

### ***3- RESULTADOS***

---

### 3.1- Construção da biblioteca genômica do segregante 1

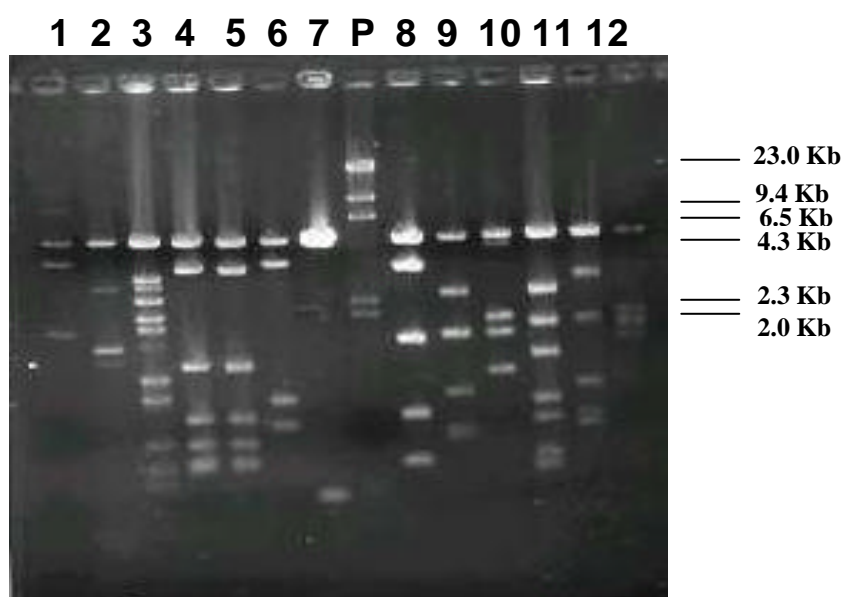
Os fragmentos de 5,0 -15Kb do DNA genômico da linhagem segregante 1 *acrA1 tebA7* (resistente a acriflavina) foram ligados no sítio *BamH* I do plasmídio pRG4 e utilizados para transformar a linhagem de XL1-*Blue E. coli*, via eletroporação. Aproximadamente 17.856 clones recombinantes que constitui a biblioteca genômica, cujo tamanho médio dos insertos clonados foi de 6,5 Kb (Figura 5) foram isolados e estocados a -80°C. Esta coleção de plasmídios, contendo insertos do DNA do fungo dentro da região *lacZ*, está sendo mantida como um banco de colônias em nosso laboratório. Assumindo-se que a massa molecular do genoma de *A. nidulans* é de 31 Mb e o tamanho médio dos insertos clonados corresponde a aproximadamente 6,5 kb, conclui-se que a biblioteca construída tem quatro equivalentes genômicos do DNA deste fungo. Pode-se inferir, segundo Clarke e Carbon (1976), que uma seqüência gênica específica tenha 98% de probabilidade de estar representada nesta biblioteca.

Extraímos os plasmídios das bactérias que compõem esta biblioteca em “pools” e estes foram utilizados em experimentos de transformação da linhagem receptora GR5 para identificar e isolar o clone de interesse. Antes de iniciarmos as transformações, realizamos os experimentos para identificar os CIMs de alguns inibidores de *A. nidulans* para os conídios e os protoplastos de linhagens resistentes e sensíveis e estabelecer a concentração adequada para ser utilizada na seleção dos transformantes.

### 3.2- Determinação das concentrações mínimas inibitórias (CIM) do tioconazol, da acriflavina e da terbinafina para a linhagem receptora

O CIM do tioconazol para os protoplastos das linhagens sensíveis e resistentes foram 8,0µg/ml e 10,0µg/ml, respectivamente, e para os conídios, 50,0µg/ml e 70,0µg/ml, respectivamente, quando cultivados em meio MMS sem “top-ágar” (Tabela 5). O CIM da acriflavina para os protoplastos das linhagens sensíveis e resistentes foram 10,0µg/ml e 70,0µg/ml, respectivamente e para os

conídios 50,0µg/ml e 80,0µg/ml, respectivamente, quando cultivados em meio MMS sem "top-ágar" (Tabela 6). O CIM da terbinafina para os protoplastos das linhagens sensíveis e resistentes foram 0,1µg/ml e >20,0µg/ml, respectivamente (Tabela 7).



**Figura 5:** Padrão de peso molecular dos fragmentos obtidos após a digestão com a enzima de restrição *Xba* I (enzima do "polylinker" do plasmídeo pRG4) de 12 diferentes clones da biblioteca genômica da linhagem *acrA1 tebA7* de *A. nidulans*. P- Padrão de peso molecular  $\lambda$  Hind III. Gel de agarose 0.8%.

**Tabela 5-** Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do tioconazol para linhagens sensíveis e resistentes de *A. nidulans*.

| CIM (µg/ml) do tioconazol                                 |          |              |
|---|----------|--------------|
| Linhagens- genótipos relevantes                           | Conídios | Protoplastos |
| GR5 ( <i>acrA</i> <sup>+</sup> <i>tebA</i> <sup>+</sup> ) | 50,0     | 8,0          |
| MSF ( <i>acrA1</i> <i>tebA</i> <sup>+</sup> )             | >70,0    | 10,0         |
| Segregante 1 ( <i>acrA1</i> <i>tebA7</i> )                | >70,0    | 10,0         |

**Tabela 6-** Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de acriflavina para linhagens sensíveis e resistentes de *A. nidulans*.

| CIM (µg/ml) da acriflavina                                |          |              |
|---|----------|--------------|
| Linhagens- genótipos relevantes                           | Conídios | Protoplastos |
| GR5 ( <i>acrA</i> <sup>+</sup> <i>tebA</i> <sup>+</sup> ) | 50,0     | 10,0         |
| MSF ( <i>acrA1</i> <i>tebA</i> <sup>+</sup> )             | 80,0     | >70,0        |
| Segregante 1 ( <i>acrA1</i> <i>tebA7</i> )                | 80,0     | >70,0        |

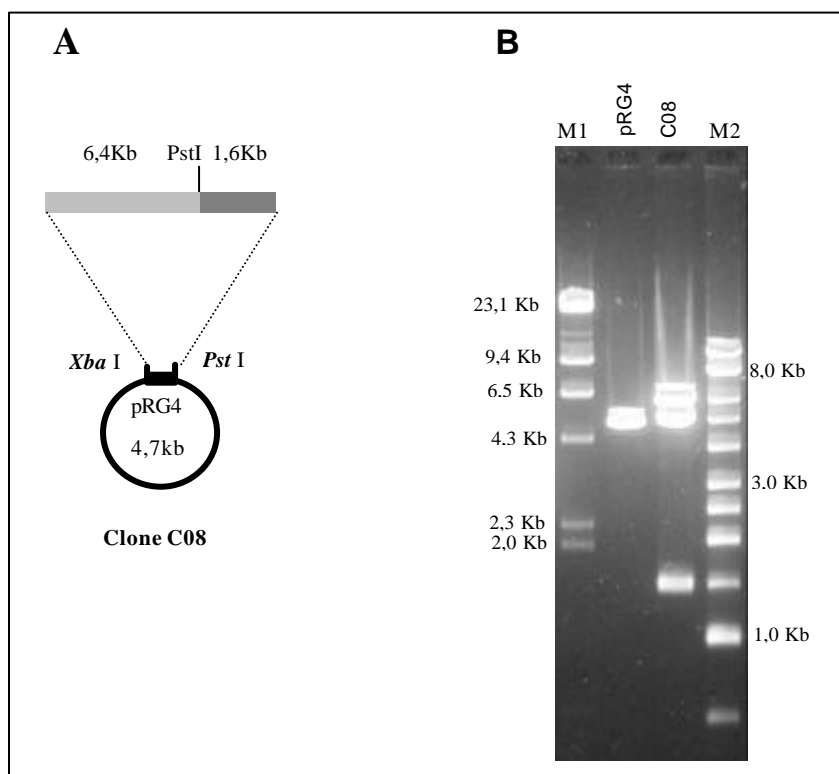
**Tabela 7-** Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de terbinafina para linhagens sensíveis e resistentes de *A. nidulans*.

| CIM (µg/ml) da terbinafina                                |          |              |
|---|----------|--------------|
| Linhagens- genótipos relevantes                           | Conídios | Protoplastos |
| GR5 ( <i>acrA</i> <sup>+</sup> <i>tebA</i> <sup>+</sup> ) | 0,1      | 0,1          |
| MSF ( <i>acrA1</i> <i>tebA</i> <sup>+</sup> )             | 0,1      | 0,1          |
| Segregante 1 ( <i>acrA1</i> <i>tebA7</i> )                | >20,0    | >20,0        |

### 3.3- Clonagem de um gene envolvido na resistência à acriflavina, ao tioconazol e ao brometo de etídio

#### 3.3.1- Clone C08

A estratégia utilizada para a clonagem de um gene que confere resistência à acriflavina e a outros inibidores se baseou em técnicas de transformação por complementação de função. Partimos de um “pool” de 960 clones de uma biblioteca genômica de *A. nidulans* resistente à acriflavina, ao brometo de etídio, ao tioconazol e também um marcador para resistência à terbinafina. Identificamos e selecionamos um clone, através da técnica de “*sib selection*”, que consiste no fracionamento seqüencial de uma amostra heterogênea de plasmídios (ou cosmídeos) (McCormick, 1987), que se mostrou capaz de transformar protoplastos da linhagem sensível e receptora (GR5) de *A. nidulans* em resistente quando cultivada em meio seletivo contendo 25,0µg/ml de acriflavina. Este clone foi denominado C08 devido a sua localização numa placa tipo Elisa, e o seu tamanho foi estimado em aproximadamente 12,7Kb. Dois fragmentos de 6,4Kb e 1,6Kb correspondentes ao inserto, e um fragmento de 4,7Kb correspondente ao vetor pRG4 do clone C08, foram visualizados em gel de agarose após tratamento com enzimas de restrição *Xba* I e *Pst* I (Figura 6). Outras digestões foram também realizadas para obtenção de vários fragmentos que foram subclonados em pUC18/*Sma*I. Paralelamente à subclonagem acima citada, utilizamos também a estratégia de “shotgun” para seqüenciamento do clone C08. Os subclones provenientes de ambas metodologias foram então seqüenciados. Concomitantemente ao processo de seqüenciamento, realizamos os experimentos de retransformação dos protoplastos da linhagem sensível e receptora de *A. nidulans* com os vários subclones obtidos. Com isto pudemos identificar que o fragmento de 1.6 Kb (Figura 6) foi capaz de transformar a linhagem sensível de *A. nidulans* em resistente

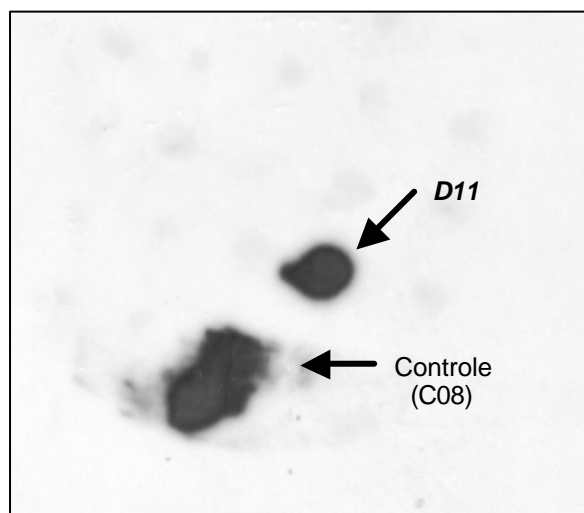


**Figura 6** A- Representação esquemática do clone C08. Este clone contém o vetor pRG4 de 4,7Kb e um inserto de 8,0Kb (representado pelos fragmentos de 6,4Kb e 1,6kb). B- Digestão do plasmídeo pRG4 com a enzima *Xba* I e do clone C08 com as enzimas *Xba* I e *Pst* I. Marcadores de tamanho molecular: M1:  $\lambda$  /*Hind* III e M2: 1,0Kb (Kilobase)

### 3.3.2- Rastreamento do alelo sensível à acriflavina na biblioteca genômica cromossomo-específica de *A. nidulans*

Com o objetivo de seqüenciar o alelo selvagem, o *acrA*<sup>+</sup> (sensível à acriflavina), de *A. nidulans*, rastreamos um clone positivo da biblioteca genômica cromossomo-específica de *A. nidulans*, construída nos cosmídeos pWE15 e pLORIST2 (Brody *et al.*, 1991). Utilizamos o fragmento de 1.6Kb, correspondente a uma parte do inserto do clone C08 (8.0Kb) acima mencionado, como sonda molecular. Após rastreamos 2880 clones desta biblioteca, obtivemos dois clones positivos que foram usados num rastreamento

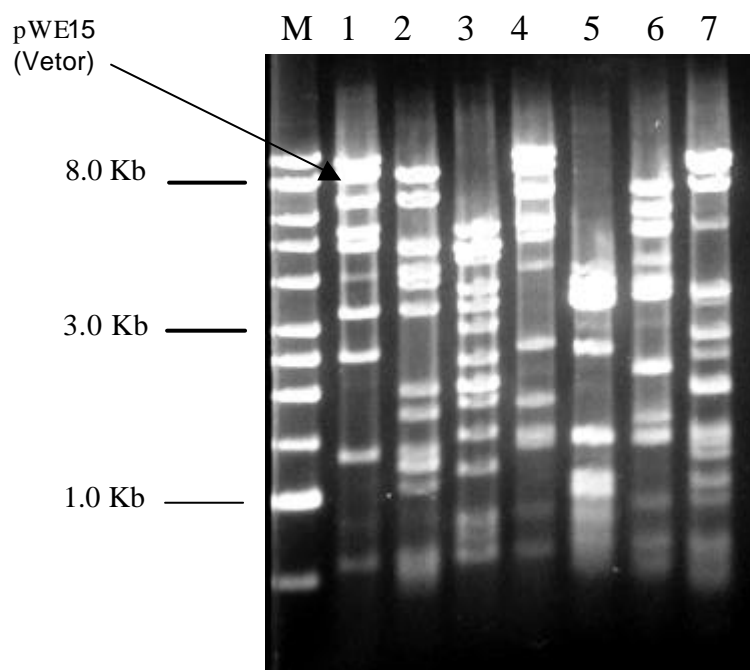
secundário. Um dos clones que apresentou um intenso sinal de hibridação, foi o W27D11 devido ao seu posicionamento na placa de nº 27 (Figura 7).



**Figura 7-** Rastreamento secundário do clone W27D11 da biblioteca cromossomo-específico de *A. nidulans* para confirmar a hibridação com a sonda 1.6 Kb do clone C08

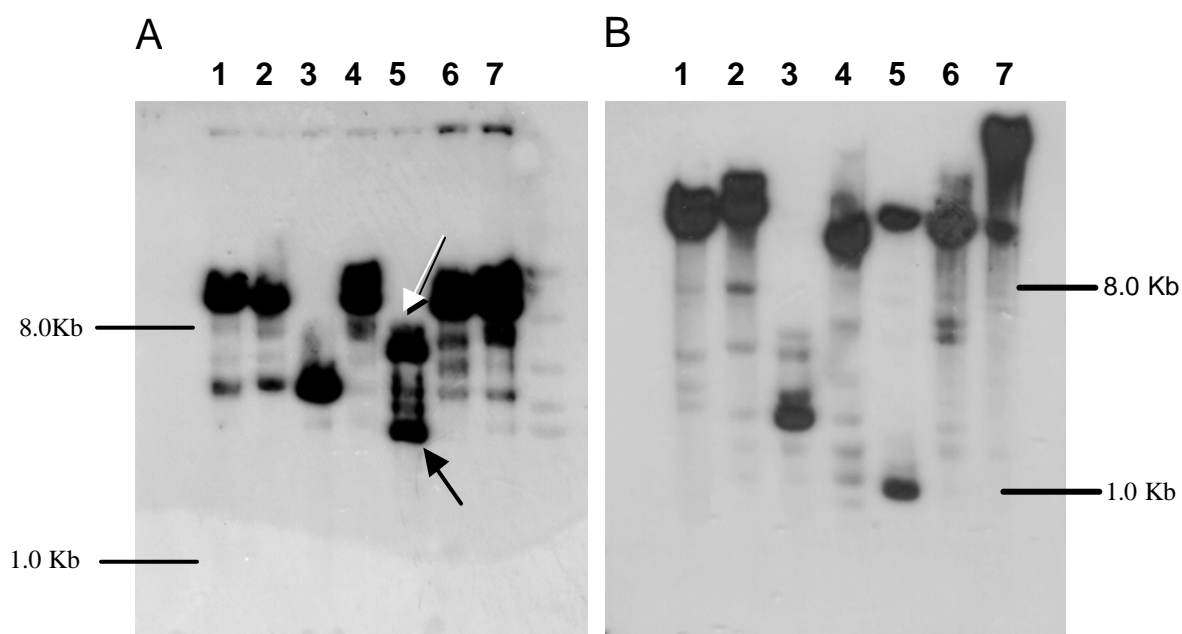
A análise do padrão de restrição do clone W27D11 digerido com a enzima *EcoR* I (enzima do “polylinker” do cosmídio pWE15) revelou que o seu inserto contém aproximadamente 32.0Kb. Concomitantemente, realizamos digestões deste mesmo clone com outras enzimas de restrição (Figura 8).

A Fig. 9A mostra o resultado da hibridação do gel da Fig. 8 com a sonda de 1.6Kb do clone C08 marcada radioativamente. A Fig. 9B mostra o resultado do “*southern blotting*” de fragmentos obtidos com outras enzimas de restrição com a mesma sonda. Obtivemos assim, de cada padrão alguns fragmentos que apresentaram um forte sinal de hibridação (Figura 9).



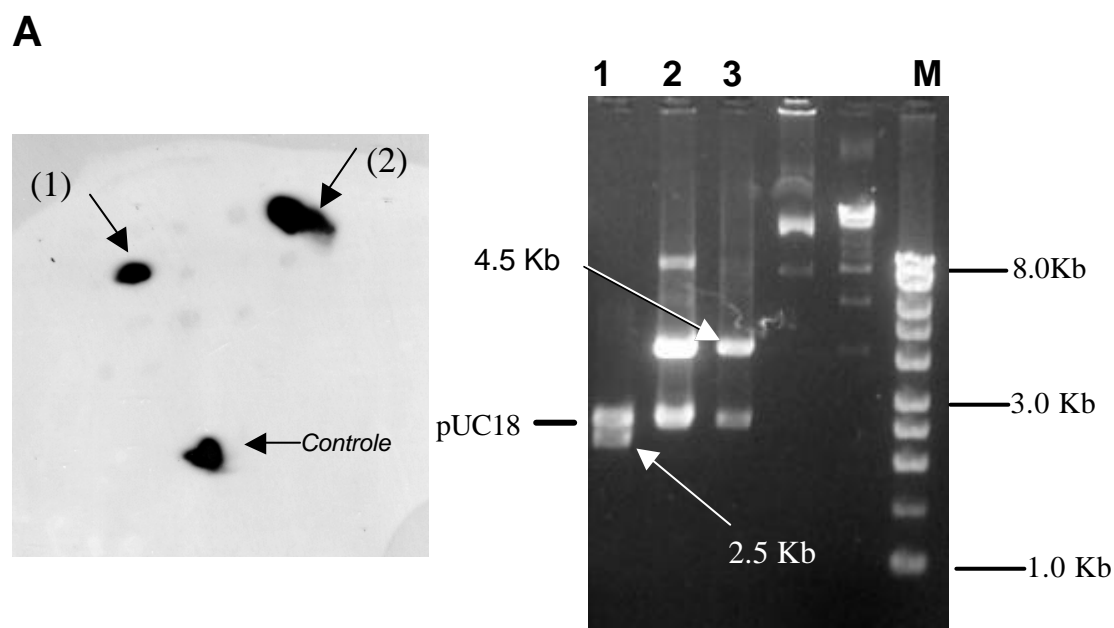
**Figura 8-** Eletroforese em gel de agarose, mostrando o padrão de digestão do clone W27D11: M- Padrão molecular 1.0Kb (Kilobase); 1- Digestão com com *EcoR* I (enzima de restrição presente no “polylinker” do vetor pWE15); 2- Digestão com *EcoR* I e *BamH* I; 3- Digestão com *EcoR* I e *Pst* I; 4- Digestão com *EcoR* I e *Kpn* I; 5- Digestão com *EcoR* I e *Hind* III; 6- Digestão com *EcoR* I e *Sma* I e 7- Digestão com *EcoR* I e *Xba* I. O vetor pWE15 possui 8.8Kb.





**Figura 9-** Análise por “southern blotting” para identificar as bandas marcadas radioativamente com a sonda de 1.6Kb das várias digestões realizadas com o clone W27D11. A- “Southern Blotting” do gel apresentado na figura 8. B- “southern blotting” de gel não mostrado. As enzimas de restrição utilizadas neste gel foram as seguintes: 1- *Not* I (enzima de restrição, também presente no “polylinker” do vetor pWE15); 2- *Not* I e *Bam*H I; 3- *Not* I e *Pst* I; 4- *Not* I e *Kpn* I; 5- *Not* I e *Hind* III; 6- *Not* I e *Sma* I e 7- *Not* I e *Xba* I. As bandas indicadas pelas setas foram subclonadas.

As bandas provenientes da digestão *EcoR* I e *Hind* III marcadas positivamente (Figura 9A), uma de aproximadamente de 4.5Kb e a outra 2.5Kb, foram subclonadas em pUC18/*Sma* I (Figura 10). Em seguida as extremidades destes insertos foram seqüenciadas e a banda de 4.5Kb apresentou uma alta similaridade com as proteínas “clock-controlled gene-9 protein” (ccg-9) de *N. crassa*, “trehalose phosphorylase” de *Pleurotus sajor-caju*, “trehalose syntase” de *Grifola frondosa* e “probable trehalose syntase” de *N. crassa*. Esta mesma similaridade foi apresentada pelo fragmento de 1.6Kb, parte do clone C08 (8.0Kb), o qual foi capaz de retransformar a linhagem sensível (GR5) em resistente à acriflavina de *A. nidulans*. Portanto, este resultado nos indicou que na banda de 4.5Kb do clone nº2 estava presente a seqüência de nucleotídeos do alelo selvagem (sensível à acriflavina).



**Figura 10-** A- Análise por “*southern blotting*” para confirmar que os clones 1 (fragmento de 2.5Kb) e 2 (fragmento de 4.5Kb) hibridaram positivamente com a sonda molecular de 1.6Kb do clone C08. B- Digestão para confirmar o tamanho das bandas subclonadas: 1- Clone 1 (inserto de 2.5Kb) digerido com duas enzimas do “polylinker” do pUC18; 2 e 3 Clone 2 (inserto de 4.5Kb) digerido com duas enzimas do “polylinker” do pUC18 e M- Marcador de peso molecular (1.0 Kb). O vetor de clonagem (pUC18) possui 2.6Kb

Em seguida realizamos a subclonagem de fragmentos de 0.5 a 2.0Kb, obtidos pela digestão parcial do inserto de 4.5Kb presente no clone 2, estes subclones foram então seqüenciados. Estas seqüências foram montadas no programa “*phredPhrap*”, revelando um único contig de aproximadamente 4.9Kb contendo a seqüência completa do gene (alelo selvagem) (Figuras 11B e 12).

A seqüência completa deste fragmento revelou também a presença de um outro gene identificado como um provável fator de ADP-ribosilação, que está mostrado nas Figs. 11A (Frame -2) e 12.

## A

1 GACAAGGTAG GAAAGGAAAG GGCATTGTTG TACATGAGGG CGGGCCGTGA CCGTGACAAT  
 61 ACACCTTCGT GACGGGCGAA GGACCGGAGG GCGGCGGCTT ATTTTTGGGG TTGTTGGACC  
 121 TTGACGTTGT TTGAAAGCCA TGCCTAGAGG GGGTTAGTCG GTAAGTGAAG CTGATCGAGG  
 181 ATAAGAAGAC TTACCAATCC CTCGAAGATA CCAGTCCCT CGGTAGCAAC GCTAGGCGCA  
 241 ACGTACCAGG TCTTATCCTT GAGGCTGTGC AATTTGAGCG CGCTAATGAC CTCGTCCGGA  
 301 CTCAAGTCTG TTATGTGTTA GCGTCGAACT GCTGGTCTGT ATCTGGCGGG TGACGTACGT  
 361 CCGGGAACAT CTTGCTTGTT TGCGAACACC AGTAGGAGTG CGTCTTTCAT TTCGCGGTTCG  
 421 TTGATGATCT TGTGAAGTTC TGAGCGGGCT TCGTCCATTC TAGCCGTGTC GCTGGAATCC  
 481 ACCACGAAGA TCAAACCCTG GGTGCCTGTA GTTGCATTGT TAGCGGATAT ACCCACGTGC  
 541 AATATGGCGA GCTATACCAG AGTAGTAGTG TCTCCAGAGA GGACGGATCT TGTCTGACC  
 601 ACCCACATCC CACACGTAA ATTTACATT CTTATAGGTG ACGCTTTCGA CGTTGAAGCC  
 661 GACTGTGGGA ATTGTGGTGA CATCCTGGTT GGTGAGTTT AGTTTGTACA AAATTGCTAT  
 721 GGAAGTCAGT AAACGCTCGC GAGAGTTTTA AGGGAACATG AATCGGCAAC GTECTCGTCT  
 781 TTCCAGCAGC ATCCAAACCC AGCATGAGAA TCCGCATCTC CTTTGTTCGA AAAATTTTGC  
 841 CCATGATCTT CGACACTGAG CCGCCCATCT TGACGGATAC TGCGCGACTG CGGGGGAGAT  
 901 CGTAGACCGG TGATTAGGGG TTGAGAGTGT AGATTGCGAC TCGGTGTTTG TATCGACAGC  
 961 AACGAGGAAA GCAACGAGCG TAGTCTAGGT AAGGGAGAAG AGGGACCGTG AAATCAATTC  
 1021 GAAGCAAGGG GCCTGTTT TAG TCGAGTTCAA ATCAGCGAAC GTGGTCTTTCG TCATTTTCATG  
 1081 CGCAGGGTGC AGGGGACGAC GGGGCCATGG GCTATGGAGC AGTGGGATTA AACTCACTAC  
 1141 TTGCTTCCAG AGAGCAACAC AGAATAAAGT GAGGATAGCG CAATCGCAAA GCCAGACGAC  
 1201 GCAGCAGAAG AAATATTAGT AGATTTTCGC ACAAAGATGT TAAGTGAAGC CGAAAGACAC

← Frame = - 2

## B

→ Frame = + 1

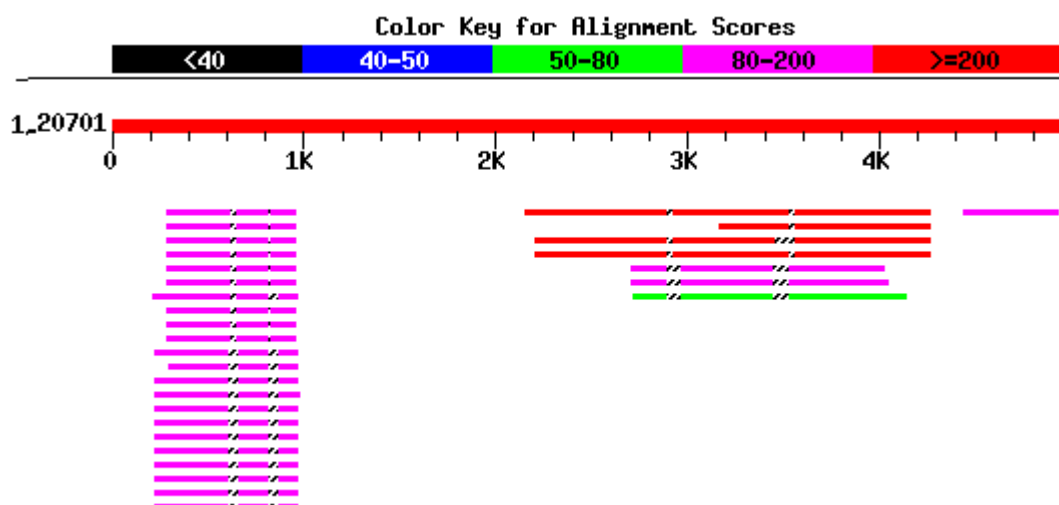
1261 TGAATAAATT CGGGGTTGAG CTAGATCCAC ACTCCTTGTC CTGGCGAGCG TCTCGAGGCC  
 1321 AACTCCGTAA AAGGGGCTGG CGATGCTGAC TCAGCGCGCC CACGAGCCGC CAAGAGTTGG  
 1381 TCTGTTTCAT CTCCGCATGC AACACATGCT TCAGCTTTC GCCCAATTTTTC TTCATTGTTT  
 1441 TTATTGACAA CTAAGACTTT TTGTTAGCTG CATATATTGA TTGTGTGAAC GTGCTTCCAT  
 1501 TTGCTACAGT AGCAGCCATT GGAATCCATG ATGGTTTGGTA TGCATCGGTA GCCTTCTGTG  
 1561 CTTTTCCAGC TTGTGCAGAT TGGACCCGTG CTTAGACCTG TGCTAGGCTT ATTTTGCAGC  
 1621 AGTGTATCT TGATCTTCAT TCCATGGGGT ACTCCAGATG TGAATGTACT CCTAATGCGC  
 1681 AGTCTACTG CGTACCCTGT GCTTGTATCC GTTCGTATGC AACCAAGTAG CCAATGCAAC  
 1741 TGCTGCTTAC TCAGTCCCTAC GTCATGTCAT GGCAATCGAT GAGGTGAGAC CATGCTTCCG  
 1801 CGGCTCCGAG GTGTGTACCT TGCTATATCT TTGCACACAC TCTTCCCATC TCAATCATCT  
 1861 TCCAAAACCT GATAGAATAT AGACAACCTG TTCGACATG TCGGCGGCGG TTCTCCATCT  
 1921 CCCCCTAGAG CCTCGCTTCA ACAGAAGCGC CGTCTGTGCGA CGGAGCATT CCCCATTCC  
 1981 TGGGGCGCAG CAACGACGGG Agtacgcata tgcccattat cccatggtga tgaaagtctt  
 2041 aactcgtgta gAACTTGTAT GCGGTTTAT CAACGGTGT CGAGAAGGAT AAAGTCATTT  
 2101 TCGCTGTCGC CATCCGTGAT GCAACTTACC TGGTGGACTT TGCGAAGAT GAACTGCCCT  
 2161 TCAGCGAGAG CGATGACTTG GATTTAAAGA TTGGGGACCA CATGATGAGA CACTTATATA  
 2221 AGTGGTGC GA TACACATCTT GAAAAGATGA TAGGATTGGC TATTCCGAAA CAACTGGCGC  
 2281 ACACATGTCC CACGATCTGC TCCCGCCTAT GGTTAGAGCT CGATATCATC CCCTTGGTGC  
 2341 TGTCAGACAA CAGCAAGCTC GATTTCCGCG GTGAGGATCT GCAATATGGC TTTTCAGCAGT  
 2401 CCGCAGACTG GGAACCTCAGG ACTCTGGACG AACAAGCAGA GTCCATGGCT AGGAAATGCG  
 2461 TTCGGTTTTGT CCGACCTACC AAATGTGATC ATTAATAACT GACCAAGTAT AGATTATTCG  
 2521 GCCCAGAGGG AACTCCTTTG CTACAAGTCG GGCTTTCCGG CCTCGTCCAG GTTGACACGG  
 2581 CTTTTTCATGT GCAGTTGACC AACAAAGATA ACTACAAAAA TTCTGTGACT GCCAATACGT  
 2641 GGAAAGCCAT CGAACACTAT GCCGACGACC TCAGGAACCG AAAGGTTAAG TTGGCTTTCT  
 2701 TCAGCGCCAC TCCGCAAGGG GGAGGGGTTG CCCTTATGAG ACACGCTATG GTGAGGTTTG

```

2761 CCCATTCTAT AGGGACTGAC ATGAAATGgt aagtttcctg agatgcccgt gcattttctgC
2821 TCTGACCGGT CTAGGTATGT ACCGAAACCA CGACCAGGCG TCTTTCGTAT CACCAAGACG
2881 AATCACAACA TCCTTCAAGG TGTCTCTGCG CCCGAGGAGC GTCTTACCGA CGAAAACCTGG
2941 GAGCAAGTTA CCAACTGGAT ACAAGAGAAT GCGGACAGAT ATTGGTTGCG GCCTGGAGGT
3001 CCGCTCGAGC ATCCATCGAA AGGTGGCGCA GACGTCATTG TCATCGACGA CCCGCAAATG
3061 CCTGCGTTGA TTCCTTTGGC GAAACAGAAA GCTCCAGAGA GGCCGGTTGT CTTCCGTAGC
3121 CATATACAGA TCCGAAGTGA CCTGGTCGAC CAGGATGGAA GTCCACAAGC AGAGTGCTGG
3181 GGCACCATGT GGAAGGACAT TCAGAAGGCC GACATTTTCG TTAGCCATCC TGTTAAATCT
3241 TTCGTACCAA AGATCGTTCC CCGTGAAAAG GTGGGCTACA TGCCGGCGTC GACAGACTGG
3301 CTGGACGGAC TGAACAAGAA CATGAGAAAC GAAGATATCG CCTATTACGG ACGAATCTTC
3361 AACTCCTGGG TGCGAAATTC AGGAATGCCG GTCATTGACT ATCCTGCAGg tgagttcacg
3421 caggtatctt tgagaaaact acactaacga gagaagacgA GTATATTGTC CAGATTGCAC
3481 GCTTCGACCC ATCCAAAGGC ATCCCGCACG TAATCGAGTC CTACGAGAAA TTCCACCAGC
3541 GTATGCAGGA CTATTGCCCG GATAAGCCTA TACCCAAGCT CTTGATCTGT GGCCACGGCT
3601 CCGTCGATGA CCCGGATGGC TCGATCATT ACGACCTGGC CGTCAGATAT ATTGAGACT
3661 CTATTCCTCGA CCTCGCCGAC CAGATCTGTG TCGTCCGCCT TGGCCCATCT GACCAAGTCC
3721 TCAACGCACT CATGTCCAAA GCCAAAGTGG CTCTCCAGCT TTCTACCCGC GAGGGGTTCCG
3781 AAGTCAAGGT TTCCGAAGCT ATTCATAAGG GTCGGCCGGT TATTGCCACC AGAGCCGGCG
3841 GTATCCCGTT GCAGGTAATC GACAAAGGTA ACGGGTTCTT GGTAGATGTC GGCGATACGG
3901 ATGCTGTGGC CAAGCATTTA TTCGACCTGT GTACCGACGA CGTGCTGTGG AAGAAGATGC
3961 ATGAGTTCGC GCTGGCCCAT GTGTGTGACG AGGTGAGCAC GGTGGGTAAC TCGCTGAACT
4021 GGTGTGTATCT TGCTTCGAAG CTCTCCAAGG GGGGAGTAAT CAAGCCGAAC GAGCGTTGGC
4081 TCAATGATAT GGCGCGCGAA GATGCAGGTA TCCCCTACCA GGAGGGTGAG GACCGGCTAA
4141 AGCGGGAGCT TGAAGTGCAG AAGATGGGT AGCATTATT CTCTCAGAGA AGCCTTTTGT
4201 ACATATTAGC GCCTGAGATA CATCTCAACT ATTTTTGAGC GATAGGCCAG CTATCCGCGA
4261 ACAAAGGGGG TATAATATCC AAAACCAATA ACCCAAACCT CACCCAACCG AGGCCGACTC
4321 CAAGTACAGT ACCTATCGGA TACTTCGATA TCTCTCCCGA CTCAATCCCC CCTCCAGCCC
4381 CTCAACCCCG TACGCAATTG GCGTATCTCC CACAATCCGC GCCGGCTGCC CACCAACCAC
4441 ACAATGACTC GGCACCACCA TGCCCCCGG CACAACGCAC CCGTCTAGTA CCTGACACCT
4501 TTCCTTCAGA ATCGCCATCG ACCCAATCAC GCAATCCTTC CCAATCGTCA CATTATCTTC
4561 CACCTTCGCG GCCTCGACGA TACTCCGCTC CCCTACAAAA ACATGAGACC CGATATGCAG
4621 CGTTGTGTAC GTGTGGACAC CACGCGAGA

```

**Figura 11-** Seqüência de nucleotídeos do contig (1) do clone W27D11 da linhagem selvagem de *A. nidulans* contendo 4621 pares de bases, e que possui dois genes: A Fator de ADP-ribosilação que contém 1200 pares de bases. B- Alelo selvagem do gene envolvido na resistência à acriflavina que contém aproximadamente 2276 pares de bases. Os ATGs representam os prováveis códons de iniciação; o TGA e TAA representam os prováveis códons de finalização (“stop códon”) (em vermelhos) e o TATA representa a região promotora do gene (em azul). As seqüências dos íntrons estão representadas em letras sublinhadas, marrom e minúsculas. A provável seqüência 3’UTR terminal está representada em verde.



**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. O Fator de ADP-ribosilação que contém 1200 pares de bases está representado entre 0-1K em rosa. O alelo selvagem do gene envolvido na resistência à acriflavina que contém 2276 pares de bases está representado 2K- 4K em vermelho, rosa e verde, e por último uma terceira similaridade com parte da proteína “dynactina” representado pelo rosa à direita do esquema.

### 3.4- Análise da seqüência nucleotídica

A montagem da seqüência do clone W27D11 do alelo selvagem bem como a do clone C08 do alelo resistente à droga em estudo revelaram a presença de um gene de 2276 nucleotídeos, interrompido por quatro íntrons. O primeiro com 50 nucleotídeos, o segundo com 48 nucleotídeos, o terceiro com 31 nucleotídeos e o quarto com 50 nucleotídeos (Figura 15). Este gene possui uma seqüência terminal rica em timinas denominada de 3' UTR de 71 nucleotídeos. A região que flanqueia a região 5' próxima do códon de iniciação apresenta algumas características de regiões promotoras. Uma adenina está presente na posição -3 e uma região TATA está na posição -22, em relação ao códon de iniciação putativo ATG (Chen e Struhl., 1988) (Figuras 13). Esta seqüência foi depositada no “GenBank”, sob o número de acesso AY102266.

1-ATGCTCGGCGGCGGTTCTCCATCTCCCCGTAGAGCCTCGCTTCAACAGAAGCGCCGTCTG-60  
M L G G G S P S P R R A S L Q Q K R R L

61-TCGACGGAGCATTCTCCCAATTCCTGGGGCGCAGCAACGACGGGAgtacgcatatgcca-120  
S T E H S P N S W G A A T T G

121-ttatcccatggtgatgaaagtcctaactcgtgtagAACTTGTATGGCGGTTTATCAACGG-180  
N L Y G G L S T V

181-TGTTTCGAGAAGGATAAAGTCATTTTCGCTGTTCGCCATCCGTGATGCAACTTACCTGGTGG-240  
F E K D K V I F A V A I R D A T Y L V D

241-ACTTTTCGCAAGAGGAACCTGCCCTTCAGCGAGAGCGATGACTTGGATTTAAAGATTGGGG-300  
F A Q E E L P F S E S D D L D L K I G D

301-ACCACATGATGAGACACTTATATAAGTGGTGCAGACACATCTTGAAAAGATGATAGGAT-360  
H M M R H L Y K W C D T H L E K M I G L

361-TGGCTATTCCGAAACAACCTGGCGCACACATGTCCCACGATCTGCTCCCGCCTATGGTTAG-420  
A I P K Q L A H T C P T I C S R L W L E

421-AGCTCGATATCCCTTGGTGCTGTAGCAACAGCAAGCTCGATTTCCGCGGTGAGG-480  
L D I I P L V L S D N S K L D F R G E D

481-ATCTGCAATATGGCTTTCAGCAGTCCGCGACTGGGAACCTCAGGACTCTGGACGAACAAG-540  
L Q Y G F Q Q S A D W E L R T L D E Q A

541-CAGAGTCCATGGCTAGGAAATGCGTTTCGGTTTGTCCGACCTACCAAATGTGATCATTAAA-600  
E S M A R K C V R F V R P T K C D H \* I

601-TACTGACCAAGTATAGATTATTCGGCCAGAGGGAACCTCTTTGCTACAAGTCGGGCTTT-660  
L T K Y R L F G P E G T P L L Q V G L S

661-CCGGCCTCGTCCAGGTTGACACGGCTTTTCATGTGCAGTTGACCAACAAAGATAACTACA-720  
G L V Q V D T A F H V Q L T N K D N Y K

721-AAAATTCTGTGACTGCCAATACGTGGAAAGCCATCGAACACTATGCCGACGACCTCAGGA-780  
N S V T A N T W K A I E H Y A D D L R N

781-ACCGAAAGGTTAAGTTGGCTTTCTTCAGCGCCACTCCGCAAGGGGGAGGGGTTGCCCTTA-840  
R K V K L A F F S A T P Q G G G V A L M

841-TGAGACACGCTATGGTGAGGTTTGCCCAATCTATAGGGACTGACATGAAATGgtaagttt-900  
R H A M V R F A H S S I G T D M K C

901-cctgagatgccgctgcatttctgCTGACCGGTCTAGGTATGTACCGAAACCACGACCA-960  
S D R S R Y V P K P R P

961-GGCGTCTTTTCGTATACCAAGACGAATCACAACATCCTTCAAGGTGTCTCTGCGCCCGAG-1020  
G V F R I T K T N H N I L Q G V S A P E

1021-GAGCGTCTTACCGACGAAAACCTGGGAGCAAGTTACCAACTGGATAACAAGAGAATGCGGAC-1080  
E R L T D E N W E Q V T N W I Q E N A D

1081-AGATATTGGTTGCGGCCTGGAGGTCGCTCGAGCATCCATCGAAAGGTGGCGCAGACGTC-1140  
R Y W L R P G G P L E H P S K G G A D V

1141-ATTGTCATCGACGCCGCAAATGCCTGCGTTGATTCCTTTGGCGAAACAGAAAGCTCCA-1200  
I V I D D P Q M P A L I P L A K Q K A P

1201-GAGAGGCCGGTTGTCTTCCGTAGCCATATACAGATCCGAAGTGACCTGGTTCGACCAGGAT-1260  
E R P V V F R S H I Q I R S D L V D Q D

1261-GGAAGTCCACAAGCAGAGTGCTGGGGACCATGTGGAAGGACATTGAGAAGGCCGACATT-1320  
G S P Q A E C W G T M W K D I Q K A D I

1321-TTCGTTAGCCATCCTGTTAAATCTTTCGTACCAAAGATCGTTCCCGGTGAAAAGGTGGGC-1380  
F V S H P V K S F V P K I V P R E K V G

1381-TACATGCCGGCGTCGACAGACTGGCTGGACGGACTGAACAAGAACATGAGAAACGAAGAT-1440  
Y M P A S T D W L D G L N K N M R N E D

1441-ATCGCCTATTACGGACGAATCTTCAACTCCTGGGTGCGAAATTCAGGAATGCCGGTCATT-1500  
I A Y Y G R I F N S W V R N S G M P V I

1501-GACTATCCTGCAGgtgagttcacgcaggtatctttgagaaaactacactaacgagagaag-1560  
D Y P A E

1561-acgAGTATATTGTCCAGATTGCACGCTTCGACCCATCCAAAGGCATCCCGCACGTAATCG-1620  
Y I V Q I A R F D P S K G I P H V I E

1621-AGTCCTACGAGAAATCCACCAGCGTATGCAGGACTATTGCCCGGATAAGCCTATACCCA-1680  
S Y E K F H Q R M Q D Y C P D K P I P K

1681-AGCTCTTGATCTGTGGCCACGGCTCCGTCGATGACCCGGATGGCTCGATCATTTACGACC-1740  
L L I C G H G S V D D P D G S I I Y D L

```

1741-TGGCCGTCAGATATATTGAGGACTCTATTCCCGACCTCGCCGACCAGATCTGTGTCTGTCC-1800
      A V R Y I E D S I P D L A D Q I C V V R
1801-GCCTTGGCCCATCTGACCAAGTCCTCAACGCACTCATGTCCAAAGCCAAAGTGGCTCTCC-1860
      L G P S D Q V L N A L M S K A K V A L Q
1861-AGCTTTCTACCCGCGAGGGGTTCTGAAGTCAAGGTTTCCGAAGCTATTTCATAAGGGTCTGGC-1920
      L S T R E G F E V K V S E A I H K G R P
1921-CGGTTATTGCCACCAGAGCCGGCGGTATCCCGTTGCAGGTAATCGACAAAGGTAACGGGT-1980
      V I A T R A G G I P L Q V I D K G N G F
1981-TCTTGGTAGATGTCTGGCGATACGGATGCTGTGGCCAAGCATTTATTCGACCTGTGTACCG-2040
      L V D V G D T D A V A K H L F D L C T D
2041-ACGACGTGCTGTGGAAGAAGATGCATGAGTTCGCGCTGGCCCATGTGTGTGACGAGGTGA-2100
      D V L W K K M H E F A L A H V C D E V S
2101-GCACGGTGGGTAACCTCGCTGAACTGGTGTATCTTGCTTCCGAAGCTCTCCAAGGGGGGAG-2160
      T V G N S L N W L Y L A S K L S K G G V
2161-TAATCAAGCCGAACGAGCGTTGGCTCAATGATATGGCGCGCGAAGATGCAGGTATCCCCT-2220
      I K P N E R W L N D M A R E D A G I P Y
2221-ACCAGGAGGGTGTAGGACCGGCTAAAGCGGGAGCTTGAAGTGCAGAAGATGGGTTAG -2280
      Q E G E D R L K R E L E V Q K M G *

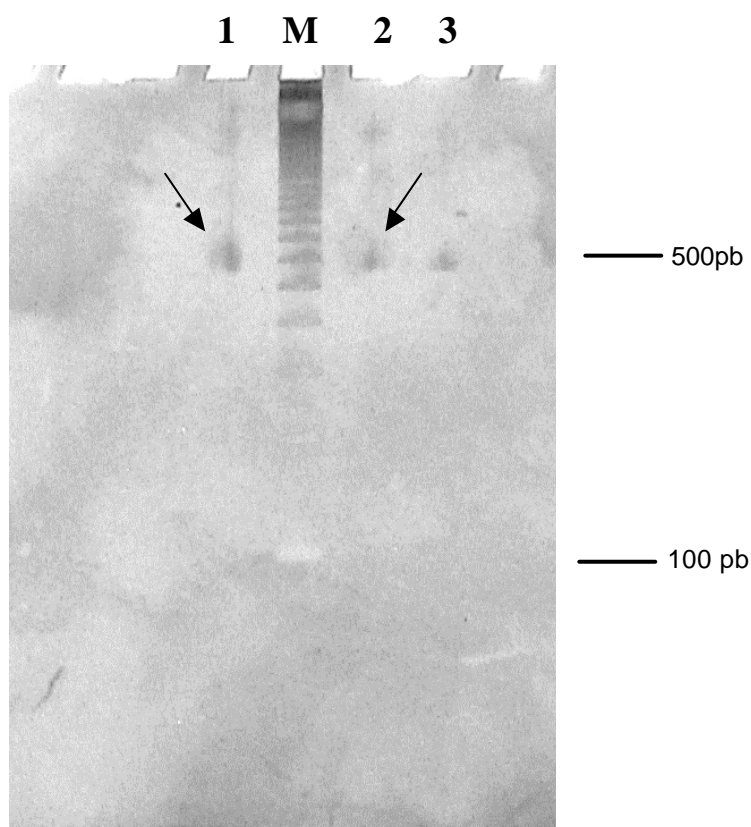
```

**Figura 13-** Seqüência de nucleotídeos do alelo selvagem do gene envolvido na resistência à acriflavina de *A. nidulans*, deduzida em seqüência de aminoácidos. As prováveis regiões dos íntrons estão representadas com letras minúsculas e sublinhadas. O TATA box em azul, o ATG e o TAG em vermelho. O “stop codon” na seqüência gênica está representado em amarelo.

### 3.5- Análise da presença de um “stop codon” na seqüência de nucleotídeos do gene envolvido na resistência à acriflavina

Como pode ser visto na figura 13 a seqüência do alelo selvagem do gene envolvido na resistência à acriflavina apresentou um “stop codon” na posição 597 da seqüência nucleotídica. Este “stop codon” também existe no mutante resistente.

Todavia, como não havia nesta região uma seqüência consenso de “splicing” em fungos relatada na literatura científica, decidimos amplificar por PCR o cDNA para confirmar a presença de um possível intron na região que continha o “stop códon”. O cDNA foi obtido através do RNA total das linhagens sensível e resistente à acriflavina. A figura 14 mostra que o produto de PCR do fragmento de cDNA e do fragmento de DNA genômico apresentaram aparentemente a mesma massa molecular. Em seguida, estes fragmentos foram clonados e seqüenciados. A seqüência do cDNA da linhagem resistente apresentou o “stop codon”, entretanto na linhagem sensível detectamos uma possível região de íntron contendo 48 pares de bases (Figura 15).



**Figura 14-** Análise do cDNA de *A. nidulans*. 1- Fragmento obtido a partir do DNA genômico de *A. nidulans* da linhagem resistente. 2- cDNA obtido da linhagem resistente exposta à acriflavina. 3- cDNA obtido da linhagem sensível M- marcador de peso molecular 100 pb.

```

541 CGGCTCCGAG GTGTGTACCT TGCTATAATCT TTGCACACAC TCTTCCCATC TCAATCATCT
601 TCCAAAACCT GATAGAAATAT AGACAACCTG TTCGACATG CCGGCGGCGG TTCTCCATCT
661 CCCCCTAGAG CCTCGCTTCA ACAGAAGCGC CGTCTGTCTGA CGGAGCATTTC TCCCAATTCC
721 TGGGGCGCAG CAACGACGGG AGTACGCATA TGCCCATTTAT CCCATGTTGA TGAAAGTCCT
781 AACTCGTGTA GAACTTGTAT GGCGGTTTAT CAACGGTGTT CGAGAAGGAT AAAGTCATTT
841 TCGCTGTCTGC CATCCGTGAT GCAACTTACC TGGTGGACTT TGCGCAAGAG GAACTGCCCT
901 TCAGCGAGAG CGATGACTTG GATTTAAAGA TTGGGGACCA CATGATGAGA CACTTATATA
961 AGTGGTGCGA TACACATCTT GAAAAGATGA TAGGATTGGC TATTCCGAAA CAACTGGCGC
1021 ACACATGTCC CACGATCTGC TCCCGCCTAT GGTTAGAGCT CGATATCATC CCCTTGGTGC
1081 TGTCAGACAA CAGCAAGCTC GATTTCCGCG GTGAGGATCT GCAATATGGC TTTCAGCAGT
1141 CCGCAGACTG GGAACCTCAG ACTCTGGACG AACAAGCAGA GTCCATGGCT AGGAAATGCG
1201 TTCGGTTTGT CCGACCTACC AAATGTGATC ATTAATACT GACCAAGTAT AGATTATTCTG
1261 GCCCAGAGGG AACTCCTTTG CTACAAGTCG GGCTTTCCGG CCTCTCCAG GTTGACACGG
1321 CTTTTTCATGT GCAGTTGACC AACAAAGATA ACTACAAAAA TTCTGTGACT GCCAATACGT
1381 GGAAAGCCAT CGAACACTAT GCCGACGACC TCAGGAACCG AAAGGTTAAG TTGGCTTTCT
1441 TCAGCGCCAC TCCGCAAGGG GGAGGGGTTG CCCTTATGAG ACACGCTATG GTGAGGTTTG
1501 CCCATTCTAT AGGGACTGAC ATGAAATGGT AAGTTTCCTG AGATGCCGCT GCATTTCTGC
1561 TCTGACCGGT CTAGGTATGT ACCGAAACCA CGACCAGGCG TCTTTCGTAT CACCAAGACG
1621 AATCACAACA TCCTTCAAGG TGTCTCTGCG CCCGAGGAGC GTCTTACCGA CGAAAACCTGG
1681 GAGCAAGTTA CCAACTGGAT ACAAGAGAAT GCGGACAGAT ATTGTTGCG GCCTGGAGGT
1741 CCGCTCGAGC ATCCATCGAA AGGTGGCGCA GACGTCATTG TCATCGACGA CCCGCAAATG
1801 CCTGCGTTGA TTCCTTTGGC GAAACAGAAA GCTCCAGAGA GGCCGGTTGT CTTCCTAGC

```



```

1861 CATATACAGA TCCGAAGTGA CCTGGTCGAC CAGGATGGAA GTCCACAAGC AGAGTGCTGG
1921 GGCACCATGT GGAAGGACAT TCAGAAGGCC GACATTTTCG TTAGCCATCC TGTAAATCT
1981 TTCGTACCAA AGATCGTTCC CCGTGAAAAG GTGGGCTACA TGCCGGCGTC GACAGACTGG
2041 CTGGACGGAC TGAACAAGAA CATGAGAAAC GAAGATATCG CCTATTACGG ACGAATCTTC
2101 AACTCCTGGG TGCGAAATTC AGGAATGCCG GTCATTGACT ATCCTGCAGG TGAGTTCACG
2161 CAGGTATCTT TGAGAAAAC ACACTAACGA GAGAAGACGA GTATATTGTC CAGATTGCAC
2221 GCTTCGACCC ATCCAAAGGC ATCCCGCACG TAATCGAGTC CTACGAGAAA TTCCACCAGC
2281 GTATGCAGGA CTATTGCCCG GATAAGCCTA TACCCAAGCT CTTGATCTGT GGCCACGGCT
2341 CCGTCGATGA CCCGGATGGC TCGATCATT ACGACCTGGC CGTCAGATAT ATTGAGGACT
2401 CTATTCCTCGA CCTCGCCGAC CAGATCTGTG TCGTCCGCCT TGGCCCATCT GACCAAGTCC
2461 TCAACGCACT CATGTCCAAA GCCAAAGTGG CTCTCCAGCT TTCTACCCGC GAGGGGTTTCG
2521 AAGTCAAGGT TTCCGAAGCT ATTCATAAGG GTCGGCCGGT TATTGCCACC AGAGCCGGCG
2581 GTATCCCCTT GCAGGTAATC GACAAAGGTA ACGGGTTCTT GGTAGATGTC GGCGATACGG
2641 ATGCTGTGGC CAAGCATTTA TTCGACCTGT GTACCGACGA CGTGCTGTGG AAGAAGATGC
2701 ATGAGTTCGC GCTGGCCCAT GTGTGTGACG AGGTGAGCAC GGTGGGTAAC TCGCTGAAC
2761 GGTTGTATCT TGCTTCGAAG CTCTCCAAGG GGGGAGTAAT CAAGCCGAAC GAGCGTTGGC
2821 TCAATGATAT GGCGCGCGAA GATGCAGGTA TCCCCTACCA GGAGGGTGAG GACCGGCTAA
2881 AGCGGGAGCT TGAAGTGCAG AAGATGGGT AGCATTTATT CTCTCAGAGA AGCCTTTTGT
2941 ACATATTAGC GCCTGAGATA CATCTCAACT ATTTTTGAGC GATAGGCCAG CTATCCGCGA

```

**Figura 15-** Seqüência de nucleotídeos da linhagem sensível à acriflavina de *A. nidulans*.

Em amarelo está a região do intron e em itálico sublinhado representa o “stop codon” (TAA).

### 3.6- Análise da proteína envolvida na resistência à acriflavina

A seqüência nucleotídica do gene envolvido na resistência à acriflavina foi analisada pelo programa “pblast” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e revelou uma proteína com alta similaridade à trealose sintase/fosforilase de vários organismos e um motivo de glicosiltransferase (Tabela 8). Por esta razão este gene passou a ser denominado de *tsaA* e sua proteína correspondente TsaA.

**Tabela 8-** Análise dos resultados das seqüências do gene envolvido na resistência à acriflavina:

|  |                     |  |         |
|--|---------------------|--|---------|
| A- Seqüência gênica presente no Clone C08 (mutante) e no clone W27D11(selvagem): |                     |  |         |
| Proteínas:   |                     |  | e-value |
| <a href="#">gi 3746895 gb AAC64285.1 </a> (AF088906) clock-controlled gene-...   | <a href="#">268</a> |  | 0.0     |
| <a href="#">gi 7521770 pir  T00130</a> trehalose synthase (EC 2.4.1.-) - Gr...   | <a href="#">258</a> |  | e-150   |
| <a href="#">gi 6651233 gb AAF22230.1 AF149777_1</a> (AF149777) trehalose ph...   | <a href="#">262</a> |  | e-150   |
| <a href="#">gi 11359598 pir  T47213</a> probable trehalose synthase (EC 2.4...   | <a href="#">262</a> |  | e-106   |

O alinhamento da seqüência protéica completa codificada pelo alelo que confere sensibilidade à acriflavina e as proteínas identificadas pelo “blast” (Tabela 8) revelou a existência de algumas regiões conservadas, envolvendo os seguintes aminoácidos: serina (S), histidina (H), treonina (T), tirosina (Y) e outros (Figura 16).

|            | 10   | 20                                       | 30                          | 40         | 50                   | 60                          |
|------------|--|--|-----------------------------|------------|----------------------|-----------------------------|
| TreP-Ps    | -MSTPHHQFESK   | SSTAIRRRLSSSVSSKQRPNIMTTTFASLTPMWAGVAGT  | LNNNTQYE                    |            |                      |                             |
| Tsa -Gf    | --MAPPHQFQSK   | PSDVIRRLSSAVSSK--RPNIPG--YTSLTPMWAGIAGAV | NNNTQFE                     |            |                      |                             |
| TsaA-An    | -MLGGGSPSPRRASLQQRRLSTEHS                                    | PNS--WGA--AT-TGNLYGGLS-TVFEKDK-VI        |                             |            |                      |                             |
| Ccg9-Nc    | MAFEKARKFSTGTSVHRKRQMS                                       | TLVEKEG--HFG--PA-LTTLYLGLIS-AVFADDHTAV   |                             |            |                      |                             |
| Prim.cons. | MM44P4HQF4SK4S44I2RRLS24VSSK3RPNI4GTT42SLTP22AGI2G2V2NN2TQ4E |  |                             |            |                      |                             |
|            | 70   | 80                                       | 90                          | 100        | 110                  | 120                         |
| TreP-Ps    | I  | AVTVHDGVYSTDFASVI                        | IPVTPGDTVKN                 | SKDIEAQV   | LN                   | LIRKFSAEHLCKFLGAGITLA       |
| Tsa -Gf    | V  | AISIHDSVYNTDFASSV                        | PYPSPNEPEAQAGI              | IEKHVLET   | LRKFS                | STEHMCKFLGAGVTVI            |
| TsaA-An    | F  | AVAIRDATYLVDFAEEL                        | LPFSESDDL--DLK              | IGDHMMRHL  | YKWC                 | DTLHEKMI                    |
| Ccg9-Nc    | V  | ALAIHDTVYLVDFSVKH                        | IELDDALKMG--EDL             | IAEYVI     | SEVQ                 | KYEHENFS-FVGAGLPTT          |
| Prim.cons. | VAVAIHD4VYL2DFAS44IP4SP4D4432444IE4HVL44LRKFS4EHLCKFLGAGI244 |  |                             |            |                      |                             |
|            | 130  | 140                                      | 150                         | 160        | 170                  | 180                         |
| TreP-Ps    | LLKECPNLC  | TRLWLDMDIVPIVFN                          | IKPFHTDSVTRP                | NIKH       | RISSTTGSYVPSGSETPTVY |                             |
| TSA -Gf    | LLREAPNLC  | TRLWLDMDIVPIVFN                          | IKPFHTDSITRPN               | VRHRIS     | STTGSYVPSGAETPTVY    |                             |
| TsaA-An    | LAHTCPTICS   | RWLWLELDIIP                              | VLSDNSKL--DFR               | GEDLQYGF   | -----                | QQSAD                       |
| Ccg9-Nc    | LKYMSPTLCS   | RWLWLEVDIVPIV                            | MRPD-----D                  | -----EH    | -----                | KEATF                       |
| Prim.cons. | LL4ECP2LC2RLWL2MDIVPIVFN                                     | IKPFHTD23TRPN34HRISSTTGSYVPSG2ETPTVY     |                             |            |                      |                             |
|            | 190  | 200                                      | 210                         | 220        | 230                  | 240                         |
| TreP-Ps    | VEASHLGDPSH  | LSPNAAQKLPI                              | PRTLDEQSDSAARK              | CLMYFGPN   | NNNPRLSIGARNP        | VTV                         |
| Tsa -Gf    | YDPAQLQDPN   | KLSANVQTRLPI                             | PRTVDEQADSAARK              | CIMYFGPG   | NNNPRLQIGPRNQ        | VAVD                        |
| TsaA-An    | WELRTLDEQA   | ESMARKCVR                                | -----                       | LF         | GP                   | EGTPLLQVGLSGLVQVD           |
| Ccg9-Nc    | WDVKRVDEQA   | DSMARKC                                  | IMKGP                       | PCPVSSALKS | ILTALVRHFGPS         | SLVPLLQVGF                  |
| Prim.cons. | W2444LD22A422A2KC4RLPI                                       | PRTVDEQLDSAARKC42YFGP4NNP2LQ2G4R24VQVD   |                             |            |                      |                             |
|            | 250  | 260                                      | 270                         | 280        | 290                  | 300                         |
| TreP-Ps    | AGGKIHL  | IDDLEEYRMTV                              | GAGTWN                      | AVIKLADE   | LR                   | REKKVKIGFFSSTPQGGGVALMRHALI |
| Tsa -Gf    | AGGKIHL  | IDDIDEYRKT                               | TVGKGTWNS                   | VIKLADE    | LR                   | REKKIKIG-FSSTPQGGGVALMRHAI  |
| TsaA-An    | TAFHVQL  | TN-KDNYKNS                               | VTANTWKA                    | IEHYAD     | DLNR                 | KVKLAFFSATPQGGGVALMRHAMV    |
| Ccg9-Nc    | AGFRAHL  | TT-VQNHK                                 | DTCGPATWET                  | TLTFAK     | KL                   | RANKLKMFFSSTPQGGGVALMRHALV  |
| Prim.cons. | AG2KIHL2DD4D2Y24TVGAGT                                       | TWNAVIKLADELR                            | REKKVKI2FFSSTPQGGGVALMRHAL2 |            |                      |                             |
|            | 310  | 320                                      | 330                         | 340        | 350                  | 360                         |
| TreP-Ps    | RFL  | TALD                                     | VDV-----                    | AWYVP      | NPSPQVFR             | TTKN                        |
| Tsa -Gf    | RF   | F  | TALD                        | VDV-----   | AWYVP                | NPSPSVFR                    |
| TsaA-An    | RF   | AHS                                      | I                           | G          | T                    | MK                          |

```

Ccg9-Nc      RFARLLGVDL--T----YVPKPRPGVFRITKNIHNILQGVSHPDQRVSAEEKQAIIDWIN
**      :..*      ***:* * *** *. *****: * .*: * : . **
Prim.cons.   RFATAL2VD4KC2DRAWYVP2P2PGVFR2TKNNHNILQGV23PDLRLT4EAKDAFD4WIL

              370      380      390      400      410      420
              |      |      |      |      |      |
TreP-Ps      KNGLR-WTAEGGPLAP--GGVDVVFIDDPQMPGLIPLIKKVRPEVPIVYRSHIEIRNDL
Tsa- Gf      KNGLR-WTAEGGPLAP--GGVDIAFIDDPQMPGLIPLIKRIRPDLPIIYRSHIEIRSDL
TsaA-An      ENADRYWLRPGGPLEHPSKGGADVIVIDDPQMPALIPLAKQKAPERPVVFRSHIQIRSDL
Ccg9-Nc      ENASRYWFSEGGPLRAPEEGGADIVVIDDPQMPGLIPLIKKYTPNRPVLYRSHIQIRSDL
*: * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Prim.cons.   2N2LRYWTAEGGPLAPP22GG2D2V2IDDPQMPGLIPLIKK4RPERP2VYRSHI2IRSDL

              430      440      450      460      470      480
              |      |      |      |      |      |
TreP-Ps      VHVAVSPQEEVWKYLWNNIQLADLFISHPVSKFVPSDVPTEKLALLGAATDWLDGLNKDL
Tsa -Gf      VHVKGSPQEEVWNYLWNNIQHSDFISHPVNKFVPSDVPLEEKLALLGAATDWLDGLSKHL
TsaA-An      VDQDGSQAECWGTMWKDIQKADIFVSHPVKSFVPKIVPREKVGMPASTDWLDGLNKNM
Ccg9-Nc      VAKAGSPQADIWDFLWGNIQGDMFISHPIPSFVPHNVPREKVVYLPATTDWLDGLNKHL
*      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Prim.cons.   VHVAGSPQ2EVW4YLWNNIQ4ADLFISHPV42FVPSDVPREK2A2L2AATDWLDGLNKHL

              490      500      510      520      530      540
              |      |      |      |      |      |
TreP-Ps      DPWDSPFYMGEFRPRGSHLNRGEFRSLCAKEKMHELNWPARDYIVQVARFDPSKGIPNVV
Tsa -Gf      DAWDSQYMGEFR-----NLCVKEKMNELGWPAREYIVQIARFDPSKGIPNVI
TsaA-An      RNEDIAYGRIFN-----SWVRNSGMPVIDYPA-EYIVQIARFDPSKGIPHVI
Ccg9-Nc      NHWDSGYGNLYN-----NACHSQRMTELNWPARKYIIQVARFDPSKGIPTVI
*      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Prim.cons.   D4WDS4YY2GEF2PRGSHLNRGEFR2LC4KEKM4ELNWPAREYIVQ2ARFDPSKGIPNVI

              550      560      570      580      590      600
              |      |      |      |      |      |
TreP-Ps      DSYYKFRNLLRTRSPDMESEHPQLLICGHAVDDPDASIIYDQIMALVNSDPYKEYAHD
Tsa -Gf      DSYARFRKLCVDK---VMEDDIPQLLICGHAVDDPDASIIYDQVQLQLIHAK-YKEYAPD
TsaA-An      ESYEKFRHQRMQDYCP---DKPIPQLLICGHSVDDPDGSIIYDLAVRYIEDS-IPDLADQ
Ccg9-Nc      DSYAEFRRCDKAG---ITDVPQLVCGNGSVDDPDASLIYDQTMAQLETY-YPDLIRD
*: * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Prim.cons.   DSYAKFR42C4D43PD22E4DIPQLLICGHG2VDDPDASIIYDQ4MALIE44PY222A4D

              610      620      630      640      650      660
              |      |      |      |      |      |
TreP-Ps      IVMRLPPSDELLNAMMANSRIALQLSTREGFEVKVSEALHTGKPVIACRTGGIPLQIQH
Tsa -Gf      IVMRCPPSDQLLNTLMANAKFALQLSTREGFEVKVSEALHAGKPVIACRTGGIPLQIEH
TsaA-An      ICVVRLGPSDQVLNALMSKAKVALQLSTREGFEVKVSEALIHKGRPVIATRAGGIPLQVID
Ccg9-Nc      VSVMRLEPNDQVINTLLSNAHVALQLSTREGFEVKVSEALHAGRPVIVTNVGGIPLQVKD
: * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Prim.cons.   IVMRLPPSDQ2LN2LM2NAKVALQLSTREGFEVKVSEALHAG2PVIA2RTGGIPLQ242

              670      680      690      700      710      720
              |      |      |      |      |      |
TreP-Ps      GKSGYLTTPGEKDAVAGHFYDFYTDEALYRKMSDFARTHVSNEVGTVGNAAAWLYLAVMY
Tsa -Gf      GKSGYLCEPGDNAAVAQHMLDLYTDEDLYDTMSEYARTHVSDEVGTVGNAAAWMYLAVMY
TsaA-An      KGNGFLVDVGDTDAVAKHLFDLCTDDVLWKKMHEFALAHVCDEVSTVGNSLNWLYLASKL
Ccg9-Nc      KVNGFLVAPGDWRAVAGHLMDF-TDEELWKRMHHAARTGVSDEVGTVGNALAWFYLAAKW
. * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Prim.cons.   2K2G2LV4PGD4DAVAGHL4D2YTD24L2KKM2EFARTHVSDEVGTVGNA2AWLYLAV2Y

```

```

              730      740      750      760      770      780
              |        |        |        |        |        |
TreP-Ps      S-RGEK-----IKPNGAWINDFFREETGEPYKEGETKLPRTKLDMQG-----
Tsa -Gf      VSRGVK-----LRPHGAWINDLMRTEMGEPYRPGEPRLPRGELHVQG-----
TsaA-An      SKG-----GVIKPNERWLNDMAREDA GIPYQEGEDRLKR-ELEVQKMG-----
Ccg9-Nc      TEVGVETSGKGLKGNQWVNDMART EAGYLYTQEENR LPR-HFTQRKPESESESKDLPI
              :: : *::*: * : * * * * : * * .: :
Prim.cons.   S3RGVKTSGKG22KPN2AWINDMAR2EAGEPY4EGE4RLPR2EL4VQ222SESESKDLPI

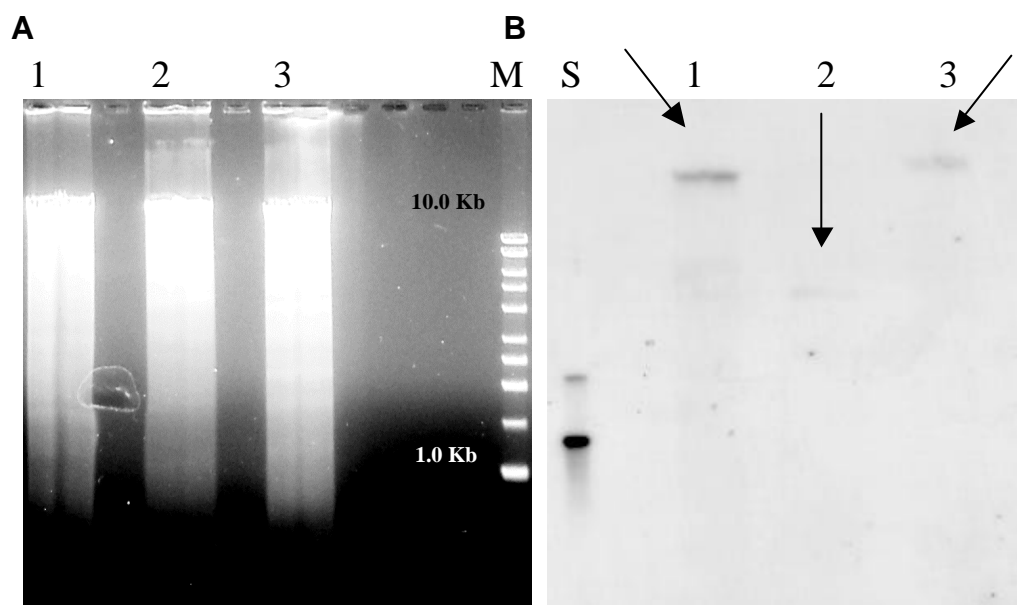
TreP-Ps      -----
Tsa -Gf      -----
TsaA-An      -----
Ccg9-Nc      HEKKPEVTA

Prim.cons.   HEKKPEVTA

```

**Figura 16-** Alinhamento entre as seqüências das proteínas TreP-Ps ( “Trehalose phosphorylase” de *P. sajor-caju*), Tsa-Gf (“Trehalose syntase” de *G. frondosa*), TsaA (envolvida na resistente à acriflavina de *A. nidulans*) e ccg9-Nc (“clock-controlled gene-9 protein” de *N. crassa*). As regiões consenso estão representadas por asterístico.

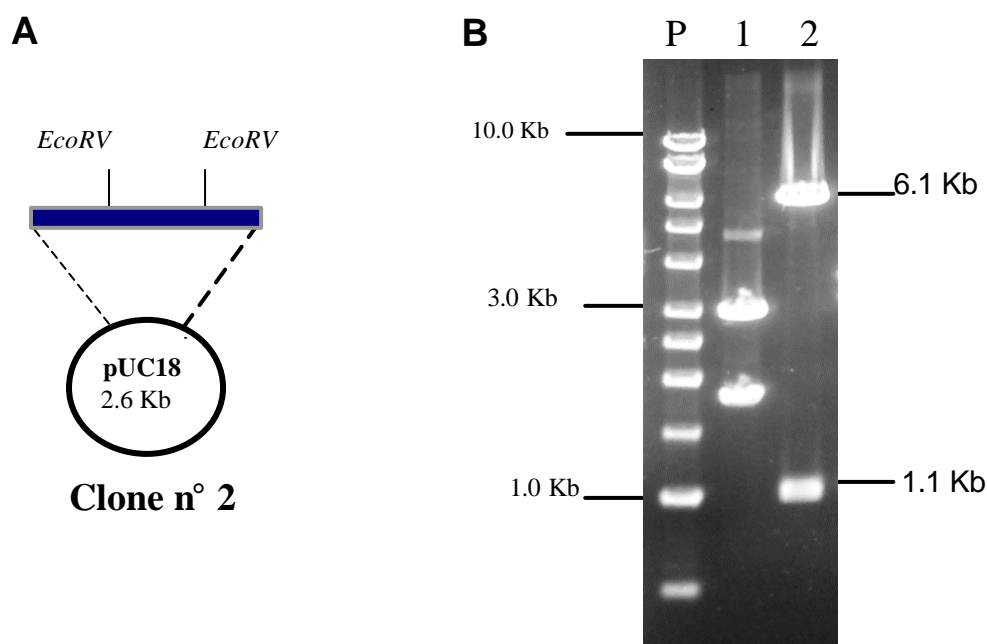
A análise do DNA genômico de *A. nidulans* digerido com enzimas de restrição *Apa* I, *Cla* I e *Not* I e a hibridação com uma sonda molecular interna ao gene *tsaA*, marcada radioativamente, demonstrou que este gene possui uma cópia única no genoma do fungo (Figura 17). As enzimas utilizadas não possuem sítios de restrição no gene em estudo.



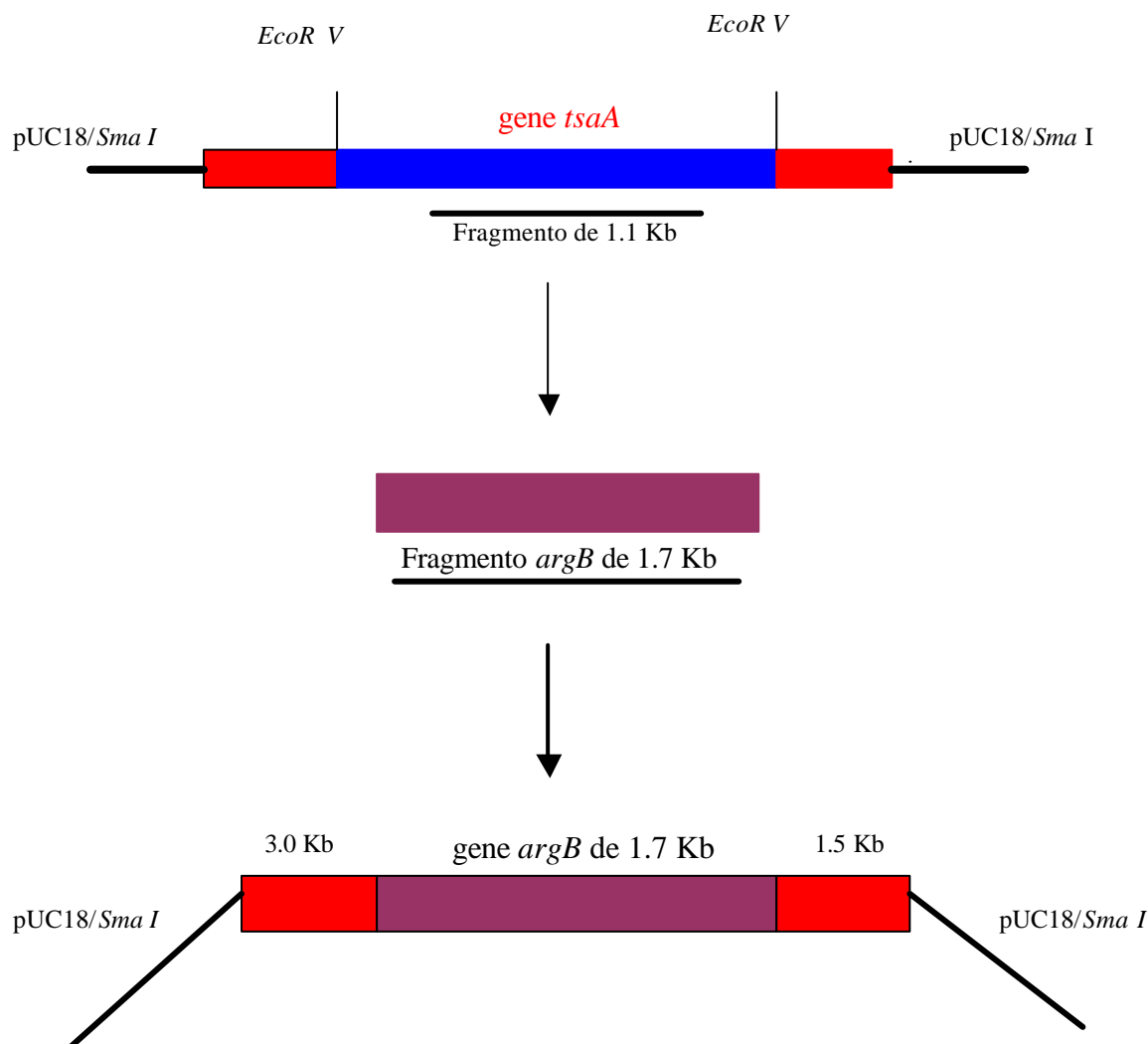
**Figura 17-** Análise por “*southern blotting*” para identificar o número de cópias do gene *tsaA*. O DNA genômico da linhagem FGSC 26 de *A. nidulans* foi digerido com enzimas de restrição (1)- *Apa* I; (2)- *Cla* I; (3)- *Not* I; separado em gel de agarose 0.8% (m/v) (A), transferido para a membrana e hibridado com uma sonda interna ao gene *tsaA* (B). (S)-sonda molecular; M- Padrão molecular 1.0Kb (Kilobase). As enzimas utilizadas não possuem sítio de restrição no gene *tsaA*

### 3.7- Inativação gênica

Com o objetivo de caracterizar funcionalmente o gene que confere resistência à acriflavina em *A. nidulans*, realizamos o nocaute gênico. Um clone denominado nº 2 contendo um inserto de aproximadamente de 4.5Kb (que contém o gene *tsaA*) clonado no vetor pUC18/*Sma* I foi digerido com a enzima de restrição *EcoRV* e dois fragmentos foram obtidos: um de aproximadamente 6.1Kb e outro de 1.1Kb (Figura 18). O fragmento de 6.1Kb foi ligado ao gene *argB* de 1.7Kb para a construção do cassete da ruptura gênica. A figura 19 representa o diagrama esquemático da construção do cassete da ruptura gênica.

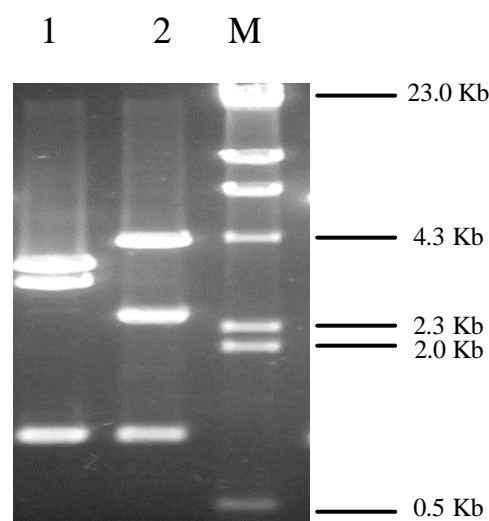


**Figura 18-** A- Representação esquemática do clone nº 2. Este clone contém o plasmídeo pUC18 (2.6Kb) e um inserto de 4.5Kb (representado pelo fragmento azul escuro). B- 1-Vetor JYargBC22 que contém gene *argB* digerido com a enzima *Sma* I. 2-Digestão do clone nº 2 com a enzima *EcoRV*. P- marcador molecular: 1.0Kb



**Figura19**– Representação esquemática da construção do cassete da ruptura gênica. Substituição de parte do gene *tsaA* pelo gene *argB* de *A. nidulans*.

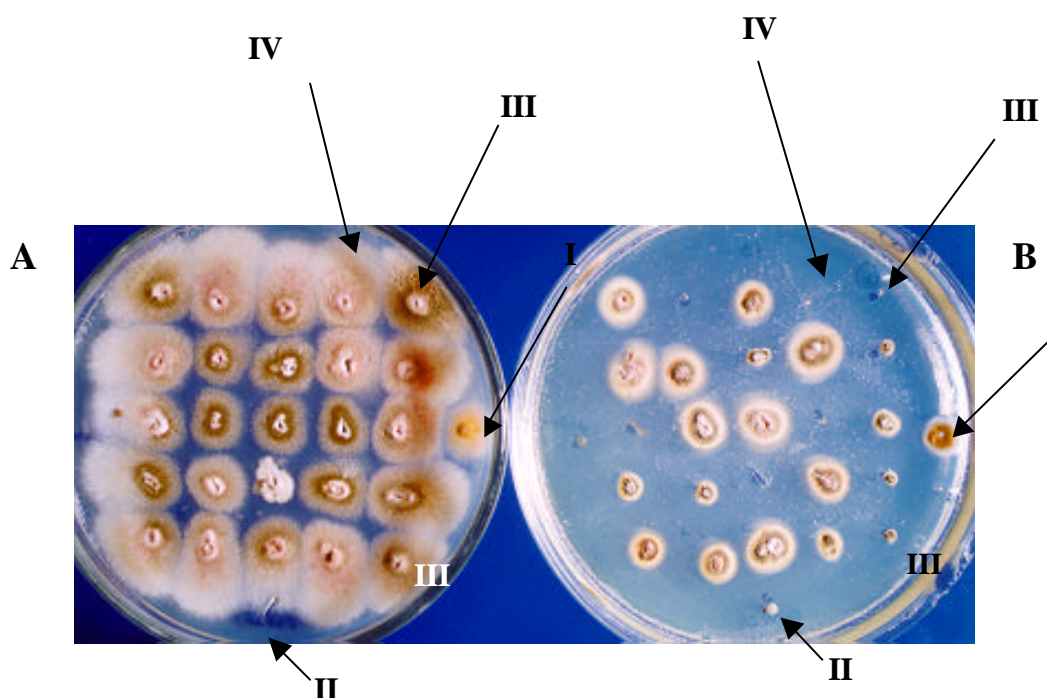
O DNA plasmidial de duas colônias de *E. coli* transformadas com o cassete da ruptura gênica estão representadas na figura 20, e apresentam o padrão de digestão esperado de aproximadamente 7.7Kb (Figura 19), quando digeridas com a enzima de restrição *HindIII*. Além disto, a construção do cassete da ruptura gênica foi confirmada por seqüenciamento. A diferença de padrão apresentada pelos clones 1 e 2 (Figura 20) ocorre em função da posição do cassete da ruptura no vetor.



**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, digeridas com a enzima *HindIII*. Ambos contêm três sítios de restrição para esta enzima e a somatória dos fragmentos apresentados foi estimada em aproximadamente 7.7Kb. M- Marcador de tamanho molecular:  $\lambda$  /*HindIII*

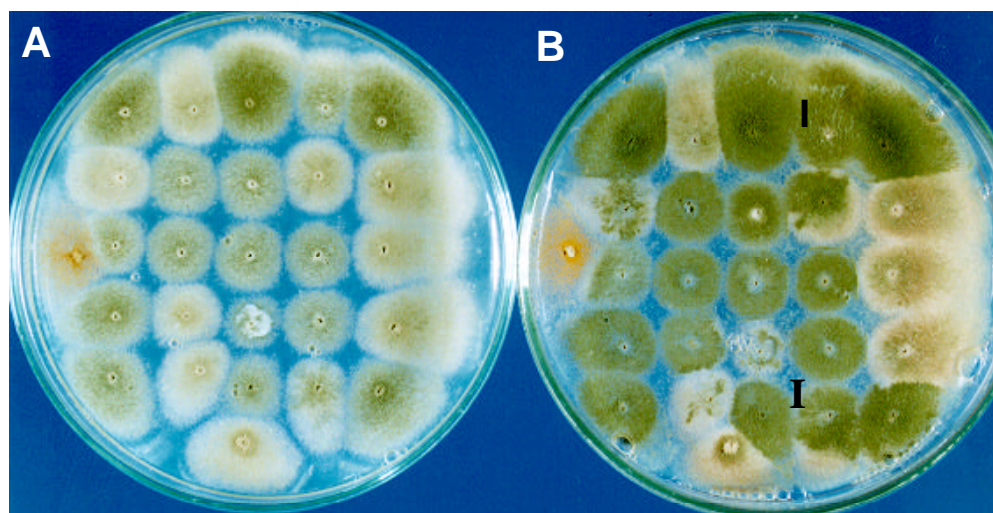
Através do cruzamento da linhagem mutante nulo para arginina e sensível à acriflavina, RAP 26, ( $\Delta argB$  *acrA*<sup>+</sup>) com uma resistente à acriflavina, Segragante 1, (*argB* *acrA1*) isolamos a linhagem de *A. nidulans* denominada 22 ( $\Delta argB$  *acrA1*) que foi utilizada como receptora para o cassete do nocaute gênico, durante os experimentos de transformação no fungo. Um transformante nocauteado, com fenótipo esperado e selecionado em meio mínimo, foi posteriormente confirmado por “*southern blotting*” está representado como III na figura 21. Nesta figura também pode ser observada a colônia identificada como IV que não confirmou, posteriormente, a ruptura gênica.



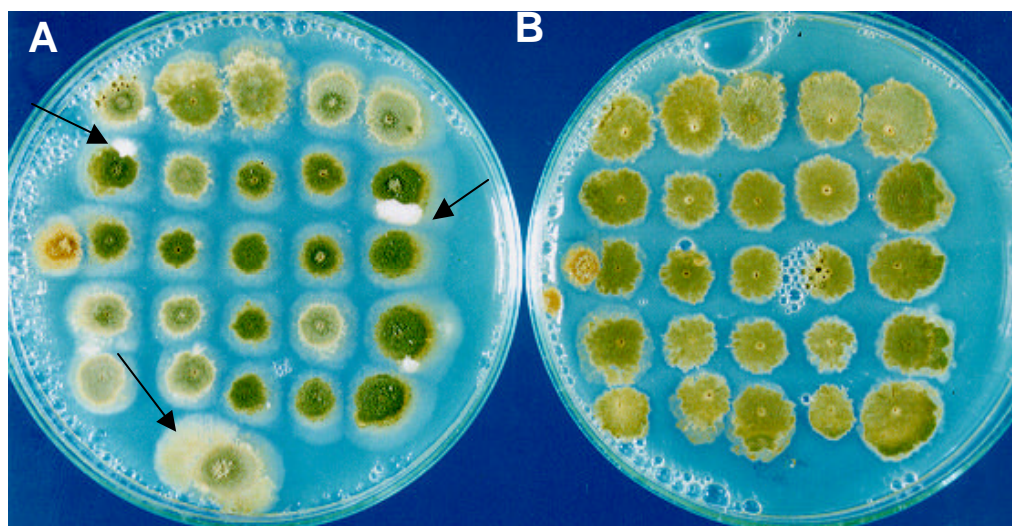


**Figura 21**– Colônias transformantes de *A. nidulans*. (A)- Colônias transformantes cultivadas em meio mínimo sem arginina e sem droga. (B)- Colônias transformantes, cultivadas em meio mínimo sem arginina e contendo 8.0µg/ml de acriflavina; I-Segregante 1 (linhagem de *A. nidulans* resistente à acriflavina) (*argB acrA1*); II- linhagem 22 ( $\Delta argB acrA1$ ) mutante nulo para arginina; III-Colônia nocauteada no gene *tsaA*. IV-Colônia transformada mas não nocauteada.

Estes mesmos transformantes de *A. nidulans* foram cultivados na presença de glicose e de trealose, como fonte de carbono (Figuras 22 e 23).

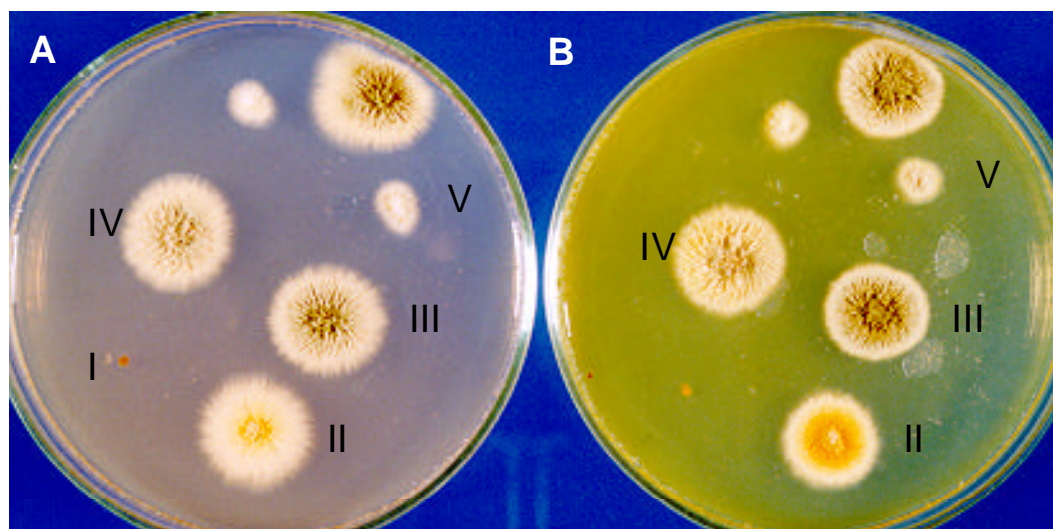


**Figura 22-** A-Colônias transformantes cultivadas em meio mínimo sem arginina e com glicose como fonte de carbono. B-Colônias transformantes cultivadas em meio mínimo sem arginina e com trealose como principal fonte de carbono. I-Colônias que apresentaram um aumento significativo na conidiação e na coloração.



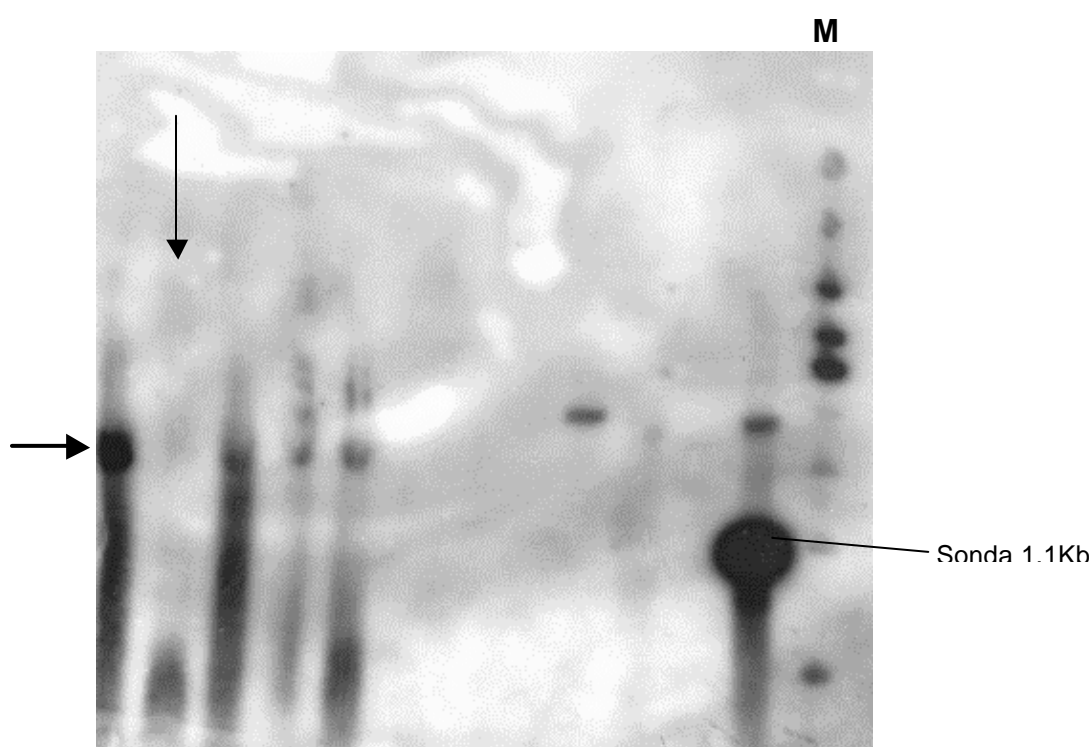
**Figura 23-** A-colônias transformantes cultivadas em meio mínimo com arginina contendo 2.0 $\mu$ g/ml de acriflavina e glicose como fonte de carbono, as colônias que apresentaram setores estão indicadas pelas setas. B- colônias cultivadas em meio mínimo sem arginina contendo 2.0 $\mu$ g/ml de acriflavina e trealose como principal fonte de carbono; nenhuma colônia apresentou setores

Alguns transformantes foram também cultivados em meio completo na presença de brometo de etídio e acriflavina, como representado na figura 24.



**Figura 24-** Colônias transformantes de *A. nidulans*. (A)- Colônias transformantes cultivadas em meio completo com arginina e 15µg/ml de brometo de etídio. (B)- Colônias transformantes, cultivadas em meio completo com arginina e 15µg/ml de acriflavina. I- *pabaA1* (linhagem sensível para ambas as drogas); II-Segregante 1 (linhagem de *A. nidulans* resistente a ambas as drogas) (*argB acrA1*); III-linhagem 22 ( $\Delta argB acrA1$ ) mutante nulo para arginina (resistente para as duas drogas utilizadas); IV-Colônia nocauteada no gene *tsaA*; V-Colônia transformada mas não nocauteada.

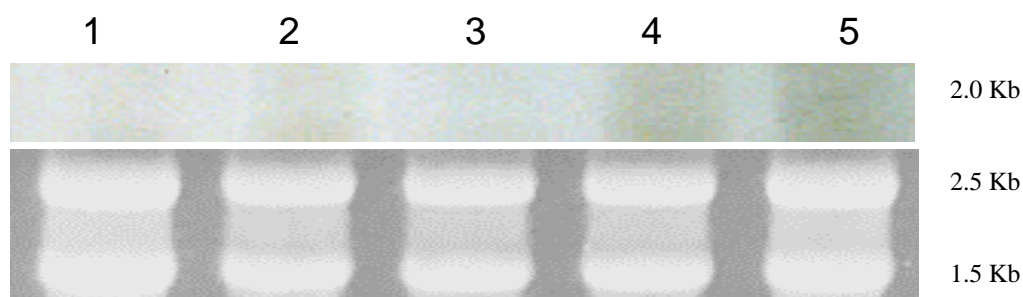
Algumas colônias transformadas foram selecionadas e analisadas por “*southern blotting*” para confirmarmos a ruptura gênica. A sonda utilizada foi o fragmento de 1.1Kb removido do gene *tsaA* na construção do cassete. Como pode ser visto pela figura 25 apenas um dos transformantes teve seu gene *tsaA* inativado.



**Figura 25-** “*Southern blotting*” das colônias transformantes de *A. nidulans*. A sonda utilizada foi o fragmento de 1.1Kb (Figura 18). A seta indica o transformante nocauteado

### 3.8- Análise da expressão gênica por “*northern blotting*”

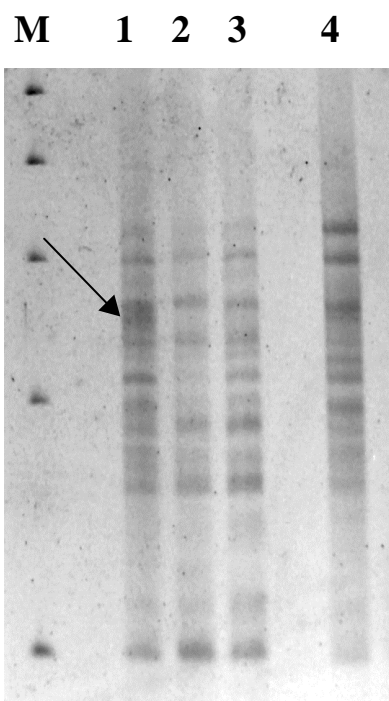
O nível de expressão do gene de *A. nidulans* que confere resistência à acriflavina, foi analisado por “*northern blotting*”. Como resultado, foi observado um aumento na transcrição do gene visualizado através do aparecimento de uma banda de aproximadamente 2.0kb quando o micélio foi exposto à concentração de 320µg/ml de acriflavina (Figura 26).



**Figura 26-** Análise da expressão do gene que confere a resistência à acriflavina por “*northern blotting*” usando RNA total extraído do micélio da linhagem segregante 1 de *A. nidulans*, resistente à acriflavina, exposto a várias concentrações de acriflavina por 10 minutos. 1- controle (sem droga); 2- 80µg/ml de acriflavina; 3- 160µg/ml de acriflavina; 4- 240µg/ml de acriflavina; 5- 320µg/ml de acriflavina. Utilizou-se um fragmento interno do gene *tsaA* como sonda molecular.

### 3.9- “*Differential display*”

A estratégia do “*differential display*” foi utilizada com o objetivo de isolar e identificar genes diferencialmente expressos pelo fungo em presença/ausência das drogas, acriflavina e brometo de etídio. Um padrão eletroforético diferente foi observado quando as linhagens foram ou não submetidas às drogas (Figura 27).



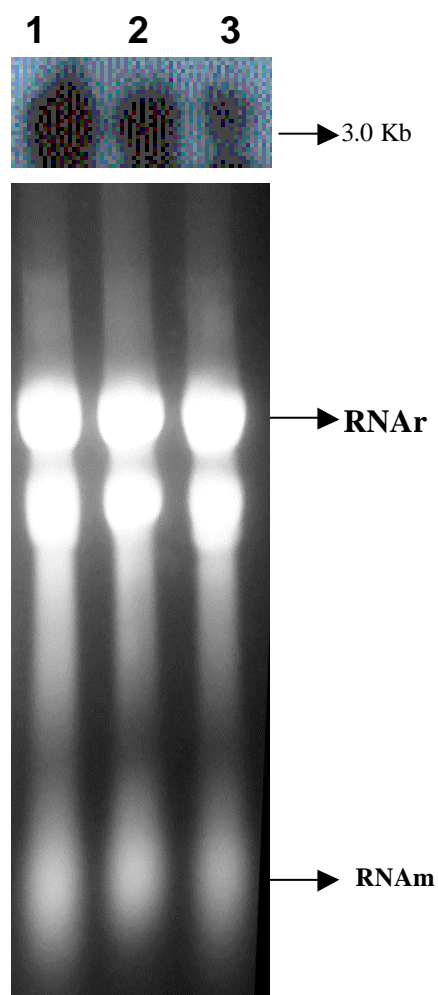
**Figura 27-** Análise do padrão eletroforético do “differential display” usando RNA total extraído do micélio de *A. nidulans*, exposto às drogas acriflavina e brometo de etídio por 10 minutos. 1-controle (sem droga) *pabaA1* linhagem sensível à acriflavina e ao brometo de etídio; 2 *pabaA1* exposta em 100µg/ml brometo de etídio; 3 *pabaA1* exposta em 100µg/ml de acriflavina; 4-Segregante 1 (linhagem resistente à acriflavina e ao brometo de etídio) sem drogas. M- marcador de peso molecular 100pb.

O fragmento indicado pela seta na figura 27 foi clonado no vetor pMOS e em seguida seqüenciado. Esta sequência foi analisada através do programa Blastx do site [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) e o resultado desta análise está representado na tabela 9.

**Tabela 9-** Análise da seqüência de nucleotídeo referente ao fragmento clonado a partir do experimento de “differential display”

| Score   | E | Sequences producing significant alignments: | (bits)             | Value |
|---|---|---|--------------------|-------|
| <a href="#">gi 6319499 ref NP_009581.1 </a>           |   | (NC_001134) Hypothetical ORF; Y...          | <a href="#">75</a> | 1e-13 |
| <a href="#">gi 15902048 ref NP_357598.1 </a>          |   | (NC_003098) Conserved hypothet...           | <a href="#">70</a> | 6e-12 |
| <a href="#">gi 15899953 ref NP_344557.1 </a>          |   | (NC_003028) GTP-binding protei...           | <a href="#">70</a> | 6e-12 |
| <a href="#">gi 15674254 ref NP_268427.1 </a>          |   | (NC_002737) putative GTP-bindi...           | <a href="#">69</a> | 1e-11 |
| <a href="#">gi 7959905 gb AAF71123.1 AF116721_103</a> |   | (AF116703) PRO2455 [H...                    | <a href="#">69</a> | 2e-11 |
| <a href="#">gi 19745204 ref NP_606340.1 </a>          |   | (NC_003485) putative GTP-bindi...           | <a href="#">68</a> | 2e-11 |
| <a href="#">gi 7643796 gb AAF65513.1 </a>             |   | (AF108896) GTP-binding protein [C...        | <a href="#">68</a> | 2e-11 |

Este mesmo fragmento foi utilizado como sonda no experimento de “*northern blotting*” para confirmar uma possível expressão diferencial deste gene. Este resultado está apresentado na figura 28, onde a linhagem sensível apresenta um sinal positivo de hibridação, quando em ausência de droga (controle) e na presença de brometo de etídio, embora em menos intensidade, enquanto na presença da acriflavina houve uma redução expressiva no sinal da marcação, indicando assim uma redução na expressão deste gene em presença da acriflavina.



**Figura 28-** Análise por “*northern blot*” da expressão diferencial do micélio da linhagem *pabaA1* de *A. nidulans*, quando exposto à presença de acriflavina e brometo de etídio. 1- controle (sem droga); 2- 100µg/ml de brometo de etídio; 3- 100µg/ml de acriflavina.



### 3.10 - Análise do blastx da seqüência de 1.2Kb

Conforme já mostrado nas figuras 11 e 12 o contig de 4.9Kb do clone W27D11 da linhagem selvagem revelou uma seqüência nucleotídica de 1.2Kb vizinho ao gene *tsaA*. Esta seqüência foi submetida ao “blastx” e revelou uma proteína com similaridade às seguintes proteínas já depositadas no “GeneBank”: um fator de ADP-ribolisação, pequena proteína G e proteína ligada ao GTP (Tabela 10)

**Tabela 10-** Análise do resultado do blastx da seqüência de 1200 nucleotídeos do clone W27D11.

| Sequences producing significant alignments:                                    | (bits)              | Value |
|--|---------------------|-------|
| <a href="#">gi 19113614 ref NP_596822.1 </a> (NC_003423) probable ADP-ribos... | <a href="#">107</a> | 2e-52 |
| <a href="#">gi 11131023 sp O48649 ARF_SALBA</a> ADP-ribosylation factor 1 >... | <a href="#">96</a>  | 2e-47 |
| <a href="#">gi 3182915 sp P91924 ARF_DUGJA</a> ADP-RIBOSYLATION FACTOR >gi ... | <a href="#">97</a>  | 5e-47 |
| <a href="#">gi 461533 sp P34728 ARF_CRYNE</a> ADP-RIBOSYLATION FACTOR >gi 1... | <a href="#">94</a>  | 5e-47 |
| <a href="#">gi 4502211 ref NP_001654.1 </a> (NM_001663) ADP-ribosylation fa... | <a href="#">108</a> | 5e-47 |
| <a href="#">gi 7767049 pdb 1E0S A</a> Chain A, Small G Protein Arf6-Gdp        | <a href="#">108</a> | 5e-47 |
| <a href="#">gi 18484766 ref XP_080265.1 </a> (XM_080265) ADP ribosylation f... | <a href="#">108</a> | 7e-47 |
| <a href="#">gi 114128 sp P26990 ARF6_CHICK</a> ADP-RIBOSYLATION FACTOR 6 >g... | <a href="#">108</a> | 7e-47 |
| <a href="#">gi 1703375 sp P51822 ARF1_DAUCA</a> ADP-RIBOSYLATION FACTOR 1 >... | <a href="#">97</a>  | 9e-47 |
| <a href="#">gi 13399897 pdb 1HFV A</a> Chain A, Structure Of The Small G Pr... | <a href="#">108</a> | 1e-46 |
| <a href="#">Gi 17538184 ref NP_501336.1 </a> (NM_068935) GTP-binding protei... | <a href="#">94</a>  | 4e-45 |
| <a href="#">gi 422756 pir  A46054</a> GTP-binding protein ARD 1 - human        | <a href="#">79</a>  | 6e-32 |
| <a href="#">gi 15226086 ref NP_179133.1 </a> (NM_127091) putative ADP-ribos... | <a href="#">80</a>  | 1e-31 |
| <a href="#">gi 543840 sp P36407 ARD1_RAT</a> GTP-binding protein ARD-1 >gi ... | <a href="#">79</a>  | 5e-31 |
| <a href="#">gi 6324668 ref NP_014737.1 </a> (NC_001147) GTP-binding ADP-rib... | <a href="#">87</a>  | 9e-31 |
| <a href="#">gi 15228912 ref NP_188935.1 </a> (NM_113195) ADP-ribosylation f... | <a href="#">72</a>  | 9e-30 |
| <a href="#">gi 103187 pir  A40438</a> GTP-binding protein arl (arf-like) - ... | <a href="#">79</a>  | 2e-29 |

### 3.11 - Análise genética

A tabela 11 mostra o resultado dos segregantes resistentes obtidos do cruzamento meiótico entre as linhagens segregante 1 e 47. Foram analisados 267 segregantes e os 66 destes que tinham o genótipo *acrA1 tebA7* foram submetidos à altas concentrações de terbinafina para definir o fenótipo apresentado. Destes apenas 56 se mostraram super-resistentes a este antimicótico, caracterizando que o fenótipo da super-resistência à terbinafina é independente da mutação *acrA1*.

**Tabela 11-** Análise do fenótipo dos segregantes duplo resistentes (*acrA1 tebA7*) do cruzamento entre o segregante 1 e a linhagem 47 com relação a presença de terbinafina

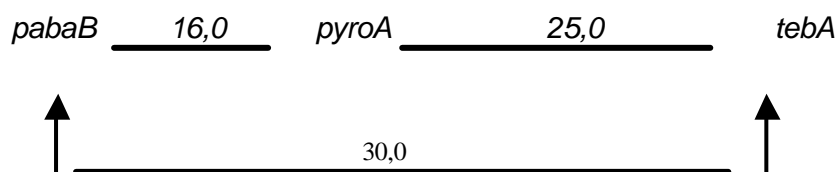
| Cruzamento     | Segregantes |                    | Total de Segregantes<br>( <i>acrA1 tebA7</i> ) |
|----------------|-------------|--------------------|--|
|                | Resistentes | Super- resistentes |  |
| Segreg. 1 x 47 | 10          | 56                 | 66   |

Este cruzamento permitiu também definir a posição do gene *tebA* no cromossomo IV de *A. nidulans*. A distância gênica foi estimada a partir do número de segregantes recombinantes entre dois marcadores gênicos dividido pelo número total de segregantes analisados x 100. Os resultados desta análise estão na tabela 12 e figura 29.

**Tabela 12**– Análise meiótica do cruzamento entre as linhagens segregante 1 x 47.

| Marcador Genético<br>do<br>Cromossomo IV               | Segregantes                     |                               | Unidade de<br>Recombinação |
|--|---------------------------------|-------------------------------|----------------------------|
|  | Resistentes<br>à<br>Terbinafina | Sensíveis<br>à<br>Terbinafina |                            |
| <i>pyroA</i> <sup>+</sup><br><i>pyroA</i> <sup>-</sup> | 98<br><b>40</b>                 | <b>27</b><br>102              | 25,0                       |
| <i>pabaB</i> <sup>+</sup><br><i>pabaB</i>              | 83<br><b>47</b>                 | <b>33</b><br>104              | 30,0                       |

Número de segregantes recombinantes está em negrito



**Figura 29**- Mapa gênico de parte do cromossomo IV de *A. nidulans*. Posicionamento do gene *tebA*, que confere resistência à terbinafina, em relação aos genes já mapeados *pabaB* e *pyroA*.