do tamanho dos fragmentos entre a cepa selvagem e o mutante condicional do gene *phoA*^{PHO85}.

TABELA 06. Sequência dos primers utilizados para a produção do mutante condicional do gene *phoA*^{PHO85} com o promotor *niiA*.

Primers	Sequência	pb
5 F	5'- <u>GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGCCTCGATCCGTATACCGTTGACC</u> -3'	1408
5 R	5'- ggagctcgatattttccctgcGCTCGGAGGTGATCTGATCGC-3'	
ORF F	5'- ggcgttgagacttcgtcacgATGGACTATCGGAATTCATACA-3'	2749
ORF R	5'- <u>GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCCTAGTATGTCTGCTGTGGTG</u> -3'	
Pyr4	5'- GCAGGGAAAAATACGAGCTCC-3'	2749
NiiA	5'- CGTGACGAAGTCTCAACGCC-3'	

* Regiões sublinhadas indicam homologia com o vetor pRS426.

* Regiões com letras minúsculas indicam homologia com o promotor *NiiA*.

3.4.21.1 Análise fenotípica do mutante condicional *niiA::phoA*^{PHO85}

A cepa mutante *niiA::phoA*^{PHO85}, juntamente com a cepa selvagem, foram inoculadas pontualmente em placas de petri contendo meio AMM com 0.1 e 11 mmol/L de fosfato com nitrato e amônio, incubados à 37°C por 48 horas e após este tempo observou-se o crescimento radial de cada cepa.

3.4.22 Infecção em modelo animal

As infecções em camundongos foram realizadas em Imperial College London, Inglaterra. Camundongos machos (cepa CD1, 18-22g, Harlan Ortech) foram colocados individualmente em gaiolas. Estes foram imunossuprimidos como previamente descrito (Schrettl et al., 2004). Esporos das cepas mutantes $\Delta phoB$ ^{PHO80} e $\Delta phoD$ ^{PHO84} e de suas respectivas cepa selvagem foram crescidos em meio

completo, contendo glicose 1% (v/v) e 5mmol/L de tartarato de amônio por 5 dias para posterior infecção. Os conídios foram lavados com salina estéril gelada (Baxter Healthcare) e filtrados em Miracloth (Calbiochem). Suspensões dos conídios foram centrifugadas por 10 minutos à 3.000g, lavadas duas vezes com salina estéril, contadas usando-se um hemocítmetro e ressuspensas para concentração de 1.25×10^7 cfu/ml. Conídios viáveis para administração do inóculo foram determinados pela diluição seriada e plaqueamento destas diluições em meio completo contendo glicose 1% (v/v) e 5mmol/L de tartarato e incubados à 37°C. Os ratos foram anestesiados pela inalação de halothano e infectados pela instilação intranasal de 2.5×10^5 - 5.0×10^5 conídios em 40ul de salina. Os camundongos foram pesados de 24 em 24 horas após a infecção e inspecionados visualmente duas vezes por dia. Na maioria dos casos, ao final dos experimentos de sobrevivência, os animais apresentaram uma redução do peso corpóreo de cerca de 20%. Para análise estatística, as curvas de sobrevivência Kaplan-Meier foram comparadas usando-se o teste de Log rank. $p < 0.05$ foi considerado significativo.

3.4.23 Análise estatística

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

4.1 Identificação e deleção dos genes *pho80* e *pho85*

O fosfato inorgânico é um nutriente indispensável para todos os organismos e é necessário para a biossíntese de ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos e açúcares. Em *S. cerevisiae*, a via *PHO* regula a expressão dos genes *PHO*, envolvidos na absorção de fosfato das fontes extracelulares. Os principais componentes da via *PHO* são: os ativadores transcricionais Pho2 e Pho4, o complexo da quinase dependente de ciclina Pho85-Pho80 e a proteína inibidora da quinase, Pho81 (Lenburg & O'Shea, 1996; Mouillon & Persson, 2006; Huang et al., 2007).

Visando obter maiores informações acerca do sistema de aquisição de fosfato inorgânico em *A. fumigatus*, nós decidimos caracterizar o homólogo de *PHO80* e *PHO85* neste organismo. Para a identificação dos genes *pho80* e *pho85* em *A. fumigatus*, foi realizado um BLASTp no banco de dados do genoma deste fungo (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/afu1/>) utilizando-se Pho80p e Pho85p de *S. cerevisiae* como “queries”. A partir desta análise, uma única região aberta de leitura de cada gene, Afu1g07070 (aqui designado *phoB*^{PHO80}) e Afu5g04130 (aqui designado como *phoA*^{PHO85}), foram identificadas em *A. fumigatus* apresentando uma grande similaridade com Pho80p (e-value= 2e-30; 47% identidade; 68% similaridade) e Pho85p (e-value= 1e-112; 69% identidade; 81% similaridade) de *S. cerevisiae*.

Como um primeiro passo para a caracterização da função de *phoB*^{PHO80} e *phoA*^{PHO85}, a inativação destes foi realizada utilizando-se a técnica de deleção mediada por PCR e por recombinação homóloga “in vivo” em *S. cerevisiae*, respectivamente, descritas anteriormente (Itens 3.4.16 e 3.4.18, respectivamente – Materiais e Métodos). Em ambas estratégias, o produto da PCR final foi transformado na cepa selvagem, e os transformantes obtidos foram selecionados em meio YAG (prototrofia para uridina e uracila). O DNA genômico de alguns dos transformantes isolados dos genes *phoB*^{PHO80} e *phoA*^{PHO85} e também do tipo selvagem foi extraído e submetido a uma restrição enzimática com *Pst*I e com *Hind*III, respectivamente.

A figura 04 A mostra a estratégia utilizada para a confirmação da deleção do gene *phoB*^{PHO80}. A digestão do DNA genômico da cepa selvagem com a enzima de restrição *Pst*I produz dois fragmentos de DNA de tamanhos aproximados de 2,2-kb e 6,0-Kb, sendo que o fragmento de 2,2-Kb é comum as duas cepas, selvagem e

mutante, enquanto esta mesma digestão para o mutante do gene *phoB*^{PHO80} apresenta dois fragmentos sendo eles de 2,2-kb e 2,8-Kb, quando ambos são hibridados com a sonda marcada radioativamente de um fragmento de 2,0-kb da região 3'-UTR do gene. A figura 04 B mostra uma autoradiografia evidenciando as marcações em 2,2 e 6,0-kb para a cepa selvagem e 2,2 e 2,8-Kb para o mutante ($\Delta phoB$ ^{PHO80}).

A figura 05 A mostra a estratégia utilizada para a confirmação da deleção do gene *phoA*^{PHO85}. A digestão do DNA genômico da cepa selvagem com a enzima de restrição *HindIII* produziu dois fragmentos de DNA de tamanhos aproximados de 2,6-kb e 1,3-Kb, sendo que o fragmento de 1,3- Kb é comum as duas cepas, selvagem e mutante, enquanto esta mesma digestão para o mutante do gene *phoA*^{PHO85} apresenta dois fragmentos sendo eles o comum de 1,3-kb e outro fragmento de 1,8-Kb, quando ambos são hibridados com a sonda marcada radioativamente de um fragmento de 1,4-kb da região 5'-UTR do gene. Foram isolados mais de 50 transformantes para a deleção de *phoA*^{PHO85}, entretanto não obteve-se êxito na deleção deste gene, como pode ser comprovado por um Southern representativo de um destes transformantes onde pode-se observar que o mutante apresenta tanto as bandas correspondentes à sua deleção (1,3-Kb e 1,8-Kb) quanto a banda da cepa selvagem (2,6-Kb) (Figura 05 B). Todos os transformantes obtidos para essa construção apresentaram o mesmo padrão de hibridização (dados não apresentados).

FIGURA 04. Representação esquemática da estratégia de deleção do gene *phoB*^{PHO80} **A.** Representação esquemática da estratégia de deleção na qual o gene *phoB*^{PHO80} foi substituído pelo marcador auxotrófico *pyrG*. **B.** Autoradiografia do Southern blot mostrando as bandas radiomarcadas da cepa selvagem (2,2 e 6,0-kb) e mutante (2,2 e 2,8-kb).

FIGURA 05. Representação esquemática da estratégia de deleção do gene $phoA^{PHO85}$ **A.** Representação esquemática da estratégia de deleção na qual o gene $phoA^{PHO85}$ foi substituído pelo marcador auxotrófico $pyrG$. **B.** Autoradiografia do Southern blot mostrando as bandas radiomarcadas da cepa selvagem (1,3 e 2,6-kb) e mutante (1,3; 1,8 e 2,6-kb).

4.2 Construção e caracterização dos mutantes condicionais $alcA::phoA^{PHO85}$ e $niiA::phoA^{PHO85}$

Como visto acima, não foi possível a obtenção da deleção da quinase $phoA^{PHO85}$ em *A. fumigatus*. Sendo esta a única homóloga de *PHO85* presente neste fungo, isto nos levou a investigar a possibilidade deste gene ser essencial em *A. fumigatus*. Neste contexto, foi realizada a construção com dois promotores condicionais. Foram construídos dois mutantes condicionais para PhoA: (i) um com o promotor *alcA*, que é o promotor do gene *alcA* (álcool desidrogenase) de *A. nidulans* que é regulável por álcool, glicerol e glicose e (ii) com o promotor *niiA* que é o promotor do gene que codifica a nitrato redutase e é regulável por nitrogênio. O promotor *niiA* já foi demonstrado como tendo firme controle transcricional nitrogênio-dependente em *A. fumigatus* (Amaar et al., 1998 e Hu et al., 2007). Dois sinais operacionalmente independentes controlam a expressão do *pniiA*: nitrato induz a

expressão enquanto amônio induz a repressão. De forma que a expressão somente é possível na ausência de amônio e presença de nitrato e vice-versa.

A linhagem selvagem foi transformada com o cassete contendo o gene *pyrG* de *A. niger* e o promotor *NiiA* fusionados a ORF do gene *phoA*^{PHO85} (Figura 06), assim como com o cassete contendo o gene *pyr4* de *A. nidulans* e o promotor *alcA* fusionados a ORF deste mesmo gene. Esses cassetes foram gerados pela técnica de recombinação “in vivo” em *S. cerevisiae*.

A inserção homóloga do cassete no DNA genômico mediante a substituição do promotor endógeno do gene foi comprovada por PCR, utilizando-se um par de primers onde pode-se observar um fragmento de 2,6-Kb na cepa selvagem e 5,3-Kb no mutante condicional *alcA::phoA*^{PHO85} (Figura 07) e um fragmento de 2,6 Kb na cepa selvagem e 5,4 Kb no mutante condicional *niiA::phoA*^{PHO85} (Figura 08). Desta forma pode-se observar através da discriminação do locus selvagem daquele obtido na linhagem mutante pela diferença de tamanho das bandas.

Um dos mutantes condicional *alcA::phoA*^{PHO85} obtidos, foi submetido a crescimento em meio para repressão (MM 2x glicose), indução (MM 2% glicerol contendo 100mM de treonina) e meio para expressão basal do gene *phoA*^{PHO85} (MM 2% glicerol) (Figura 09). Assim como um dos mutantes condicional *niiA::phoA*^{PHO85} obtidos, foi submetido a crescimento em meio sólido para indução (AMM com 0.1 e 11mmol/L de fosfato contendo Nitrato) e em meio sólido para repressão (AMM com 0.1 e 11 mmol/L de fosfato contendo Amônio) (Figura 10), a linhagem selvagem sem mutações foi usado como controle para ambos mutantes condicionais. Tanto o mutante *alcA::phoA*^{PHO85} quanto o mutante *niiA::phoA*^{PHO85} não apresentaram a regulação gênica esperada sob condições de repressão, indução e expressão basal do gene, desta forma pode-se considerar que as técnicas utilizadas para obtenção de um mutante condicional em *A. fumigatus* não obtiveram êxito.

FIGURA 06. Representação esquemática do mecanismo de recombinação homóloga do cassete de inserção do promotor *niiA* no DNA genômico do *A. fumigatus*. O cassete de inserção foi clonado em plasmídio pRS426 construído pelo mecanismo de recombinação homóloga em *S. cerevisiae* e a partir dele amplificado por PCR e a posteriorie usado para transformar o fungo.

FIGURA 07. PCR mostrando a confirmação da inserção do cassete *alcA::phoA*^{PHO85} no DNA genômico de *A. fumigatus*.

FIGURA 08. PCR mostrando a confirmação da inserção do cassete *niiA::phoA^{PHO85}* no DNA genômico de *A. fumigatus*.

FIGURA 09. Fenótipo do transformante *alcA::phoA^{PHO85}* obtido pela estratégia de substituição do promotor endógeno do gene *phoA^{PHO85}*. O mutante foi incubado sob indução (MM + 100mM de treonina), repressão (MM + 2x glicose) e sobre expressão basal (MM + 2% glicerol) contendo 11 mmol/L de fosfato a 37°C e após 30 horas fez-se análise do crescimento radial das colônias.

FIGURA 10. Fenótipo do transformante *niaA::phoA^{PHO85}* obtido pela estratégia de substituição do promotor endógeno do gene *phoA^{PHO85}*. O mutante foi incubado sob indução (AMM com nitrato) e repressão (AMM com amônio) em AMM contendo 0.1 e 11 mmol/L de fosfato a 37°C e após 30 horas fez-se análise do crescimento radial das colônias.

4.3 Análise da cinética de divisão nuclear no mutante $\Delta phoB^{PHO80}$

A fim de se caracterizar a divisão nuclear no mutante $\Delta phoB^{PHO80}$, ensaios de cinética de divisão nuclear foram realizados com a cepa mutante $\Delta phoB^{PHO80}$ e a selvagem. Conídios foram germinados em meio mínimo contendo 0.1 e 11 mmol/L de fosfato à 37° C, amostras foram retiradas nos tempos 2, 4, 6, e 8 horas e o número de núcleos em cada célula foi contado.

A figura 11 (A e B) mostra o gráfico do número de núcleos em função do tempo de incubação das cepas selvagem e mutante, em MM contendo 0.1 e 11 mmol/L de fosfato, respectivamente. Em ambos os meios de cultura, após 4 horas de incubação o mutante $\Delta phoB^{PHO80}$ apresenta uma divisão nuclear atrasada em relação ao selvagem. Foi avaliado também a septação em ambas cepas, entretanto não há diferenças entre a cepa mutante e a selvagem no que diz respeito à septação (dados não apresentados). O início da germinação no fungo *A. fumigatus* começa com o seu desenvolvimento assexuado. Quando este é colocado em condições adequadas para o seu crescimento o processo de germinação é iniciado

e a primeira divisão nuclear ocorre por volta de 4 horas após o início da germinação e após a terceira divisão nuclear ocorre a citocinese através da formação de um septo (Doonan, 1992; Harris, 1999; Rhodes, 2006). Os resultados obtidos indicam que o gene *phoB*^{PHO80} parece estar envolvido na velocidade da divisão nuclear do fungo, devido ao seu atraso em relação a cepa selvagem.

Para uma melhor caracterização da cepa mutante $\Delta phoB^{PHO80}$, a determinação do crescimento radial foi realizada. A cepa mutante $\Delta phoB^{PHO80}$ e a cepa selvagem foram inoculadas pontualmente em meio completo YAG, MM com 11 e 0.1 mmol/L de fosfato e incubadas à 37°C; o diâmetro radial de cada cepa foi medido em 24, 48, 72 e 96 horas. Tanto em meio mínimo contendo 11 mmol/L de fosfato quanto em meio mínimo contendo 0.1 mmol/L de fosfato a cepa mutante $\Delta phoB^{PHO80}$ não apresentou diferença de crescimento radial em relação a cepa selvagem (dados não mostrados).

O crescimento radial foi também determinado frente a diferentes tipos de estresses. Assim, a cepa $\Delta phoB^{PHO80}$ e a cepa selvagem, foram também inoculadas pontualmente em meios de cultivos contendo concentrações variadas de CPT (5; 10; 25; 50 e 75 mmol/L), bleomicina (0,25; 0,5; 1 e 1,5 ug/ml), 4-NQO (0,005; 0,01; 0,05; 0,1 e 0,25 ug/ml), HU (1; 2,5; 5; 7,5 e 10mmol/L), itraconazole (0,125; 0,25; 0,50; 1; 2 e 3 ug/ml), caspofungin (1; 10; 50 e 100 ng/ml), ZnSO₄ (0,05; 0,1; 0,2; 0,5 e 0,7 mmol/L), CrSO₄ (0,01; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20 e 0,25 mmol/L), FeSO₄ (0,25; 0,5; 0,75; 1 e 3 mmol/L), menadiona (0,04; 0,05; 0,075 e 0,1 mmol/L), paraquat (3; 3,5; 4 e 5 mmol/L), H₂O₂ (1; 2,5; 5; 7,5 e 10mmol/L) e t-butil hidroperóxido (0,005; 0,01; 0,2; 0,3 e 0,5 mmol/L). Também foi verificado o crescimento radial frente a temperaturas de 30°C, 37°C e 44°C. Em todas as condições de cultivo aqui analisadas a cepa mutante $\Delta phoB^{PHO80}$ comportou-se semelhante a cepa selvagem, não evidenciando crescimento radial diferente (dados não mostrados).

FIGURA 11. Análise da cinética de divisão nuclear na cepa mutante $\Delta phoB^{PHO80}$. Para a cinética de divisão nuclear, a cepa selvagem e a cepa mutante $\Delta phoB^{PHO80}$ foram crescidas nos respectivos meios, à 37° C. Amostras foram retiradas nos tempos indicados e as células foram coradas com DAPI e calcoflúor. Os valores indicam o número de células que apresentam determinado número de núcleos em cada ponto experimental. Foram analisados 100 germinantes em três experimentos independentes. A. MM contendo 0.1mmol/L de fosfato ($p < 0.05$). B. MM contendo 11mmol/L de fosfato ($p < 0.05$).

4.4 Análise da polarização do crescimento em conídios da linhagem $\Delta phoB^{PHO80}$

Durante o crescimento dos conídios de fungos filamentosos, alguns fenômenos ocorrem ordenadamente visando promover o crescimento das hifas. A primeira mitose ocorre cerca de 4 horas após a saída do estado de quiescência do esporo (G1). Durante a quebra da dormência, o esporo intumescce e aumenta o seu volume citoplasmático. Nesse período todas as células devem crescer isotropicamente, pela deposição de novas camadas de parede celular em todas as direções. Surge dessa forma o tubo germinativo, gerando um eixo de crescimento polarizado. A formação do tubo germinativo e do crescimento polarizado indica que a célula encontra condições ideais para o crescimento. Após essa etapa inicial, a célula continua o crescimento e aproximadamente depois da terceira divisão celular ocorre a formação do primeiro septo nos germinantes de *A. nidulans* (o que é equivalente a citocinese de células de mamíferos). O crescimento polarizado é uma das características mais peculiares do crescimento das células fúngicas, tanto em células de leveduras como de fungos filamentosos (Harris, 1999). A forma mais conveniente de se verificar o crescimento polarizado do esporo é a presença do tubo germinativo. Um esporo é classificado como polarizado microscopicamente pela presença do tubo germinativo. Uma vez que os esporos de *A. fumigatus* apresentam uma morfologia esférica, o tubo germinativo pode ser facilmente detectado pela presença de pequenas protuberâncias na superfície do conídio corado com DAPI e calcoflúor (Harris, 1999).

Visando-se observar o defeito de polarização no mutante $\Delta phoB^{PHO80}$, foi realizado um ensaio para observação do crescimento polarizado após a liberação do bloqueio de 5 horas com 50 mmol/L de HU. A droga HU inibe rapidamente a síntese de DNA (fase S) e como consequência inibe a progressão para a mitose (fase M). Entretanto, após a remoção de HU, a inibição é rapidamente revertida (Bergen & Morris, 1983). Este bloqueio promove a parada das células na fase S, tornando assim todas as células sincronizadas nesta fase. Desta forma, amostras do mutante e da linhagem selvagem, foram retiradas nos tempos 0, 60, 90, 120 e 180 minutos após a liberação do bloqueio com HU e as células que apresentavam tubo germinativo e, portanto crescimento polarizado, foram contadas em cada tempo. Em

tempos de incubação menores que 60 minutos, a porcentagem de crescimento polarizado permaneceu semelhante entre as duas cepas e a partir deste tempo houve um crescimento polarizado da cepa mutante menor que o observado para a cepa selvagem (Figura 12). Estes resultados mostram que o gene *phoB*^{PHO80} está envolvido no estabelecimento e/ou na manutenção do crescimento polarizado em *A. fumigatus*.

O esterol presente nas membranas de animais e leveduras influencia a localização polar de proteínas. Os “lipids rafts” são domínios de membrana especializados ricos em esfingolípídeos e ergosterol os quais promovem uma plataforma para a ancoragem de proteínas na membrana plasmática e medeiam o transporte biossintético ou endocítico (Alvarez et al., 2007). Esses “lipids rafts” desenvolvem um papel importante em processos dinâmicos como por exemplo na transdução de sinal (Alvarez et al., 2007). Para determinar se os lipídeos de membrana estavam polarizados durante o crescimento polarizado na cepa selvagem de *A. fumigatus* e na cepa mutante $\Delta phoB^{PHO80}$, estes foram corados com a sonda fluorescente filipina (Pearson et al., 2004). A filipina é um antibiótico polieno que é similar na estrutura à anfotericina B e se liga aos esteróis. Ela tem sido utilizada para a visualização dos esteróis da membrana em vários tipos celulares porque suas propriedades fluorescentes podem ser observadas ao microscópio (Ghannoum & Rice, 1999). Durante o crescimento polarizado a cepa mutante $\Delta phoB^{PHO80}$ e a sua respectiva cepa selvagem mostraram intensa coloração por filipina nas pontas das hifas (dados não mostrados), indicando que a polarização dos lipídeos de membrana não é deficiente na cepa mutante $\Delta phoB^{PHO80}$.

FIGURA 12. Análise do crescimento polarizado em germinantes da cepa mutante $\Delta phoB^{PHO80}$. O gráfico representa o percentual de germinantes que apresentaram emissão de tubo germinativo nos tempos indicados após liberação do bloqueio na fase S com 50 mmol/L de HU por 5 horas a 37°C. Os pontos indicam os valores referente a média $\pm$ desvio padrão de 100 germinantes analisados em 3 experimentos independentes, corados com DAPI e calcoflúor ($p < 0,05$).

4.5 Atividade da Enzima Fosfatase Ácida e Transporte do Fosfato no mutante $\Delta phoB^{PHO80}$

A aquisição celular, armazenamento, liberação e integração metabólica do fosfato inorgânico está baseada na participação essencial de numerosas enzimas, tais como fosfatases ácidas e alcalinas extracelulares (para uma revisão, ver Persson et al., 2003).

Previamente, Caddick e Arst (1986) e Caddick et al. (1986) mostraram que em níveis nutricionais adequados de fosfato inorgânico (11 mmol/L) a expressão da fosfatase ácida é reprimida e em baixas concentrações de fosfato (0.1 mmol/L) a expressão é induzida em *A. nidulans*. Em *S. cerevisiae*, a deleção tanto de *PHO85*, quanto de *PHO80* causa a expressão constitutiva de genes da via *PHO* em presença de fosfato (Persson et al., 2003).

Por isso, para verificar se a ausência de $phoB^{PHO80}$ interfere na atividade da enzima fosfatase ácida no fungo *A. fumigatus* a atividade da fosfatase ácida foi

avaliada no mutante $\Delta phoB^{PHO80}$ e na cepa selvagem em meio contendo 11 e 0.1 mmol/L de fosfato (Figura 13). Na concentração de 11 mmol/L de fosfato, a atividade da fosfatase ácida no mutante não foi reprimida, contrastando com a atividade da fosfatase ácida na cepa selvagem que foi reprimida em relação à cepa mutante $\Delta phoB^{PHO80}$ (Figura 13 A). Em 0.1 mmol/L de fosfato, a atividade da fosfatase ácida tanto da cepa mutante quanto da cepa selvagem estava completamente desreprimida (Figura 13 B).

O transporte de fosfato também foi avaliado na concentração de 11 mmol/L de fosfato (Figura 13 C). Este mostrou-se mais alto cerca de 4 a 5 vezes no mutante $\Delta phoB^{PHO80}$ quando comparado à cepa selvagem sugerindo que não há uma atividade reprimida dos transportadores de fosfato na cepa mutante. Estes resultados indicam que há uma indução constitutiva das enzimas de aquisição de fosfato no mutante $\Delta phoB^{PHO80}$ comparável com a deleção dos homólogos de *PHO80* em *S. cerevisiae* e *A. nidulans* (Madden et al., 1990; Wu et al., 2004).

Estes resultados em conjunto indicam que o homólogo da ciclina *PHO80* em *A. fumigatus* está envolvida na regulação das enzimas de aquisição de fosfato.

A.

B.

C.

FIGURA 13. Atividade da fosfatase ácida no mutante $\Delta phoB^{PHO80}$ em 0.1 mmol/L e 11 mmol/L de fosfato e o transporte de fosfato em 11mmol/L de fosfato. A. MM contendo 11mmol/L de fosfato ($p < 0.01$). **B.** MM contendo 0.1mmol/L de fosfato ($p < 0.05$). Os resultados estão expressos em nmol/p-nitrofenol liberado/mg de micélio seco/min (Caddick and Arst, 1986; Caddick et al., 1986). **C.** Transporte do fosfato em MM contendo 11mmol/L ($p < 0.01$).

4.6 Sensibilidade da cepa mutante $\Delta phoB^{PHO80}$ à ciclosporina A e ao cálcio

Foi previamente relatado que a calcineurina, uma serina/treonina fosfatase regulada por Ca^{2+} /calmodulina e inibida por ciclosporina, não é um gene essencial em *A. fumigatus* e apresenta papéis na regulação da diferenciação e adaptação neste fungo (da Silva Ferreira et al., 2007). O mutante de *A. fumigatus* com a subunidade catalítica A da calcineurina deletada ($\Delta calA$) apresenta defeitos na morfologia da hifa como, por exemplo, a extensão apical e o crescimento polarizado alterados, o que resulta em uma drástica diminuição da filamentação (da Silva Ferreira et al., 2007). O mutante $\Delta calA$ apresenta um decréscimo na infecção em camundongos e não consegue crescer em soro bovino fetal, o qual contém baixa concentração de fosfato.

Quando fosfato foi adicionado ao soro ocorreu a complementação do fenótipo defectivo de crescimento deste mutante. Quando a calcineurina de *A. fumigatus* foi inibida pelo imunossupressor tacrolimus em um meio sem fosfato, houve uma redução do transporte do fosfato e seis genes que codificam para transportadores de fosfato, tiveram seus níveis de mRNA alterado (da Silva Ferreira et al., 2007). Esses resultados sugeriram que a calcineurina estaria de alguma forma envolvida na regulação da via PHO em *A. fumigatus*. Com a obtenção da cepa mutante $\Delta phoB^{PHO80}$ surgiu então, uma excelente oportunidade para se estudar em maiores detalhes esses fenótipos observados.

Primeiramente, comparou-se o crescimento da cepa selvagem e da cepa mutante $\Delta phoB^{PHO80}$ em MM contendo 0.1 mmol/L e 11 mmol/L de fosfato e em SBF 10% acrescentados de concentrações sub-inibitórias de ciclosporina A (10; 20; 30; 40 e 50 nmol/L). A cepa mutante $\Delta phoB^{PHO80}$ teve seu crescimento significativamente mais sensível à ciclosporina em todas as concentrações de ciclosporina e em todos os meios acima citados (Figura 14 A, B e C). Embora o mutante $\Delta phoB^{PHO80}$ apresente um decréscimo no crescimento em MM contendo 11 mmol/L de fosfato quando comparado com a cepa selvagem (dados não mostrados), a adição de ciclosporina A promove um efeito sinérgico aumentando a diferença no crescimento (Figura 14 B).

Dois importantes mediadores dos sinais de cálcio nas células eucarióticas são as proteínas calmodulina dependente de cálcio e a fosfatase calcineurina

dependente de cálcio/calmodulina. A calcineurina consiste de uma subunidade catalítica A e uma subunidade reguladora B de ligação a Ca^+ /calmodulina. A associação dessas duas subunidades é essencial para sua ativação (Da Silva Ferreira et al., 2007). Para se avaliar a susceptibilidade do mutante $\Delta phoB^{\text{PHO80}}$ ao cálcio, comparou-se o crescimento radial desta cepa mutante com a sua cepa selvagem em SBF 10%, MM contendo 0.1 e 11 mmol/L de fosfato acrescidos de concentrações crescentes de cloreto de cálcio (50; 100; 200; 400 e 800 mmol/L). Quando comparado à cepa selvagem, o mutante $\Delta phoB^{\text{PHO80}}$ mostrou-se mais susceptível ao cálcio do que a cepa selvagem em todas as condições de crescimento avaliadas (Figura 15 A, B e C). Estes resultados sugerem que há uma interação entre o metabolismo de fosfato, calcineurina e o cálcio.

FIGURA 14. A sensibilidade do mutante $\Delta phoB^{PHO80}$ à ciclosporina A. O mutante e sua cepa selvagem foram inoculados pontualmente nos respectivos meios, incubados à 37°C e o diâmetro radial foi medido após 48 horas de incubação. Os resultados são a média de quatro repetições $\pm$ desvio padrão. **A.** MM contendo 0.1mmol/L de fosfato acrescentado de concentrações crescentes de ciclosporina A ($p < 0.05$). **B.** MM contendo 11mmol/L de fosfato acrescentado de concentrações crescentes de ciclosporina A ($p < 0.05$). **C.** SBF 10% acrescentado de concentrações crescentes de ciclosporina A ($p < 0.05$).

FIGURA 15. Sensibilidade do mutante $\Delta phoB^{PHO80}$ ao cálcio. O mutante e sua cepa selvagem foram inoculados pontualmente nos respectivos meios, incubados à 37°C e o diâmetro radial foi medido após 48 horas de incubação. Os resultados são a média de quatro repetições $\pm$ desvio padrão. **A.** SBF10% acrescido de concentrações crescentes de cálcio ($p < 0.05$). **B.** MM contendo 0.1mmol/L de fosfato acrescido de concentrações crescentes de cálcio ($p < 0.01$). **C.** MM contendo 11mmol/L de fosfato acrescido de concentrações crescentes de cálcio ($p < 0.0005$).

4.7 Identificação de genes modulados pela deleção do gene *phoB*^{PHO80} através de hibridações de *microarray* e validação por RT-PCR

Para se observar o efeito da deleção do gene *phoB*^{PHO80} na expressão de genes em *A. fumigatus*, hibridações de *microarray* foram realizadas com RNA obtido como descrito anteriormente (ver item 3.4.13 – Materiais e Métodos). Os RNAs da cepa selvagem crescida em MM contendo 0.1 mmol/L de fosfato por 6 e 10 horas foram usados como referência. Análises estatísticas identificaram 1.422 genes que mostraram modulação em pelo menos um ponto experimental. Uma análise direta dos genes identificados através de hibridação de *microarray*, permitiu identificar vários genes envolvidos na via *PHO*, bem como em uma variedade de processos celulares (Tabela 07). Estes genes parecem ser modulados pela deleção do gene *phoB*^{PHO80}. Os dados completos foram depositados em Gene Expression Omnibus (GEO) pertencente ao National Center of Biotechnology (NCBI) com o número GSE9516.

A tabela 07 mostra 11 e 17 genes escolhidos arbitrariamente, os quais são relacionados e não relacionados, respectivamente, ao metabolismo do fosfato e que foram mais expressos (razão $\log \geq 1$) quando a cepa selvagem foi crescida em MM contendo 0.1 mmol/L de fosfato e quando a cepa mutante foi crescida em MM contendo 0.1 e 11 mmol/L de fosfato. Quanto aos genes relacionados ao metabolismo do fosfato, foram encontrados 6 fosfatases (duas ácidas, três alcalinas e possivelmente uma fitase), quatro transportadores de fosfato, incluindo possíveis homólogos de PHO84 e PHO89 (Afu4g03610 e Afu7G06350), uma chaperona transportadora vacuolar (Vtc4), recentemente implicada na acumulação de polifosfato no patógeno de milho *Ustilago maydis* (Boyce et al., 2006) e o *phoC*^{PHO81}, um inibidor do complexo PHO85-PHO80, quinase dependente de ciclina (Tabela 07). Quanto aos genes não relacionados ao metabolismo do fosfato, foram encontrados vários transportadores, o fator de transcrição StuA envolvido na competência desenvolvimental de *A. fumigatus* (Sheppard et al., 2005) e uma ATPase vacuolar MVP1 (Tabela 07). Observou-se também que somente quatro genes tiveram um consistente decréscimo no acúmulo do seu RNAm ($\log \text{ ratio} \leq 1$): Afu8g01640, Afu1g16450, Afu2g02630 e Afu2g02610, o quais codificam uma peptídeo sintase

não-ribossomal, duas proteínas hipotéticas e uma subunidade Vam7 do complexo SNARE, respectivamente.

A fim de se obter uma confiabilidade das hibridações de *microarray* e validar a expressão dos dados deste por outro método, foram escolhidos quatro genes: Afu4g06020 (*phoC*^{PHO81}), Afu4g03610 (*phoD*^{PHO84}), Afu7g06350 (*phoE*^{PHO89}), e Afu2g09040 (transportador vacuolar Vtc4). Sondas fluorescentes Lux foram desenhadas e utilizou-se a análise por real time RT-PCR para a quantificação da expressão destes genes na cepa selvagem e no mutante $\Delta phoB^{PHO80}$ crescidos em MM contendo 0.1 e 11 mmol/L de fosfato. Os resultados foram expressos pelo número de cópias do cDNA de cada gene dividido pelo número de cópias do cDNA de *β -tubulina*. Todos esses genes mostraram-se mais expressos quando a cepa selvagem foi crescida em MM contendo 0.1 mmol/L e a cepa mutante $\Delta phoB^{PHO80}$ foi crescida também em MM contendo 0.1 e 11 mmol/L de fosfato (Figura 16). Dessa forma, pode-se ver que as hibridações de *microarray* foram capazes de promover informações sobre a modulação de expressão gênica em *A. fumigatus* com um considerável nível de confiabilidade. Esses resultados sugerem que a mutação $\Delta phoB^{PHO80}$ pode afetar direta ou indiretamente a expressão do mRNA de genes que possuem seu acúmulo de mRNA modulada pela exposição à diferentes concentrações de fosfato.

Considerando o alto nível de acúmulo de mRNA do gene Vtc4 no mutante $\Delta phoB^{PHO80}$, o acúmulo de polifosfato nos vacúolos tanto da cepa mutante quanto da cepa selvagem foi investigado. Conídios de ambas as cepas foram crescidos em MM contendo 0.1 e 11 mmol/L de fosfato por 8 horas e após corados com Toluidine Blue O. Curiosamente, na cepa selvagem não foi observado o acúmulo vacuolar de polifosfato tanto em meio contendo 11 e 0.1mmol/L de fosfato (Figura 17 A). Da mesma forma, não foram observadas diferenças significativas no acúmulo de mRNA do gene Vtc4 quando a cepa selvagem foi crescida em meio com 0.1 e 11 mmol/L de fosfato (Figura 16 C).

Interessantemente, no mutante $\Delta phoB^{PHO80}$, de *A. fumigatus*, foi observada grande quantidade de acúmulo vacuolar de polifosfato tanto em meio contendo 11 mmol/L de fosfato quanto em meio contendo 0.1 mmol/L de fosfato (Figura 17 B). Esses resultados sugerem que o mutante $\Delta phoB^{PHO80}$ pode afetar o acúmulo de

polifosfato em vacúolos de tubos germinativos previamente crescidos em 0.1 ou 11 mmol/L de fosfato extracelular.

O gene *pho84* codifica para o principal transportador de alta afinidade para o fosfato em *S. cerevisiae* (Mouillon & Persson, 2006). Visando-se a inativação deste gene em *A. fumigatus*, construiu-se um cassete de deleção utilizando-se a técnica de recombinação *in vivo* utilizando a levedura *S. cerevisiae*, segundo Colot e colaboradores (2006).

A figura 18 A mostra a estratégia utilizada para a confirmação da deleção do gene *pho84*. A digestão do DNA genômico da cepa selvagem com a enzima de restrição *Xba*I produz um fragmento de DNA de tamanho aproximado de 3 kb, enquanto esta mesma digestão para o mutante do gene *pho84* (aqui designado *phoD*^{PHO84}) apresenta um fragmento de 8 kb, quando ambos são hibridados com a sonda marcada radioativamente de um fragmento de 1,7 kb da região 5'UTR do gene. A figura 18 B mostra uma autoradiografia evidenciando as marcações em 3 e 8 kb para a cepa selvagem e para o mutante (*ΔphoD*^{PHO84}), respectivamente.

A fim de se obter uma melhor caracterização da cepa mutante *ΔphoD*^{PHO84} a determinação do crescimento radial foi realizada. A cepa mutante *ΔphoD*^{PHO84} e a cepa selvagem, foram inoculadas pontualmente em MM com 11mmol/L e 0.1mmol/L de fosfato e incubados à 37°C por 48 horas e o diâmetro radial de cada cepa foi medido. A cepa mutante *ΔphoD*^{PHO84} não apresentou diferença quando comparada à sua cepa selvagem em relação ao crescimento radial (dados não mostrados).

O crescimento radial também foi determinado frente a diversos estresses. A cepa *ΔphoD*^{PHO84} e sua respectiva cepa selvagem, foram inoculadas pontualmente em MM contendo 0.1 e 11mmol/L de fosfato contendo concentrações variadas de fosfito (15; 20; 40 e 80mmol/L), ciclosporina (625nmol/L), MnCl₂ (2,5; 5; 10; 20 e 30mmol/L), CaCl₂ (200 e 400mmol/L), ZnSO₄ (0,25; 0,5; 1; 1,5; 3; 5; 7mmol/L), CoCl₂ (0,1; 0,25; 0,5; 1; 2; 3 e 5mmol/L) e CuSO₄ (0,5; 1; 3; 5 e 10mmol/L). Também foi verificado o crescimento radial frente à pHs de 3, 6 e 9. Em todas as condições testadas, citadas acima, a cepa mutante *ΔphoD*^{PHO84} não apresentou diferença em relação ao crescimento radial quando comparada à sua cepa selvagem (dados não mostrados).

TABELA 07. Genes relacionados e não relacionados ao metabolismo do fosfato inorgânico no mutante $\Delta phoB^{PHO80}$.

Gene*	
Relacionados ao metabolismo do fosfato inorgânico	
Afu4g01070	Fosfatase ácida
Afu4g03660	Fosfatase ácida
Afu2g03110	Fosfatase alcalina
Afu3g14030	Fosfatase alcalina
Afu6g08710	Fosfatase alcalina
Afu7g06350	Transportador de fosfato ($phoE^{PHO89}$)
Afu3g03010	Permease reprimível por fosfato
Afu6g08020	Transportador ABC, transportador de fosfato
Afu4g03610	Fosfato: H ⁺ symporter ($phoD^{PHO84}$)
Afu2g09040	Chaperona, transportador vacuolar ($Vtc4$)
Afu4g06020	Inibidor da quinase dependente de ciclina, Nuc2 ($phoC^{PHO81}$)
Não relacionados ao metabolismo do fosfato inorgânico	
Afu1g17470	Transportador de alta afinidade de nitrato, NrtB
Afu5g10320	Proteína hipotética
Afu5g13180	Agmatinase
Afu1g17030	Glicosil transferase
Afu3g13470	Transportador de sulfato
Afu5g09530	Proteína hipotética conservada
Afu3g12650	Proteína hipotética conservada
Afu6g12240	Glicerofosforil diester fosfodiesterase
Afu3g08870	Proteína hipotética conservada, fitase putativa
Afu5g02470	Proteína de biossíntese de tiamina, Nmt1
Afu6g052 10	Malato desidrogenase, NAD-dependente
Afu2g08090	Proteína hipotética
Afu1g17590	Fosfolipase C
Afu1g16250	Alfa-glucosidase B
Afu2g07900	APSES fator de transcrição StuA
Afu4g04070	Proteína hipotética conservada
Afu5g08830	ATPase vacuolar MVP1 putativa

* Genes com maior expressão (razão $\log \geq 1$) quando a cepa selvagem foi crescida em MM contendo 0.1mmol/L de fosfato e a cepa mutante $\Delta phoB^{PHO80}$ em MM contendo 11 e 0.1mmol/L de fosfato.

A.

B.

C.

D.

FIGURA 16. Expressão do mRNA de genes selecionados em resposta a diferentes concentrações de fosfato inorgânico. A. Níveis de expressão do mRNA de $phoC^{PHO81}$. B. Níveis de expressão do mRNA de $phoD^{PHO84}$. C. Níveis de expressão do mRNA de $Vct4$. D. Níveis de expressão do mRNA de $phoE^{PHO89}$. O método utilizado para a quantificação do mRNA foi o Real-time RTPCR. As amostras foram normalizadas usando-se os valores de CT obtidos pela amplificação de β -tubulina. A relação quantitativa da expressão dos genes selecionados e da β -tubulina foi determinada por uma curva padrão. Os valores representam o número de cópias de mRNA do mutante $\Delta phoB^{PHO80}$ normalizado pelo número de cópias de cDNA de β -tubulina.

FIGURA 17. O acúmulo de polifosfato no mutante $\Delta phoB^{PHO80}$. A cepa selvagem e a cepa mutante $\Delta phoB^{PHO80}$ foram crescidas nos respectivos meios, à 37° C por 8 horas. Após, as células foram coradas com Toluidine Blue O e observadas ao microscópio. Bar, 10 μ m. **A.** Cepa selvagem em MM contendo 0.1 e 11mmol/L de fosfato. **B.** Cepa mutante $\Delta phoB^{PHO80}$ em MM contendo 0.1 e 11mmol/L de fosfato. Observar a intensidade dos vacúolos indicados pelas setas.

FIGURA 18. Representação esquemática da estratégia de deleção do gene *pho84*. **A.** Representação esquemática da estratégia de deleção na qual o gene *pho84* foi substituído pelo marcador auxotrófico *pyrG*. **B.** Autoradiografia do Southern blot mostrando as bandas radiomarcadas da cepa selvagem (8kb) e mutante (3 kb).

4.8 Expressão de genes envolvidos na aquisição de fosfato no mutante com a deleção da proteína quinase A ($\Delta pkaC1$) de *A. fumigatus*

Existem várias evidências conectando a proteína quinase A com o complexo *PHO80-PHO85* e o metabolismo do fosfato (Timblin & Bergman, 1997; Giots et al., 2003; Thevelein et al., 2005; Larraya et al., 2005). Por isso experimentos para a dosagem da atividade da fosfatase ácida e a acumulação do mRNA de *phoC^{PHO81}* e *phoD^{PHO84}* foram realizados no mutante com a deleção do gene *pkaC1* que codifica a subunidade catalítica da proteína quinase A (PKA) (Liebmann et al., 2004). Como mostrado previamente para a cepa selvagem (ver Figura 13), a atividade da fosfatase ácida foi muito mais alta quando a cepa selvagem foi crescida em MM contendo 0.1 mmol/L de fosfato do que quando esta foi crescida em MM contendo 11 mmol/L de fosfato (Figura 19). Embora exista um aumento proporcional na atividade da fosfatase ácida quando os resultados do meio com 0.1 e 11mmol/L são comparados, no geral a atividade da fosfatase ácida é cerca de 40% menor no mutante $\Delta pkaC1$ do que na sua respectiva cepa selvagem quando ambas são

crescidas em MM contendo 0.1mmol/L de fosfato (Figura 19 A). Foram observados também baixos níveis no acúmulo de mRNA de *phoC*^{PHO81} e *phoD*^{PHO84} quando a cepa $\Delta pkaC1$ foi comparada com a cepa selvagem ambas crescida em MM contendo 0.1mmol/L de fosfato (Figura 20). Estes resultados sugerem que a falta da proteína quinase A contribui para um decréscimo na expressão dos genes da via *PHO* em *A. fumigatus*.

FIGURA 19. Atividade da fosfatase ácida no mutante $\Delta pkaC1$ em 0.1 e 11 mmol/L de fosfato. A. MM contendo 0.1mmol/L de fosfato ($p < 0.05$). **B.** MM contendo 11 mmol/L de fosfato ($p < 0.005$). Os resultados estão expressos em nmol/p-nitrofenol liberado/mg de micélio seco/min (Caddick & Arst, 1986; Caddick et al., 1986).

A.

B.

FIGURA 20. Expressão do mRNA de *phoC^{PHO81}* e *phoD^{PHO84}* em resposta a concentrações de fosfato no mutante da proteína quinase A ($\Delta pkaC1$). A. Níveis de expressão do mRNA de *phoC^{PHO81}*. B. Níveis de expressão do mRNA de *phoD^{PHO84}*. O método utilizado para a quantificação do mRNA foi o Real-time RTPCR. As amostras foram normalizadas usando-se os valores de CT obtidos pela amplificação de β tubulina. A relação quantitativa da expressão de *phoC^{PHO81}* e *phoD^{PHO84}* e da β tubulina foi determinada por uma curva padrão. Os valores representam o número de cópias de mRNA do mutante $\Delta phoB^{PHO80}$ normalizado pelo número de cópias de cDNA de β -tubulina.

4.9 Virulência da cepa mutante $\Delta phoB^{PHO80}$ e $\Delta phoD^{PHO84}$ em modelo animal

Recentemente foi visto que a Cdk5^{PHO85} do fungo *U. maydis* é necessária para a total virulência neste fungo, provavelmente porque mutantes deste gene não apresentam o crescimento polar requerido para a formação de estruturas para infecção (Castillo-Lluva et al., 2007). Considerando-se o defeito no crescimento polarizado do mutante $\Delta phoB^{PHO80}$ e a possibilidade de sua interação com PhoA^{PHO85}, decidiu-se verificar uma possível influência na patogenicidade resultante da deleção do gene *phoB*^{PHO80} através da virulência em modelo animal. A virulência do mutante $\Delta phoB^{PHO80}$ de *A. fumigatus* em comparação com a cepa selvagem, foi determinada em um modelo murino de aspergilose invasiva. Não houve diferenças na virulência entre a cepa mutante e a cepa selvagem (Figura 21 A). Observando-se a mortalidade total e a forma da curva pode-se confirmar este resultado. A infecção tanto pela cepa selvagem quanto pela cepa mutante resultou em uma mortalidade de aproximadamente 90% após 13 dias da inoculação dos conídios. Esses resultados indicam que o mutante $\Delta phoB^{PHO80}$ não causa a redução da virulência quando comparada à sua cepa selvagem correspondente.

Resultados anteriores mostraram que o mutante com a deleção do gene *vtc4* de *U. maydis* apresentou decréscimo de sintomas no desenvolvimento e reduzida proliferação em plantas (Boyce et al., 2006). Com este resultado surge a possibilidade de que o transporte de fosfato reduzido pode afetar a virulência em *A. fumigatus*. Apesar de não ter sido observado nenhum fenótipo no mutante $\Delta phoD^{PHO84}$, a sua virulência foi avaliada em modelo animal. A virulência do mutante $\Delta phoD^{PHO84}$ de *A. fumigatus* em comparação à cepa selvagem, foi determinada em um modelo murino de aspergilose invasiva. Não houve diferenças na virulência entre a cepa mutante e a cepa selvagem (Figura 21 B). Observando-se a mortalidade total e a forma da curva pode-se confirmar este resultado. A infecção tanto pela cepa selvagem quanto pela cepa mutante resultou em uma mortalidade de aproximadamente 90% após 5 dias da inoculação dos conídios. Esses resultados indicam que o mutante $\Delta phoD^{PHO84}$ não possui uma redução da virulência quando comparada à sua cepa selvagem correspondente.

FIGURA 21. A virulência do mutante $\Delta phoB^{PHO80}$ e $\Delta phoD^{PHO84}$ de *A. fumigatus*. A. Análise comparativa de $\Delta phoB^{PHO80}$ (n=15) e da cepa selvagem (n=15) em camundongos neutropênicos para aspergilose invasiva pulmonar. **B.** Análise comparativa de $\Delta phoD^{PHO84}$ (n=15) e da cepa selvagem (n=15) em camundongos neutropênicos para aspergilose invasiva pulmonar. Camundongos foram inoculados com 40 μ l de suspensão de conídios contendo $2.5 - 5.0 \times 10^5$. Os camundongos foram sacrificados quando apresentavam uma redução de 20% do seu peso corpóreo a partir do dia da infecção.

Em *Aspergilli* existe uma distribuição das espécies que possuem dois homólogos PhoA e PhoB (homólogos da quinase Pho85,), como *A. oryzae* (96% e 83% de identidade) e *A. flavus* (96 % e 80 % de identidade) e os que possuem apenas o homólogo de PhoA, como *A. fumigatus* (96%), *Neosartori fischeri* (96%), *A. terreus* (96%) e *A. clavatus* (96%). Curiosamente, *A. niger* apresentou uma identidade de 73% e 77% com PhoA e PhoB, respectivamente. Em contraste, em *Aspergillus* ssp, existe apenas um homólogo de Pho80 (dados não mostrados). Para a caracterização do sistema de aquisição de fosfato em *A. fumigatus* realizou-se a deleção da quinase e da ciclina homólogas (pho85 e pho80) neste fungo, designadas aqui como *phoA*^{PHO85} e *phoB*^{PHO80}. No entanto, após várias tentativas de deleção da quinase *phoA*^{PHO85}, a deleção deste gene não foi obtida. Foi visto que em *S. cerevisiae*, a quinase pho85 não é essencial para o crescimento deste fungo, entretanto em *A. nidulans*, a deleção dos dois homólogos da quinase pho85 (*phoA* e *phoB*, respectivamente) causa letalidade (Castillo Luvla et al., 2007). Desta forma, pode-se levar em consideração a não obtenção da deleção desta quinase em *A. fumigatus*, devido a este apresentar somente um homólogo da quinase PHO85 (*phoA*). Foram realizadas construções para a obtenção de mutantes condicionais da única quinase homóloga (*phoA*^{PHO85}) com o promotor *alcA* e *niiA* em *A. fumigatus*, entretanto estes não apresentaram o fenótipo esperado sob condições de indução e repressão, podendo-se considerar que as técnicas para obtenção de mutantes condicionais do gene *phoA*^{PHO85} em *A. fumigatus* não foram bem sucedidas neste fungo. Levando-se em consideração o fato de que o promotor endógeno de PhoA não foi deletado, é possível imaginar que exista algum elemento neste promotor que esteja impedindo a regulação adequada dos promotores *alcA* e *niiA*. Desta forma os resultados sugerem que o gene que codifica a quinase *phoA*^{PHO85} em *A. fumigatus* é um gene essencial. Em *Ustilago maydis*, foi observado que a quinase PHO85 é um gene essencial após tentativas de obtenção de uma cepa contendo a deleção do gene *phoA*^{pho85} e o não êxito da mesma (Castillo-Lluva, et al., 2007).

A caracterização da única ciclina homóloga de pho80 de *A. fumigatus*, *phoB*^{PHO80}, foi realizada. O mutante Δ *phoB*^{PHO80} apresentou altos níveis de expressão de genes PHO em meios com 11 e 0.1 mmol/L de fosfato. Não foi observada nenhuma diferença entre a cepa selvagem e o mutante Δ *phoB*^{PHO80} em relação ao desenvolvimento assexuado e a quantidade de conídios em diferentes

concentrações de fosfato (dados não mostrados). Entretanto, o mutante $\Delta phoB^{PHO80}$, apresentou uma redução no crescimento polarizado e não teve a sua virulência reduzida em um modelo murino de aspergilose invasiva. Recentemente, foi observado que um mutante condicional de $Cdk5^{PHO85}$ em *U. maydis*, apresenta problemas na polarização da célula (Castillo-Lluva et al., 2007), podendo assim existir a possibilidade de que a ausência da ciclina *pho80* esteja influenciando também no atraso da polarização das células no mutante para este gene em *A. fumigatus*.

Como uma estratégia preliminar para a obtenção de resultados de vias que sejam influenciadas por $phoB^{PHO80}$, uma análise transcricional da cepa selvagem e do mutante $\Delta phoB^{PHO80}$ crescidos por 6 e 10 horas em MM contendo 0.1 e 11 mmol/L de fosfato foi realizada. Observou-se um aumento no acúmulo de mRNA de genes relacionados e não relacionados à via *PHO*. Previamente, somente dois estudos analisaram a expressão global de genes regulados por Pho80-Pho85 em *S. cerevisiae* (Ogawa et al., 2000; Huang et al., 2002). O primeiro estudo observou 22 genes regulados pela via *PHO*. Não era conhecida a função de oito destes genes, PHM1-PHM8, no metabolismo do fosfato. A seqüência de aminoácidos de PHM1 (YFL004w), PHM2 (YJL012c) e PHM4 (YER072w) eram 32 a 56% idênticas. Mutantes dos genes *phm3* e *phm4* e o duplo mutante *phm1phm2* apresentavam deficiência severa na habilidade de acumular polifosfato. O gene PHM3 codifica um homólogo de VTC4 de *A. fumigatus*, o qual apresentou-se mais expresso no “background” de $\Delta phoB^{PHO80}$. O outro estudo (Huang et al., 2002), mostrou que alguns genes também são dependentes da regulação pelo fator de transcrição Pho4, na ausência de PHO80 e PHO85, incluindo os genes PHM/VTC.

Desta forma, avaliou-se em maiores detalhes a expressão e a função de quatro dos genes obtidos na análise transcricional, sendo eles: dois transportadores de fosfato ($phoD^{PHO84}$ e $phoE^{PHO89}$), o inibidor de Pho85-Pho80 ($phoC^{PHO81}$) e um transportador vacuolar de polifosfato, *vtcD*. Em *S. cerevisiae*, *Vtcp4*, um transportador vacuolar de fosfato é requerido durante a fusão de vesículas contendo fosfato inorgânico e o consequente acúmulo de fosfato na forma de polifosfato (Muller et al., 2002). Interessantemente, a deleção do gene que codifica para a proteína vacuolar VTC4 suprime a sensibilidade da cepa $\Delta pho85$ a elevados níveis de $CaCl_2$ e muitas outras condições de estresse (Huang et al.,

2002). Usando testes genéticos, os mesmo autores sugeriram que VTC4 é o alvo-chave para o fator de transcrição Pho4 e que a regulação da expressão de VTC4 através de Pho85-Pho80 é requerida para a sua própria função vacuolar e para a sobrevivência da levedura sob uma variedade de condições sub-ótimas. Recentemente foi visto que VTC4 influencia no armazenamento de polifosfato, na morfogênese e na virulência do fungo patogênico do milho *U. maydis* (Boyce et al., 2006).

Os sistemas de transporte de fosfato têm sido caracterizados como sistema de alta afinidade, o qual é ativado em resposta a ausência externa de fosfato e sistema de baixa afinidade, o qual assegura um suprimento de fosfato em concentrações normais ou altas de fosfato extracelular (Lenburg & O'Shea, 1996; Mouillon & Persson, 2006; Huang et al., 2007). PHO84 é o principal transportador de alta afinidade para o fosfato em *S. cerevisiae* (Mouillon & Persson, 2006).

A deleção do gene Pho84 em *S. cerevisiae*, resulta em resistência à manganês, zinco, cobalto e cobre (Jensen et al., 2003). Entretanto, não foi observado nenhuma resistência a metais no mutante $\Delta phoD^{PHO84}$ e o crescimento desta cepa em meio contendo 0.1mmol/L de fosfato também não foi afetado. Essas observações são surpreendentes considerando-se o importante papel de PHO84 em *S. cerevisiae* (Mouillon and Persson, 2006). Estes resultados sugerem que um outro transportador, como $PhoE^{PHO89}$, esteja atuando de forma redundante com $PhoD^{PHO84}$.

Previamente, resultados do nosso laboratório mostraram que quando a calcineurina de *A. fumigatus* era inibida ocorria a redução do transporte de fosfato (Da Silva Ferreira et al., 2007). Em *S. cerevisiae*, os genes são também regulados transcricionalmente e desta forma, foi observado que o acúmulo de alguns mRNA de genes que codificam para alguns transportadores de fosfato em *A. fumigatus* (como $phoE^{PHO89}$ e $phoD^{PHO84}$), estavam reduzidos quando a calcineurina era inibida (Da Silva Ferreira et al., 2007). Estes resultados sugerem que a deficiência na aquisição de fosfato pode ser também devido ao decréscimo do transporte de fosfato. Com os resultados aqui obtidos, observou-se uma interação entre o mutante $\Delta phoB^{PHO80}$, sensibilidade a ciclosporina A e a tolerância ao cálcio. A influência da calcineurina no transporte de fosfato tem sido observado no co-transportador renal de sódio/fosfato do tipo II (Moz et al., 2004). Camundongos com a deleção do gene

que codifica a calcineurina A β apresentaram um decréscimo nos níveis de mRNA do transportador de sódio/fosfato do tipo II e não apresentaram um aumento nos níveis de mRNA após a troca por uma dieta com baixa concentração de fosfato.

Foi evidenciado no nosso trabalho um decréscimo na expressão de genes *PHO* no mutante da subunidade catalítica da proteína quinase pkaC1 de *A. fumigatus*. Giots et al. (2003) mostraram que a adição de fosfato em um meio onde as células se encontravam com uma baixa concentração de fosfato, ativava a via de sinalização da proteína quinase A. Entretanto, os mecanismos que induzem a atividade da proteína quinase A em resposta ao fosfato não estão completamente esclarecidos. Esses resultados sugerem uma conexão entre a aquisição de fosfato e a proteína quinase A (Mouillon & Persson, 2006).

A regulação e degradação do transportador Pho84 de *S. cerevisiae* em resposta a elevação de fosfato externo é diminuída pela inibição da proteína quinase A (Mouillon & Persson, 2005). Estes autores sugerem que a via de sinalização da proteína quinase A possui um papel na condução do sinal para a regulação do transportador Pho84 em um compartimento vacuolar em resposta a alteração da disponibilidade de fosfato no ambiente externo. Interessantemente, a regulação das fosfatases ácidas secretadas não requer a ativação da via de sinalização da proteína quinase A. Assim, estes resultados sugerem, que o Pho84 é parte da maquinaria sensorial envolvida na resposta celular devido a mudanças na concentração de fosfato do meio (Mouillon & Persson, 2006).

O complexo Pho85-Pho80 regula negativamente a localização nuclear de Crz1, que é um fator de transcrição ativado através de sua defosforilação pela calcineurina (Cyert, 2003; Sopko et al., 2006; Huang et al., 2007). A calcineurina defosforila o Crz1 e este é rapidamente translocado do citosol para o núcleo (Cyert, 2003).

O Crz1 é também fosforilado e negativamente regulado pela proteína quinase A dependente de AMP cíclico (Kafadar & Cyert, 2004; Sopko et al., 2006). Assim, acredita-se que o CrzA^{CRZ1} de *A. fumigatus* é menos fosforilado no mutante Δ phoB^{PHO80}. Desta forma, a via calcineurina-CrzA é mais susceptível ao cálcio e à ciclosporina A. Isto explica parcialmente a expressão reduzida de genes envolvidos na aquisição de fosfato no mutante Δ pkCa1 de *A. fumigatus*. Essas observações são apoiadas pelo fato de que a super-expressão de CrzA confere sensibilidade ao cálcio (Soriani et al., 2008) e também sugere um papel para o CrzA na aquisição do fosfato.

6. CONCLUSÕES

Os resultados aqui obtidos revelam que:

- a ciclina *phoB*^{PHO80} de *A. fumigatus* apresenta papéis conservados na aquisição de fosfato e no metabolismo de polifosfato.
- a ciclina *phoB*^{PHO80} está interagindo com a calcineurina e a proteína quinase A, indicando uma complexa via de interações durante a aquisição do fosfato inorgânico em *A. fumigatus*.
- o mutante $\Delta phoB^{PHO80}$ apresentou altos níveis de expressão de genes *PHO* em meios com 0.1 e 11 mmol/L de fosfato.
- as hibridações de *microarray* revelaram um aumento no acúmulo de genes relacionados e não relacionados à via *PHO*.
- existe um decréscimo na expressão de genes da via *PHO* no mutante da proteína quinase A de *A. fumigatus*.
- os mutantes $\Delta phoB^{PHO80}$ e $\Delta phoD^{PHO84}$ não apresentam uma redução da virulência em um modelo murino de aspergilose invasiva.
- o gene que codifica a quinase *phoA*^{PHO85} parece ser essencial em *A. fumigatus*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, J. A. T., ENGLER, J. A., RAES, J., MAGYARC, Z., DE GROOD, R., INZÉ, D., DE VEYLDER, L. Molecular characterization of *Arabidopsis* PHO80-like proteins, a novel class of CDKA1-interacting cyclins. **CMLS, Cell. Mol. Life Sci.**, v. 61, p. 1485-1497, 2004.

ALVAREZ, F. J., DOUGLAS, L. M., KONOPKA, J. B. Sterol-rich plasma membrane domains in fungi. **Eukaryot. Cell**, v. 6, p. 755-763, 2007.

AMAAR, Y. G., MOORE, M. M. Mapping of the nitrate-assimilation gene cluster (*crnA-niiA-niaD*) and characterization of the nitrite reductase gene (*niiA*) in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. **Curr. Genet.**, v. 33, p. 206-215, 1998.

AUESUKAREE, C., HOMMA, T., KANEKO, Y., HARASHIMA, S. Transcriptional regulation of phosphate-responsive genes in low-affinity phosphate-transporter-defective mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 306, p. 843-850, 2003.

BAUDIN, A., OZIER-KALOGEROPOULOS, O., DENOUEL, A., LACROUTE, F., CULLIN, C. A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Acids Res.**, v. 21, p. 3329-3330, 1993.

BERGEN, L. G. & MORRIS, N. R. Kinetics of nuclear division cycle of *Aspergillus nidulans*. **J. Bacteriol.**, v. 156, p. 155-160, 1983.

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

BOYCE, K. J., KRETSCHMER, M., KRONSTAD, J. W. The *vtc4* gene influences polyphosphate storage, morphogenesis, and virulence in the maize pathogen *Ustilago maydis*. **Eukaryot. Cell.**, v. 5, p. 1399-1409, 2006.

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

BUSSINK, H. J. & OSMANI, S. A. A cyclin-dependent kinase family member (PHOA) is required to link developmental fate to environmental conditions in *Aspergillus nidulans*. **EMBO J**, v. 17, p. 3990-4003, 1998.

CADDICK, M. X., ARST, H. N. Structural genes for phosphatases in *Aspergillus nidulans*. **Genet. Res. Camb.**, v. 47, p. 83-91, 1986.

CADDICK, M. X.; BROWNLEE, A. G.; ARST, H. N. Phosphatases regulation in *Aspergillus nidulans*: responses to nutritional starvation. **Genet. Res. Camb.**, v. 47, p. 93-102, 1986.

CASTILLO-LLUVA, S., ALVAREZ-TABARÉS, I., WEBER, I., STEIBERG, G., PÉREZ-MARTIN, J. Sustained cell polarity and virulence in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis* depends on an essential cyclin-dependent kinase from the Cdk5/Pho85 family. **J. Cell Sci.**, v. 120, p. 1584-1595, 2007.

CHEADLE, C., WAWTER, M. P., FREED, W. J., BECKER, K. G. Analysis of microarray data using Z score transformation. **J. Mol. Diagn.**, v. 5, p. 73-81, 2003.

COLOT, H.V., PARK, G., TURNER, G. E., RINGELBERG, C., CREW, C. M., LITVINKOVA, L., WEISS, R. L., BORKOVICH, K. A., DUNLAP, J. C. A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. **PNAS**, v. 103, p. 10352-10357, 2006.

CYERT, M. S. Calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: how yeast go crazy in response to stress. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 311, p. 1143-1150, 2003.

DA SILVA FERREIRA, M. E., HEINEKAMP, T., HÄRT, A., BRAKHAGE, A. A., SEMIGHINI, C. P., HARRIS, S. D., SAVOLDI, M., GOUVÊA, P. F., GOLDMAN, M. H., GOLDMAN, G. H. Functional characterization of the *Aspergillus fumigatus* calcineurin. **Fungal Genet. Biol.**, v. 44, p. 219-230, 2007.

DA SILVA FERREIRA, M. E., KRESS, M. R. V., SAVOLDI, M., GOLDMAN, M. H., HARTL, A., HEINEKAMP, T., BRAKHAGE, A. A., GOLDMAN, G. H. The *akuBKU80* Mutant Deficient for Nonhomologous End Joining Is a Powerful Tool for Analyzing Pathogenicity in *Aspergillus fumigatus*. **Eukariot. Cell**, v. 5, p. 207-211, 2006.

DENNING, D.W. Invasive Aspergillosis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 26, p. 781-805, 1998.

DOONAN, J.H. Cell division in *Aspergillus*. **J. Cell. Sci.**, v. 103, p. 596-611, 1992.

DOU X., WU, D., AN, W., DAVIES, J., HASHMI, S. B., UKIL, L., OSMANI, S. A. The PHOA and PHOB cyclin-dependent kinases perform an essential function in *Aspergillus nidulans*. **Genetics**, v. 165, p. 1105-1115, 2003.

DUCHINI, A., REDFIELD, D. C., MCHUTCHISON, J. G., BRUNSON, M. E., POCKROS, P. J. Aspergillosis in liver transplant recipients: successful treatment and improved survival using a multistep approach. **South. Med. J.**, v. 95, p. 897-899, 2002.

EISEN, M. B., SPELLMAN, P. T., BROWN, P. O., BOTSTEIN, D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 14863-14868, 1998.

FEINBURG, A. P. & VOGELSTEIN, B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonucleases fragments to high specific activity. **Anal. Biochem.**, v. 132, p. 6-13, 1983.

FEINBURG, A. P. & VOGELSTEIN, B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonucleases fragments to high specific activity. **Anal. Biochem.**, v. 137, p. 266-267, 1984.

FOX, D. S. & HEITMAN, J. Good fungi gone bad: the corruption of calcineurin. **Bioessays**, v. 24, p. 894-903, 2002.

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

GIOTS, F., DONATON, M. C. V., THEVELEIN, J. M. Inorganic phosphate is sensed by specific phosphate carriers and acts in concert with glucose as a nutrient signal for activation of the protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Microbiol.**, v. 47, p. 1163-1181, 2003.

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

HARRIS, S. D., HOFMANN, A. F., TEDFORD, H. W., LEE, M. P. Identification and characterization of genes required for hyphal morphogenesis in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. **Genetics**, v. 151, p. 1015-1025, 1999.

HIRST, K., FISHER, F., MCANDREW, P. C., GODING, C. R. The transcription factor, the Cdk, its cyclin and their regulator: directing the transcriptional response to a nutritional signal. **EMBO J**, v. 13, p. 5410-5420, 1994.

HOGAN, L. H., KLEIN, B. S., LEVITZ, S. M. Virulence factors of medically important fungi. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 9, p. 469-488, 1996.

HU, W., SILLAOTS, S., LEMIEUX, S., DAVISON, J., KAUFFMAN, S., BRETON, A., LINTEAU, A., XIN, C., BOWMAN, J., BECKER, J., JIANG, B., ROEMER, T. Essential gene identification and drug target prioritization in *Aspergillus fumigatus*. **PLoS Pathog.**, v. 3, p. E24, 2007.

HUANG, D., FRIESEN, H. & ANDREWS, B. Pho85, a multifunctional cyclin-dependent protein kinase in budding yeast. **Mol. Microbiol.**, v. 66, p. 303-314, 2007.

HUANG, D., MOFFAT, J. & ANDREWS, B. Dissection of a complex phenotype by functional genomics reveals roles for the yeast cyclin-dependent protein kinase Pho85 in stress adaptation and cell integrity. **Mol. Cell. Biol.**, v. 22, p. 5076-5088, 2002.

HUANG, D., PATRICK, G., MOFFAT, J., TSAI, L., ANDREWS, B. Mammalian Cdk5 is a functional homologue of the budding yeast Pho85 cyclin-dependent protein kinase. **PNAS**, v. 96, p. 14445-14450, 1999.

ITO, J. I. & LYONS, J. M. Vaccination of corticosteroid immunosuppressed mice against invasive pulmonary aspergillosis. **J. Infect. Dis.**, v. 186, p. 869-871, 2002.

JENSEN, L. T., AJUA-ALEMANJI, M., CULOTTA, V. C. The *Saccharomyces cerevisiae* high affinity phosphate transporter encoded by PHO84 also functions in manganese homeostasis. **J. Biol. Chem.**, v. 43, p. 420356-42040, 2003.

KAFADAR, K. A. & CYERT, M. S. Integration of stress response: modulation of calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae* by protein kinase A. **Eukaryot. Cell.**, v. 3, p. 147-1153, 2004.

KORNBERG, A., RAO, N. N., AULT-RICHÉ, D. Inorganic Polyphosphate: a molecule of many functions. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 68, p. 68-89, 1999.

KULAEV, I. S., VEGABOV, V.M. Polyphosphate metabolism in microorganism. **Adv. Microbiol. Physiol.**, v. 24, p. 83-171, 1983.

KULAEV, I. S. The Biochemistry of Inorganic Polyphosphates. **New York: Wiley.** 256 pp, 1979.

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

LARRAYA, L. M., BOYCE, K. J., SO, A., STEEN, B. R., JONES, S., MARRA, M., KRONSTAD, J. W. Serial analysis of gene expression reveals conserved links between protein kinase A, ribosome biogenesis, and phosphate metabolism in *Ustilago maydis*. **Eukaryotic Cell.**, v. 4, p. 2029-2043, 2005.

LATGE, J. P. & CALDERONE, R. Host-microbe interactions: fungi invasive human fungal opportunistic infections. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 5, p. 355-358, 2002.

LATGÉ, J. P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, p. 310-350, 1999.

LENBURG, M. E., & O'SHEA, E. K. Signaling phosphate starvation. **Trends in Biochem. Sci.**, v. 21, p. 383-387, 1996.

LI, Z., & WANG, C. C. A PHO80-like Cyclin and a B-type Cyclin Control the Cell Cycle of the Procyclic Form of *Trypanosoma brucei*. **The Journal Of Biol. Chem.**, v. 278, p. 20652-20658, 2003.

LIEBMANN, B., MULLER, M., BRAUN, A., BRAKHAGE, A. A. The cyclic AMP-dependent protein kinase A network regulates development and virulence in *Aspergillus fumigatus*. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 5193-5203, 2004.

LOUDON, K. W., COKE, A. P., BURNIE, J. P., LUCAS, G. S., LIU YIN, J. A. Invasive aspergillosis: clusters and sources? **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 32, p. 217-224, 1994.

MADDEN, S. L., JOHNSON, D. L., BERGMAN, L. W. Molecular and expression analysis of the negative regulators involved in the transcriptional regulation of acid phosphatase production in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.**, v. 10, p. 5950-7, 1990.

MEASDAY, V., MOORE, L., RETNAKARAN, R., LEE, J., DONOVIEL, M., NEIMAN, A., M., ANDREWS, B. A Family of Cyclin-Like Proteins That Interact with the Pho85 Cyclin-Dependent Kinase. **Mol. and Cell. Biol.**, v. 17, p. 1212-1223, 1997.

MISSALL, T. A., LODGE, J. K., MCEWEN, J. E. Mechanisms of resistance to oxidative and nitrosative stress: implications for fungal survival in mammalian hosts. **Eukaryot. Cell**, v. 3, p. 835-846, 2004.

MOUILLON, J. M. & PERSON, B. L. New aspects on phosphate sensing and signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Res.**, v. 6, p. 171-176, 2006.

MOUILLON, J. M. & PERSSON, B. L. Inhibition of the protein kinase A alters the degradation of the high-affinity phosphate transporter Pho84 in *S. cerevisiae*. **Curr. Genet.**, v. 48, p. 226-234, 2005.

MOZ, Y. R. L., LAVI-MOSHAYOFF, V., COX, K. B., MOLKENTIN, J. D., SILVER, J., NAVEH-MANY, T. Calcineurin A β is central to the expression of the renal type II

Na/Pi co-transporter gene and to the regulation of renal phosphate transport. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 15, p. 2972-2980, 2004.

MULLER, O., BAYER, M. J., PETERS, C., ANDERSEN, J. S., MANN, M., MAYER, A. The Vtc proteins in vacuole fusion: coupling NSF activity to V0 trans-complex formation. **EMBO J.**, v. 21, p. 259-269, 2002.

NIERMAN, W. C., PAIN, A., ANDERSON, M. J., WORTMAN, J. R., KIM, H. S., ARROYO, J., BERRIMAN, M., ABE, K., ARCHER, D. B., BERMEJO, C., BENNETT, J., BOWYER, P., CHEN, D., COLLINS, M., COULSEN, R., DAVIES, R., DYER, P. S., FARMAN, M., FEDOROVA, N., FEDOROVA, N., FELDBLYUM, T. V., FISCHER, R., FOSKER, N., FRASER, A., GARCIA, J. L., GARCIA, M. J., GOBLE, A., GOLDMAN, G. H., 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, J. P., LI, W., LORD, A., LU, C., MAJOROS, W. H., MAY, G. S., MILLER, B. L., MOHAMOUD, Y., MOLINA, M., MONOD, M., MOUYNA, I., MULLIGAN, S., MURPHY, L., O'NEIL, S., PAULSEN, I., PENALVA, M. A., PERTEA, M., PRICE, C., PRITCHARD, B. L., QUAIL, M. A., RABBINOWITSCH, E., RAWLINS, N., RAJANDREAM, M. A., REICHARD, U., RENAULD, H., ROBSON, G. D., RODRIGUEZ DE CORDOBA, S., RODRIGUEZ-PENA, J. M., RONNING, C. M., RUTTER, S., SALZBERG, S. L., SANCHEZ, M., SANCHEZ-FERRERO, J. C., SAUNDERS, D., SEEGER, K., SQUARES, R., SQUARES, S., TAKEUCHI, M., TEKAIA, F., TURNER, G., VAZQUEZ DE ALDANA, C. R., WEIDMAN, J., WHITE, O., WOODWARD, J., YU, J. H., FRASER, C., GALAGAN, J. E., ASAI, K., MACHIDA, M., HALL, N., BARRELL, B., DENNING D. W. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. **Nature**, v. 438, p. 1151-1156, 2005.

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

OGAWA, N., DERISI, J., BROWN, P. O. New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis. **Mol. Biol. Cell.**, v. 11, p. 4309-4321, 2000.

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

PEGUES, D. A., LASKER, B. A., MCNEIL, M. M., HAMM, P. M., LUNDAL, J. L., KUBAK, B. M. Cluster of cases of invasive aspergillosis in a transplant intensive care unit: evidence of person-to-person airborne transmission. **Clin. Infect. Dis.**, v. 34, p. 412-416, 2002.

PERSSON, B. L., LAGERSTEDT, J. O., PRATT, J. R., PATTISON-GRANBERG, J., LUNDH, K., SHOKROLLAHZADEH, S., LUNDH, F. Regulation of phosphate acquisition in *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr. Genet.**, v. 43, p. 225-244, 2003.

PERSSON, B. L., PETTERSON, J., FRISTEDT, U., WEINANDER, R., BERHE, A., PATTISON, J. Phosphate permeases of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and regulation. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1422, p. 255-272, 1999.

PETER, E., BAKRI, F., BALL, D. M., CHENEY, R. T., SEGAL, B. H. Invasive pulmonary filamentous fungal infection in a patient receiving inhaled corticosteroid therapy. **Clin. Infect. Dis.**, v. 35, p. e54-e56, 2002.

PITT, J. I. The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health. **J. Med. Vet. Mycol.**, suppl. I, v. 32, p. 17-32, 1994.

REMENTERIA, A., LOPEZ-MOLINA, N., LUDWIG, A., VIVANCO, A. B., BIKANDI, J., PONTON, J., GARAIZAR, J. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 22, p. 1-23, 2005.

RHODES, J.C. *Aspergillus fumigatus*: growth and virulence. **Med. Micol.**, v. 44, p. 77-81, 2006.

RIVERA, A., HOHL, T., PAMER, E. G. Immune Responses to *Aspergillus fumigatus* Infections. **Biol. of Blood and Marrow Transplant.**, v. 12, p. 47-49, 2006.

SAEED, A. I., SHAROV, V., WHITE, J., LI, J., LIANG, W., BHAGABATI, N., BRAISTED, J., KLAPA, M., CURRIER, T., THIAGARAJAN, M., STURN, A., SNUFFIN, M., REZANTSEV, A., POPOV, D., RYLTSOV, A., KOSTUKOVICH, E., BORISOVSKY, I., LIU, Z., VINSAVICH, A., TRUSH, V., QUACKENBUSH, J. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. **Biotechniques**, v. 34, p. 374-378, 2003.

SAMBROOK, J. & RUSSEL, D. W. Molecular Cloning: a laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, **Cold Spring Harbor, NY**, 2001.

SCHRETTL, M., BIGNELL, E., KRAGL, C., JOECHL, C., ROGERS, T., ARST JR, H. N., HAYNES, K., HAAS, H. Siderophore biosynthesis but not reductive iron assimilation is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. **J. Exp. Med.**, v. 200, p. 1213-1219, 2004.

SHEPPARD, D. C., DOEDT, T., CHIANG, L. Y., KIM, H. S., NIERMAN, W. C., FILLER, S. G. The *Aspergillus fumigatus* StuA protein governs the up-regulation of a

discrete transcriptional program during the acquisition of developmental competence. **Mol. Biol. Cell.**, v. 16, p. 5866-5879, 2005.

SHIBUYA, K., ANDO, T., HASEGAWA, C., WAKAYAMA, M., HAMATANI, S., HATORI, T., NAGAYAMA, T., NONAKA, I. Pathophysiology of pulmonary aspergillosis. **J. Infect. Chemother.**, v. 10, p. 138-145, 2004.

SOPKO, R., HUANG, D., PRESTON, N., CHUA, G., PAPP, B., KAFADAR, K., SNYDER, M., OLIVER, S. G., CYERT, M., HUGHES, T. R., BOONE, C., ANDREWS, B. Mapping pathways and phenotypes by systematic gene overexpression. **Mol. Cell.**, v. 21, p. 319-330, 2006.

SORIANI, F. M., MALAVAZI, I., DA SILVA FERREIRA, M. E., SAVOLDI, M., VON ZESKA KRESS, M. R., DE SOUZA GOLDMAN, M. H., LOSS, O., BIGNELL, E., GOLDMAN, G. H. Functional characterization of the *Aspergillus fumigatus* CRZ1 homologue, CrzA. **Mol. Microbiol.**, v. 67, p. 1274-1291, 2008.

SOUTHERN, C. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel eletrophoresis. **J. Mol. Biol.**, v.98, p.503-517, 1975.

SPRINGER, M., WYKOFF, D. D., MILLER, N., O'SHEA, E. K. Partially phosphorylated Pho4 activates transcription of a subset of phosphate-responsive genes. **Plos. Biology**, v. 1, p. 261-270, 2003.

STEVENS, D. A. Vaccinate against aspergillosis! A call to arms of the immune system. *Clin. Infect. Dis.*, v. 38, p. 1131-1136, 2004.

SWINNEN, E., ROSSEELS, J., WINDERICKX, J. The minimum domain of Pho81 is not sufficient to control the Pho85–Rim15 effector branch involved in phosphate starvation-induced stress responses. **Current. Genetic**, v. 48, p. 18-33, 2005.

TANAKA, K. & OKAYAMA, H. A Pcl-like Cyclin Activates the Res2p-Cdc10p Cell Cycle "Start" Transcriptional Factor Complex in Fission Yeast. **Molec. Biol. of the Cell.**, v. 11, p. 2845-2862, 2000.

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

THEVELEIN, J. M. , GELADE, R., HOLSBEEKS, I., LAGATIE, O., POPOVA, Y., ROLLAND, F., STOLTZ, F., VAN DE VELDE, S., VAN DIJCK, P., VANDORMAEL, P., VAN NULAND, A., VAN ROEY, K., VAN ZEEBROECK, G., YAN, B. Nutrient sensing systems for rapid activation of the protein kinase A pathway in yeast. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 33, p. 253-256, 2005.

TILBURN J., SCAZZOCCHIO C., TAYLOR G. G., ZABICKY-ZISSMAN J. H., LOCKINGTON R. A., DAVIES R. W. Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. **Gene**, v. 26, p. 205-221, 1983.

TIMBLIN, B. K. & BERGMAN, L. W. Elevated expression of stress response genes resulting from deletion of the PHO85 gene. **Mol. Microbiol.**, v. 26, p. 981-990, 1997.

TOH-E, A. & NISHIZAWA, M. Structure and function of cyclin-dependent Pho85 kinase of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, v. 47, p. 107-117, 2001.

WANKE, B., LAZERA MDOS, S., NUCCI, M. Fungal infections in the immunocompromised host. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 153-158, 2000.

WU, D., HASHIMI, S. B., OSMANI, S. A. The Pho80-like cyclin of *Aspergillus nidulans* regulates development independently of its role in phosphate acquisition. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 37693-37703, 2004.

YANG, L., UKIL, L., OSMANI, A., NAHM, F., DAVIES, J., DE SOUZA, C. P. C., DOU, A., PEREZ-BALAGUER, A., OSMANI, S. A. Rapid production of gene replacement constructs and generation of a Green fluorescent protein-tagged centromeric marker in *Aspergillus nidulans*. **Euk. Cell**, v. 3, p. 1359-1362, 2004.

8.1 Apêndice A - Artigo publicado: “Functional characterization of the *Aspergillus fumigatus* PHO80 homologue”. **Fungal Genet. Biol.** v. 45, p. 1135-1146, 2008.