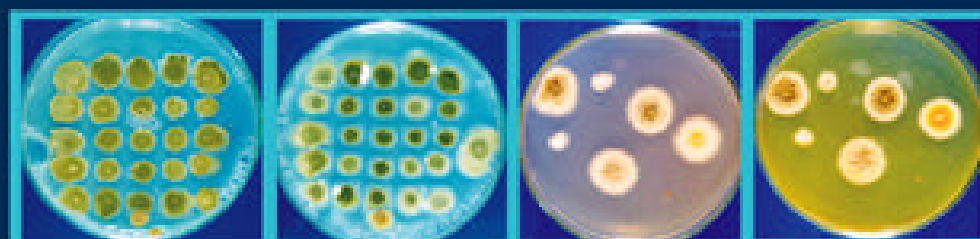


UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

Mecanismo molecular envolvido na
resistência aos derivados de acridina e
ao antimicótico tioconazol em
Aspergillus nidulans.

Eleusa Maria Ferreira Rocha



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**Mecanismo molecular envolvido na resistência
aos derivados de acridina e ao antimicótico
tioconazol em *Aspergillus nidulans*.**

Eleusa Maria Ferreira Rocha

RIBEIRÃO PRETO-SP
2002

Eleusa Maria Ferreira Rocha

**Mecanismo molecular envolvido na resistência
aos derivados de acridina e ao antimicótico
tioconazol em *Aspergillus nidulans***

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto,
Universidade de São Paulo, para a
obtenção do grau de Doutor em
Ciências, área de concentração em
Genética

Orientadora: Profa. Dra. Nilce M. Martinez-Rossi

RIBEIRÃO PRETO-SP
2002

FICHA CATALOGRÁFICA

Rocha, Eleusa Maria Ferreira

Mecanismo molecular envolvido na resistência aos derivados de acridina e ao antimicótico tioconazol em *Aspergillus nidulans*.

Ribeirão Preto, 2002.

108p. : il.; 30cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP/USP – Área de concentração: Genética.

Orientadora: Martinez-Rossi, Nilce M.

1. *Aspergillus nidulans*
2. Resistência aos derivados de acridina
3. Trealose sintase/fosforilase

Dedico e ofereço este trabalho

A **Deus**, aos meus pais **Djalma** e **Eleuza**, e aos meus irmãos **Rosa**, **Ana**, **Angela** e **Djalma Jr.**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética e Biologia Molecular de Fungos, do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, tendo sido financiado por auxílios concedidos pela **FAPESP**, **CAPES** e **CNPq**.

Agradeço à **USP** pela estrutura e à **FAPESP** pela concessão da bolsa de estudo e dos auxílios que permitiram a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra. Nilce M. Martinez-Rossi** pela orientação eficiente, paciência, constante estímulo durante o desenvolvimento deste trabalho, pela determinação em oferecer as melhores condições aos seus alunos e também pelo critério e rigor científicos em todas as atividades que desempenha.

Aos companheiros de laboratório e amigos **Ana Graci, Ana Lúcia, Camila, Eliane, Fernando, Jeny, Luciano, Márcia, Mônica, Nalu, Sérgio e Tânia** pelo carinho, incentivo, presença, apoio, sugestões e colaboração durante a realização deste trabalho.

Aos colegas e amigos **Mendel, Rose e Ana Cláudia** pelo apoio técnico e pela amizade de todos estes anos.

Aos funcionários **Pedro, Gustavo e Antônio** pelos auxílios referentes à informática.

Aos funcionários do Departamento de Genética **Cleusa, Maria Aparecida e Susie** pelos auxílios prestados e pela atenção.

À **Gilmara, Vinícius e André** pela amizade e carinho.

À todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram neste trabalho.

ÍNDICE

Resumo.....	
Summary.....	
1. Introdução.....	1
1.1 - Agentes antifúngicos e resistência.....	2
1.2 - Modelo experimental utilizado.....	9
1.3 - Objetivos e Justificativa.....	10
2. Material e Métodos.....	12
2.1- Linhagens utilizadas.....	13
2.1.1- Foram utilizadas as seguintes linhagens de <i>A. nidulans</i> ..	13
2.1.2- Foram utilizadas as seguintes linhagens de <i>E. coli</i>	13
2.2 – Soluções para <i>A. nidulans</i>	15
2.2.1 - Solução de elementos-traço.....	15
2.2.2 - Solução de sais.....	15
2.2.3 - Solução de vitaminas.....	15
2.2.4 - Solução de casaminoácidos ou caseína hidrolisada.....	16
2.2.5 - Solução de ácido nucléico hidrolisado.....	16
2.3 - Meios de cultura.....	16
2.3.1 - Meio mínimo (MM)	16
2.3.2 - Meio completo (MC)	17
2.4 - Soluções para obtenção de protoplastos.....	17
2.4.1- Solução CT.....	17
2.4.2- Solução DT.....	18
2.4.3- Solução ET.....	18
2.4.4- Meio mínimo com sacarose (MMS) para regeneração de protoplasto.....	18
2.5- Soluções e meio de cultura para <i>E. coli</i>	19
2.5.1- Solução de X-gal (5-bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D- galactoside)	19
2.5.2- Solução de IPTG (“Isopropyl- β -D-thiogalactosyranoside)	19
2.5.3- Meio de cultura de Luria e Bertani (LB).....	19
2.6 - Soluções de agentes inibidores.....	20
2.6.1- Soluções de acriflavina e brometo de etídio.....	20
2.6.2- Soluções de tioconazol e terbinafina.....	20
2.7- Estoque das linhagens.....	20
2.7.1- Estoque das linhagens de <i>A. nidulans</i>	20
2.7.2- Estoque das linhagens de <i>E. coli</i>	21
2.8- Vetores.....	21
2.9- Extração de DNA plasmidial da linhagem <i>E. coli</i>	21
2.10- Preparo da suspensão de conídios de <i>A. nidulans</i>	22
2.11- Extração de DNA genômico de <i>A. nidulans</i>	23
2.12- Construção da biblioteca genômica do segregante 1 duplo mutante <i>acrA1 tebA7</i> de <i>A. nidulans</i>	23
2.13- Obtenção de células competentes e transformações por eletroporação.....	25
2.14- Obtenção de células competentes e transformações por “heat shock”.....	25

2.15- Obtenção de protoplastos de <i>A. nidulans</i>	26
2.16- Determinação da concentração mínima inibitória (CIM) para o tioconazol, acriflavina e terbinafina.....	27
2.17- Transformação de <i>A. nidulans</i>	27
2.18- Subclonagem do clone C08 da biblioteca genômica do segregante 1 de <i>A. nidulans</i> , envolvido na resistência à acriflavina, pela estratégia de “shotgun”.....	28
2.19- Obtenção e análise do alelo selvagem do gene que confere resistência à acriflavina.....	31
2.19.1- Biblioteca genômica cromossomo-específica de <i>A. nidulans</i>	31
2.19.2- Preparação das membranas de “nylon” da biblioteca genômica cromossomo-específica de <i>A. nidulans</i>	32
2.19.3- Marcação da sonda.....	32
2.19.4- Hibridação e rastreamento de clones positivos da biblioteca genômica cromossomo-específica de <i>A. nidulans</i>	33
2.19.5- Identificação do inserto de interesse presente no cosmídio W27D11.....	33
2.19.6- Subclonagem de fragmentos marcados pelo “Southern-blotting”.....	34
2.19.7- Seqüenciamento do gene de resistência e de seu alelo selvagem.....	35
2.20- Análise da expressão gênica por “northern blotting”.....	36
2.20.1- Condições de cultivo.....	36
2.20.2- Extração de RNA total.....	36
2.20.3- “Northern blot”	37
2.21- Nocaute gênico em <i>A. nidulans</i>	38
2.21.1- Gene da arginina (<i>argB</i>).....	38
2.21.2- Construção do cassete para o nocaute gênico.....	38
2.21.3- Transformação da linhagem segregante 22 de <i>A. nidulans</i> com o gene que confere resistência à acriflavina rompido pelo gene da arginina (<i>argB</i>)	39
2.22- Expressão diferencial de genes (“Differential Display”- DDRT-PCR)..	40
2.23- Amplificação de DNA e do cDNA por PCR.....	41
2.24- Análise genética.....	42
2.24.1– Obtenção de heterocários.....	42
2.24.2– Análise meiótica.....	42
3. Resultados.....	45
3.1- Construção da biblioteca genômica do segregante 1.....	45
3.2- Determinação das concentrações mínimas inibitórias (CIM) do tioconazol, da acriflavina e da terbinafina para a linhagem receptora	48
3.3- Clonagem de um gene envolvido na resistência à acriflavina, ao tioconazol e ao brometo de etídio.....	48
3.3.1- Clone C08.....	48
3.3.2- Rastreamento do alelo sensível à acriflavina na biblioteca genômica cromossomo-específica de <i>A. nidulans</i>	49

3.4- Análise da seqüência nucleotídica.....	56
3.5- Análise da presença de um “stop codon” na seqüência de nucleotídeos do gene envolvido na resistência à acriflavina.....	58
3.6- Análise da proteína envolvida na resistência à acriflavina.....	60
3.7- Inativação gênica.....	65
3.8- Análise da expressão gênica por “ <i>northern blotting</i> ”.....	72
3.9- “Differential display”	72
3.10 - Análise do blastx da seqüência de 1.2Kb.....	76
3.11 - Análise genética.....	77
4- Discussão.....	79
4.1- Análise genética.....	92
5- Referências Bibliográficas.....	94

Lista de Figuras

Figura 1- Via de síntese do ergosterol e os sítios de ação de seus principais inibidores.....	3
Figura 2 - Estrutura química dos antifúngicos tioconazol e terbinafina.....	4
Figura 3 - Estrutura química da acriflavina e proflavina (ACF).....	4
Figura 4 – Estrutura química do brometo de etídio.....	7
Figura 5: Padrão de peso molecular dos fragmentos obtidos após a digestão com a enzima de restrição <i>Xba</i> I de 12 diferentes clones da biblioteca genômica da linhagem <i>acrA1 tebA7</i> de <i>A. nidulans</i>	46
Figura 6- A- Representação esquemática do clone C08.....	49
Figura 7- Rastreamento secundário do clone W27D11.....	50
Figura 8- Eletroforese em gel de agarose, mostrando o padrão de digestão do clone W27D11.....	51
Figura 9- Análise por “ <i>southern blotting</i> ” para identificar as bandas marcadas radioativamente com a sonda de 1.6Kb das várias digestões realizadas com o clone W27D11.....	52
Figura 10- A- Análise por “ <i>southern blotting</i> ” para confirmar que os clones 1 (fragmento de 2.5Kb) e 2 (fragmento de 4.5Kb).....	53
Figura 11- Seqüência de nucleotídeos do contig (1) do clone W27D11 da linhagem selvagem de <i>A. nidulans</i> verde.....	55
Figura 12: Análise dos resultados das similaridades de seqüências do programa blastx do site http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ do contig (4.9Kb) do clone selvagem W27D11.....	56
Figura 13- Seqüência de nucleotídeos do alelo selvagem do gene envolvido na resistência à acriflavina de <i>A. nidulans</i> , deduzida em seqüência de aminoácidos.....	58
Figura 14- Análise do cDNA de <i>A. nidulans</i>	59
Figura 15- Seqüência de nucleotídeos da linhagem sensível à acriflavina de <i>A. nidulans</i>	60
Figura 16- Alinhamento entre as seqüências das proteínas TreP-Ps (“Trehalose phosphorylase” de <i>P. sajor-caju</i>), Tsa-Gf (“Trehalose syntase” de <i>G. frondosa</i>), TsaA (envolvida na resistente à acriflavina de <i>A. nidulans</i>) e	

ccg9-Nc (“clock-controlled gene-9 protein” de <i>N. crassa</i>).....	63
Figura 17- Análise por “ <i>southern blotting</i> ” para identificar o número de cópias do gene <i>tsaA</i>	64
Figura 18- A- Representação esquemática do clone nº 2.....	65
Figura 19- Representação esquemática da construção do cassete da ruptura gênica.....	66
Figura 20- Eletroforese em gel de agarose 0.8% (m/v) mostrando o DNA plasmidial das colônias transformantes (1 e 2) com o cassete da ruptura gênica.....	67
Figura 21- Colônias transformantes de <i>A. nidulans</i>	68
Figura 22- Colônias transformantes cultivadas em meio mínimo sem arginina e com glicose como fonte de carbono. Colônias transformantes cultivadas em meio mínimo sem arginina e com trealose como principal fonte de carbono.....	69
Figura 23- A-colônias transformantes cultivadas em meio mínimo com arginina contendo 2.0µg/ml de acriflavina.....	69
Figura 24- Colônias transformantes de <i>A. nidulans</i>	70
Figura 25- “ <i>Southern blotting</i> ” das colônias transformantes de <i>A. nidulans</i>	71
Figura 26- Análise da expressão do gene por “ <i>northern blotting</i> ”.....	72
Figura 27- Análise do padrão eletroforético do “ <i>differential display</i> ” usando RNA total extraído do micélio de <i>A. nidulans</i>	73
Figura 28- Análise por “ <i>northern blot</i> ” da expressão diferencial do micélio da linhagem <i>pabaA1</i> de <i>A. nidulans</i>	75
Figura 29- Mapa gênico de parte do cromossomo IV de <i>A. nidulans</i>	78
Figura 30- Via geral da biossíntese e de degradação da trealose.....	85
Figura 31- Esquema geral da via metabólica da trealose e do glicogênio.....	86

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Potenciais mecanismos moleculares de resistência a antifúngicos.....	11
Tabela 2 - Marcadores gênicos das linhagens utilizadas, sua localização e seus efeitos fenotípicos.	14
Tabela 3 - Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados no experimento de DDRT-PCR.	40
Tabela 4 - Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados no experimento para confirmar uma região na seqüência de nucleotídeos que continha um “stop códon”.....	41
Tabela 5 - Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do tioconazol para linhagens sensíveis e resistentes de <i>A. nidulans</i>	47
Tabela 6 - Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de acriflavina para linhagens sensíveis e resistentes de <i>A. nidulans</i>	47
Tabela 7 - Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de terbinafina para linhagens sensíveis e resistentes de <i>A. nidulans</i>	47
Tabela 8 - Análise dos resultados das seqüências do gene envolvido na resistência à acriflavina.....	60
Tabela 9 - Análise da seqüência de nucleotídeo referente ao fragmento clonado a partir do experimento de “differential display”....	74
Tabela 10 - Análise do resultado do blastx da seqüência de 1200 nucleotídeos do clone W27D11	76
Tabela 11 - Análise do fenótipo dos segregantes duplo resistentes (<i>acrA1 tebA7</i>) do cruzamento entre o segregante 1 e a linhagem 47 com relação a presença de terbinafina	77
Tabela 12 - Análise meiótica do cruzamento entre as linhagens segregante 1 x 47.....	78

RESUMO

A humanidade tem aumentado drasticamente o uso de antibióticos, antifúngicos, inseticidas, herbicidas e agentes quimioterápicos para tratar infecções, câncer e obter ganho econômico com a produção agrícola e industrial. O repetido uso destas substâncias leva freqüentemente à sua ineficiência devido à seleção de organismos resistentes ou tolerantes, com graves conseqüências econômicas e sociais. Os mecanismos envolvidos no processo de resistência à antifúngicos são pouco conhecidos. A compreensão destes mecanismos auxiliará no desenvolvimento de estratégias para a identificação de isolados clínicos resistentes, no tratamento de infecções fúngicas, na prevenção do surgimento de isolados resistentes, na definição de novas estratégias de utilização de antifúngicos, na revelação de novos alvos terapêuticos e portanto, no controle dos patógenos. Para o entendimento das bases moleculares da resistência à acriflavina e outros agentes inibidores em fungos nós clonamos, por transformação, um gene que confere esta resistência em *Aspergillus nidulans* e o caracterizamos molecularmente. Construimos uma biblioteca a partir de uma linhagem duplo-resistente e isolamos um clone que se mostrou capaz de transformar uma linhagem receptora sensível em resistente à acriflavina. A seqüência deste clone proveniente do mutante resistente, e de seu alelo selvagem revelou um gene de aproximadamente 2276 nucleotídeos traduzido em 697 aminoácidos, com alta similaridade com a trealose sintase/fosforilase (glicosiltransferase) de vários organismos. Esta seqüência foi depositada no "GenBank" (AY102266). As enzimas trealose sintase e fosforilase participam da síntese da trealose que, além de ser fonte de carbono, está relacionada com a proteção das proteínas de membrana e das enzimas, e contra o estresse térmico e oxidativo em fungos filamentosos. As seqüências nucleotídicas dos alelos selvagem e mutante não apresentaram diferenças nas regiões estruturais ou promotoras. No entanto, a seqüência do cDNA da linhagem selvagem apresenta um íntron extra quando comparada com o cDNA da linhagem mutante. Portanto, o mRNA do gene da linhagem mutante não estaria sendo adequadamente processado, provavelmente por uma alteração no mecanismo envolvido

neste processamento, inviabilizando a funcionalidade da trealose sintase / fosforilase produzida. O nocaute deste gene e a análise do fenótipo dos mutantes nulos na presença de acriflavina ou brometo de etídio confirmaram que ele não é essencial para o fungo. Através de genética clássica verificou-se que não há interação gênica ou sinergismo entre as mutações *acrA1*, que confere resistência à acriflavina e a outros inibidores, e *tebA1*, que confere resistência ao antimicótico terbinafina no fungo *A. nidulans*.

Mankind has drastically increased the use of antibiotics, antifungals, insecticides, herbicides and chemotherapeutic agents to treat infections and cancer and to obtain economic gains with agricultural and industrial production. The continuous use of these substances frequently leads to their inefficiency due to the selection of resistant or tolerant organisms, with serious economic and social consequences. The mechanisms involved in the process of antifungal resistance are little known. Understanding these mechanisms will help in the development of strategies for the identification of resistant clinical isolates, the treatment of fungal infections, the prevention of the occurrence of resistant isolates, the definition of new strategies for the use of antifungal agents, and the discovery of new therapeutic targets, and therefore the control of pathogens.

To better understand the molecular basis of resistance to acriflavine and other inhibitory agents among fungi we cloned by transformation a gene that confers this resistance to *Aspergillus nidulans* and characterized it molecularly. We constructed a library from a double-resistant strain and isolated a clone that proved to be able to transform a receptor strain sensitive into an acriflavine-resistant strain. The sequence of this clone obtained from the resistant mutant and of its wild allele revealed a gene of approximately 2276 nucleotides translated into 697 amino acids, with high similarity to the trehalose synthase/phosphorylase (glycosyltransferase) of various organisms. This sequence was deposited in GenBank (AY102266). The enzymes trehalose synthase and trehalose phosphorylase are related to the synthesis of trehalose, which in addition to being a carbon source is related to protection of the membrane proteins and of the enzymes against thermal and oxidative stress in filamentous fungi.

The nucleotide sequences of the wild and mutant alleles did not show differences in the structural or promoter regions. However, the cDNA sequence of the wild strain presents an extra intron compared to the cDNA of the mutant strain. Thus, the mRNA of the gene of the mutant strain may not be adequately processed, probably due to an alteration in the mechanism involved in this processing, leading to invariability of the functionality of the

trehalose synthase/phosphorylase produced. Knock out of this gene and analysis of the null mutant phenotypes in the presence of acriflavine or ethidium bromide confirmed that this gene is not essential for the fungus.

Using classical Genetics, no gene interaction or synergism was observed between the *acrA1* mutation, which confers resistance to acriflavine and to other inhibitors, and the *tebA1* mutation, which confers resistance to the antimycotic agent terbinafine in the fungus *A. nidulans*.