

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

**Caracterização funcional e bioquímica do fator de transcrição
HsfA e estudo da termotolerância, composição lipídica e
integridade da parede celular de *Aspergillus fumigatus***

Discente: João Henrique Tadini Marilhano Fabri

Orientador: Prof. Dr. Iran Malavazi

São Carlos

2022

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

**Caracterização funcional e bioquímica do fator de transcrição
HsfA e estudo da termotolerância, composição lipídica e
integridade da parede celular de *Aspergillus fumigatus***

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ciências com ênfase em Bioquímica e Biologia Molecular.

Discente: João Henrique Tadini Marilhano Fabri

Orientador: Prof. Dr. Iran Malavazi

São Carlos

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado do candidato João Henrique Tadini Marilhano Fabri, realizada em 02/02/2022.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Iran Malavazi (UFSCar)

Prof. Dr. Agustín Hernández López (UFSCar)

Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo (UFSCar)

Profa. Dra. Maria Célia Bertolini (UNESP)

Prof. Dr. Roberto Nascimento Silva (USP)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Dedicatória

*Dedico este trabalho aos meus queridos avós
Nair, Edgard, Eny e Ataliba, por todos os
momentos maravilhosos que passamos juntos;
E à minha companheira canina Belinha, por
toda a alegria que trouxe à minha vida.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador, professor Dr. Iran Malavazi, obrigado pela confiança, oportunidade de trabalho e aprendizagem, e por todo o auxílio e preocupação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro ao longo desse trabalho e pela concessão das bolsas de Doutorado Direto (Processo 2017/13363-5) e BEPE (Processo 2018/22755-7).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Perfeiçãoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro ao laboratório e ao departamento.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Cássio e Renata pelo exemplo, carinho e apoio, ao meu irmão João Vitor pelos bons momentos compartilhados, e a todos os meus demais familiares.

À colega de laboratório e grande amiga Marina, por ter sido praticamente minha co-orientadora e ter me ensinado todos os dias.

Aos meus amigos Yulli, Mariana, Matheus, Frederico e Ricardo, pelos momentos de descontração e pela amizade duradoura.

Ao professor Dr. Anderson Ferreira da Cunha, do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos, e a todos os seus alunos, pelo apoio e auxílio na realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Maurizio Del Poeta, da Stony Brook University, por todo apoio e por permitir que eu realizasse o estágio BEPE em seu laboratório, e a todos os seus alunos, em especial a Caroline, a quem serei eternamente grato.

Ao professor Dr. Gustavo Henrique Goldman, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pelo apoio e por disponibilizar o seu laboratório para a realização de experimentos deste trabalho.

Aos alunos do professor Gustavo, em especial Laure, Leandro e Patrícia, pelo auxílio na realização de experimentos.

À professora Dra. Taícia Pacheco Fill e aos seus alunos Jonas e Daniel, do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, pela realização das análises de metabólitos secundários em *Aspergillus fumigatus*.

Ao professor Dr. Flávio Henrique Silva, do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos, por permitir o uso do equipamento ChemiDoc para a revelação dos experimentos de *Western blot*.

Ao professor Dr. Felipe Roberti Teixeira, do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos, por permitir o uso do equipamento sonicador e pelo empréstimo de anticorpos.

À professora Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo, do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de São Carlos, por permitir o uso do equipamento SpectraMax e pelo empréstimo de anticorpos.

Ao professor Dr. Marcelo de Bello Cioffi, do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos, por permitir o uso do microscópio de fluorescência em seu laboratório.

À professora Dra. Ilana Lopes Baratella da Cunha Camargo, do Instituto de Física de São Carlos, por permitir o uso do equipamento SpectraMax em seu laboratório.

Ao especialista Douglas Antonio Alvaredo Paixão, do Laboratório Nacional de Biorrenováveis do CNPEM, por gerar os dados de sequenciamento de RNA.

À especialista Gabriela Felix Persinoti, do Laboratório Nacional de Biorrenováveis do CNPEM, pela análise dos dados de sequenciamento de RNA.

Aos especialistas Robert Rieger e Izolda Mileva do Biological Mass Spectrometry Shared Resource no Stony Brook Cancer Center da Stony Brook University, pela análise de espectrometria de massas para quantificação dos esfingolipídios.

Ao VCU Lipidomics/Metabolomics Core do VCU Massey Cancer Center, pela análise de espectrometria de massas dos fosfolipídios.

À Susan C. Van Horn da TEM Facility do Central Microscopy Imaging Center da Stony Brook University, pelo preparo e análise das amostras de microscopia eletrônica de transmissão.

A todos os técnicos que passaram pelo laboratório, em especial Andréia, Janaína e Magda, pelo auxílio e amizade, e a todos os alunos que também passaram pelo laboratório.

A todos os professores que contribuíram com sugestões ou com o envio de reagente, linhagens e plasmídeos.

À Universidade Federal de São Carlos e aos professores e funcionários do Departamento de Genética e Evolução.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e para a minha formação.

RESUMO

O fungo filamentosso e saprofítico *Aspergillus fumigatus* é o principal agente causador da aspergilose pulmonar invasiva (API) em indivíduos imunocomprometidos. Um dos seus mais importantes determinantes de virulência é a termotolerância. Diante do estresse por alta temperatura, os fungos oportunistas patogênicos implantam um mecanismo adaptativo conhecido como resposta ao choque térmico controlado por fatores de transcrição de choque térmico (HSFs), como Hsf1. Em eucariotos, os HSFs regulam a expressão de proteínas de choque térmico, como a chaperona Hsp90, que fazem parte do programa celular de adaptação ao calor. Recentemente, foi observado que a perturbação na integridade da parede celular (CWI) de *A. fumigatus* causa também suscetibilidade a temperaturas elevadas. Além disso, sabe-se que em resposta ao choque de temperatura, os fungos adaptam a composição e fluidez de suas membranas celulares em busca de homeostase. Neste trabalho, o gene *hsfA^{HSF1}* de *A. fumigatus* foi estudado, por meio da construção de um mutante condicional. *hsfA* se mostrou essencial para a viabilidade, virulência, termotolerância e CWI de *A. fumigatus*. O choque de temperatura e o estresse de parede celular modificaram a ultraestrutura da parede celular e desencadearam a expressão coordenada de HsfA e Hsp90, a qual se mostrou regulada pelos componentes da via CWI PkcA e MpkA. Análises de RNA-Seq confirmaram que HsfA regula a expressão de genes relacionados à resposta ao choque térmico, à biossíntese e remodelamento da parede celular e à homeostase lipídica. Ademais, HsfA apresentou função na síntese de esfingolipídios e fosfolipídios. Por essa razão, também foi investigada aqui a função do gene *sdeA^{OLE1}*, que codifica uma dessaturase de ácidos graxos, e sua relação com *hsfA*. *sdeA* se mostrou essencial, necessário para a síntese de ácidos graxos e importante para o metabolismo de fosfolipídios. Foi observado também que HsfA regula a expressão de *sdeA* e do pseudogene *sdeB*. Por fim, análises de *Western blot* provaram que SdeA interage fisicamente com Hsp90 e regula a expressão dessa chaperona. Coletivamente, estes resultados demonstraram as conexões entre a resposta ao choque térmico e a via CWI e a homeostase da membrana plasmática, com HsfA desempenhando um papel crucial na regulação dessas vias. Tais conclusões podem ser importantes para trazer novas informações sobre potenciais alvos terapêuticos no tratamento da API, podendo também ser aplicadas a outros fungos patogênicos ou fungos filamentosos relevantes.

ABSTRACT

The filamentous and saprophytic fungus *Aspergillus fumigatus* is the main causative pathogen of invasive pulmonary aspergillosis (API) in immunocompromised individuals. One of its most important determinants of virulence is the thermotolerance. Faced with high temperature stress, opportunistic fungal pathogens implement an adaptive mechanism known as heat shock response controlled by heat shock transcription factors (HSFs), such as Hsf1. In eukaryotes, HSFs regulate the expression of heat shock proteins, such as the chaperone Hsp90, which are part of the cellular program for heat adaptation. Recently, it was observed that the disturbance in cell wall integrity (CWI) of *A. fumigatus* also causes susceptibility to elevated temperatures. Furthermore, it is known that, in response to temperature shock, fungi adapt the composition and fluidity of their cell membranes towards homeostasis. In this work, the *hsfA^{HSF1}* gene from *A. fumigatus* was studied, through the construction of a conditional mutant. *hsfA* was essential for the viability, virulence, thermotolerance and CWI of *A. fumigatus*. Temperature shock and cell wall stress modified the cell wall ultrastructure and triggered the coordinated expression of HsfA and Hsp90, which was shown to be regulated by the components of the CWI pathway PkcA and MpkA. RNA-Seq analyzes confirmed that HsfA regulates the expression of genes related to heat shock response, cell wall biosynthesis and remodeling, and lipid homeostasis. Furthermore, HsfA had a role in the synthesis of sphingolipids and phospholipids. For this reason, the function of the *sdeA^{OLE1}* gene, which encodes a fatty acid desaturase, and its relationship with *hsfA* was also investigated here. *sdeA* was shown to be essential, necessary for the synthesis of fatty acids and important for the phospholipids metabolism. It was also observed that HsfA regulates the expression of *sdeA* and the pseudogene *sdeB*. Finally, Western blot analysis proved that SdeA physically interacts with Hsp90 and regulates the expression of this chaperone. Collectively, these results demonstrate the connections between heat shock response and the CWI pathway and plasma membrane homeostasis, with HsfA playing a crucial role in the regulation of these pathways. Such conclusions may be important to bring new information about potential therapeutic targets in the treatment of API, and can also be applied to other pathogenic or relevant filamentous fungi.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação diagramática das doenças causadas por espécies de <i>Aspergillus</i> em função da resposta imune do hospedeiro.....	4
Figura 2. Esquema da organização estrutural da proteína Hsf1 de <i>S. cerevisiae</i>	7
Figura 3. Mecanismo de funcionamento de Hsf1 em levedura durante o choque de temperatura.....	8
Figura 4. A via da integridade da parede celular (CWI) de <i>A. fumigatus</i>	13
Figura 5. Esquema de extração de lipídios.....	44
Figura 6. Estruturas fosfolipídicas encontradas em <i>S. cerevisiae</i>	47
Figura 7. Desenho experimental da análise de RNA-Seq das linhagens selvagem e <i>xyIP::hsfA</i> de <i>A. fumigatus</i> durante o estresse de temperatura.....	58
Figura 8. Alinhamento de proteínas homólogas a HsfA.....	64
Figura 9. Construção e validação do mutante <i>xyIP::hsfA</i>	65
Figura 10. Construção e validação do mutante <i>tet_{OFF}::hsfA</i>	67
Figura 11. Análise da expressão do gene <i>hsfA</i> por RT-qPCR nos mutantes condicionais <i>xyIP::hsfA</i> e <i>tet_{OFF}::hsfA</i>	68
Figura 12. HsfA é essencial para a germinação de <i>A. fumigatus</i>	70
Figura 13. <i>hsfA</i> é essencial para o crescimento normal e a termotolerância de <i>A. fumigatus</i>	72
Figura 14. O estresse térmico causa o remodelamento e o espessamento da parede celular de <i>A. fumigatus</i>	73
Figura 15. O mutante <i>xyIP::hsfA</i> é mais suscetível ao estresse de parede celular.....	75
Figura 16. A repressão de <i>hsfA</i> leva ao aumento da espessura da parede celular de <i>A. fumigatus</i>	77
Figura 17. HsfA exerce função na tolerância ao estresse oxidativo.....	78
Figura 18. O mutante <i>xyIP::hsfA</i> é mais sensível ao estresse de retículo.....	79
Figura 19. <i>hsfA</i> interage geneticamente com <i>pkcA</i> , <i>mpkA</i> e <i>sakA</i> durante o estresse de temperatura e de parede celular.....	81
Figura 20. A expressão dos genes <i>hsfA</i> e <i>hsp90</i> responde ao choque de temperatura e ao estresse de parede celular.....	83
Figura 21. O mutante <i>xyIP::hsfA</i> é sensível à inibição da Hsp90.....	84
Figura 22. Construção e validação do mutante <i>hsfA::luc</i>	85
Figura 23. Validação dos duplos mutantes <i>pkcA^{G579R} hsfA::luc</i> e <i>ΔmpkA hsfA::luc</i>	86
Figura 24. A perda de função dos reguladores da via CWI aumenta a expressão de HsfA em biofilmes de <i>A. fumigatus</i> durante o choque de temperatura e o estresse de parede celular.....	88
Figura 25. Construção e validação do mutante <i>hsp90P::luc</i>	89
Figura 26. Validação dos duplos mutantes <i>pkcA^{G579R} hsp90P::luc</i> , <i>ΔrlmA hsp90P::luc</i> , <i>ΔmpkA hsp90P::luc</i> e <i>xyIP::hsfA hsp90P::luc</i>	90
Figura 27. A perda de função dos reguladores da via CWI aumenta a expressão de <i>hsp90</i> em biofilmes de <i>A. fumigatus</i> sob o choque de temperatura e o estresse na parede celular.....	92
Figura 28. A repressão de <i>hsfA</i> aumenta a expressão de <i>hsp90</i> durante o choque de temperatura.....	93
Figura 29. Fenótipo de crescimento dos mutantes simples e duplos de <i>hsfA::luc</i> e <i>hsp90P::luc</i>	94

Figura 30. Resposta transcricional global das linhagens selvagem e <i>xyIP::hsfA</i> durante o choque de temperatura.....	97
Figura 31. O transcriptoma de <i>A. fumigatus</i> é modificado quando <i>hsfA</i> está reprimido.....	99
Figura 32. A repressão de <i>hsfA</i> impacta a expressão de genes relacionados à resposta ao choque térmico, parede celular, lipídios e metabolismo do ferro.....	101
Figura 33. Gráficos da quantificação de uma seleção de metabólitos secundários nas linhagens selvagem e <i>xyIP::hsfA</i>	107
Figura 34. HsfA é importante para a virulência em <i>Galleria mellonella</i>	108
Figura 35. Análise da expressão e purificação da proteína HsfA-GST.....	110
Figura 36. Esquema da relação entre HsfA-Hsp90 e a via CWI em <i>A. fumigatus</i> durante o choque de temperatura.....	116
Figura 37. Alinhamento e comparação das sequências de aminoácidos dos homólogos de Ole1 em diferentes organismos.....	119
Figura 38. Construção e validação do mutante <i>xyIP::sdeA</i>	120
Figura 39. Análise da expressão do gene <i>sdeA</i> por RT-qPCR no mutante condicional <i>xyIP::sdeA</i>	121
Figura 40. Construção e validação do mutante <i>sdeA::GFP</i>	122
Figura 41. Construção e validação do mutante <i>sdeA::3xHA</i> e do duplo mutante <i>xyIP::hsfA sdeA::3xHA</i>	123
Figura 42. Fenótipo de crescimento dos mutantes <i>sdeA:: GFP</i> , <i>sdeA::3xHA</i> e <i>xyIP::hsfA sdeA::3xHA</i>	124
Figura 43. A proteína SdeA está localizada no retículo endoplasmático.....	125
Figura 44. SdeA é essencial para a germinação de <i>A. fumigatus</i>	127
Figura 45. <i>sdeA</i> é essencial em <i>A. fumigatus</i> e tem papel sobre a conidiação.....	129
Figura 46. O gene <i>sdeA</i> parece não ser importante para a resposta ao estresse de parede celular.....	131
Figura 47. A perda de função de <i>sdeA</i> leva a uma grande redução da atividade metabólica na presença de caspofungin.....	132
Figura 48. O mutante <i>xyIP::sdeA</i> apresenta diferentes níveis de sensibilidade a drogas que provocam estresse oxidativo.....	133
Figura 49. O mutante <i>xyIP::sdeA</i> é auxotrófico para ácidos graxos monoinsaturados e sensível ao estresse de membrana plasmática.....	136
Figura 50. A perda de função de <i>sdeA</i> altera a proporção de fosfolipídios saturados e insaturados.....	141
Figura 51. Construção e validação do mutante $\Delta sdeB$ e dos duplo mutantes <i>xyIP::sdeA $\Delta sdeB$</i> e <i>sdeA::GFP $\Delta sdeB$</i>	143
Figura 52. <i>sdeB</i> não é importante para a tolerância ao estresse térmico em <i>A. fumigatus</i>	144
Figura 53. O mutante $\Delta sdeB$ possui capacidade de germinação e adesão similares à linhagem selvagem.....	145
Figura 54. O mutante $\Delta sdeB$ não é sensível ao estresse de membrana plasmática.....	147
Figura 55. <i>sdeB</i> regula negativamente a virulência de <i>A. fumigatus</i> em larvas de <i>G. mellonella</i>	148
Figura 56. <i>sdeA</i> interage geneticamente com <i>sdeB</i> a 30°C.....	150
Figura 57. <i>sdeB</i> é induzido na repressão de <i>sdeA</i> e SdeA é induzido na ausência de <i>sdeB</i>	152

Figura 58. O mutante <i>xyIP::hsfA</i> é sensível ao estresse de membrana plasmática....	159
Figura 59. A abundância de esfingolípídios aumenta na linhagem <i>xyIP::hsfA</i> durante o choque térmico...	161
Figura 60. Gráficos da concentração das classes de esfingolípídios nas linhagens selvagem, <i>xyIP::hsfA</i> e <i>xyIP::sdeA</i>	163
Figura 61. O mutante <i>xyIP::sdeA</i> acumula esfingolípídios com cadeias de ácido graxo saturadas....	165
Figura 62. A perda de função de <i>hsfA</i> altera a proporção de fosfolípídios insaturados durante o choque de temperatura.....	167
Figura 63. A repressão de <i>hsfA</i> reprime a expressão de <i>sdeA</i> e <i>sdeB</i>	170
Figura 64. A perda de função de <i>sdeA</i> e <i>sdeB</i> induz os níveis da proteína Hsp90.....	172
Figura 65. Os mutantes $\Delta mpkA$ e $\Delta sakA$ acumulam mais esfingolípídios.....	177
Figura 66. Gráficos da concentração de esfingolípídios nas linhagens selvagem, $\Delta sakA$ e mutantes da via CWI separadas por classes.....	179
Figura 67. O comprometimento da parede celular provoca o acúmulo de ergosterol em <i>A. fumigatus</i>	181
Figura 68. O mutante $\Delta mpkA$ é sensível à lovastatina e ao fluconazol.....	182
Figura 69. O mutante $\Delta sakA$ é sensível à miriocina e ao fluconazol.....	183
Figura A1. RT-qPCR de genes diferencialmente expressos selecionados na análise de RNA-Seq....	219
Figura C1. Quantificação de fosfolípídios nas linhagens selvagem, <i>xyIP::hsfA</i> e <i>xyIP::sdeA</i>	221
Figura D1. A repressão de <i>hsfA</i> provoca o acúmulo de esfingolípídios no choque de temperatura...	222
Figura E1. Os mutantes $\Delta mpkA$ e $\Delta sakA$ acumulam mais ceramidas, hidroxiceramidas, hidroxifitoceramidas e glucosilceramidas.....	223
Figura F1. Placas de TLC das linhagens selvagem, <i>pkcA^{G579R}</i> , $\Delta mpkA$, $\Delta rlmA$ e $\Delta sakA$...	224

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Genótipos das linhagens de <i>A. fumigatus</i> utilizadas neste trabalho.....	21
Tabela 2. Agentes e drogas utilizados para seleção de mutantes e nos ensaios de caracterização fenotípica das linhagens utilizadas neste trabalho.....	22
Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados para a construção e validação de construções das linhagens utilizadas neste trabalho.....	23
Tabela 4. Oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-qPCR.....	24
Tabela 5. Descrição da composição dos meios de cultura para cultivo de <i>A. fumigatus</i>	25
Tabela 6. Descrição da composição dos meios de cultura para cultivo de <i>E. coli</i>	26
Tabela 7. Descrição da composição dos meios de cultura para cultivo de <i>S. cerevisiae</i>	26
Tabela 8. Soluções para o preparo de meios de cultivo.....	26
Tabela 9. Soluções para transformação em <i>S. cerevisiae</i>	27
Tabela 10. Soluções de protoplastização para transformação em <i>A. fumigatus</i>	27
Tabela 11. Tampões para extração de macromoléculas.....	27
Tabela 12. Soluções para extração de DNA plasmidial de <i>E. coli</i>	28
Tabela 13. Soluções para quantificação de proteínas totais pelo método de Lowry modificado.....	28
Tabela 14. Tampões para eletroforese.....	29
Tabela 15. Soluções para <i>Southern blot</i>	29
Tabela 16. Soluções para a confecção, coloração e descoloração de gel SDS-PAGE.....	30
Tabela 17. Soluções para <i>Western blot</i>	30
Tabela 18. Tampão para co-imunoprecipitação de proteínas (Co-IP).....	31
Tabela 19. Géis para eletroforese de macromoléculas.....	31
Tabela 20. Um resumo dos termos GO enriquecidos entre os genes que foram regulados positivamente ou negativamente na comparação entre a linhagem <i>xyIp::hsfA</i> e a linhagem selvagem a 30°C sob indução (xilose).....	102

LISTA DE ABREVIATURAS

bp/pb - Pares de bases
BSA - Albumina bovina sérica
CASP - Caspofungin
CAF - Cafeína
CFW - Calcofluor white
Co-IP - Co-imunoprecipitação de proteínas
CR - Congo red
CWI - Integridade da parede celular
DTT - Ditionitrito
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
GFP - Proteína verde fluorescente
HOG - *High osmolarity glycerol*
HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência
HSE - Elementos de choque térmico
HSF - *Heat shock transcription factor*/ fator de transcrição de choque térmico
HSP - *Heat shock protein*/ proteína de choque térmico
LUC - Luciferase
MAPK - proteína quinase ativada por mitógenos
MET - Microscopia eletrônica de transmissão
MEV - *Multiple Experiment View*
MM - Meio mínimo
mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro
ORF - *Open reading frame*/ fase de leitura aberta
PBS - Tampão fosfato-salina
PCR - Reação em cadeia da polimerase
Pi - Fosfato inorgânico
PMSF - *Phenylmethanesulfonyl fluoride*
RT-qPCR - Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
q.s.p - Quantidade suficiente para
RE - Retículo endoplasmático
SDS - Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE - Dodecil sulfato de sódio - Eletroforese em gel de Poliacrilamida
STRE - *Stress Response Element*/ elemento de resposta ao estresse
TLC - *Thin Layer Chromatography*/ cromatografia de camada fina
UPR - *Unfolded protein response*/ resposta à proteína desenovelada
UV - Ultravioleta
WT - *Wild-type*/ linhagem selvagem

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1 O fungo filamentoso <i>Aspergillus fumigatus</i>	2
1.2 A resposta ao choque térmico	4
1.2.1 O fator de transcrição de choque térmico Hsf1	6
1.2.2 Termotolerância e resposta ao choque térmico de <i>A. fumigatus</i>	9
1.3 Termotolerância e o estresse de parede celular	11
1.4 Termotolerância e a dinâmica da fluidez da membrana plasmática	15
2. Objetivos	18
3. Materiais e Métodos	20
3.1 Linhagens de <i>A. fumigatus</i> utilizadas neste trabalho	21
3.2 Soluções estoque das drogas e agentes utilizados neste trabalho	22
3.3 Oligonucleotídeos	23
3.4 Meios de cultura	25
3.2.1 Meios de cultura para <i>A. fumigatus</i>	25
3.2.2 Meios de cultura para <i>Escherichia coli</i>	26
3.2.3 Meios de cultura para <i>S. cerevisiae</i>	26
3.3 Soluções e tampões	26
3.6 Géis para eletroforese	31
3.7 Construção dos cassetes gênicos para transformação em <i>A. fumigatus</i>	32
3.8 Protocolos adotados	34
3.8.1 Preparo de células competentes de <i>S. cerevisiae</i> e transformação	34
3.8.2 Extração do DNA de <i>S. cerevisiae</i>	35
3.8.3 Preparo de células competentes de <i>E. coli</i> e transformação	36
3.8.4 Mini preparação do DNA plasmidial	36
3.8.5 Transformação em <i>A. fumigatus</i>	37
3.8.6 Extração de DNA de <i>A. fumigatus</i>	39
3.8.6.1 Extração de DNA de micélio	39
3.8.6.2 Extração de DNA de conídios	40
3.8.7 Extração de proteínas de <i>A. fumigatus</i>	41
3.8.8 Extração de RNA de <i>A. fumigatus</i>	42
3.8.9 Análise da expressão gênica por RT-qPCR em tempo real	42
3.8.10 Extração de lipídios de <i>A. fumigatus</i>	43
3.8.11 Determinação de fosfato inorgânico	45
3.8.12 Análise de lipídios por espectrometria de massas	45
3.8.12.1 Esfingolipídios	45
3.8.12.2 Fosfolipídios	46
3.8.12.3 Ergosterol	48
3.8.13 Testes fenotípicos	49
3.8.14 Indução do estresse de temperatura e de parede celular	50
3.8.15 Análises de <i>Southern blot</i>	51
3.8.16 Análises de <i>Western blot</i>	53
3.8.17 Experimentos de co-imunoprecipitação de proteínas com GFP-Trap	54
3.8.18 Análises de microscopia	55
3.8.18.1 Microscopia eletrônica de transmissão	55
3.8.18.2 Microscopia óptica	56
3.8.18.3 Microscopia de fluorescência	56
3.8.19 Ensaio da formação de biofilme	56

3.8.20 Ensaio de viabilidade celular com XTT.....	56
3.8.21 Ensaio de atividade da luciferase (luc) em <i>A. fumigatus</i>	57
3.8.22 Análise de RNA-Seq.....	57
3.8.23 Análise de espectrometria de massas de metabólitos secundários.....	60
3.8.24 Teste de virulência em <i>Galleria mellonella</i>	60
3.8.25 Análises estatísticas.....	61
4. Resultados e Discussão.....	62
Módulo 4.1 Caracterização funcional do fator de transcrição HsfA de <i>A. fumigatus</i>.....	63
4.1.1 Construção das linhagens mutantes <i>xyIP::hsfA</i> e <i>tetOFF::hsfA</i>	63
4.1.2 Caracterização funcional do mutante <i>xyIP::hsfA</i> em <i>A. fumigatus</i>	68
4.1.2.1 O gene <i>hsfA</i> é essencial para o crescimento normal e para a termotolerância de <i>A. fumigatus</i>	69
4.1.2.2 HsfA exerce papel na adaptação ao estresse de parede celular e no remodelamento da parede celular.....	72
4.1.2.3 HsfA é importante na tolerância ao estresse oxidativo e de retículo endoplasmático.....	77
4.1.3 <i>hsfA</i> interage geneticamente com os genes <i>pkcA</i> , <i>mpkA</i> e <i>sakA</i>	80
4.1.4 HsfA e Hsp90 agem em conjunto para lidar com o choque térmico e o estresse de parede celular por meio da via CWI.....	82
4.1.5 HsfA modula a expressão de genes envolvidos na adaptação ao choque térmico, ao estresse de parede celular e à homeostase da membrana plasmática.....	94
4.1.6 A superexpressão de <i>hsfA</i> altera a expressão gênica mesmo na ausência do choque de temperatura.....	102
4.1.7 HsfA e o metabolismo secundário de <i>A. fumigatus</i>	104
4.1.8 O mutante <i>tetOFF::hsfA</i> apresenta virulência atenuada quando reprimido.....	107
4.1.9 Construção de mutantes de fusão de HsfA e expressão heteróloga da proteína HsfA.....	108
4.1.10 Discussão.....	111
Módulo 4.2 Caracterização funcional da dessaturase de ácidos graxos SdeA e do pseudogene <i>sdeB</i> de <i>A. fumigatus</i>.....	118
4.2.1 Identificação do homólogo SdeA ^{Ole1} em <i>A. fumigatus</i> e construção das linhagens <i>xyIP::sdeA</i> , <i>sdeA::GFP</i> e <i>sdeA::3xHA</i>	118
4.2.2 A proteína SdeA está localizada no retículo endoplasmático.....	125
4.2.3 Caracterização funcional do mutante <i>xyIP::sdeA</i> de <i>A. fumigatus</i>	126
4.2.3.1 O gene <i>sdeA</i> é essencial em <i>A. fumigatus</i>	126
4.2.3.2 O biofilme maduro do mutante <i>xyIP::sdeA</i> apresenta redução da atividade metabólica na presença de caspofungin.....	130
4.2.3.3 O mutante <i>xyIP::sdeA</i> apresenta diferenças na sensibilidade ao estresse oxidativo.....	132
4.2.4 SdeA é necessário para a síntese de ácidos graxos insaturados.....	133
4.2.5 A perda de função de <i>sdeA</i> compromete o <i>pool</i> de fosfolípidios de <i>A. fumigatus</i>	137
4.2.6 Identificação do pseudogene <i>sdeB</i> e construção dos mutantes Δ <i>sdeB</i> , <i>xyIP::sdeA</i> Δ <i>sdeB</i> e <i>sdeA::GFP</i> Δ <i>sdeB</i>	142
4.2.7 O mutante Δ <i>sdeB</i> não é suscetível aos estresses térmico, de parede celular, de membrana plasmática e oxidativo.....	144
4.2.8 O mutante Δ <i>sdeB</i> é hipervirulento em <i>G. mellonella</i>	147

4.2.9 <i>sdeA</i> e <i>sdeB</i> interagem geneticamente e suas expressões são interdependentes.....	148
4.2.10 Discussão.....	152
Módulo 4.3 A relação entre termotolerância e a composição da membrana plasmática de <i>A. fumigatus</i>.....	158
4.3.1 A repressão de <i>hsfA</i> aumenta a abundância de fosfolípidios insaturados e de esfingolipídios.....	158
4.3.2 HsfA controla a expressão de <i>SdeA</i> e <i>sdeB</i>	168
4.3.3 A perda de função de <i>sdeA</i> e <i>sdeB</i> induz a expressão de Hsp90.....	170
4.3.4 Discussão.....	173
Modulo 4.4 A relação entre a via de integridade da parede celular e a composição da membrana plasmática de <i>Aspergillus fumigatus</i>.....	176
4.4.1 A deleção das MAPKs <i>mpkA</i> e <i>sakA</i> provoca o acúmulo de esfingolipídios e ergosterol.....	176
4.4.2 O mutante $\Delta mpkA$ é suscetível à inibição da síntese de ergosterol, enquanto o mutante $\Delta sakA$ é suscetível à inibição da síntese de esfingolipídeos e ergosterol.....	181
4.4.3 Discussão.....	184
5. Conclusões.....	189
6. Referências Bibliográficas.....	192
Apêndices.....	218
Apêndice A.....	219
Apêndice B.....	220
Apêndice C.....	221
Apêndice D.....	222
Apêndice E.....	223
Apêndice F.....	224
Apêndice G.....	225

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1 O fungo filamentoso *Aspergillus fumigatus*

As espécies do gênero *Aspergillus* fazem parte de um amplo grupo de fungos cosmopolitas de grande importância industrial, farmacêutica, científica e ambiental (Baker 2008). Apesar de amplo, o gênero *Aspergillus* contém menos de 20 espécies que podem causar doenças em humanos (Steinbach 2008). No entanto, estas foram responsáveis por aproximadamente 20% das 75 mil internações causadas por fungos nos Estados Unidos em 2017, o que gerou um custo de \$1,2 bilhão de dólares ao país (Benedict et al. 2019). Destas espécies, *Aspergillus fumigatus* destaca-se como o principal e mais comum agente patogênico em humanos. Estima-se que as infecções causadas por *A. fumigatus*, bem como pelos fungos oportunistas *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, matam mais pessoas anualmente do que a malária e a tuberculose (Denning and Bromley 2015).

A. fumigatus é um fungo filamentoso e saprofítico encontrado de forma ubíqua em solos e em matéria orgânica em decomposição, onde desempenha um papel fundamental na reciclagem de carbono e nitrogênio (Alexopoulos et al. 1996; Perez-Nadales et al. 2014). Apesar de ser capaz de se reproduzir sexuadamente, este fungo se perpetua principalmente por meio da reprodução assexuada e formação de conídios, os quais são resistentes aos estresses ambientais, facilmente dispersos na atmosfera e, graças ao seu pequeno tamanho (2-3 µm de diâmetro), constantemente aspirados pelos seres humanos (Gigout et al. 1999). Em pessoas imunocompetentes, os conídios inalados são facilmente eliminados ao serem fagocitados pelos macrófagos alveolares do sistema imune inato (Ibrahim-Granet et al. 2003). Contudo, a inalação dos conídios de *Aspergillus* por indivíduos imunocomprometidos, tais como receptores de órgãos transplantados, portadores do vírus HIV e imunodeficientes, pode originar micoses profundas denominadas Aspergiloses (Gigout et al. 1999; Abad et al. 2010; Palousova et al. 2012). Estas doenças variam de acordo com a resposta imune anormal do hospedeiro e podem ser induzidas por tratamentos químicos, doenças autoimunes ou predisposições genéticas [revisado em Abad et al. (2010)]. Entre os diferentes tipos de Aspergiloses (Figura 1), as mais comuns são a aspergilose broncopulmonar

alérgica (ABPA), o aspergiloma e a aspergilose pulmonar invasiva (API). Durante a API, que é a forma mais grave da doença apresentando uma taxa de mortalidade que varia de 60% a 90%, os conídios escapam do sistema imune e germinam em hifas, as quais invadem o tecido pulmonar e colonizam a camada epitelial até atingir os capilares sanguíneos, disseminando-se para outros órgãos [revisado em Abad et al. (2010)]. Mesmo podendo ser causada por outras espécies do gênero, como *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nidulans* e *Aspergillus terreus*, 90% dos casos de API são exclusivamente originários de infecções por *A. fumigatus* (Denning 1998; Brown et al. 2012; Steinbach et al. 2012), indicando a existência de fatores de virulência específicos neste fungo que permitem mais facilmente a colonização do hospedeiro humano.

A virulência de *A. fumigatus* é multifatorial, ou seja, depende de uma variedade de genes e moléculas que de forma conjunta propiciam a adesão, colonização, disseminação e imunomodulação do fungo no hospedeiro (Rhodes et al. 2001). Dentre estes genes, destacam-se os relacionados à composição da parede celular, resistência à resposta imune, produção de metabólitos secundários e toxinas, resposta ao estresse oxidativo, aquisição de nutrientes e termotolerância (Abad et al. 2010; Plesofsky 2010).

O tratamento clínico da aspergilose é realizado utilizando-se drogas como a anfotericina B, um polieno que se liga aos esteróis da membrana celular fúngica; o voriconazol, um triazol que inibe a enzima lanosterol demetilase e conseqüentemente a síntese do ergosterol na membrana celular; e as equinocandinas caspofungin (CASP), anidulafungin e micafungin, as quais inibem a enzima β -1,3-glucana sintase e impedem a manutenção da integridade da parede celular (Perlin 2011; Herbrecht et al. 2012). No entanto, estudos mostraram que a terapia prolongada com azóis tende a promover a ocorrência de linhagens resistentes (Camps et al. 2012; Tashiro et al. 2012). Além disso, o tratamento é muitas vezes ineficaz devido à resistência intrínseca ao fármaco ou ao diagnóstico tardio, enquanto que altas concentrações dos fármacos acima mencionados, principalmente anfotericina B, também podem causar efeitos colaterais graves no paciente (Fanos and Cataldi 2000). Este cenário destaca a necessidade de novos alvos farmacológicos e abordagens terapêuticas para minimizar a mortalidade associada à API.

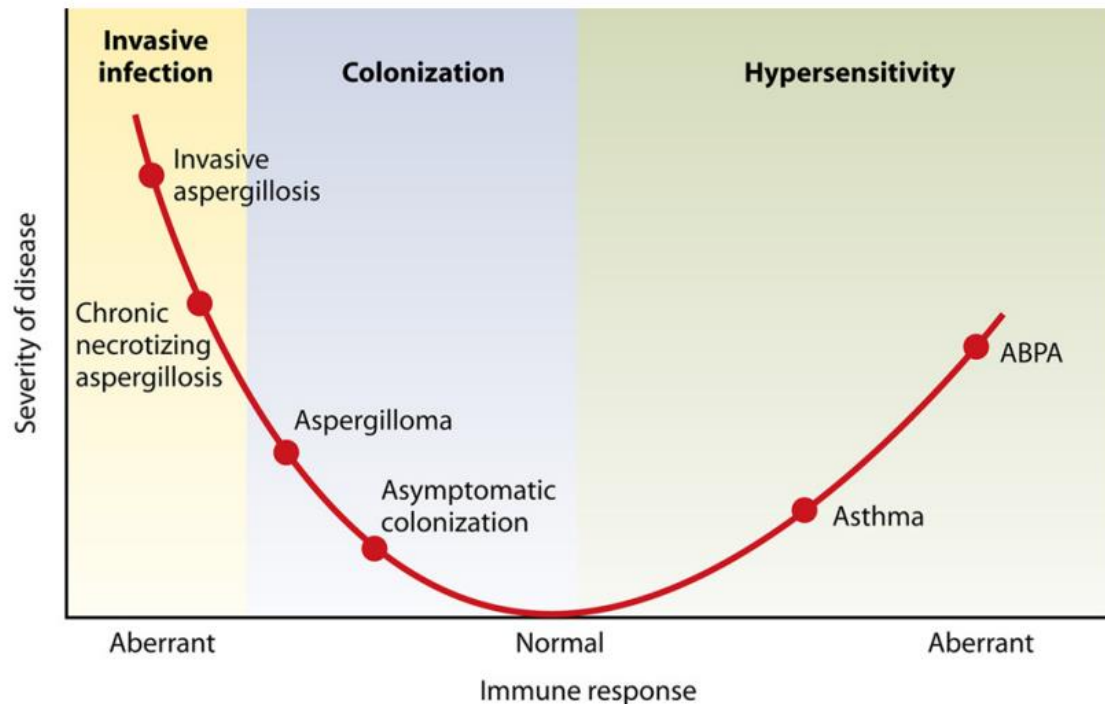


Figura 1. Representação diagramática das doenças causadas por espécies de *Aspergillus* em função da resposta imune do hospedeiro. O tipo de Aspergilose e gravidade da doença dependem do estado do sistema imune do hospedeiro. A aspergilose pulmonar invasiva (API) afeta indivíduos com sistema imunológico enfraquecido e é caracterizada por uma infecção que começa nos pulmões, mas se espalha para outros órgãos. O aspergiloma é o desenvolvimento de uma massa emaranhada de fungo, muco, tecido, células inflamatórias e proteínas de coagulação do sangue dentro dos pulmões, mas geralmente sem o aparecimento de sintomas. Quando o hospedeiro está em condição de hipersensibilidade, ele está suscetível à aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA), uma reação alérgica à inalação dos conídios de *Aspergillus* que pode gerar complicações quando o diagnóstico é tardio. Além destas doenças, espécies de *Aspergillus* podem também realizar a colonização assintomática do tecido pulmonar, causar asma e também a aspergilose necrozante crônica, sendo esta última uma forma localmente invasiva de aspergilose pulmonar que também ocorre em indivíduos gravemente imunocomprometidos. Extraído de Park and Mehrad (2009).

1.2 A resposta ao choque térmico

A temperatura é um dos parâmetros que continuamente são monitorados pelos seres vivos (Leach et al. 2012c; Leach and Cowen 2013). Além do desenvolvimento e conseqüente agregação inespecífica e inativação de proteínas, o choque de temperatura pode causar efeitos deletérios advindos destes problemas, tais como defeitos no citoesqueleto, comprometimento do transporte intracelular e da correta localização das organelas celulares, diminuição do processo de tradução, perturbação dos processos nucleares, mudanças na morfologia da membrana plasmática e interrupção do ciclo celular [revisado em Richter et al. (2010)].

Para impedir que estes problemas apareçam e comprometam o funcionamento celular, todos os organismos em condição de estresse por altas

temperaturas ativam um mecanismo adaptativo conhecido como resposta ao choque térmico [revisado em Verghese et al. (2012)]. Por meio deste, a expressão gênica da célula é alterada a favor da indução de diferentes genes, incluindo aqueles que codificam um grupo de proteínas específicas chamadas “*heat shock proteins*” (HSPs) ou proteínas de choque térmico (Parsell and Lindquist 1993; Truman et al. 2007; Plesofsky 2010). Estas proteínas são em sua maioria chaperonas moleculares que ajudam a célula a sobreviver em temperaturas mais elevadas e diante de outros tipos de estresse, pois, nessas situações, as HSPs diminuem a agregação de proteínas desnaturadas e auxiliam a restauração de suas conformações nativas (Hartl 1996). Além disso, algumas HSPs de diferentes organismos podem ser encontradas associadas à membrana plasmática ajudando a manter sua estabilidade durante condições de estresse (Toth et al. 2014). As HSPs fúngicas são divididas em seis grandes famílias: as Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 e as “*small*” HSPs (sHSPs) [revisado em Tiwari et al. (2015)]. Embora muitas dessas sejam constitutivamente expressas, as HSPs apresentam um aumento de expressão em células expostas ao choque térmico [revisado em Borges and Ramos (2005)].

A resposta ao choque térmico da levedura modelo *Saccharomyces cerevisiae* é regulada de maneira cooperativa por dois sistemas regulatórios: os fatores de transcrição Hsf1 e Msn2/Msn4 [revisado em Verghese et al. (2012)]. Apesar de haver genes cuja expressão é controlada especificamente por um dos dois fatores de transcrição, ambos sobrepõem-se significativamente no controle da expressão de certos alvos (Treger et al. 1998; Boy-Marcotte et al. 1999; Amoros and Estruch 2001). Hsf1 faz parte da família de fatores de transcrição de choque térmico (do inglês “*heat shock factors*” – HSFs) e é o principal responsável por ativar a transcrição das HSPs durante o choque térmico (Boy-Marcotte et al. 1999). Já os fatores de transcrição Msn2 e Msn4 são proteínas do tipo *zinc finger* que desempenham função de resposta a diferentes tipos de estresse, incluindo o térmico, ativando a expressão de genes específicos por meio da ligação ao elemento de resposta ao estresse (STRE) localizado nos promotores destes genes alvos (Martinez-Pastor et al. 1996), principalmente aqueles que codificam enzimas do metabolismo de carbono e proteínas de resposta ao estresse oxidativo e osmótico (Schmitt and McEntee 1996). Destaca-se ainda um terceiro fator de transcrição chamado Hac1, que é

responsável por desencadear a resposta a proteínas mal enoveladas (do inglês “*unfolded protein response*” – UPR) e ativar a expressão de genes cujos produtos promovem o enovelamento correto de proteínas no retículo endoplasmático e a degradação de proteínas enoveladas incorretamente (Urano et al. 2000).

1.2.1 O fator de transcrição de choque térmico Hsf1

Uma importante família de proteínas que se ligam ao DNA e regulam a transcrição de genes durante diferentes estresses, incluindo o de temperatura, são os fatores de transcrição de choque térmico (HSFs), os quais são conservados de fungos a humanos [revisado em Gomez-Pastor et al. (2018)]. Enquanto plantas e vertebrados possuem várias dessas proteínas [revisado em Akerfelt et al. (2010)], fungos são reconhecidos como portadores de apenas uma: o fator de transcrição Hsf1, que já foi amplamente estudado na levedura *S. cerevisiae* (Plesofsky 2004; Truman et al. 2007; Plesofsky 2010).

Assim como outros fatores de transcrição de choque térmico, Hsf1 é bastante conservado em eucariotos (Wu 1995). Hsf1 de *S. cerevisiae* (Figura 2), por exemplo, contém dois domínios de ativação, AR1 e AR2, localizados nas extremidades N e C-terminais da proteína [revisado em Veri et al. (2018b)]. Apesar de não serem necessários para o crescimento normal em condições basais, estes domínios são importantes para a resposta a variações de temperatura de curta e longa duração, respectivamente (Nieto-Sotelo et al. 1990; Sorger 1990). Já no meio da sequência proteica são encontrados um domínio de ligação ao DNA (DBD) na forma de hélice-volta-hélice, uma região *coiled-coil* hidrofóbica necessária para a oligomerização e um curto domínio regulatório chamado elemento conservado 2 (CE2), o qual reprime a atividade de Hsf1 mantendo-o em uma configuração inativa (Jakobsen and Pelham 1991; Wu 1995). Além disso, Hsf1 de levedura também apresenta um domínio modulador C-terminal (CTM) responsável por regular o domínio CE2 e por auxiliar a ligação a certas sequências de DNA (Sakurai and Fukasawa 2001).

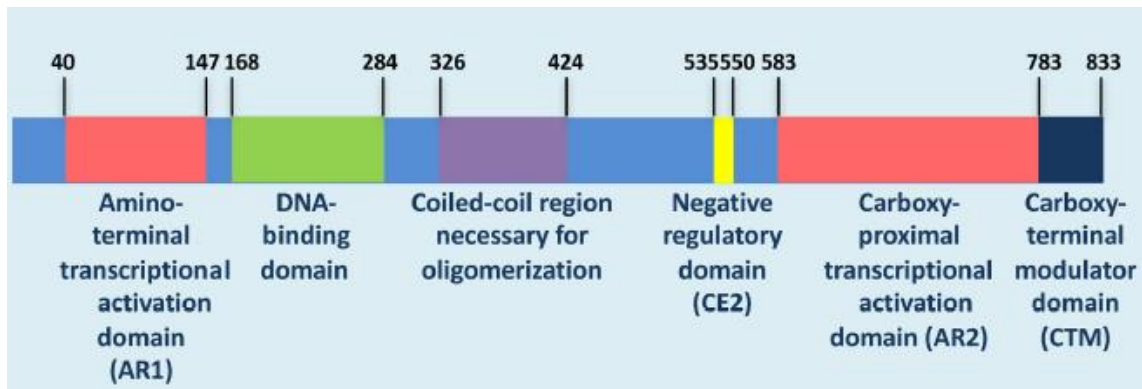


Figura 2. Esquema da organização estrutural da proteína Hsf1 de *S. cerevisiae*. Hsf1 de *S. cerevisiae*, como todo fator de transcrição, possui um domínio de ligação ao DNA (em verde) na forma de hélice-volta-hélice. Além disso, domínios de oligomerização (em roxo), de ativação transcricional (em vermelho) e regulatórios (em amarelo e azul escuro) estão presentes e permitem o correto funcionamento, ativação e regulação da atividade da proteína. Mais detalhes são descritos no texto. Retirado de Veri et al. (2018b).

Em *S. cerevisiae*, o gene *HSF1* é essencial (Wiederrecht et al. 1988) e a resposta ao choque térmico governada por ele possibilita a sobrevivência do organismo à subsequente exposição a altas e letais temperaturas (Yamamoto et al. 2008). Durante o choque de temperatura, Hsf1 liga-se fortemente a sequências específicas (nGAAn ou nTTCn) chamadas elementos de choque térmico (do inglês “*heat shock elements*” – HSE) nas regiões promotoras de certos genes alvos, como mostrado na Figura 3, induzindo a expressão de chaperonas moleculares e muitos outros genes relacionados à adaptação térmica (Sugiyama et al. 2000; Yamamoto et al. 2005; Do et al. 2009; Albrecht et al. 2010). Essa ligação de Hsf1 nas sequências HSE ocorre quando a proteína está em sua forma homotrimérica e pode se dar até mesmo na ausência de choque térmico (Sorger and Pelham 1987; Jakobsen and Pelham 1988; Wiederrecht et al. 1988; Sorger and Nelson 1989; Giardina and Lis 1995). Além da temperatura, a atividade transcricional de Hsf1 também é induzida por estresse oxidativo, tratamento com etanol e pela ausência completa de glicose (Liu and Thiele 1996; Hahn and Thiele 2004; Takemori et al. 2006; Hashikawa et al. 2007; Yamamoto et al. 2008). Em condições de estresse, a proteína Hsf1 de *S. cerevisiae*, que está constantemente fosforilada, é hiperfosforilada [revisado em Leach and Cowen (2013)], especialmente nos domínios CE2 e CTM mostrados na Figura 2 (Hoj and Jakobsen 1994; Hashikawa and Sakurai 2004). A fosforilação de Hsf1, no entanto, não é imprescindível para a ativação da proteína, mas sim importante para ajustar o nível da ativação de Hsf1

(Hashikawa et al. 2006; Zheng et al. 2016). Embora já se saiba que as quinases Yak1, Rim15 e Snf1 fosforilam Hsf1 em resposta à depleção de glicose (Hahn and Thiele 2004; Lee et al. 2008; Lee et al. 2013), a quinase que fosforila Hsf1 em condição basal e durante o choque de temperatura ainda é desconhecida.

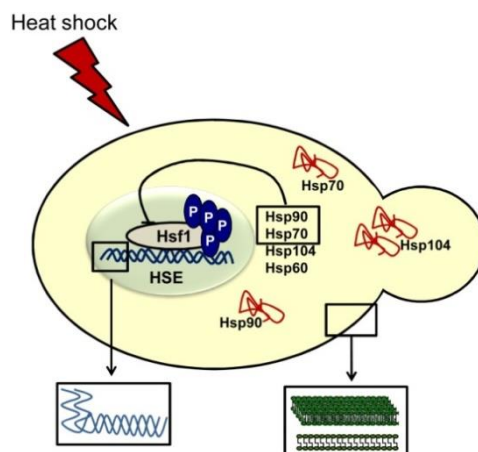


Figura 3. Mecanismo de funcionamento de Hsf1 em levedura durante o choque de temperatura. Diante de um choque térmico, Hsf1 de *S. cerevisiae* e *C. albicans* é hiperfosforilada e se liga a regiões HSEs em promotores-alvos, induzindo a expressão de proteínas chaperonas como Hsp60, Hsp70, Hsp90 e Hsp104, as quais auxiliam na estabilização e redobramento de proteínas desnaturadas. As Hsp90 e Hsp70, por *feedback* negativo, participam da regulação de Hsf1. Uma vez que o fator de transcrição Hsf1 é também cliente de Hsp90, o acúmulo de Hsp90 leva à menor expressão de Hsf1 (Leach et al. 2016). Quando exposta ao choque térmico, a membrana plasmática da célula tende a ficar mais fluida e seu conteúdo de RNA tende a sofrer mudanças. Extraído de Leach and Cowen (2013).

Por meio de ChIP-Array, foi inicialmente observado que 165 genes de *S. cerevisiae* envolvidos em diferentes processos são alvos diretos de Hsf1, a maioria após 5 a 15 minutos de indução do choque térmico (Hahn et al. 2004). Apesar disso, apenas 18 genes foram identificados como dependentes de Hsf1 em condições basais, isto é, na ausência de choque térmico, incluindo as chaperonas Hsp90, Hsp70 e Hsp104 (Solis et al. 2016). Outros genes alvos de Hsf1 identificados codificam proteínas com diferentes funções biológicas, incluindo degradação de proteínas, geração de energia, manutenção da integridade celular, organização da parede celular, síntese de trealose, transporte de proteínas e pequenas moléculas, sinalização celular e transcrição (Hahn et al. 2004; Yamamoto et al. 2005).

O fator de transcrição Hsf1 da levedura patogênica *C. albicans* é essencial para a viabilidade, é também fosforilado em resposta ao choque térmico e induz a resposta transcricional de genes relacionados ao estresse de temperatura, como as chaperonas Hsp70, Hsp90 e Hsp104 (Nicholls et al. 2009; Nicholls et al. 2011). Além disso, a depleção e a superexpressão de Hsf1 nesse fungo

promovem distintos programas morfogenéticos que culminam na filamentação da levedura, indicando que esta proteína também possui papel no desenvolvimento fúngico (Veri et al. 2018a). Na ausência de estresse, a Hsp90 de *C. albicans* é normalmente expressa em níveis relativamente altos, e acredita-se que essa chaperona reprime Hsf1 como mecanismo regulador (Leach et al. 2012a; Leach et al. 2012c). Durante o estresse térmico, no entanto, o desempenho da Hsp90 está sobrecarregado uma vez que muitas proteínas clientes sofrem problemas de enovelamento (Leach et al. 2012b). Portanto, nessa condição, presume-se que a Hsp90 não é mais capaz de reprimir a função de Hsf1, a qual, conseqüentemente, torna-se ativa e promove um aumento na expressão de Hsp90 para proteger a célula do choque térmico, até o excesso de Hsp90 se ligar a Hsf1, reprimindo-a novamente (Leach et al. 2012a; Leach et al. 2012b; Leach et al. 2012c) (Figura 3). Um comportamento semelhante foi observado sendo desempenhado pela chaperona Hsp70 de *S. cerevisiae* (Zheng et al. 2016), sugerindo que a ativação e funcionamento de Hsf1 em *S. cerevisiae* e *C. albicans* são regulados por *feedback* negativo pelas chaperonas Hsp70 e Hsp90, respectivamente, as quais são seus próprios alvos transcricionais.

Já no organismo modelo *Neurospora crassa*, um fungo filamentosamente haploide, há dois genes homólogos ao *HSF1*: *hsf1* e *hsf2*. Enquanto *hsf1* é um gene essencial e sua deleção só pode ser mantida em heterozigose, o gene *hsf2* é necessário para o desenvolvimento assexuado e conidiação (Thompson et al. 2008). De maneira semelhante, *HSF1* do patógeno *C. neoformans* é também essencial para o crescimento e sua superexpressão favorece a termotolerância (Yang et al. 2017). No entanto, apesar da proteína Hsf1 deste fungo ser fosforilada em resposta a elevadas temperaturas, a transcrição do gene *HSF1* é, de maneira surpreendente, regulada negativamente durante essa condição (Yang et al. 2017).

1.2.2 Termotolerância e resposta ao choque térmico de *A. fumigatus*

A relativa resistência dos mamíferos aos fungos é atribuída à combinação entre a atividade do sistema imune e a endotermia. Conseqüentemente, a temperatura mais elevada do sangue dos mamíferos cria um ambiente restritivo para a infecção fúngica (Garcia-Solache and Casadevall 2010). No entanto, fungos mais adaptados a sobreviverem em temperaturas elevadas, como é o

caso do fungo oportunista *A. fumigatus*, apresentam melhor *fitness* no hospedeiro homeotérmico, especialmente em condições imunossupressoras.

A. fumigatus é um organismo termofílico capaz de crescer em temperaturas de até 55°C e sobreviver na forma de conídios viáveis em temperaturas de até 70°C [revisado em Brakhage and Langfelder (2002) e Rhodes (2006)]. É muito comum, por exemplo, encontrar conídios desse fungo em pilhas de compostagem, onde temperaturas mais elevadas de até 60°C favorecem a prevalência de espécies termofílicas (Millner et al. 1977; Haas et al. 2016). Além disso, ao contrário de outras espécies de *Aspergillus* como *A. niger* e *A. flavus*, *A. fumigatus* adapta-se muito bem a alterações dramáticas de temperatura e germina normalmente em temperaturas elevadas (Araujo and Rodrigues 2004). Apesar de ser uma característica poligênica, a termotolerância é um dos principais determinantes de virulência reconhecidos em *A. fumigatus*, uma vez que permite a adaptação do fungo à temperatura corpórea do hospedeiro humano (Bhabhra and Askew 2005; Nierman et al. 2005; Albrecht et al. 2010).

Como em outros organismos, tanto a temperatura durante o crescimento como a temperatura à qual os conídios estão expostos exercem um efeito determinante na expressão gênica global de *A. fumigatus* (Sueiro-Olivares et al. 2015; Hagiwara et al. 2017). Durante a resposta ao choque de temperatura, HSPs e genes envolvidos no metabolismo de carboidratos, aminoácidos e lipídios, bem como no processo de tradução e produção de energia, são os mais modulados neste patógeno (Nierman et al. 2005; Do et al. 2009). Os fatores de transcrição responsáveis por essa modulação transcricional, no entanto, ainda não foram identificados.

O gene *hsfA* (Afu5g01900) é o homólogo de *HSF1* de *S. cerevisiae* que codifica o fator de transcrição putativo responsável pela regulação da resposta ao choque térmico em *A. fumigatus*. Os estudos descritos acima sugerem que *HSF1* é importante para a termotolerância de diferentes espécies fúngicas, bem como para outros processos celulares diversos, mas o papel de seu homólogo na resposta ao estresse de temperatura e em outros processos celulares ainda não foi bem descrito em *A. fumigatus*. Um estudo conduzido por Albrecht et al. (2010) identificou, pela técnica de eletroforese em gel bidimensional, proteínas responsivas ao choque térmico cujos genes apresentam domínio de ligação HSE e, portanto, são regulados putativamente por HsfA em *A. fumigatus*. Esse

domínio de ligação foi encontrado em genes que codificam as chaperonas HSPs, enzimas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo, transdução de sinal, metabolismo de carboidratos e nitrogênio, reorganização do citoesqueleto e biossíntese/tradução de proteínas (Albrecht et al. 2010). Contudo, essa interação entre o fator de transcrição HsfA e os genes alvo não foi validada experimentalmente. Além disso, a proteína quinase responsável pela fosforilação de HsfA ainda é desconhecida. Portanto, os mecanismos regulatórios desta resposta ainda não foram esclarecidos neste organismo.

Ao contrário de *S. cerevisiae*, *A. fumigatus* não possui homólogos dos fatores de transcrição Msn2/Msn4 (Fan et al. 2016). Porém, o domínio *zinc finger* do fator de transcrição SebA de *A. fumigatus* apresenta considerável homologia com o mesmo domínio das proteínas Msn2/Msn4, e a proteína SebA inclusive responde ao estresse oxidativo, térmico e de íons de cálcio (Dinamarco et al. 2012). Como a deleção desse gene reduziu a expressão de genes envolvidos na resposta ao choque térmico, acredita-se que SebA seja outra proteína chave na resposta ao choque de temperatura, através do reconhecimento de sequências promotoras diferentes daquelas do motivo STRE, mas também existe a hipótese de que SebA interaja com outros fatores de transcrição, como HsfA, modulando sua ativação (Dinamarco et al. 2012).

1.3 Termotolerância e o estresse de parede celular

A termotolerância não se relaciona apenas à resposta ao choque térmico e às proteínas desenoveladas. Durante a adaptação ao choque térmico, as células ativam vias de sinalização que afetam inúmeros processos e estruturas celulares, como a membrana plasmática, a maquinaria de transcrição e até mesmo a morfogênese e dimorfismo celular [revisado em Brown et al. (2010) e Leach and Cowen (2013)]. Como consequência, as HSPs fúngicas agem e interagem com muitas proteínas de diferentes vias de sinalização [revisado em Gong et al. (2017)]. Além disso, a perda da capacidade termotolerante ou dos próprios genes necessários para o crescimento em temperaturas mais elevadas leva muitas vezes à diminuição da virulência e até à morte de fungos patogênicos (Bhabhra et al. 2004; Lamoth et al. 2012).

Uma interessante relação é a conexão entre termotolerância e a homeostase da parede celular. A parede celular dos fungos consiste

essencialmente em uma estrutura rígida formada por polímeros de quitina, glucanas e mananas/galactomananas. A parede celular de *A. fumigatus* especificamente é composta principalmente por polímeros de β -1,3-glucana, α -1,3-glucana, galactomanana e quitina [revisado em Latge et al. (2017)]. Além de ser responsável por promover a integridade estrutural da célula e desempenhar um papel fundamental no crescimento e na morfogênese, a parede celular também é a primeira barreira entre o patógeno invasor e o ambiente intercelular do hospedeiro [revisado em Lee and Sheppard (2016)].

A biossíntese e manutenção da parede celular em organismos fúngicos são controladas pela cascata de transdução de sinal chamada via de integridade da parede celular (do inglês “*Cell Wall Integrity pathway*” – via CWI) [revisado em Dichtl et al. (2016)], esquematizada na Figura 4. Em *A. fumigatus*, a ativação dessa via se dá em resposta a estresses detectados pelos mecanossensores integrais Wsc1, Wsc2, Wsc3 e MidA localizados na membrana plasmática (Dichtl et al. 2012). Esses sensores, por sua vez, transmitem um sinal para a proteína quinase apical C (PkcA) via transmissão pelos fatores de troca de GDP/GTP Rom1 e Rom2 e a proteína Rho1, uma pequena Rho GTPase (Dichtl et al. 2012; Samantaray et al. 2013). PkcA, em seguida, ativa a cascata de três proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) por meio da fosforilação de Bck1 (MAPKKK), que ativa as quinases a jusante Mkk2 (MAPKK) e, finalmente, MpkA (MAPK) (Valiante et al. 2008; Valiante et al. 2009; Dirr et al. 2010; Rocha et al. 2015). Em *A. fumigatus*, MpkA fosforila e ativa o fator de transcrição RlmA (Rocha et al., dados não publicados), responsável por regular a expressão de genes relacionados à biossíntese da parede celular (Rocha et al. 2016). Além da via CWI, outras vias de sinalização como a via de alta osmolaridade do glicerol (do inglês “*High-Osmolarity Glycerol pathway*” – via HOG) também estão implicadas na resposta ao estresse de parede celular, muitas vezes colaborando com a via CWI [revisado em Rodriguez-Pena et al. (2010)]. Dada a importância da parede celular para a sobrevivência e também virulência de *A. fumigatus*, ela é considerada um atrativo alvo terapêutico, sendo inclusive o alvo de um dos principais grupos de antifúngicos (as equinocandinas) usados para tratar a API [revisado em Perlin (2011)].

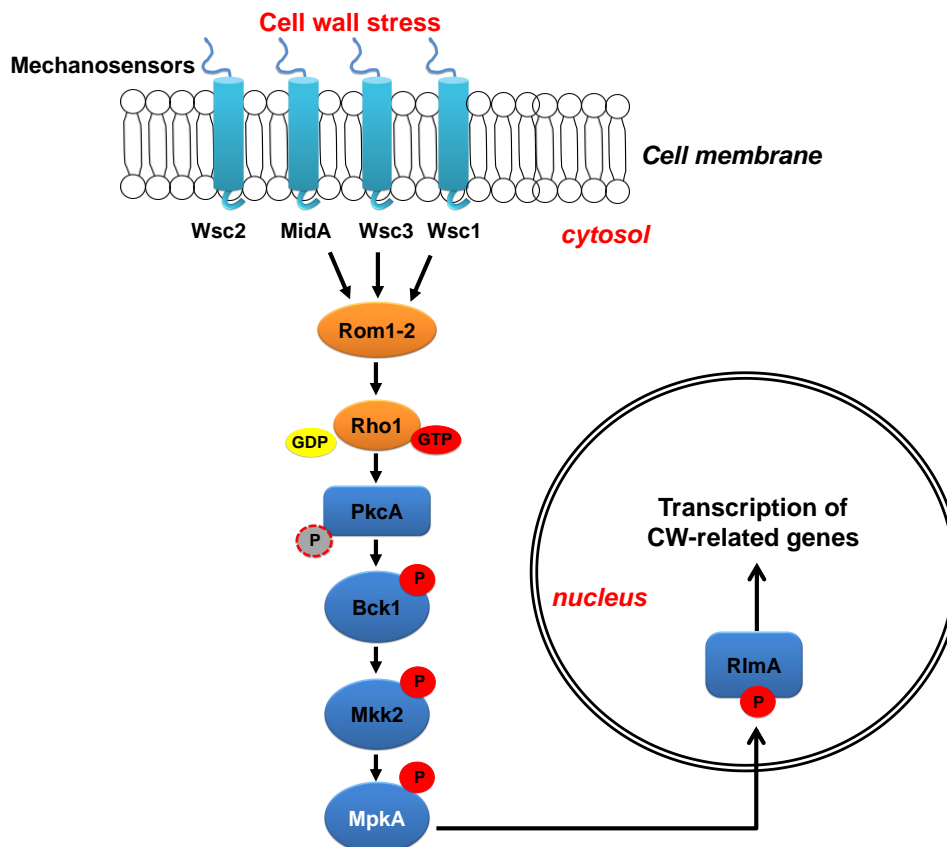


Figura 4. A via da integridade da parede celular (CWI) de *A. fumigatus*. A via CWI é ativada por mecanossensores localizados na membrana plasmática (Wsc1, Wsc2, Wsc3 e MidA) (Rajavel et al. 1999; Lesage and Bussey 2006; Levin 2011; Dichtl et al. 2016). Estes sensores de superfície celular detectam diferencialmente estresses em *A. fumigatus*, como o de parede celular e até mesmo o estresse de temperatura, e transmitem um sinal às pequenas Rho GTPases (Rho 1, Rho2 e Rho4) (Dichtl et al. 2012; Samantaray et al. 2013). Rho1 é ativada pelos fatores de troca de GTP Rom1 e Rom2 e passa a ativar a proteína quinase C (PkcA) (Samantaray et al. 2013). Esta por sua vez ativa a cascata de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), por meio da fosforilação de Bck1 (uma MAPKKK), a qual então ativa as quinases a jusante Mkk2 (uma MAPKK) e finalmente MpkA (uma MAPK) (Valiante et al. 2008; Malavazi et al. 2014; Rocha et al. 2015). RlmA é o fator de transcrição dessa via e, uma vez ativado por MpkA, regula a transcrição de genes relacionados à manutenção da parede celular (Rocha et al. 2016; Rocha et al. dados não publicados). Extraído e modificado de Fabri et al. (2019).

Alguns estudos já mostraram que a via CWI também é ativada pelo estresse de temperatura (Verna et al. 1997; Zu et al. 2001; Lam et al. 2013). Nesse contexto, termotolerância e parede celular parecem se conectar em muitos aspectos. Em hifas de *C. albicans*, por exemplo, o estresse térmico leva ao espessamento da parede celular (Ikezaki et al. 2019). Além disso, no fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*, a perda de função de *hsf1* causa uma maior sensibilidade ao agente estressor de parede celular Congo red (CR) e uma maior taxa de protoplastização, indicando que a parede celular deste fungo é fragilizada na ausência de *hsf1* (Zhou et al. 2018). Ademais, anteriormente já foi

sugerido que Hsf1 regula a expressão de genes envolvidos na formação e remodelamento da parede celular em *S. cerevisiae* em resposta ao choque de temperatura (Imazu and Sakurai 2005; Yamamoto et al. 2005). Uma importante conexão entre a termotolerância e a integridade da parede celular é mantida pela chaperona Hsp90, que é essencial em *A. fumigatus* (Borkovich et al. 1989). Algumas “proteínas clientes” dessa chaperona são a calcineurina, proteínas relacionadas à resistência a agentes antifúngicos e a MAPK da via CWI (Mpk1 em *S. cerevisiae* e *C. albicans*), todas com papel na parede celular (Cowen and Lindquist 2005; Cowen 2009). Em *S. cerevisiae* foi demonstrado que sem a expressão de Hsp90 dirigida pelo fator de transcrição Hsf1 em situações de estresse térmico, a integridade da parede celular frente à exposição a elevadas temperaturas é comprometida (Truman et al. 2007). Isto, por sua vez, leva à ausência da expressão de genes que promovem a integridade da parede celular durante a exposição a elevadas temperaturas e, conseqüentemente, a parede celular é enfraquecida quando exposta a temperaturas elevadas (Truman et al. 2007). Em *C. albicans*, a depleção de Hsp90 afeta a biogênese da parede celular por prejudicar a ativação de Mpk1 e outras MAPKs (Leach et al. 2012a). Além disso, a Hsp90 potencializa a resistência de *C. albicans* e *A. fumigatus* a drogas que afetam a parede celular fúngica (as chamadas equinocandinas), uma vez que a depleção desta chaperona torna a célula mais suscetível a esses agentes antifúngicos (Cowen and Lindquist 2005; Cowen 2009; LaFayette et al. 2010). Um efeito semelhante também foi observado em *C. neoformans* (Chatterjee and Tatu 2017) e no dermatófito *Trichophyton rubrum* (Jacob et al. 2015). Outra evidência da relação entre termotolerância e parede celular em fungos é a localização de Hsp90 na parede celular de *C. neoformans* em condição basal (Chatterjee and Tatu 2017), e também na parede de *A. fumigatus* na presença de estresse de parede celular (Lamoth et al. 2012).

Recentemente, por meio de experimentos químicos e de biologia molecular, foi mostrado que a Hsp90 de *A. fumigatus* interage com as proteínas da via CWI PkcA, MpkA e RlmA e que essa mesma via regula a expressão de genes envolvidos na adaptação térmica (Rocha et al. 2020b). Além disso, o choque térmico diminui expressivamente a viabilidade dos conídios dos mutantes da via CWI (Rocha et al. 2020b). Particularmente, como a transcrição de Hsp90 é dependente da função do fator de transcrição Hsf1 e como Hsp90

desempenha importante papel na manutenção da função dos genes envolvidos na via CWI, há uma correlação direta entre o estresse de parede celular e o estresse de temperatura, a qual necessita ser melhor estudada em *A. fumigatus*. Tendo em vista essas conexões e o fato de que o aumento da temperatura pode causar uma maior sensibilidade a drogas que afligem a parede celular de *A. fumigatus* (Zeng et al. 2014), uma ação conjunta visando uma resposta limitada do fungo para lidar com o estresse de temperatura e o estresse da parede celular constitui uma abordagem atraente para a terapia antifúngica.

1.4 Termotolerância e a dinâmica da fluidez da membrana plasmática

As membranas biológicas são fundamentais para a vida da célula eucariótica tendo em vista as inúmeras funções que desempenham, tais como: separar e manter as diferenças características entre os conteúdos de cada organela, do citosol e do meio extracelular; possuir receptores que funcionam como sensores de sinais externos e de reconhecimento do ambiente; abrigar proteínas que catalisam o transporte seletivo de moléculas ou atuam como enzimas metabólicas; e desempenhar papel regulatório nos eventos de transdução de sinal (Daum et al. 1998; Alberts et al. 2007).

Estruturalmente, a membrana plasmática é composta predominantemente por lipídios (fosfolipídios, esteróis e esfingolipídios) e proteínas organizados em uma bicamada dinâmica e fluida (Daum et al. 1998; Alberts et al. 2007). Os fosfolipídios são os lipídios estruturais primários da membrana plasmática. Sua estrutura composta por um grupo polar ligado a um esqueleto de glicerol-3-fosfato com duas cadeias de ácido graxo dá à molécula uma natureza anfipática, o que possibilita a formação de bicamadas lipídicas e a manutenção de propriedades como o potencial de superfície da membrana [revisado em Henderson and Block (2014)]. Os esfingolipídios por sua vez são componentes lipídicos mais complexos, compostos por uma longa cadeia de base esfingoide ligada a uma cadeia de ácido graxo, a qual pode se ligar a um grupo polar de uma ou mais unidades de açúcar [revisado em Fernandes et al. (2018)]. Essas moléculas formam as jangadas lipídicas (do inglês “*lipid rafts*”), que são importantes para a polaridade celular, a transdução de sinal e o tráfego de proteínas da membrana [revisado em Rella et al. (2016)]. Outro componente das jangadas lipídicas é o ergosterol, o principal esterol em fungos e fundamental

para a elasticidade, permeabilidade e integridade da membrana plasmática [revisado em Alcazar-Fuoli et al. (2008)].

Em muitos microrganismos, a membrana plasmática atua como um sensor térmico, pois é uma das primeiras estruturas celulares a detectar flutuações da temperatura ambiental, alterando consideravelmente sua fluidez e outras propriedades (Digel 2011; Shapiro and Cowen 2012). A fluidez da membrana celular depende do número de ácidos graxos insaturados presentes nos lipídios da membrana, já que o equilíbrio entre os ácidos graxos saturados e insaturados determina o estado fluido da membrana biológica durante as variações de temperatura (Digel 2011; Nguyen et al. 2011; Shapiro and Cowen 2012; Leach and Cowen 2014). A uma temperatura mais baixa, por exemplo, bactérias, leveduras e outros organismos tendem a sintetizar ácidos graxos com mais insaturações do tipo *cis* a fim de evitar a redução da fluidez da membrana, mantendo-a relativamente constante (Alberts et al. 2007). Estudos também já mostraram que a levedura *S. cerevisiae* sintetiza cadeias de ácidos graxos mais longas quanto maior a temperatura ambiente, afetando também a fluidez da membrana (Klose et al. 2012). Além disso, no fungo patogênico *Histoplasma capsulatum* crescendo em temperaturas elevadas, a adição de ácido palmítico, um ácido graxo saturado, ao meio induz a transcrição de genes de choque térmico, enquanto a adição de ácido oleico, um ácido graxo insaturado, reprime a transcrição dos mesmos (Maresca and Kobayashi 1993).

Em leveduras, a síntese de ácidos graxos monoinsaturados é catalisada por uma enzima do retículo endoplasmático chamada estearoil-CoA dessaturase ou $\Delta 9$ -ácido graxo dessaturase, que é codificada pelo gene essencial *OLE1* (Stukey et al. 1990; Martin et al. 2007; Nguyen et al. 2011). Esta enzima tem como substratos palmitoil (16:0) e estearoil (18:0) CoA e gera como produtos ácido graxo palmitoleico (16:1) e oleico (18:1) (Martin et al. 2007), os quais irão compor os fosfolipídios da membrana plasmática. Em *C. albicans*, o homólogo de *OLE1* também é essencial e necessário para o processo de morfogênese das hifas e formação de estruturas reprodutivas chamadas clamidósporos (Krishnamurthy et al. 2004). Diferentemente, o homólogo de *OLE1* em *A. nidulans* (chamado de *sdeA*) não é essencial, mas desempenha um papel importante na produção de conídios e ascósporos (Wilson et al. 2004). Enquanto

isso, o homólogo de *OLE1* em *A. fumigatus* não foi caracterizado até bem recentemente, sendo também um gene essencial (Wang et al. 2021).

Estudos anteriores já mostraram que *OLE1* também parece estar relacionado à resposta ao choque térmico. A transcrição de *OLE1* em leveduras é induzida em resposta à baixa temperatura (Nakagawa et al. 2002; Sahara et al. 2002; Schade et al. 2004), reiterando seu papel durante a adaptação térmica. Em *C. neoformans*, um estudo do perfil de transcrição durante o crescimento em alta temperatura identificou uma modulação do ativador transcricional *MGA2*, cujo homólogo em *S. cerevisiae* regula a transcrição de *OLE1* (Zhang et al. 1999; Kraus et al. 2004), sugerindo que *C. neoformans* também requer o remodelamento da membrana celular durante o estresse de temperatura através da enzima Ole1 (Leach and Cowen 2013). Além disso, a depleção de *OLE1* em *C. albicans* impede a ativação completa do fator de transcrição de choque térmico Hsf1, o que diminui a expressão das HSPs em resposta ao choque térmico (Leach and Cowen 2014). Ademais, a expressão gênica de HSPs em *H. capsulatum* também é modulada tanto pelo nível de expressão do *OLE1* quanto pela adição de ácidos graxos saturados ou insaturados no meio de cultivo (Carratu et al. 1996; Porta et al. 2010). Embora essa relação entre a fluidez da membrana e a resposta ao choque térmico tenha sido verificada em células de mamíferos (Balogh et al. 2005; Nagy et al. 2007) e em diferentes organismos fúngicos, ela ainda não foi investigada no patógeno *A. fumigatus*.

Uma série de estudos em diferentes organismos já mostrou que algumas moléculas lipídicas funcionam como mensageiros da percepção de calor e participam da transdução deste sinal até a ativação de Hsf1, indicando que as modificações da membrana podem modular a atividade deste fator de transcrição [revisado em Torok et al. (2014)]. Considerando que moléculas de fosfolipídios (Klose et al. 2012), esfingolipídios (Patton et al. 1992; Dickson et al. 1997; Jenkins et al. 1997; Luberto et al. 2001; Cowart et al. 2003; Cowart et al. 2010; Tereshina et al. 2013; Munshi et al. 2018) e esteróis (Swan and Watson 1998; O'Meara et al. 2016) estão implicadas na resposta ao choque térmico de diferentes fungos, é notável que existe uma relação concisa entre a dinâmica da membrana celular e a mudança de temperatura que em *A. fumigatus* continua sendo um campo aberto a ser explorado.

2. OBJETIVOS

2. Objetivos

Este trabalho teve como objetivos caracterizar funcionalmente o fator de transcrição HsfA^{HSF1} e investigar em detalhes a rede reguladora governada por ele, bem como desvendar o potencial papel desta proteína na tolerância ao estresse térmico, na integridade da parede celular e na composição lipídica da membrana plasmática do fungo *A. fumigatus*. Adicionalmente, uma vez que existe uma estreita relação entre o choque de temperatura, o reforço da parede celular e a composição e fluidez da membrana plasmática, a função do gene *sdeA* de *A. fumigatus* (o homólogo de *OLE1* em levedura) nestes processos também foi estudada.

Para tanto, os objetivos específicos deste trabalho foram:

- A. Isolamento e caracterização fenotípica de mutantes para o gene *hsfA*.
- B. Análise dos níveis proteicos de HsfA durante o estresse térmico e de parede celular.
- C. Análise transcricional global por RNA-Seq da linhagem condicional *xyIP::hsfA* durante o choque de temperatura.
- D. Análise da interação genética entre *hsfA* e os componentes da via da integridade da parede celular *pkcA*, *mpkA* e *sakA* por meio da construção de duplo mutantes.
- E. Isolamento e caracterização fenotípica de mutantes para o gene *sdeA*.
- F. Análise da localização subcelular e expressão de SdeA durante o estresse de temperatura.
- G. Análise lipidômica por cromatografia e espectrometria de massas de diferentes linhagens mutantes visando o estudo da relação entre termotolerância, manutenção da parede celular e homeostase da membrana plasmática.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. Materiais e Métodos

3.1 Linhagens de *A. fumigatus* utilizadas neste trabalho

Tabela 1. Genótipos das linhagens de *A. fumigatus* utilizadas neste trabalho.

Linhagem	Genótipo	Referência
\DeltaakuB^{KU80}	$\DeltaakuB; pyrG- MAT1-1$	(da Silva Ferreira et al. 2006)
$xyIP::hsfA$	$pyrG::xyIP::hsfA; \DeltaakuB$	Este trabalho
$tet_{OFF}::hsfA$	$pyrG::tet_{OFF}::hsfA; \DeltaakuB$	Este trabalho
$pkcA^{G579R}$	$pkcA^{G579R}::pyrG; \DeltaakuB$	(Rocha et al. 2015)
$pkcA^{G579R} pyrG-$	$pkcA^{G579R}; \DeltaakuB$	(Rocha et al. 2020b)
$\Delta mpkA$	$\Delta mpkA::ptrA; \DeltaakuB$	(Valiante et al. 2009)
$\Delta mpkA::mpkA^+$	$\Delta mpkA::mpkA::hph; \DeltaakuB$	(Valiante et al. 2009)
$\Delta sakA$	$\Delta sakA::hph; \DeltaakuB$	(Altwasser et al. 2015)
$\Delta sakA::sakA^+$	$\Delta sakA::sakA::ptrA; \DeltaakuB$	(Altwasser et al. 2015)
$\Delta rlmA$	$\Delta rlmA::pyrG; \DeltaakuB$	(Rocha et al. 2016)
$pkcA^{G579R} xyIP::hsfA$	$pkcA^{G579R}; pyrG::xyIP::hsfA; \DeltaakuB$	Este trabalho
$\Delta mpkA xyIP::hsfA$	$\Delta mpkA::ptrA; pyrG::xyIP::hsfA; \DeltaakuB$	Este trabalho
$\Delta sakA xyIP::hsfA$	$\Delta sakA::hph; pyrG::xyIP::hsfA; \DeltaakuB$	Este trabalho
$hsp90P::luc$	$hsp90P::luc::hph; \DeltaakuB$	Este trabalho
$\Delta rlmA hsp90P::luc$	$\Delta rlmA::pyrG; hsp90P::luc::hph; \DeltaakuB;$	Este trabalho
$pkcA^{G579R} hsp90P::luc$	$pkcA^{G579R}::pyrG; hsp90P::luc::hph; \DeltaakuB$	Este trabalho
$\Delta mpkA hsp90P::luc$	$\Delta mpkA::ptrA; hsp90P::luc::hph; \DeltaakuB$	Este trabalho
$xyIP::hsfA hsp90P::luc$	$hsp90P::luc::hph; pyrG::xyIP::hsfA; \DeltaakuB$	Este trabalho
$hsfA::luc$	$hsfA::luc::pyrG; \DeltaakuB$	Este trabalho
$pkcA^{G579R} hsfA::luc$	$pkcA^{G579R}; hsfA::luc::pyrG; \DeltaakuB$	Este trabalho
$\Delta mpkA hsfA::luc$	$\Delta mpkA::ptrA; hsfA::luc::pyrG; \DeltaakuB$	Este trabalho
$xyIP::sdeA$	$pyrG::xyIP::sdeA; \DeltaakuB$	Este trabalho
$sdeA::GFP$	$sdeA::GFP::pyrG; \DeltaakuB$	Este trabalho
$sdeA::3xHA$	$sdeA::3xHA::ptrA; \DeltaakuB$	Este trabalho

<i>xylP::hsfA sdeA::3xHA</i>	<i>xylP::hsfA::pyrG; sdeA::3xHA::ptrA; ΔakuB</i>	Este trabalho
<i>ΔsdeB*</i>	<i>ΔsdeB::ptrA; ΔakuB</i>	Este trabalho
<i>ΔsdeB*::sdeB+</i>	<i>ΔsdeB::sdeB; ΔakuB</i>	Este trabalho
<i>xylP::sdeA ΔsdeB*</i>	<i>pyrG::xylP::sdeA; ΔsdeB::ptrA; ΔakuB</i>	Este trabalho
<i>sdeA::GFP ΔsdeB*</i>	<i>sdeA::GFP::pyrG; ΔsdeB::ptrA; ΔakuB</i>	Este trabalho

* *sdeB* está anotado como um pseudogene no genoma da linhagem A1163. Vide texto para detalhes.

3.2 Soluções estoque das drogas e agentes utilizados neste trabalho

Tabela 2. Agentes e drogas utilizados para seleção de mutantes e nos ensaios de caracterização fenotípica das linhagens utilizadas neste trabalho.

Droga	Mecanismo de ação	Estoque
CFW	Liga-se a cadeias de quitina, enfraquecendo a parede celular	10 mg/ml em água
CR	Liga-se a cadeias de quitina, enfraquecendo a parede celular	10 mg/ml em água
SDS	Ação detergente na membrana plasmática	10% em água
Cafeína	Inibição de fosfodiesterases e interferência na quinase TOR	735 mM em água
Radicolol	Inibição da Hsp90	5 mg/ml em etanol 100%
CASP	Inibição da síntese de β-1,3-glucana	5 mg/ml em água
Fluconazol	Inibição de enzimas da síntese de ergosterol pela ligação ao citocromo P-450	10 mg/ml em água
DTT	Promove o desenovelamento de proteínas, interferindo no transporte do RE para o complexo de Golgi	1 M em água
Paraquat	Produz radicais superóxido (O ⁻²), peróxido (H ₂ O ₂) e hidroxila (OH), que promovem o estresse oxidativo	1 M em água
Diamida	Promove a oxidação de cisteínas, desfazendo pontes dissulfeto	1 M em água
Menadiona	Libera ânion O singlete (O ⁻¹), que promove o estresse oxidativo	1 M em água
Peróxido de Hidrogênio	Promove o estresse oxidativo	30% (9,8 M; comercial)
Fludioxonil	Relacionado ao estresse oxidativo e osmótico	10 mg/ml em água
Anfotericina B	Liga-se a esteróis e altera a permeabilidade das membranas	250 µg/ml em água

Voriconazol	Inibição de enzimas da síntese de ergosterol	1 mg/ml em DMSO
Miriocina	Inibe a síntese de esfingolipídios	8,33 mg/ml em etanol 100%
Lovastatina	Inibe a síntese de ergosterol	25 mg/ml em Tris-HCl 25 mM, pH 8
Cerulenina	Inibe a síntese de ácidos graxos	5 mg/ml em etanol
Trans-chalcona	Inibe a síntese de ácidos graxos	10 mg/ml em DMSO
Aureobasidina A	Inibe a síntese de inositolfosforil ceramidas	2,5 mg/ml em etanol 100%
ZnSO ₄	Promove estresse por metais em altas concentrações	1 M em água
Piritiamina	Usada como droga de seleção para o gene marcador auxotrófico <i>ptrA</i>	1 mg/ml em água
Higromicina	Usada como droga de seleção para o gene marcador auxotrófico <i>hph</i>	50 mg/ml em PBS
Doxiciclina	Antibiótico usado para reprimir o promotor condicional <i>tet_{OFF}</i>	10 mg/ml em água
Ampicilina	Antibiótico usado como droga de seleção de <i>Escherichia coli</i> contendo o marcador AmpR	10 mg/ml em etanol 70%

3.3 Oligonucleotídeos

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados para a construção e validação de construções das linhagens utilizadas neste trabalho.

Nome do primer	Sequência
pRS426 HsfA tet 5UTR FW	5'- gtaacgccagggtttccagtcacgacg CACTCGCCTCTGTCCA-3'
HsfA 5UTR tet pyrG RV	5'- <u>gtgcctcctctcagacagagaat</u> CAATCATCTCGCGCTATCATA-3'
pyrG FW	5'-GGAATTCTGTCTGAGAGGAGGC-3'
pyrG REV	5'-GATATCGAATTCGCCTCAAAC-3'
pyrG 200 REV	5'-ATCGTCAAGGTTTTCCCTTG-3'
xylP pyrG FW	5'- <u>agcattgttgaggcgaattc</u> ACTGATGCGAGCAACAG-3'
xylP RV	5'-GGTTGGTTCTTCGAGTCG-3'
HsfA 2 xylP 5UTR FW	5'- <u>catcgactcgaagaaccaacc</u> TTTAGCGCTCGCAGTG-3'
HsfA 2 5UTR RV pRS426	5'- gcgataacaatttcacacaggaacagc TACAGGCGACAGACTTGA-3'
HsfA 600 ups	5'-TCGACGGGAGGATTTATACG-3'
HsfA 1400 5F	5'- gtaacgccagggtttccagtcacgacg ATCAACAAGTTGAGGAGAGAGCA-3'
HsfA ORF REV GFP	5'- <u>agttctctccttactcat</u> AGCCTTCCTGCGCCGTTTC-3'
GFP FW	5'-ATGAGTAAAGGAGAAGAAGACT-3'
HsfA 3F	5'- <u>aagagcattgttgaggcgaattc</u> gatatcACTTGGCTTCGAGTCAATAAAAA-3'
HsfA 3R	5'- gcgataacaatttcacacaggaacagc CAAACACCGTCCCAAGACG-3'
HsfA Lucif Rv	5'- <u>gttcttggcgtcctccat</u> AGCCTTCCTGCGCC-3'
Luc FW	5'- ATGGAGGACGCCAAGAAC-3'
Luc REV	5'- <u>tgctcctctcagacagagaat</u> CTAGACGGCGATCTTGCC-3'
HsfA 3UTR pyrG FW	5'- <u>gcattgttgaggcgaattc</u> TGTTACATGACATCTACTAATTG-3'
HsfA 3UTR pRS426 RV	5'- gcgataacaatttcacacaggaacagc GCCATCTACCAGCCAGT-3'
HsfA 900 FW	5'-TCCCCAGAGCGACATAATGT-3'
pRS426 5UTR pyrG FW	5'- gtaacgccagggtttccagtcacgacg TCCCCTATCCGCACAG-3'
5UTR pyrG RV	5'-CGTGGGAATGGAGGGT-3'

Hsp90P pyrG FW	5'- <u>accctccattcccacg</u> CGATCCCTCGTTTTAGATGAT-3'
Hsp90P RV luc	5'- <u>cggtgaccatggtgtttta</u> GATGGCGGAGGGAGA-3'
Luc 2 FW	5'-TTAAACACCATGGTCACCG-3'
pyrG 3UTR pRS426 RV	5'- gcgataacaatttcacacaggaacagc CCTCCTTCTCCGCTCT-3'
pyrG 500 ups	5'-TGAGATACTGAGTCAGAAGA-3'
pkcA GC FW	5'-TTGTCATGCTCAATGTAICTCACCTTGTCCCTGACTTTTGTCCGATGTCCA-3'
Afu5g11970 3R	5'-TCGTCATTTGTATTACCTGCCA-3'
RImA 600 ups	5'-GAATGAGAAGAAAGGAGGAATGA-3'
MpkA 600 ups	5'-GAGCCCTGACTTCACTGCA-3'
MpkA 5F §	5'-CTCATTCCCTTGTCTGATGCG-3'
MpkA 3R	5'- gcgataacaatttcacacaggaacagc TCAAGACTTTCCAGTTCCGG-3'
MpkA 3' REV	5'-GACTGTCCGAGAAATCCGCTT-3'
MpkA FW	5'-GCGGCAGCCATATGCTCGAGATGTCTGATCTACAGGGTC-3'
MpkA REV	5'-TCGGGCTTTGTTAGCAGCCGCTATTGGACATCCATCCCCCG-3'
SakA yes FW	5'-GTCTGTCTAAGGCAATATCG-3'
SakA yes REV	5'-CTATGGAGTGATCCCCGTCG-3'
SakA pet15b parte 2 FW	5'-GCGGCAGCCATATGCTCGAGATGATTTACTTTGTCCACAGAGC-3'
SakA pet15b parte 3 REV	5'-TCGGGCTTTGTTAGCAGCCGCTATAGAAGATCGACCGC-3'
IM-315	5'- gtaacgccagggtttccagtcacg ACGCGCAGAGCCTTATCACGTACCC-3'
IM-316	5'- <u>gcatcagtcctcctctcagacagaattcc</u> GTTGCCGACCTTTTGCCTTTCT-3'
IM-469	5'- <u>catcgactcgaagaaccaacc</u> ATGTCTGCGAAGCCTGCAGA-3'
IM-470	5'- <u>gcgataacaatttcacacaggaacagc</u> TATGCCGCATCAGCGGTGGGAA-3'
IM-319	5'-GCCTCTGATAGCTATATGCC-3'
IM-317	5'- <u>aagagcattgttgaggcgaattcgatc</u> GCATTTCTTACACTATATCAC-3'
IM-318	5'- gcgataacaatttcacacaggaacagc AGAGGAGGAGCCACGGTGACAA-3'
IM-320	5'- gtaacgccagggtttccagtcacg ACGCCGTTACACCGACTGACAAG-3'
IM-321	5'- <u>agttctctccttactcattccccgt</u> GTTCTGCCGCATCAGCGGTGGGAA-3'
IM-170	5'-GGAACACGGGGAATGAGTAAAGGAGAAGAAGTCTTTCA-3'
IM-223	5'-GATATCGAATTCGCCTCAAAC-3'
IM-508	5'- <u>accaccgctaccacctcc</u> TGCCGCATCAGCGGTGGGAA-3'
IM-509	5'- <u>cggctcatcgtcaccatgata</u> GCATTTCTTACACTATATCAC-3'
IM-193	5'-GGAGGTGGTAGCGGTGGT-3'
IM-329	5'-CTATCATGGGGTGACGATGAGCCG-3'
IM-510	5'- gtaacgccagggtttccagtcacg ACGGTTTTAGAGCAATTCGCCCT-3'
IM-511	5'- <u>tcaattgccctctgtcagatc</u> TGTGTTCTCGCAGAAGTTA-3'
IM-512	5'-GATCTGACAGACGGGCAATTGA-3'
IM-513	5'- <u>cggctcatcgtcaccatgata</u> TAGATTGGGACGAGTTTGT-3'
IM-514	5'- gcgataacaatttcacacaggaacagc TCTAAGGTACCTAAGGAGTC-3'
IM-515	5'-GATTCTGAACGTTGAAAGCG-3'
IM-517	5'- <u>ttctctccttactcattccccgtgtcc</u> CAGGGAGTTCTTCGAGGGGG-3'

Letras minúsculas em negrito indicam homologia à sequência do sítio de clonagem do plasmídeo pRS426.

Letras minúsculas sublinhadas indicam homologia a alguma sequência do cassete.

Tabela 4. Oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-qPCR.

Nome	Gene	Sequência (5'-3')
<i>hsfA</i>	Afu5g01900	CGTGGTCATCCGGATCCGGATCTACTG TGCCCCGCGGTGTTT

<i>hsp90</i>	Afu5g04170	CGCCAACATGGAGCGTATC
		TGTAAGAGCTCATGGAGGTGTCA
<i>tubA</i>	Afu1g10910	TTCCAACAACATCCAGACC
		CGACGGAACATAGCAGTGAA
<i>sdeB</i>	Afu7g05350	TGCCGAAGAGCAAGAGTACCA
		TCACGGGCTGCTCAGTGA
<i>sdeA</i>	Afu7g05920	CCAGCTTCCCGTCATGGA
		TCCGCGGCCGTTCTTAG
<i>hsp30</i>	Afu6g06470	CGCATCGCCGGCTAA
		TGTCTGGGTCCGTGAATTTGT
<i>ags2</i>	Afu2g11270	TCAGGGATTGGGCTGTATGT
		TAGCACTTGAGAAGCCAGCA
<i>chsG</i>	Afu3g14420	AGGATGAGGGCAAAGAGGTT
		AAGGCGTTGCTAAAGATCCA
<i>ppoC</i>	Afu3g12120	GCTCTCGAGGCCAATGTCAA
		GCGAAAATGCCAGAGAGTAGAC
<i>sidA</i>	Afu2g07680	GCAGCTCGGTGGTTGACTTC
		CTCGCCCGTCTCAACGTT

3.4 Meios de cultura

Todos os meios de cultura utilizados neste trabalho foram preparados dissolvendo os componentes em água destilada e ajustando-se o pH para 6,5. A seguir, eles foram esterilizados por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos, exceto quando utilizados para crescimento de amostras para experimentos de microscopia (conforme descrito abaixo). Nessas ocasiões, os meios foram filtrados em membranas com poros de 0,22 µm.

3.4.1 Meios de cultura para *A. fumigatus*

Tabela 5. Descrição da composição dos meios de cultura para cultivo de *A. fumigatus*.

Meio	Componentes
Meio mínimo (MM)	Solução de sais 5% (v/v) Glicose 1% (p/v) Solução de elementos traços 0,1% (v/v) Ágar (se sólido) 2% (p/v) Água destilada q.s.p.
MM + UU	Os mesmos componentes do MM, suplementado com: Uridina 4 mM Uracila 10 mM
MM + sorbitol*	Os mesmos componentes do MM, suplementado com: Sorbitol 1,2 M
MM + KCl*	Os mesmos componentes do MM, suplementado com: KCl 0,6 M

Meio completo YAG	Extrato de levedura 0,5% (p/v) Glicose 2% (p/v) Solução de elementos traços 0,1% (v/v) Ágar (se sólido) 2% (p/v) Água destilada q.s.p.
YUU	Os mesmos componentes do meio YAG, suplementado com: Uridina 4 mM Uracila 10 Mm
YAG + KCl*	Os mesmos componentes do meio YAG, suplementado com: KCl 0,6 M

* O meio top-ágar de regeneração dos protoplastos consiste no meio contendo apenas 1% (p/v) de ágar.

3.4.2 Meios de cultura para *Escherichia coli*

Tabela 6. Descrição da composição dos meios de cultura para cultivo de *E. coli*.

Meio	Componentes
Meio LB (Luria Bertani)	Extrato de levedura 0,5% (p/v) Tryptona 1% (p/v) NaCl 0,17 M Ágar (se sólido) 2% (p/v) Água destilada q.s.p.

3.4.3 Meios de cultura para *S. cerevisiae*

Tabela 7. Descrição da composição dos meios de cultura para cultivo de *S. cerevisiae*.

Meio	Componentes
Meio completo YPD	Extrato de levedura 1% (p/v) Peptona 2% (p/v) Glicose 4% (p/v) Ágar (se sólido) 2% (p/v) Água destilada q.s.p.
Meio SC URA-	Base de nitrogênio de levedura sem aminoácidos 0,67% (p/v) Glicose 2% (p/v) Lisina 0,01% (p/v) Leucina 0,01% (p/v) Tryptofano 0,01% (p/v) Histidina 0,005% (p/v) Ágar (se sólido) 2% (p/v) Água destilada q.s.p.

3.5 Soluções e tampões

Tabela 8. Soluções para o preparo de meios de cultivo.

Solução	Componentes	Preparo
Solução de elementos traços	Sulfato de zinco heptahidratado 75 mM Ácido bórico 180 mM Cloreto de manganês tetra hidratado 25 mM Sulfato de ferro heptahidratado 18 mM Cloreto de cobalto pentahidratado 6 mM Sulfato de cobre pentahidratado 6 mM	Os componentes foram dissolvidos e aqueceu-se a solução a 100°C por 5 minutos. Após resfriar a 60°C, ajustou-se o pH para 6,5. Ao final,

	Molibdato de amônio tetrahidratado 1 mM EDTA 140 mM Água destilada q.s.p.	adicionou-se clorofórmio 0,1%.
Solução de sais 20x concentrada para MM (Kafer 1977)	Nitrato de sódio 3,2 M Cloreto de potássio 0,14 M Dihidrogenofosfato de potássio 0,2 M Sulfato de magnésio heptahidratado 0,04 M Água destilada q.s.p.	Os componentes foram dissolvidos e a solução foi armazenada a 4°C.

Tabela 9. Soluções para transformação em *S. cerevisiae*.

Solução	Componentes	Preparo
Solução de TE (Tris EDTA) 10x	Tris base 100 mM EDTA 10 mM Água destilada q.s.p.	Os componentes foram dissolvidos, ajustou-se o pH para 7,5 e a solução foi autoclavada e armazenada à temperatura ambiente.
Solução de acetato de lítio 10x	Acetato de lítio 1 M Água destilada q.s.p.	Os componentes foram dissolvidos, ajustou-se o pH para 7,5 com ácido acético e a solução foi autoclavada e armazenada à temperatura ambiente.
Solução de PEG 50%	Polietilenoglicol 3350 50% (p/v) Água destilada q.s.p.	Os componentes foram dissolvidos e a solução foi autoclavada e armazenada à temperatura ambiente.

Tabela 10. Soluções de protoplastização para transformação em *A. fumigatus*.

Solução	Componentes	Preparo
1	Sulfato de amônio 0,8 M Ácido cítrico 100 mM Água destilada q.s.p.	Os componentes foram dissolvidos, ajustou-se o pH para 6,0 e a solução foi autoclavada e armazenada a 4°C.
2	Extrato de levedura 1% (p/v) Sacarose 2% (p/v) Água destilada q.s.p.	Os componentes foram dissolvidos e a solução foi autoclavada e armazenada a 4°C.
3	Sulfato de amônio 0,4 M Sacarose 1% (p/v) Ácido cítrico 50 mM Água destilada q.s.p.	Os componentes foram dissolvidos, ajustou-se o pH para 6,0 e a solução foi autoclavada e armazenada a 4°C.
4	Polietilenoglicol 8000 25% (p/v) Cloreto de cálcio dihidratado 100 mM Cloreto de potássio 0,6 M Tris HCl pH 7,5 10 mM Água destilada q.s.p.	Os componentes foram dissolvidos, ajustou-se o pH para 7,5 e a solução foi autoclavada e armazenada a 4°C.
5	Cloreto de cálcio dihidratado 50 mM Cloreto de potássio 0,6 M MES pH 6,0 10 mM Água destilada q.s.p.	Os componentes foram dissolvidos, ajustou-se o pH para 6,0 e a solução foi autoclavada e armazenada a 4°C.

Tabela 11. Tampões para extração de macromoléculas.

Tampão	Componentes	Preparo
---------------	--------------------	----------------

Tampão de extração de proteína	SDS 0,1% (p/v) Triton 1% (v/v) Tris-HCl pH 7,5 50 mM NaCl 150 mM EDTA 15 mM EGTA 5 mM NaF 100 mM Na ₂ P ₂ O ₇ 10 mM Complete-mini Merck® 1x Água ultrapura q.s.p.	Os componentes foram dissolvidos e a solução foi armazenada a 4°C. No momento do uso, adicionou-se o Complete-mini Merck®.
Tampão de extração de DNA (para micélio e levedura)	Tris-HCl pH 8,5 200 mM Cloreto de sódio 250 mM EDTA 25 mM SDS 0,5% (p/v) Água ultrapura q.s.p.	Os componentes foram dissolvidos e a solução foi armazenada à temperatura ambiente.
Tampão de extração de DNA (para conídio)	Tris-HCl pH 8,0 10 mM Cloreto de sódio 250 mM EDTA 1 mM SDS 1% (p/v) Triton 2% (v/v) Água ultrapura q.s.p.	Os componentes foram dissolvidos e a solução foi armazenada à temperatura ambiente.
Tampão Mandala de extração de lipídios	Etanol 42% Éter dietílico 14% Piridina 3% NH ₄ OH 14,2 N 0,05% Água ultrapura q.s.p.	Os componentes foram dissolvidos usando apenas vidrarias. A solução foi preparada no momento do uso.

Tabela 12. Soluções para extração de DNA plasmidial de *E. coli*.

Solução	Componentes	Preparo
1	Glicose 50 mM Tris HCl pH 8,0 25 mM EDTA pH 8,0 10 mM Água destilada q.s.p.	Os componentes foram dissolvidos, ajustou-se o pH para 8,0 e a solução foi autoclavada e armazenada a 4°C.
2	Hidróxido de sódio 0,2 M SDS 1% (v/v) Água destilada q.s.p.	Preparada no momento do uso.
3	Acetato de potássio 5 M Ácido acético glacial 11,5% (v/v) Água destilada q.s.p.	Os componentes foram dissolvidos e a solução foi autoclavada e armazenada a 4°C.

Tabela 13. Soluções para quantificação de proteínas totais pelo método de Lowry modificado.

Solução	Componentes	Preparo
Solução de Na ₂ CO ₃ e NaOH 2%	Carbonato de sódio 2% (p/v) Hidróxido de sódio 0,1 M Água ultrapura q.s.p	Os componentes foram dissolvidos e a solução foi armazenada a 4°C.
Solução de CuSO ₄ 1%	Sulfato de cobre 1% (p/v) Água ultrapura q.s.p	Os componentes foram dissolvidos e a solução foi armazenada a 4°C.

Solução de tartarato de sódio e potássio 1%	Tartarato de sódio e potássio 1% (p/v) Água ultrapura q.s.p	Os componentes foram dissolvidos e a solução foi armazenada a 4°C.
Solução mix	Solução de Na ₂ CO ₃ e NaOH 2% 980 µl Solução de CuSO ₄ 1% 10 µl Solução de tartarato de sódio e potássio 1% 10 µl	Os componentes foram misturados no momento do uso.

Tabela 14. Tampões para eletroforese.

Tampão	Componentes	Preparo
Tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 50x	Tris base 2 M Ácido acético glacial 5,71% (v/v) EDTA 0,5M pH 8,0 0,05 M Água destilada q.s.p.	Os componentes foram misturados, ajustou-se o pH para 8,0 e armazenou-se à temperatura ambiente.
Tampão MOPS 10x	MOPS 0,2 M Acetato de sódio 0,5 M EDTA 0,01 M Água ultrapura tratada com DEPC q.s.p.	Os componentes foram misturados, ajustou-se o pH para 7,0 e armazenou-se a 4°C.
Tampão para eletroforese de proteína 5x	Tris base 125 mM Glicina 95 mM SDS 0,1% (p/v) Água destilada q.s.p.	Os componentes foram dissolvidos e a solução foi armazenada a 4°C.
Tampão de amostra para eletroforese de DNA 5x	Azul de bromofenol 0,1 mg/ml Xilenocianol 0,1 mg/ml Glicerol 50% (v/v) Água ultrapura q.s.p.	Os componentes foram dissolvidos e a solução foi armazenada à temperatura ambiente até ser misturada com as amostras de DNA.
Tampão de amostra para eletroforese de RNA	Formaldeído 16,5% Formamida 50% Tampão MOPS 10x Azul de bromofenol 0,5% Brometo de etídeo 0,024 mg Água ultrapura tratada com DEPC q.s.p.	Os componentes foram dissolvidos e misturados com as amostras de RNA. As amostras foram aquecidas a 65°C por 15 minutos e aplicadas no gel.
Tampão de amostra para eletroforese de proteína 5x (tampão Laemmli)	Tris base 0,625 M SDS 10% (p/v) Glicerol 10% (v/v) Azul de bromofenol 0,1% (p/v) DTT 1 mol/l Água ultrapura q.s.p.	Os componentes foram dissolvidos e a solução foi armazenada à temperatura ambiente. No momento do uso, misturou-se com as amostras de proteínas e adicionou-se o DTT.

Tabela 15. Soluções para *Southern blot*.

Solução	Componentes	Preparo
Solução de ácido clorídrico	Ácido clorídrico 0,25 M Água ultrapura q.s.p	A solução foi preparada no momento do uso.
Solução de desnaturação	Cloreto de sódio 1,5 M Hidróxido de sódio 0,5 M Água ultrapura q.s.p	A solução foi preparada no momento do uso.

Solução de neutralização	Tris base 0,5 M Cloreto de sódio 1,5 M Água ultrapura q.s.p	Os componentes foram dissolvidos e ajustou-se o pH para 7,0. A solução foi preparada no momento do uso.
Solução salina citrato 20x	Cloreto de sódio 3 M Citrato de sódio 0,3 M Água ultrapura q.s.p	Os componentes foram dissolvidos e ajustou-se o pH para 7,0. A solução foi preparada no momento do uso.

Tabela 16. Soluções para a confecção, coloração e descoloração de gel SDS-PAGE.

Solução	Componentes	Preparo
Solução de Bis-acrilamida 30:08	Acrilamida 30% (p/v) N,N-Metileno-bis-acrilamida 0,8% (p/v) Água ultrapura q.s.p	Os componentes foram dissolvidos e a solução foi armazenada a 4°C em frasco âmbar.
Solução de Tris HCl 1 M pH 6,8	Tris base 1 M Água ultrapura q.s.p	Os componentes foram dissolvidos, ajustou-se o pH para 6,8 e a solução foi armazenada a 4°C.
Solução de Tris HCl 1,5 M pH 8,8	Tris base 1,5 M Água ultrapura q.s.p	Os componentes foram dissolvidos, ajustou-se o pH para 8,8 e a solução foi armazenada a 4°C.
Corante <i>coomassie blue</i>	Coomassie Brilliant Blue 0,25% (p/v) Ácido acético glacial 30% (v/v) Metanol 50% (v/v) Água ultrapura q.s.p.	Os componentes foram dissolvidos e a solução foi armazenada à temperatura ambiente.
Descorante de <i>coomassie blue</i>	Ácido acético glacial 10% (v/v) Etanol 30% (v/v) Água ultrapura q.s.p.	Os componentes foram dissolvidos e a solução foi armazenada à temperatura ambiente.

Tabela 17. Soluções para *Western blot*.

Solução	Componentes	Preparo
Tampão de transferência	Tris base 25 mM Glicina 192 mM Metanol 20% (v/v) SDS 0,1% (p/v) Água destilada q.s.p.	A solução foi preparada no momento do uso por meio da dissolução dos componentes.
Tampão tris salina (TBS) 10x	Cloreto de sódio 1,5 M Tris base 2 M Água ultrapura q.s.p.	Os componentes foram dissolvidos e a solução foi armazenada a 4°C.
Tampão fosfato salina (PBS) 10x	Cloreto de sódio 350 mM Cloreto de potássio 180 mM Hidrogenofosfato de sódio 25 mM Dihidrogenofosfato de potássio 18 mM Água ultrapura q.s.p	Os componentes foram dissolvidos e a solução foi armazenada a 4°C.
Tampão TBST	TBS 1x Tween 0,05% Água ultrapura q.s.p.	A solução foi preparada no momento do uso por meio da dissolução dos componentes.

Tampão PBST	PBS 1x Tween 0,05% Água ultrapura q.s.p.	A solução foi preparada no momento do uso por meio da dissolução dos componentes.
-------------	--	---

Tabela 18. Tampão para co-immunoprecipitação de proteínas (Co-IP).

Tampão	Componentes	Preparo
Tampão de lise para Co-IP com GFP-trap	Tris base 50 mM Cloreto de potássio 225 mM NP-40 1% (v/v) Ortovanadato de sódio 1 mM PMSF 1 mM cOmplete Mini protease inhibitor 1x Água ultrapura q.s.p.	Os componentes foram dissolvidos e o pH foi ajustado para 7,6. O tampão foi armazenado a 4°C e, no momento do uso, adicionou-se o PMSF e o cOmplete Mini.

3.6 Géis para eletroforese

Tabela 19. Géis para eletroforese de macromoléculas.

Gel	Componentes	Preparo
Gel de agarose para eletroforese de DNA	Agarose 1% Tampão TAE 1x q.s.p. Brometo de etídio 40 µg/ml	A agarose foi dissolvida em TAE no forno micro-ondas. Adicionou-se o brometo de etídio após o resfriamento, e a solução foi distribuída no suporte da cuba de eletroforese.
Gel de agarose desnaturante para eletroforese de RNA	Agarose 1,2% Tampão MOPS 10x Formaldeído 15% Água ultrapura q.s.p.	A agarose foi dissolvida em água no forno micro-ondas. Adicionou-se o tampão MOPS e o formaldeído após o resfriamento, e a solução foi distribuída no suporte da cuba de eletroforese.
Gel SDS PAGE - empilhamento	Tris-HCl pH 6,0 125 mM SDS 0,1% (p/v) Solução de Bis-acrilamida 30:08 5% (v/v) TEMED 0,15% (v/v) Persulfato de amônio 0,1% (v/v) Água ultrapura q.s.p.	Os componentes foram dissolvidos e a solução foi despejada sobre o Gel SDS PAGE – corrida.
Gel SDS PAGE – corrida*	Tris-HCl pH 8,0 375 mM SDS 0,1% (p/v) Solução de Bis-acrilamida 30:08 X% (v/v) TEMED 0,1% (v/v) Persulfato de amônio 0,1% (v/v) Água ultrapura q.s.p.	Os componentes foram dissolvidos e a solução foi despejada no suporte para eletroforese.

* X é a concentração de interesse do experimento (6%, 8%, 10%, 12% ou 15%), dependendo do tamanho da proteína que se deseja analisar.

3.7 Construção dos cassetes gênicos para transformação em *A. fumigatus*

A construção dos cassetes gênicos foi feita seguindo o método descrito por Colot et al. (2006), e as reações de PCR foram realizadas em condições padrão (Sambrook and Russell 2001) utilizando-se a enzima Phusion High Fidelity DNA polimerase (Thermo Scientific). Para os cassetes *tet_{OFF}::hsfA* e *xyIP::hsfA*, o DNA genômico da linhagem selvagem CEA17 de *A. fumigatus* foi utilizado como molde para a amplificação de um fragmento de aproximadamente 850 pb da região 5'UTR do locus do gene *hsfA* e outro de 470 pb também da região 5'UTR, mas mais próximo ao gene (região promotora original do gene *hsfA*). O vetor pCDA21 foi utilizado para amplificar o gene *pyrG* de *A. nidulans* que funciona como marcador auxotrófico da construção, semelhante ao gene *URA3* de levedura (Chaveruche et al. 2000). Para a construção *xyIP::hsfA* em específico, o vetor pYES-hph-pXyl devR foi utilizado para amplificar o promotor do gene da enzima xilose redutase (1,641 Kb) de *Penicillium chrysogenum*, o qual é reprimido na ausência de xilose e ativado na presença da mesma (Zadra et al. 2000). Já para a construção *tet_{OFF}::hsfA*, o vetor pFW22.1, foi utilizado para amplificar o sistema promotor condicional *tet_{OFF}* (2,571 Kb). Nele, a presença do antibiótico tetraciclina (ou do análogo doxíciclina) faz com que o transativador do sistema responsivo a tetraciclina (TtA), presente no sistema promotor, reprima o promotor TetO7 e, conseqüentemente, a transcrição do gene por ele controlado (no caso, *hsfA*). No entanto, na ausência do antibiótico, a transcrição é induzida.

Os fragmentos amplificados apresentavam extremidades homólogas para permitir a recombinação entre si e também com o vetor pRS426 *in vivo* em *S. cerevisiae* (Malavazi and Goldman 2012). Após a comprovação de que houve a recombinação dos fragmentos de DNA pela levedura no plasmídeo pRS426, os clones positivos escolhidos foram submetidos a uma PCR utilizando-se os *primers* distais para a amplificação de todo o cassette. O material foi fracionado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e o fragmento específico de cada cassette foi purificado por kit comercial (Cellco) e usado nas reações de transformação da linhagem selvagem \DeltaakuB^{KU80} para a obtenção das linhagens mutantes *xyIP::hsfA* e *tet_{OFF}::hsfA*.

A mesma metodologia foi empregada para a construção do cassette *xyIP::sdeA*, com o DNA genômico da linhagem selvagem CEA17 servindo de molde para a amplificação de um fragmento de aproximadamente 1,5 Kb da

região 5'UTR do lócus do gene *sdeA* e outro de mesmo tamanho da ORF do gene. O vetor pCDA21 foi novamente utilizado para amplificar o gene *pyrG* (marcador auxotrófico), enquanto o vetor pYES-hph-pXyl devR foi utilizado para amplificar o promotor do gene da enzima xilose redutase (*xyIP*).

Para a construção do cassete de fusão *sdeA::GFP*, foi utilizado o vetor pMCB17apx (Romero et al. 2003) para a amplificação do fragmento correspondente ao gene da proteína verde fluorescente (GFP), enquanto o gene *pyrG* foi usado novamente como marcador de seleção. Já para a construção do cassete de fusão *sdeA::3xHA*, foi utilizado o vetor pUC 3xHA *prtA*, um derivado do plasmídeo pOB430 (Fabri et al. 2018), para a amplificação do fragmento correspondente ao epítipo 3xHA juntamente com o gene de resistência ao antibiótico piritamina, que foi usado como marcador de seleção. Tal cassete foi transformado tanto na linhagem selvagem de *A. fumigatus*, como também no mutante *xyIP::hsfA* para a obtenção do duplo mutante.

Para a construção do duplo mutante *pkcA^{G579R} xyIP::hsfA*, o cassete *xyIP::hsfA* foi amplificado do plasmídeo previamente construído contendo este cassete condicional e transformado na linhagem *pkcA^{G579R} pyrG-* (Rocha et al. 2020b), cujo gene *pyrG* foi removido pelo tratamento com ácido fluorótico. Para a construção dos duplos mutantes $\Delta mpkA xyIP::hsfA$ e $\Delta sakA xyIP::hsfA$, os plasmídeos contendo os cassetes $\Delta mpkA$ (Valiante et al. 2009) e $\Delta sakA$ (Altwasser et al. 2015) foram utilizados para amplificar tais cassetes, os quais foram transformados na linhagem *xyIP::hsfA*.

Para a obtenção dos mutantes simples e duplos contendo a construção *hsp90P::luc*, foi transformado nas linhagens $\Delta akuB^{KU80}$, *xyIP::hsfA*, *pkcA^{G579R}*, $\Delta rlmA$ e $\Delta mpkA$ o cassete proveniente do plasmídeo previamente transformado em levedura que continha as regiões 5'UTR e 3'UTR do gene *pyrG* de *A. fumigatus* flanqueando o gene repórter da luciferase (*mluc*), que estava sob o controle do promotor do gene *hsp90*, como descrito em Rocha et al. (2016). Ao final do gene *mluc* foi colocada a região de terminação do gene *trpC* de *A. nidulans*. O gene bacteriano de resistência à higromicina (*hph*), flanqueado pelas regiões promotora e de terminação do gene *gpdA* de *A. nidulans*, foi usado como marcador de seleção da construção.

Para a construção do cassete *hsfA::luc*, um fragmento de aproximadamente 3,3 Kb da região 5'UTR juntamente com o gene *hsfA* e outro

de aproximadamente 600 pb da região 3'UTR de *hsfA* foram amplificados do DNA da linhagem selvagem, bem como o gene *pyrG* (marcador auxotrófico, a partir do vetor pCDA21) e o gene da luciferase (a partir do mesmo vetor mencionado anteriormente). Este cassete foi transformado nas linhagens \DeltaakuB^{KU80} e $pkcA^{G579R} pyrG^-$, para a obtenção do mutante *hsfA::luc* e do duplo mutante $pkcA^{G579R} hsfA::luc$. Para a obtenção dos duplos mutantes *hsfA::luc* $\Delta mpkA$ e *hsfA::luc* $\Delta sakA$, os plasmídeos contendo os cassetes $\Delta mpkA$ e $\Delta sakA$, respectivamente, foram utilizados para amplificar tais cassetes, os quais foram transformados na linhagem *hsfA::luc*.

Finalmente, para a obtenção do mutante nulo $\Delta sdeB$, o DNA genômico da linhagem selvagem CEA17 serviu de molde para a amplificação de fragmentos de aproximadamente 1,5 Kb das regiões 5'UTR e 3'UTR do lócus do pseudogene *sdeB*. O vetor pPIRA foi utilizado para amplificar o gene de resistência à piritiamina (*prtA*) de *A. oryzae* que serviu como marcador auxotrófico. Este cassete $\Delta sdeB$ foi então transformado tanto na linhagem selvagem \DeltaakuB^{KU80} , quanto nas linhagens *xyIP::sdeA* e *sdeA::GFP* para a obtenção de duplo mutantes. Para a obtenção do complementante $\Delta sdeB::sdeB^+$, o lócus nativo de *sdeB* foi clonado no plasmídeo de complementação BS311 contendo o gene de resistência à higromicina (cedido pelo Dr. Robert Cramer) e transformado no mutante nulo $\Delta sdeB$.

3.8 Protocolos adotados

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

Seguindo a metodologia de Malavazi and Goldman (2012), uma colônia isolada de *S. cerevisiae* da cepa FGSC 9721 (Fungal Genetics Stock Center, <<http://www.fgsc.net>>) foi inoculada em 20 ml de meio YPD e incubada a 30°C sob agitação constante por 18 horas. Após este período, uma alíquota de aproximadamente 500 μ l 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 2500 rpm por 2 minutos e lavadas com 20 ml de tampão TE 1x. Em seguida, foram novamente centrifugadas por 2 minutos, ressuspensas em 1,0 ml de solução TE 1x/LiAc 1x (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5, 100 mM LiAc, pH 7,5) e incubadas a 30°C por 60 minutos, sob leve agitação. Para cada reação de transformação foram misturados 200 μ l de

suspensão de células, cerca de 200-500 ng de DNA plasmidial (pRS426) linearizado com *EcoRI* e *BamHI*, 0,5-1 µg dos diferentes DNAs purificados provenientes das PCRs para a construção dos cassetes de deleção e fusão e 200 µg de DNA de esperma de salmão sonificado e desnaturado. A mistura foi incubada a 30°C por 30 minutos com leve agitação e posteriormente foi adicionado 1,2 ml de solução contendo LiAc 1x/PEG-3350 40% (p/v)/TE 1x. Após homogeneização, incubou-se a mistura por 30 minutos a 42°C e, logo após, as células foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos, lavadas com 1 ml de TE 1x, precipitadas novamente e ressuspensas em 80-100 µl de TE 1x. Finalmente, as células transformadas foram semeadas em placas contendo meio de cultura seletivo SC URA⁻ e incubadas a 30°C por 72 horas.

3.8.2 Extração do DNA de *S. cerevisiae*

As colônias de *S. cerevisiae* que cresceram na placa de transformação foram inoculadas em meio SC URA⁻ líquido, sendo mantidas a 30°C sob agitação constante de 180 rpm por dois dias. A seguir, as células foram coletadas por centrifugação a 4000 rpm por 5 minutos, ressuspensas em 500 µl de tampão de extração de DNA e transferidas para tubos de micro centrífuga contendo 250 µl de pérolas de vidro. A mistura foi agitada mecanicamente em vortex por 10 minutos. Depois, adicionou-se em cada amostra um volume igual de fenol:clorofórmio (1:1) e a mistura foi novamente agitada mecanicamente em vortex por 10 minutos. Para sedimentar as proteínas precipitadas e restantes celulares, as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga, onde foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio para a retirada de resíduos de fenol. As amostras foram misturadas manualmente, centrifugadas a 13000 rpm por 5 minutos e a fase aquosa superior foi novamente transferida para outro tubo de microcentrífuga, onde foram adicionados 800 µl de isopropanol para precipitar o DNA. Após aproximadamente 30 minutos de incubação a -80°C, as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi lavado com etanol 70% e centrifugado novamente a 13000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi novamente descartado e o resíduo de etanol evaporado à temperatura ambiente por 30 minutos. O sedimento foi ressuspendido em água ultrapura estéril e armazenado a 4°C. A integridade das

amostras foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, e o DNA foi quantificado por espectrofotometria quando necessário ($DO_{260/280nm}$) utilizando-se o equipamento NanoVue Plus (GE Health Care).

3.8.3 Preparo de células quimiocompetentes de *E. coli* e transformação

As células competentes de *E. coli* da linhagem DH5 α foram previamente preparadas de acordo com Inoue et al. (1990). A seguir, os tubos de microcentrífuga contendo as células de *E. coli* foram incubados em gelo por 10 minutos. Cerca de 10 μ g do DNA genômico de *S. cerevisiae* foram adicionados aos tubos, os quais permaneceram por mais 30 minutos em gelo. A seguir, as células passaram por um choque térmico ao serem transferidas para um banho a 42°C por 90 segundos e foram novamente incubadas em gelo por 90 segundos. Adicionaram-se 800 μ l de meio LB líquido em cada tubo e incubaram-se as reações a 37°C sob agitação constante de 180 rpm. Após 45 minutos, as células foram coletadas por centrifugação a 5000 rpm por 5 minutos e semeadas em placa contendo 20 ml de meio de cultivo LB sólido suplementado com 200 μ l de ampicilina. As placas de transformação foram então incubadas a 37°C até a visualização dos transformantes. O mesmo protocolo foi seguido para a transformação de plasmídeos diferentes do pRS426, utilizando os antibióticos adequados.

3.8.4 Mini preparação do DNA plasmidial

Para a extração do DNA plasmidial, o método utilizado foi o de lise alcalina descrito por Birboim & Doyle, de acordo com Sambrook and Russell (2001). Inicialmente, colônias das placas de transformação foram inoculadas em meio LB acrescido de 200 μ l de ampicilina e mantidas a 37°C sob agitação constante de 180 rpm por 16 horas. As células que cresceram foram coletadas por centrifugação a 4800 rpm e 4°C por 15 minutos. Para cada reação, foram adicionados: 100 μ l da solução 1 de extração de DNA plasmidial gelada para a ressuspensão das células, 200 μ l da solução 2 preparada no dia e, após leve agitação manual, 150 μ l da solução 3 gelada. A mistura foi agitada manualmente e centrifugada a 4800 rpm por 15 minutos a 4°C. A seguir, a fase aquosa foi transferida para um tubo de microcentrífuga, onde foram adicionados 800 μ l de isopropanol. Após aproximadamente 30 minutos incubadas a -80°C, as amostras

foram centrifugadas a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi ressuspensionado em 500 µl de água ultrapura estéril, adicionou-se em cada amostra um volume igual de fenol:clorofórmio (1:1) e a mistura foi agitada manualmente. Para sedimentar as proteínas precipitadas e restantes celulares, as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga, onde foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio para a retirada de resíduos de fenol. As amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 5 minutos e a fase aquosa superior foi novamente transferida para outro tubo de microcentrífuga, onde foram adicionados 800 µl de isopropanol para precipitar o DNA. Após aproximadamente 30 minutos incubadas a -80°C, as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi lavado com etanol 70% e centrifugado novamente a 13000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi novamente descartado e o resíduo de etanol evaporado à temperatura ambiente por 30 minutos. O sedimento foi ressuspensionado em água ultrapura estéril e armazenado a 4°C. A integridade das amostras foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 1% e o DNA foi quantificado por espectrofotometria quando necessário (DO_{260/280nm}), utilizando-se o equipamento NanoVue Plus (GE Health Care).

3.8.5 Transformação em *A. fumigatus*

Cerca de 1×10^7 conídios da linhagem recipiente de *A. fumigatus* $\Delta akuB^{KU80}$ ou do mutante $pkcA^{G579R} pyrG^-$ foram inoculados em 50 ml de MM + UU líquido e incubados a 37°C com agitação constante de 180 rpm por 16 horas. O mesmo foi feito para a linhagem $xyIP::hsfA$, mas em MM suplementado com xilose 1%. Já para a transformação das linhagens $\Delta rlmA$, $hsfA::luc$, $sdeA::GFP$, $\Delta sdeB$ e $akuB^{KU80}$, apenas MM foi utilizado para o crescimento. Os tubos germinativos foram coletados por centrifugação (4.800 rpm por 10 minutos, com baixa desaceleração) e a transformação foi realizada de acordo com o que foi descrito previamente por Osmani et al. (1987). Os pellets foram ressuspensionados em 20 ml de solução 1 de protoplastização, acrescentaram-se 20 ml de solução 2 de protoplastização, 6,5 ml de sulfato de magnésio 1 M, 400 mg de BSA e 600 mg de Lallzyme MMX® (Lallemand). Essa mistura foi incubada a 30°C sob agitação de 90 rpm e por pelo menos 5 horas, até a completa protoplastização

(digestão da parede celular). Após a protoplastização, a cultura foi filtrada e centrifugada a 4800 rpm por 10 minutos a 4°C. O pellet obtido foi lavado com 20 ml da solução 3 de protoplastização gelada por duas vezes e centrifugado por 5 minutos a 4800 rpm e a 4°C. Na sequência, o pellet foi ressuscitado em um volume específico de solução 5 de protoplastização, sendo que para cada reação de transformação foram usados 100 µl dessa solução. A mistura foi incubada em banho de gelo por 10 minutos. Para cada reação foram adicionados 10-20 µg de DNA de transformação com 50 µl de solução 4 de protoplastização. Essa mistura foi incubada por 20 minutos em banho de gelo. Após esse tempo, adicionou-se em cada reação 1 ml de solução 4 de protoplastização e incubou-se por mais 20 minutos à temperatura ambiente.

A seguir, os protoplastos de $\Delta akuB^{KU80}$ e $pkcA^{G579R}$ *pyrG*- transformados com os cassetes *tet_{OFF}::hsfA*, *sdeA::GFP* e/ou *hsfA::luc* foram inoculados em meio YAG + KCl top ágar, o qual tem apenas 1% de ágar. Isso foi realizado para permitir a inoculação dos protoplastos transformados pelo método de “*pour plate*” sobre o meio YAG + KCl sólido previamente depositado em uma placa de Petri. Portanto, foram inicialmente colocados 20 ml do meio sólido YAG + KCl nas placas e, em seguida, a mistura de reação de transformação foi adicionada a 15 ml de meio top ágar (YAG + KCl), homogeneizada delicadamente por inversão e então colocada sobre o meio sólido na placa de Petri. O mesmo foi feito com os protoplastos de $\Delta akuB^{KU80}$ e $pkcA^{G579R}$ *pyrG*- transformados com os cassetes *xyIP::hsfA* e/ou *xyIP::sdeA*, sendo que neste caso foi utilizado YAG + KCl sólido acrescido de 1% de xilose e YAG + KCl top ágar acrescido de 1% de xilose. Para a transformação dos cassetes $\Delta mpkA$, $\Delta sdeB$ e *sdeA::3xHA* na linhagem *xyIP::hsfA*, foi utilizado MM + KCl suplementado com 1% de xilose e 0,2 µg/ml de piriamina. Para a transformação do cassete $\Delta mpkA$ na linhagem *hsfA::luc*, do cassete $\Delta sdeB$ nas linhagens *akuB^{KU80} e *sdeA::GFP* e do cassete *sdeA::3xHA* na linhagem *akuB^{KU80}, foi utilizado MM + KCl suplementado com 0,2 µg/ml de piriamina apenas. Já para a obtenção dos duplos mutantes $\Delta sakA$ *xyIP::hsfA* e *xyIP::hsfA hsp90P::luc*, foi utilizado MM + Sorbitol suplementado com 350 µg/ml de higromicina e xilose 1%. Para a transformação do cassete $\Delta sakA$ na linhagem *hsfA::luc* e para a obtenção dos mutantes simples e duplos contendo a construção *hsp90P::luc*, foi utilizado MM + Sorbitol suplementado com 350 µg/ml de higromicina apenas. E finalmente, para a obtenção do**

complementante $\Delta sdeB::sdeB^+$, foi utilizado MM + Sorbitol suplementado com 350 $\mu\text{g/ml}$ de higromicina e 0,2 $\mu\text{g/ml}$ de piritiamina.

Todas as placas de transformação foram então incubadas a 37°C por três a cinco dias, até a visualização dos transformantes. Para a eliminação dos heterocários de transformação, os transformantes obtidos foram isolados e repicados três vezes consecutivas em YAG (para transformantes $tet_{OFF}::hsfA$, $sdeA::GFP$, $hsfA::luc$ e $pkcA^{G579R} hsfA::luc$), YAG acrescido de 1% xilose (para os mutantes $xyIP::hsfA$, $pkcA^{G579R} xyIP::hsfA$ e $xyIP::sdeA$), MM acrescido de 0,2 $\mu\text{g/ml}$ de piritiamina (para os mutantes $\Delta sdeB$, $sdeA::GFP$ $\Delta sdeB$, $sdeA::3xHA$ e $hsfA::luc$ $\Delta mpkA$), MM acrescido de 0,2 $\mu\text{g/ml}$ de piritiamina e 1% de xilose (para os mutantes $xyIP::sdeA$ $\Delta sdeB$, $xyIP::hsfA$ $sdeA::3xHA$ e $\Delta mpkA$ $xyIP::hsfA$), MM acrescido de 350 $\mu\text{g/ml}$ de higromicina (para os mutantes $hsp90P::luc$, $pkcA^{G579R} hsp90P::luc$, $\Delta rlmA$ $hsp90P::luc$, $\Delta mpkA$ $hsp90P::luc$, $hsfA::luc$ $\Delta sakA$ e $\Delta sdeB::sdeB^+$), MM acrescido de 350 $\mu\text{g/ml}$ de higromicina e 1% xilose ($\Delta sakA$ $xyIP::hsfA$ e $xyIP::hsfA$ $hsp90P::luc$) ou MM acrescido de 350 $\mu\text{g/ml}$ de higromicina e 0,2 $\mu\text{g/ml}$ de piritiamina (para o complementante $\Delta sdeB::sdeB^+$). Depois de expandidos, o DNA genômico dos transformantes foi extraído e usado para a validação dos mesmos por meio de PCR convencional diagnóstica e/ou *Southern blot*.

3.8.6 Extração de DNA de *A. fumigatus*

3.8.6.1 Extração de DNA de micélio

Conídios das linhagens foram inoculados em meio de cultura líquido por aproximadamente 16 horas a 37°C e 180 rpm. Os micélios obtidos foram coletados por filtração a vácuo e congelados imediatamente em nitrogênio líquido para serem triturados com almofariz e pistilo. Para cerca de 40 mg de micélio de cada amostra acrescentaram-se 500 μl de tampão de extração de DNA. Adicionou-se em cada amostra um volume igual de fenol:clorofórmio (1:1) e a mistura foi agitada mecanicamente em vortex por 10 minutos. Para sedimentar as proteínas precipitadas e restantes celulares, as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga, onde foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio para a retirada de resíduos de fenol. As amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 5 minutos e a fase aquosa superior foi novamente

transferida para outro tubo de microcentrífuga, onde foram adicionados 800 µl de isopropanol para precipitar o DNA. Após aproximadamente 30 minutos incubadas a -80°C, as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 10 minutos e a 4°C, e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi lavado com etanol 70% e centrifugado novamente a 13000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi novamente descartado e o resíduo de etanol evaporado à temperatura ambiente por 30 minutos. O sedimento foi ressuspensionado em água ultrapura estéril e armazenado a 4°C. A integridade das amostras foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, e o DNA foi quantificado por espectrofotometria quando necessário ($DO_{260/280nm}$) utilizando-se o equipamento NanoVue Plus (GE Health Care).

3.8.6.2 Extração de DNA de conídios

Em uma placa de cultura em que houve crescimento fúngico, foram adicionados 500 µl de tampão de extração de DNA para a captura dos conídios, os quais foram transferidos para um tubo de microcentrífuga. No mesmo tubo foram colocados 500 µl de pérolas de vidro e, em seguida, os tubos foram incubados a 70°C por 30 minutos enquanto eram agitados por 30 segundos em vortex em intervalos de 10 minutos. Em seguida, as amostras foram transferidas para um novo tubo, sem pérolas de vidro, e foi adicionado um volume igual de fenol/clorofórmio (1:1). Os tubos foram agitados por 10 minutos no vortex e depois centrifugados a 13000 rpm por 10 minutos. Houve a formação de duas fases, de tal forma que o sobrenadante foi recuperado e transferido para um novo tubo. Na sequência, adicionaram-se 200 µl de clorofórmio, misturou-se brevemente e os tubos foram centrifugados a 13000 rpm por 7 minutos. Observou-se a formação de duas fases e novamente o sobrenadante foi recuperado e transferido para outro tubo de microcentrífuga. Adicionaram-se 800 µl de isopropanol e as amostras foram incubadas por 30 minutos a -80°C. Depois, elas foram centrifugadas por 10 minutos a 13000 rpm, o sobrenadante foi descartado, o pellet formado foi lavado com etanol 70% e, após a secagem, foi eluído em água ultrapura estéril e armazenado a 4°C. A integridade das amostras foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, e o DNA foi quantificado por espectrofotometria quando necessário ($DO_{260/280nm}$) utilizando-se o equipamento NanoVue Plus (GE Health Care).

3.8.7 Extração de proteínas de *A. fumigatus*

Para romper a parede celular do fungo, os micélios foram triturados em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e pistilo. O extrato proteico total foi extraído com tampão de extração de proteína (500 µl), adicionado de inibidores de protease (descritos anteriormente) e agitando-se por 10 vezes de 30 segundos com intervalos de 30 segundos em gelo para minimizar a degradação. A seguir, a amostra foi centrifugada a 13000 rpm por 40 minutos a 4°C para a retirada do material precipitado. O sobrenadante foi congelado e armazenado a -80°C. A integridade da proteína foi verificada por meio de eletroforese em gel SDS-PAGE e quantificada pelo método colorimétrico de Lowry modificado (Hartree 1972). Para tanto, foi construída uma curva padrão com concentrações previamente conhecidas de BSA e as amostras foram quantificadas em triplicata. Brevemente, 10 µl das amostras foram diluídos em 190 µl de água ultrapura em um tubo de microcentrífuga. A seguir, adicionou-se 1 ml da solução mix para quantificação, e incubou-se por 15 minutos à temperatura ambiente. Depois, foram adicionados 100 µl da solução de Folin 0,5x, as amostras foram agitadas vigorosamente e incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente. A leitura de absorbância foi realizada utilizando um espectrofotômetro (DO_{650nm}). O equipamento foi zerado com um branco preparado com água no lugar da amostra.

3.8.8 Extração de RNA de *A. fumigatus*

Para romper a parede celular do fungo, os micélios foram triturados em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e pistilo. O RNA foi extraído utilizando-se o reagente Trizol (Life Technologies EUA), segundo as recomendações do fabricante. A integridade do RNA total foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 1,2% sob condições desnaturantes corado com brometo de etídio e visualizado sob luz UV de acordo com Sambrook and Russell (2001). A presença das bandas intactas correspondentes ao RNA ribossomal 28S e 18S, sendo a intensidade da primeira banda cerca de duas vezes maior que a da segunda, foi utilizada como critério de integridade do RNA total.

Para a utilização nas reações de qPCR, 10 µg de RNA total de cada amostra foram tratados com a enzima Ambion Turbo DNase (Life Technologies,

USA) de acordo com as recomendações do fabricante. O sucesso do tratamento de todas as amostras de RNA com DNase foi verificado através de PCR em tempo real utilizando como alvo o gene da β -tubulina de *A. fumigatus* (*tubA*), onde verificou-se o sucesso do tratamento através da ausência completa de amplificação das amostras. Após tratadas e validadas, as amostras foram transcritas utilizando-se o kit High Capacity (Life Technologies), para a obtenção do cDNA usado nas análises de expressão por RT-qPCR.

3.8.9 Análise da expressão gênica por RT-qPCR em tempo real

Alíquotas de cDNA de *A. fumigatus* obtidas de acordo com cada experimento foram usadas como molde da PCR. Foram usados os *primers* construídos especificamente para cada gene de interesse utilizando-se o programa Primer Express (Life Technologies). A concentração ideal dos *primers* a ser utilizada em cada reação de RT-qPCR foi determinada, além dos padrões de eficiência da reação (foram aceitos apenas valores variando entre 95-105%), “slope”, intercepto e desvios de acordo com Bustin et al. (2009). Como controle endógeno (normalizador), foram utilizados *primers* para amplificação do gene *tubA* de *A. fumigatus* (β -tubulina). A detecção de amplificação em tempo real foi feita no equipamento Step One Plus (Applied Biosystems) utilizando-se GoTaq qPCR Master Mix (Promega). A quantificação dos resultados foi realizada conforme descrição do fabricante e se baseia na derivação da fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen 2001).

3.8.10 Extração de lipídios de *A. fumigatus*

Para a extração de esfingolipídios, 300 mg de micélio obtidos de acordo com cada experimento foram utilizados em triplicata. A extração foi realizada seguindo o protocolo relatado anteriormente em Munshi et al. (2018) com pequenas modificações (Figura 5). Resumidamente, os micélios foram transferidos para tubos de vidro e 1,5 ml de tampão Mandala (Mandala et al. 1995) foram adicionados, juntamente com aproximadamente 1 ml de pérolas de vidro de 500 μ m de diâmetro e 50 μ l de padrão interno [lipídios C17 (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, EUA; Matreya Inc., Pleasant Gap, PA, EUA)]. Para a extração de Mandala, esses tubos foram agitados vigorosamente em vortex por

2 minutos, sonicados em banho ultrassônico por 2 minutos e incubados a 60°C por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram sonicadas novamente por 2 minutos, agitadas em vortex por 2 minutos e incubadas a 60°C por 15 minutos adicionais. Depois disso, as amostras foram sonicadas por 2 minutos, agitadas em vortex por 2 minutos e centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e seco em Speed vac. Após a secagem completa, as amostras foram mantidas a -20°C até a próxima etapa.

O passo seguinte foi a extração lipídica de Bligh e Dyer (Bligh and Dyer 1959), seguida pela hidrólise básica (Clarke and Dawson 1981). Para extração de Bligh e Dyer, 2 ml de metanol foram adicionados a cada amostra e os tubos foram sonicados e agitados em vortex até a ressuspensão do sedimento. Depois disso, 1 ml de clorofórmio foi adicionado e as amostras foram agitadas em vortex por 25 segundos. Em seguida, os tubos foram incubados a 37°C por 30 min, agitados em vortex, incubados por mais 30 minutos a 37°C e agitados novamente em vortex. A seguir, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Foi adicionado 1 ml de clorofórmio a cada tubo, seguido por 1 ml de água destilada. As amostras foram agitadas em vortex por 30 segundos duas vezes, centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente e a fase inferior foi transferida para um novo tubo. Depois disso, 1/3 do volume total da amostra foi separado para a estimativa de fosfato inorgânico (Pi). Todas as amostras (incluindo as separadas para a determinação do Pi) foram secas em evaporador de nitrogênio (Organomation N-EVAP™ 112) e armazenadas a -20°C até a etapa de hidrólise básica.

Para a hidrólise básica, 0,5 ml de clorofórmio e 0,5 ml de KOH 0,6 M em metanol foram adicionados às amostras, as quais foram agitadas em vortex por 30 segundos e deixadas à temperatura ambiente por 1 hora. Em seguida, 0,325 ml de HCl 1M e 0,125 ml de água destilada foram adicionados às amostras, as quais foram agitadas em vortex por 30 segundos e centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos a 25°C. Finalmente, a fase inferior foi transferida para um novo tubo, as amostras foram secas em um evaporador de nitrogênio (Organomation N-EVAP™ 112) e armazenadas a -20°C até a análise por espectrometria de massas.

Para a extração de fosfolípidios, o mesmo protocolo foi seguido até o final da etapa de Bligh e Dyer; no entanto, nenhum padrão foi adicionado. A determinação de Pi também foi feita.

Para a extração de esterol, foi seguido o mesmo protocolo, mas colesterol (25 µg, Avanti Polar Lipids; 57-88-5) foi usado como padrão interno.

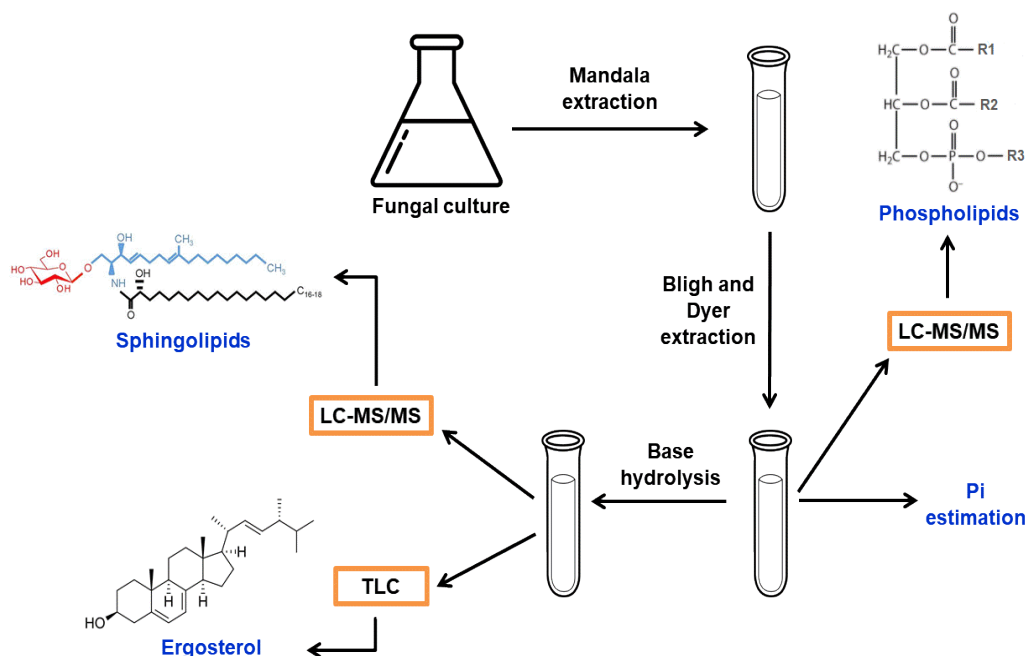


Figura 5. Esquema de extração de lipídios. Para a extração de lipídios de *A. fumigatus*, os micélios foram processados como descrito no texto, passando pelas etapas de extração de Mandala, extração de Bligh e Dyer e hidrólise básica. O fosfato inorgânico (Pi) foi estimado após a extração de Bligh e Dyer. LC-MS/MS: espectrometria de massas em tandem após cromatografia em fase líquida. TLC: cromatografia em camada delgada.

3.8.11 Determinação de fosfato inorgânico

Para a estimativa de fosfato inorgânico (Pi), diferentes volumes de NaH_2PO_4 (estoque 1 mM) foram adicionados em tubos de vidro e utilizados para a construção da curva padrão (concentrações: 0 pmol; 5 pmol; 10 pmol; 20 pmol; 40 pmol; 60 pmol; 80 pmol). 0,6 ml de tampão Ashing [H_2SO_4 a 10 N, HClO_4 a 70% e H_2O na proporção 9:1:40] foram adicionados aos padrões e as amostras (lipídios secos) que foram separadas para a estimativa de Pi. A seguir, os tubos foram agitados no vortex por 30 segundos e colocados, sem tampa, em um banho seco a 150°C durante a noite (16 horas aproximadamente).

No dia seguinte, 0,9 ml de água destilada foi adicionado aos aproximadamente 100 µl restantes após a secagem e os tubos foram agitados no vortex por 30 segundos. Em seguida, adicionou-se 0,5 ml de molibdato de amônio a 0,9% (p/v) e as amostras foram agitadas em vortex por 30 segundos.

Depois, adicionou-se 0,2 ml de ácido ascórbico a 9% (p/v) e as amostras foram agitadas em vortex por 30 segundos novamente. A seguir, as amostras foram incubadas por 30 minutos a 45°C e transferidas para placas de 96 poços transparentes em triplicata. As placas foram lidas a uma DO_{820nm} no aparelho Spectra Max M5 (Molecular Devices) e, usando o Excel®, os padrões foram usados para traçar uma curva padrão na qual a concentração de Pi das amostras foi determinada. Estes valores foram utilizados para normalizar a quantidade de esfingolípido, fosfolípido e ergosterol nas amostras após análise por espectrometria de massas.

3.8.12 Análise de lipídios por espectrometria de massas

3.8.12.1 Esfingolipídios

A análise de espectrometria de massas dos esfingolipídios foi realizada conforme descrito em Munshi et al. (2018), no Biological Mass Spectrometry Shared Resource do Stony Brook Cancer Center (Stony Brook, Nova Iorque, EUA). Resumidamente, um sistema de HPLC Thermo Accela (San Jose, CA) foi usado para separar os extratos secos dissolvidos em 150 µl de formato de amônio (1 mM) com 0,2% de ácido fórmico em metanol. Foi usada uma coluna de HPLC Peeke Scientific Spectra C8 (Redwood City, CA) (150 × 3 mm), na qual foram injetados 10 µl das amostras. Os tampões usados na corrida foram os seguintes: Tampão A, formato de amônio 2 mM e ácido fórmico 0,2%, e Tampão B, formato de amônio 1 mM com 0,2% de ácido fórmico em metanol. Um gradiente usando tampão A e B foi também utilizado, começando com 70% do tampão B com um aumento para 90% ao longo de 5 minutos, seguido por uma rampa para 99% ao longo de 9 minutos. A coluna foi equilibrada com as condições iniciais durante 8 minutos a uma taxa de fluxo de 500 µl/min. O HPLC foi acoplado à fonte de HESI de um espectrômetro de massa de triplo quadrupolo Thermo TSQ Quantum Ultra (San Jose, CA). O perfil esfingolipídico foi realizado no modo de íon positivo, com alta tensão ajustada em 3,5 kV, temperatura do vaporizador em 400°C, pressão do gás de bainha em 60, pressão do gás auxiliar em 15 e temperatura capilar de 300°C. A célula de colisão foi operada a 1,5 mTorr de argônio. Durante a corrida, as transições para cada espécie de lipídio foram monitoradas em tempo de permanência de 100 ms ou 50 ms. 20 padrões de lipídios da Avanti (Alabaster, AL) foram usados para desenvolver curvas de

calibração e essas curvas foram então usadas para monitorar as espécies de lipídios. O processamento das amostras foi feito usando o software Thermo Xcalibur 2.2 Quan Browser e exportado para o Excel®. Os valores foram normalizados pela estimativa de Pi.

3.8.12.2 Fosfolipídios

A análise de espectrometria de massas dos fosfolipídios foi realizada conforme descrito em Rizzo et al. (2018), no VCU Lipidomics/Metabolomics Core do VCU Massey Cancer Center (Richmond, Virginia EUA). Essa análise foi realizada no VCU Lipidomics and Metabolomics Core Laboratory (Massey Cancer Center, Virginia Commonwealth University, Virginia, EUA). O resíduo seco foi reconstituído em 0,5 ml do solvente de fase móvel inicial para análise LC-MS/MS, sonificado por 15 segundos e, em seguida, centrifugado por 5 min antes da transferência do sobrenadante transparente para o frasco de injetor automático para análise. As classes de fosfolipídios foram separadas por cromatografia líquida de fase reversa usando uma coluna Supelco 2.1 (id) × 150 mm Ascends Express C18 (Sigma, St. Louis, MO) e um sistema de solvente binário a uma taxa de fluxo de 0,4 ml/min com um forno de coluna definido a 45°C. A coluna foi previamente equilibrada por 0,5 minutos com uma mistura de solvente de 55% da fase móvel A (metanol:água, 50:50, v:v, com formato de amônio 10 mM e ácido fórmico a 0,5%) e 45% da fase móvel B (isopropanol com formato de amônio 10 mM e ácido fórmico a 0,5%) e após a injeção da amostra (20 µl), a razão A:B foi mantida em 55:45 por 5 min, seguido por um gradiente linear para 90% de B ao longo de 25 min. Isso foi seguido por um gradiente linear para 100% de B ao longo de 2 min, que foi mantido a 100% de B por 1 min, seguido por um gradiente de retorno a 55:45 de A:B ao longo de 2 min. A coluna foi reequilibrada com 55:45 de A:B por 0,5 min antes da próxima corrida. Cada espécie de fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilserina (PS) (Figura 6) foi quantificada durante cada corrida por análise de MRM e, além disso, a estrutura foi confirmada por meio de uma varredura MS2 durante a eluição de cada pico. Para análises de LC-MS/MS, foi utilizado um sistema de bomba binária Shimadzu Nexera LC-30 CE acoplado a um autoinjeter SIL-30 AC e desgaseificador DGU20A5R acoplado ao equipamento AB Sciex 5500 quadrupolo/linear ion trap (QTrap) (SCIEX Framingham, MA) operando em um

modo triplo quadrupolo. Q1 e Q3 foram configurados para passar íons precursores e produtos molecularmente distintos (ou uma varredura através de múltiplos m/z em Q1 ou Q3), usando N_2 para induzir dissociações colisionalmente em Q2 (que foi compensado de Q1 por 30-120 eV); a temperatura da fonte de íons foi definida para 500°C. Os padrões internos foram 1,2-diheptadecanoil-sn-glicero-3-fosfocolina (17:0/17:0 PC), 1,2-diheptadecanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (17:0/17:0 PE) e 1,2-diheptadecanoil-sn-glicero-3-fosfoserina (17:0/17:0 PS). Os valores foram normalizados pela estimativa de Pi.

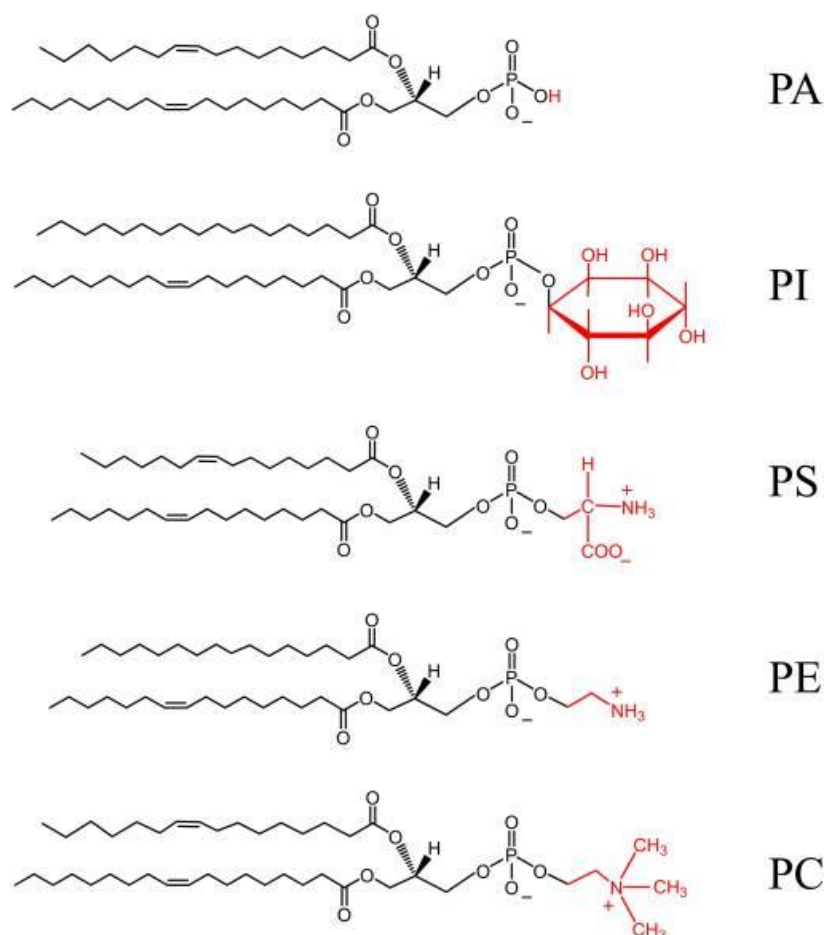


Figura 6. Estruturas fosfolipídicas encontradas em *S. cerevisiae*. Os fosfolipídios fosfatidilinositol (PI), fosfatidilserina (PS), fosfatidiletanolamina (PE) e fosfaticolina (PC) são os principais derivados do ácido fosfatídico (PA). Os grupos hidrofílicos de cada espécie de fosfolipídio (H, inositol, serina, etanolamina e colina, respectivamente) são mostrados em vermelho. Retirado de Henry et al. (2012).

3.8.12.3 Ergosterol

Para a quantificação do ergosterol, a cromatografia em camada delgada (TLC) foi realizada em um tanque de vidro 10" × 10" contendo clorofórmio/metanol/água (65:25:4, v:v:v) preparado no dia anterior. O padrão de

ergosterol (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA) (2 µg dissolvidos em 1 ml de clorofórmio e seco) e os lipídios secos foram ressuspensos em 50 µl de clorofórmio/metanol (proporção de 2:1) e 10 µl de cada amostra foram aplicados em uma placa de sílica gel (EMD Millipore, Billerica, MA, EUA) e colocadas dentro do tanque de TLC. Após 90 minutos de separação, a placa foi retirada, seca na coifa à temperatura ambiente antes de ser colocada em outro tanque contendo cristais de iodo para permitir a visualização dos lipídios. Em seguida, o ergosterol foi visualizado sob luz ultravioleta (UV) (254 nm) usando o EC3 310 Imaging System (UVP, Cambridge, UK). As imagens foram submetidas à análise densitométrica por meio do software ImageJ (Schneider et al. 2012) e normalizadas pela estimativa de Pi.

3.8.13 Testes fenotípicos

Para o teste de temperatura, 1×10^4 conídios das linhagens selvagem, *xyIP::hsfA*, *xyIP::sdeA* e *xyIP::sdeA ΔsdeB* foram inoculadas no centro de placas de Petri contendo MM sólido acrescido de diferentes concentrações de xilose. As placas foram incubadas a 30°C, 37°C ou 48°C por 72 horas e então fotografadas para a análise do crescimento radial. O mesmo foi feito com as linhagens selvagem, *ΔsdeB* e *ΔsdeB::sdeB⁺*, mas em MM sem adição de xilose. As temperaturas de 30°C e 37°C foram utilizadas por se tratarem da temperatura do solo em ambientes tropicais e da temperatura corporal do hospedeiro de *A. fumigatus* (ser humano), respectivamente. Já a temperatura de 48°C foi escolhida por já ser utilizada na literatura em experimentos de indução do choque térmico em *A. fumigatus* (Nierman et al. 2005; Do et al. 2009), além de ser a temperatura média das pilhas de compostagem onde linhagens termotolerantes de *A. fumigatus* são encontradas (Millner et al. 1977; Sharma et al. 2008; Sharma et al. 2011).

Para os testes fenotípicos com outros tipos de estresses, inoculou-se 1×10^4 conídios das linhagens selvagem e *xyIP::hsfA* no centro de placas de Petri contendo MM sólido acrescido de 0,06% de xilose e diferentes concentrações de agentes que promovem estresse à parede celular [CR, Calcofluor White (CFW), CASP e cafeína], à membrana plasmática [dodecil sulfato de sódio (SDS)], oxidativo (paraquat e menadiona), osmótico (sorbitol) e por altas concentrações de metais (ZnSO₄). As placas foram incubadas a 37°C por 72 horas e

fotografadas para a montagem dos painéis. O mesmo tipo de teste foi feito com a linhagem *xyIP::sdeA* em MM suplementado com 2,5% de xilose, exceto na presença de drogas que provocam estresse de parede celular, de membrana e oxidativo, em que seguiu-se a metodologia de teste fenotípico por *drop test*. Neste caso, 5 µl de diluições seriadas dos conídios das linhagens foram pipetados nas placas e estas foram incubadas a 37°C por 48 horas e fotografadas para a montagem dos painéis. *Drop tests* na presença de estresse de parede celular e osmótico também foram conduzidos com as linhagens selvagem, $\Delta sdeB$ e $\Delta sdeB::sdeB^+$ em MM sem adição de xilose, enquanto testes com miriocina, lovastatina e fluconazol foram conduzidos com as linhagens selvagem, $\Delta mpkA$, $\Delta sakA$ e seus complementantes.

Para testes com diamida, peróxido de hidrogênio e fludioxonil, as linhagens foram inoculadas em placas de 96 poços contendo 200 µl de MM líquido acrescido de 0,06% (para a linhagem *xyIP::hsfA*) ou 2,5% (para a linhagem *xyIP::sdeA*) de xilose e diferentes concentrações das drogas. Para testes com miriocina, cerulenina, trans-chalcona, aureobasidina A, lovastatina, voriconazol, fluconazol e anfotericina B, o meio utilizado foi sólido. Já para testes com DTT, que promove estresse de retículo, as linhagens foram inoculadas em placas de 24 poços contendo 2 ml de MM líquido acrescido de 0,06% ou 2,5% de xilose e diferentes concentrações da droga. Todas as placas foram incubadas a 37°C por 72 horas e depois fotografadas.

Para o teste fenotípico das linhagens duplo mutantes, diluições seriadas das linhagens selvagem, *xyIP::hsfA*, *pkcA^{G579R}*, *pkcA^{G579R} xyIP::hsfA*, $\Delta mpkA$, $\Delta mpkA xyIP::hsfA$, $\Delta sakA$ e $\Delta sakA xyIP::hsfA$ foram inoculadas em placas contendo MM suplementado com diferentes concentrações de xilose e incubadas a 30°C, 37°C ou 48°C por 48 horas. O mesmo foi feito na presença de diferentes concentrações de CR, CFW, CASP e SDS, com as placas sendo incubadas a 37°C por 48 horas.

Para o teste com radicicol, 1×10^4 conídios das linhagens selvagem e *xyIP::hsfA* foram inoculados em placas de 96 poços contendo MM líquido acrescido de 0,06% de xilose, diferentes concentrações da droga radicicol e 10% de *Alamar blue*TM Cell Viability Reagent (Thermo Fisher Scientific). Estas placas foram incubadas a 37°C por 48 horas.

3.8.14 Indução do estresse de temperatura e de parede celular

Para a indução do estresse de temperatura para análises de RT-qPCR, cerca de 1×10^8 conídios das linhagens selvagem, *xyIP::hsfA* e *xyIP::sdeA* foram inoculados em frascos de 250 ml contendo 50 ml de MM acrescido de 1% de xilose e incubados por aproximadamente 24 horas a 30°C e 180 rpm. Após esse período, os micélios crescidos foram centrifugados a 4800 rpm por 10 minutos e com baixa desaceleração e lavados por 2 vezes com água ultrapura estéril. A seguir, 50 ml de MM termostatzado a 30°C foram adicionados à metade dos frascos (amostras a serem reprimidas), enquanto a outra parte recebeu MM sem glicose, mas com 0,2% de xilose (amostras a serem induzidas). Os micélios retornaram para os frascos termostatzados, que foram incubados por mais 4 horas a 30°C e 180 rpm. Após, os micélios foram centrifugados a 4800 rpm por 10 minutos e com baixa desaceleração. 50 ml de MM termostatzado a 48°C foram adicionados aos frascos contendo amostras reprimidas. Os micélios retornaram para os frascos termostatzados e as amostras foram incubados com agitação constante de 180 rpm a 48°C por intervalos de tempo iguais a 5, 15, 30 ou 60 min (em duplicata). As amostras controle permaneceram a 30°C. Em seguida, o micélio de cada amostra foi filtrado a vácuo e imediatamente congelado em nitrogênio líquido para se evitar a degradação do RNA a ser extraído. Semelhantemente, fez-se também a indução do estresse de temperatura na linhagem $\Delta sdeB$ utilizando-se apenas MM. O mesmo procedimento foi seguido para o crescimento das linhagens *xyIP::hsfA sdeA::3xHA* e *sdeA::3xHA* para análises de *Western blot*, e também para as linhagens *sdeA::GFP* e *sdeA::GFP $\Delta sdeB$* , mas com o cultivo neste caso sendo feito apenas em MM.

Para a indução do estresse de parede celular para análises de RT-qPCR, cerca de 2×10^7 conídios da linhagem selvagem foram inoculados em frascos de 250 ml contendo 50 ml de YG e incubados por aproximadamente 16 horas a 37°C e 180 rpm. Posteriormente, as amostras foram tratadas com diferentes concentrações de CASP ou CR por 60 ou 30 min, respectivamente. Em seguida, o micélio de cada amostra foi filtrado a vácuo e imediatamente congelado em nitrogênio líquido para se evitar a degradação do RNA a ser extraído.

3.8.15 Análises de *Southern blot*

Para a validação das linhagens *xyIP::hsfA*, *tet_{OFF}::hsfA*, *xyIP::sdeA*, Δ *sdeB*, *sdeA::GFP* Δ *sdeB* e *xyIP::sdeA* Δ *sdeB*, o DNA genômico do micélio de cada linhagem foi extraído como descrito anteriormente e submetido a análises de *Southern blot*. Para a validação da linhagem *xyIP::hsfA*, o DNA das linhagens selvagem e *xyIP::hsfA* foi digerido com a enzima de restrição *Xho*I, enquanto que para a validação da linhagem *xyIP::sdeA*, o DNA das linhagens selvagem e *xyIP::sdeA* foi digerido com a enzima de restrição *Hind*III, de acordo com as estratégias definidas. Já para a validação da linhagem *tet_{OFF}::hsfA*, o DNA foi digerido com a enzima de restrição *Eco*RV. Por fim, para a validação das linhagens Δ *sdeB*, *sdeA::GFP* Δ *sdeB* e *xyIP::sdeA* Δ *sdeB*, o DNA foi digerido com a enzima *Eco*RI. Após a digestão, as amostras foram separadas por eletroforese (50 v por 5-6 horas) em gel de agarose 1%. O DNA foi então transferido para uma membrana de nylon carregada positivamente (Hybond N+, GE HealthCare). Para isto, o gel foi inicialmente depurinizado em solução de HCl 0,25 M por 30 minutos sob leve agitação à temperatura ambiente; a seguir, o gel foi lavado com água destilada e desnaturado por 2 vezes com a solução de desnaturação, sendo cada incubação de 30 minutos sob leve agitação à temperatura ambiente. O gel foi lavado novamente com água destilada e neutralizado por 2 vezes com a solução de neutralização, sendo cada incubação de 20 minutos sob leve agitação à temperatura ambiente. Em seguida, o gel foi colocado em contato com a membrana em uma plataforma para a transferência salina que permitia o contato direto entre o gel e a solução salina-citrato 20x concentrada. O sistema de transferência foi mantido *overnight*. No dia seguinte, a membrana foi rapidamente lavada em solução salina-citrato 2x concentrada e secada sobre papel de filtro. A seguir, a membrana foi colocada em forno UV para *cross link* (Fisher Scientific) para fixação com radiação UV de 600.000 μ J, e depois incubada em estufa a 80°C por 1 hora.

Para a hibridização dos ácidos nucleicos foi utilizado o sistema “AlkPhos Direct Labeling and Detection Systems” (GE HealthCare). A membrana fixada foi colocada em 15 ml de solução de hibridização seguindo o protocolo descrito pelo fabricante (0,5 M de NaCl dissolvido no tampão de hibridização, 4% do reagente de bloqueio). A membrana foi pré-hibridizada no forno de hibridização por 3 horas na temperatura de 60°C. Durante esse período foi preparada a sonda

utilizada na reação. Para isso, uma solução com a sequência de DNA obtida por PCR e purificada do gel de agarose correspondente à sonda (região 5'UTR do locus dos genes *hsfA*, *sdeA* e *sdeB*) foi ajustada na concentração de 10 ng/μl. 10 μl dessa solução contendo o produto de PCR foram desnaturados por 5 minutos em banho fervente e o material foi deixado por mais 5 minutos em gelo. A esse material foram adicionados 10 μl de *reaction buffer*, 2 μl de *labelling reagent* e 10 μl do reagente *cross-linker* diluído (1:5 em água), de acordo com as instruções do fabricante. A reação foi posteriormente incubada em banho seco a 37°C por 60 minutos. A sonda foi adicionada à garrafa contendo a solução de hibridização e a membrana pré-hibridizada, e a hibridização foi mantida *overnight* por cerca de 16-18 horas no forno de hibridização na temperatura de 48°C em rotação leve. Após a hibridização, a membrana foi lavada duas vezes por 10 minutos a 60°C com a solução primária na temperatura de 55°C (ureia 120 g/l, SDS 1 g/l, fosfato de sódio monobásico 50 mM, NaCl 8,7 g/l, MgCl 1 mM, reagente de bloqueio 2 g/l) de acordo com as instruções do fabricante. Na sequência, a membrana foi lavada duas vezes por 5 minutos à temperatura ambiente com a solução secundária (tris base 6,2 g/l, NaCl 5,6 g/l). Finalmente, a membrana foi lavada com 3 ml do CDP-Star (Roche) por 5 minutos e revelada utilizando o equipamento de detecção quimioluminescente ChemiDoc XRS (Bio Rad).

3.8.16 Análises de Western blot

50 μg do extrato bruto proteico das linhagens selvagem, *xyIP::sdeA*, Δ *sdeB*, *sdeA::3xHA*, *xyIP::hsfA sdeA::3xHA*, *sdeA::GFP* e *sdeA::GFP Δ sdeB* obtidos de cada experimento foram fervidos a 95°C em tampão de amostra para eletroforese de proteína 1x (Laemmli 1970). A seguir, foram submetidos a uma eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) 10% e tampão Tris-glicina 1x (tampão para eletroforese de proteína), utilizando-se uma cuba de eletroforese vertical (BioRad). As proteínas foram então transferidas do gel para uma membrana de PVDF (GE Health Care) em procedimento de transferência submerso de acordo com o protocolo do fabricante. O bloqueio da membrana de PVDF foi feito com TBST contendo 9% de leite em pó desnatado por 4 horas à temperatura ambiente. Para a detecção do epítipo 3xHA, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário α -HA produzido em

camundongo (H3663; Sigma) na diluição 1:10.000 em TBST 1× contendo 3% de leite em pó desnatado, por 16 horas a 4°C. Proteínas fusionadas à proteína GFP foram detectadas usando anticorpo primário monoclonal α -GFP produzido em camundongo (Santa Cruz Biotechnology, sc-9996) em uma diluição 1:2.000 em TBST contendo leite destanado 3%, por 16 horas a 4°C. A proteína Hsp90 de *A. fumigatus* foi detectada usando um anticorpo policlonal α -Hsp90 obtido em coelho e produzido pela Imuny, Rheabiotech (Rocha et al. 2020b). Este anticorpo foi utilizado na diluição 1:20.000 em solução de TBST contendo 5% de leite desnatado por 16 horas 4°C. O anticorpo α -Pgk1 de *S. cerevisiae* e produzido em coelho (NE130/7S; Nordic-Immunology) foi usado como controle do carregamento proteico na diluição de 1:3.000 em TBST contendo leite desnatado 5%. Este anticorpo reconhece uma única banda (44,8 kDa) correspondente à proteína PgkA de *A. fumigatus* (Afu1g10350). O reconhecimento dos anticorpos α -HA e α -GFP foi feito com um anticorpo secundário α -IgG-HRP de camundongo (A4416; Sigma). Já o reconhecimento dos anticorpos α -Hsp90 e α -Pgk1 foi feito com um anticorpo secundário α -IgG-HRP de coelho (A0545; Sigma). Ambos anticorpos secundários foram incubados em uma diluição de 1:3.000 em TBST 1× à temperatura ambiente por 2 horas. A detecção quimioluminescente foi realizada usando o kit de detecção *ECL Prime Western Blot* (GE HealthCare) no equipamento ChemiDoc XRS (BioRad). As imagens foram submetidas a uma análise densitométrica por meio do software ImageJ (Schneider et al. 2012).

3.8.17 Experimentos de co-imunoprecipitação de proteínas com GFP-Trap

Para realizar os ensaios de Co-imunoprecipitação de proteínas (Co-IP), foi utilizada a linhagem *sdeA::GFP*, a fim de verificar a interação entre SdeA e Hsp90. Para a extração de proteínas, o micélio foi macerado em nitrogênio líquido e homogeneizado em 2 ml de tampão de extração, conforme descrito anteriormente (Ries et al. 2016). Os extratos foram centrifugados a 13000 rpm por 40 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e a concentração de proteínas totais foi determinada como descrito acima. A Co-IP com GFP-Trap foi realizada conforme descrito anteriormente (Ries et al., 2016). Resumidamente, 5 mg de proteínas foram adicionados a 20 μ l da resina de agarose GFP-Trap (ChromoTek; GTA-20). A resina foi centrifugada (2.500 g durante 2 minutos a 4°C) e lavada três vezes com tampão de ressuspensão [Tris HCl 10 mM (pH

7,5), NaCl 150 mM, EDTA 0,5 mM]. Os extratos brutos e a resina foram então incubados por 4 horas com agitação a 4°C. Posteriormente, a resina foi centrifugada por 30 segundos a 5000 g e lavada três vezes com tampão de ressuspensão. Para liberar as proteínas da resina, as amostras foram incubadas com 30 µl de tampão de amostra para eletroforese de proteína (tampão Laemmli) 2x e fervidas por 5 minutos. 20 µl do imunoprecipitado foram corridos em SDS-PAGE 10% e as proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de PVDF por *Western blot*. O bloqueio, as hibridizações com anticorpos primários e secundários e a detecção foram realizados como descrito acima.

3.8.18 Análises de microscopia

3.8.18.1 Microscopia eletrônica de transmissão

1×10^7 conídios da linhagem selvagem foram cultivados estaticamente em 10 ml de YAG líquido por 36 horas a 30°C. O choque de temperatura foi induzido pela transferência do micélio para o meio YAG pré-aquecido (48°C) por 5, 10, 15, 30 e 60 min de incubação a 48°C. O controle foi deixado a 30°C. Para analisar a organização da parede celular no mutante condicional de *hsfA*, as linhagens selvagem e *xyIP::hsfA* foram cultivadas estaticamente em MM líquido suplementado com xilose 1% por 36 horas a 30°C. Os micélios foram coletados por centrifugação, lavados duas vezes com MM fresco e posteriormente incubados em MM (repressão) ou MM sem glicose, mas suplementado com xilose 0,06% (indução) por 4 horas a 30°C. Finalmente, as amostras das linhagens selvagem e *xyIP::hsfA* reprimidas foram submetidas ao choque térmico a 48°C por 15, 30 e 60 min ou tratadas com 2 µg/ml de CASP por 1 hora para induzir o estresse de parede celular. O controle não tratado permaneceu a 30°C. Em seguida, os micélios foram fixados em glutaraldeído 3% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,4 por 24 horas a 4°C. As células foram processadas conforme descrito anteriormente (Munshi et al. 2018), e a aquisição das imagens foi feita na TEM Facility do Central Microscopy Imaging Center da Stony Brook University, usando um microscópio FEI TeCnai12 BioTwinG2 a uma tensão de aceleração de 120 kV. As imagens digitais foram adquiridas com um sistema de câmera digital AMT XR-60 CCD. As espessuras da parede celular de mais de 50 seções de diferentes germinantes foram medidas utilizando o software ImageJ (Schneider et al. 2012).

3.8.18.2 Microscopia óptica

Para analisar o crescimento das hifas dos mutantes *xyIP::hsfA* e *xyIP::sdeA*, estas linhagens e a linhagem selvagem foram cultivadas e analisadas conforme descrito em Rocha et al. (2016). Para tanto, 1×10^5 conídios de cada linhagem foram inoculados em placas do tipo *glass bottom dishes* (MatTek Corporation) contendo 2 ml de MM suplementado com diferentes concentrações de xilose a 37°C por 12 horas. Imagens do tipo Contraste de Interferência Diferencial (DIC) foram capturadas usando uma câmera AxioCam (Carl Zeiss) em objetiva de 100x (Plan-Apochromat; NA 1.4) e processadas usando o software AxioVision.

Para analisar a germinação do mutante $\Delta sdeB$, 1×10^5 conídios das linhagens selvagem, $\Delta sdeB$ e $\Delta sdeB::sdeB^+$ foram inoculados em placas do tipo *glass bottom dishes* (MatTek Corporation) contendo lamínulas estéreis e 2 ml de MM por 4, 6, 8, 10 e 12 horas a 37°C. Depois da incubação, as lamínulas foram fixadas por radiação UV de 600.000 μ J, montadas e visualizadas em um microscópio de campo claro. Um conidiósporo foi contado como germinado se possuísse um tubo germinativo, que é facilmente detectável como uma pequena protuberância na superfície esférica do esporo. Cem conídios foram contados em cada experimento.

3.8.18.3 Microscopia de fluorescência

Para analisar a localização subcelular de proteínas ligadas à proteína GFP, a linhagem *sdeA::GFP* foi cultivada em placas do tipo *glass bottom dishes* (MatTek Corporation) contendo 2 ml de MM por diferentes períodos de tempo e em diferentes condições (choque térmico, estresse de membrana celular, etc.). A proteína GFP foi visualizada usando o filtro HE 38 (Carl Zeiss) em objetiva de 100x (Plan-Apochromat; NA 1.4). Imagens DIC e de fluorescência foram capturadas com uma câmera AxioCam MRm (Carl Zeiss) e processadas usando o software ZEN.

3.8.19 Ensaio da formação de biofilme

Para a quantificação da formação inicial de biofilme de linhagens de *A. fumigatus*, 1×10^5 conídios das linhagens selvagem, $\Delta sdeB$ e $\Delta sdeB::sdeB^+$

foram inoculados em poços de uma placa de 96 poços contendo 200 µl de MM e incubados a 37°C por 24 horas. Depois, o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados 3 vezes com PBS 1x. Em seguida, 150 µl de uma solução de cristal violeta (0,5%) foram adicionados a cada poço da placa e esta foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. A seguir, a solução de cristal violeta foi removida e o excesso da coloração foi removido suavemente com uma lavagem com água estéril. Cada poço da placa foi então descorado pela adição de 200 µl de etanol 95% por 16 horas à temperatura ambiente. Esta solução de descoloração foi transferida para uma nova placa de 96 poços, e a quantificação do biofilme foi realizada através da leitura espectrofotométrica (DO_{575nm}) utilizando o leitor de microplaca SpectraMax i3 (Molecular Devices). Os valores de absorbância obtidos foram normalizados pelos valores de fluorescência medidos em um experientio espelho em que as linhagens cresceram nas mesmas condições na presença de 10% do indicador *Alamar blue*TM Cell Viability Reagent (Thermo Fisher Scientific).

3.8.20 Ensaio de viabilidade celular com XTT

O ensaio de XTT [2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide] foi usado para medir a atividade metabólica de biofilmes maduros de *A. fumigatus* como descrito anteriormente (Moss et al. 2008). 1×10^5 conídios das linhagens selvagem, *xylP::sdeA* e *xylP::hsfA* foram inoculados em poços de uma placa de 24 poços contendo 500 µl de MM suplementado com 1% de xilose e incubados a 37°C por 18 horas. Depois, o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados 3 vezes com PBS 1x para remover o excesso de xilose. O biofilme formado foi então incubado em MM por mais 4 horas a 37°C. As placas controle foram mantidas nesta condição, enquanto o estresse de parede celular foi induzido no biofilme pela adição de 0,5 µg/ml de CASP por 15, 30 ou 60 minutos. A seguir, o meio de cultura foi removido e foram adicionados 300 µl de uma solução de XTT a 0,5 mg/ml contendo 50 µg/ml de coenzima K. As placas permaneceram a 37°C por 1 hora e depois lidas (DO_{490nm}) utilizando o leitor de microplaca SpectraMax i3 (Molecular Devices). Os experimentos foram feitos em triplicatas e a condição controle (sem estresse) foi utilizada para normalizar os valores de absorbância das condições de tratamento de cada linhagem.

3.8.21 Ensaio de atividade da luciferase (*luc*) em *A. fumigatus*

Seguindo o protocolo de Rocha et al. (2016) do ensaio de atividade da luciferase durante o choque de temperatura, 2×10^5 conídios das linhagens selvagem, *hsfA::luc*, *pkcA^{G579R} hsfA::luc*, $\Delta mpkA$ *hsfA::luc*, $\Delta sakA$ *hsfA::luc*, *hsp90P::luc*, *pkcA^{G579R} hsp90P::luc*, $\Delta rlmA$ *hsp90P::luc* e $\Delta mpkA$ *hsp90P::luc* foram cultivados em microplacas Cellstar brancas de 96 poços contendo 200 μ l de MM acrescido de 0,006% de extrato de levedura a 30°C por 12 horas. A seguir, 0,5 mM de luciferina foram adicionados em cada poço e a placa foi lida inicialmente a 30°C e depois a 37°C ou 48°C por 2 horas, com intervalos de 2 minutos entre cada leitura. Para o mesmo ensaio com linhagens contendo o promotor *xyIP* (*xyIP::hsfA hsp90P::luc*), o mesmo protocolo foi seguido, com algumas modificações. O cultivo foi feito em MM acrescido de 0,006% de extrato de levedura contendo 1% de xilose a 30°C por 16 horas. Depois, fez-se a lavagem das hifas com o meio de cultivo sem xilose e cultivou-se por mais 3 horas em MM acrescido de 0,006% de extrato de levedura com ou sem xilose (indução e repressão, respectivamente). A seguir, fez-se a indução do estresse de temperatura normalmente na presença de luciferina.

Para o ensaio de estresse de parede, a mesma quantidade de conídios das linhagens selvagem, *hsfA::luc*, *pkcA^{G579R} hsfA::luc*, $\Delta mpkA$ *hsfA::luc*, $\Delta sakA$ *hsfA::luc*, *hsp90P::luc*, *pkcA^{G579R} hsp90P::luc*, $\Delta rlmA$ *hsp90P::luc* e $\Delta mpkA$ *hsp90P::luc* foi inoculada em 200 μ l de MM acrescido de 0,006% de extrato de levedura e cultivada a 37°C por 5 horas. A seguir, 50 μ g/ml de CASP foram adicionados em cada poço juntamente com 0,5 mM de luciferina e a placa foi lida a 37°C por 4 horas, com intervalos de 2 minutos entre cada leitura.

A atividade luciferase das linhagens em todos os experimentos foi lida no modo Luminescência no aparelho SpectraMax i3 (Molecular Devices). A normalização foi feita pelo número de conídios.

3.8.22 Análise de RNA-Seq

As linhagens selvagem e *xyIP::hsfA* foram crescidas em MM acrescido de 1% de xilose por 24 horas a 30°C sob agitação de 180 rpm (Figura 7). A seguir, metade das amostras foi incubada em MM contendo apenas glicose 1% (repressão), enquanto a outra parte foi incubada em MM sem glicose, mas com 1% de xilose (indução) por 4 horas a 30°C. Posteriormente, as amostras em

repressão foram expostas à temperatura de 48°C por 15 ou 60 minutos (choque de temperatura), enquanto o controle permaneceu a 30°C. Os micélios foram então filtrados, o RNA total foi extraído utilizando o reagente Trizol (Life Technologies) segundo as recomendações do fabricante, tratado com DNase I (Fermentas) e purificado utilizando o kit RNeasy (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA de cada tratamento foi quantificado usando NanoDrop e o fluorômetro Qubit, e analisado em um sistema Agilent 2100 Bioanalyzer para avaliar a integridade do RNA.

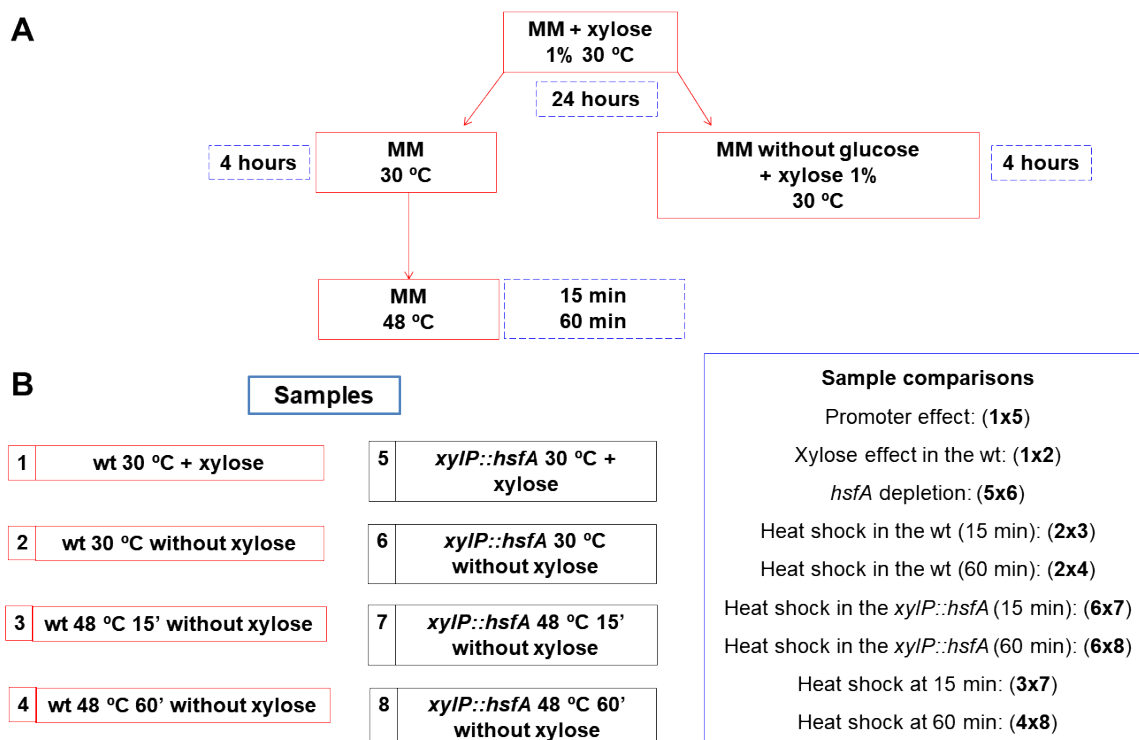


Figura 7. Desenho experimental da análise de RNA-Seq das linhagens selvagem e *xyIP::hsfA* de *A. fumigatus* durante o estresse de temperatura. (A) Esquema do cultivo, indução/repressão do promotor e indução do estresse de temperatura nas linhagens. (B) Amostras geradas e comparações realizadas na análise dos dados de RNA-Seq.

O preparo e o sequenciamento das amostras foram realizados no Laboratório Nacional de Biorrenováveis, situado no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), no distrito de Barão Geraldo, SP, como descrito anteriormente (Alves de Castro et al. 2016). Para o preparo das amostras, o Illumina TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation kit foi utilizado. Resumidamente, as moléculas de mRNA contendo cauda poliA foram selecionadas utilizando *beads* magnéticas ligadas com oligonucleotídeos poliT. A fragmentação e a preparação das bibliotecas foram realizadas utilizando cátions divalentes e fragmentação térmica. A síntese da primeira cadeia de

cDNA foi realizada utilizando transcriptase reversa (Superscript II) e primers randômicos. A síntese da segunda cadeia de cDNA foi feita utilizando DNA Polimerase I. RNase H e *beads* dUTP AMPure XP foram utilizadas para separar as duplas fitas de cDNA de extremidades cegas, às quais foi adicionado um único nucleotídeo "A" na extremidade 3' para evitar que se ligassem umas a outras durante a reação de ligação ao adaptador, que foi a próxima etapa. Os produtos foram então purificados e enriquecidos por meio de PCR usando o PCR Primer Cocktail (Illumina). Por fim, as bibliotecas foram quantificadas no equipamento Step One Plus (Applied Biosystems) e sequenciadas (2 × 100 pb) em um instrumento HiSeq 2500.

O resultado do sequenciamento foi analisado em colaboração com a Dra. Gabriela Felix Persinoti (CNPEM, Barão Geraldo, SP) seguindo o esquema da Figura 7, utilizando p valor $\leq 0,05$. As *reads* foram submetidas ao NCBI's Short Read Archive sob o Bioprojeto PRJNA690780. A qualidade dos arquivos *fastq* obtidos foi verificada com FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) e limpos com Trimmomatic (Bolger et al. 2014). O rRNA foi removido usando SortMeRNA (Kopylova et al. 2012), e as *reads* de alta qualidade foram mapeadas para a sequência do genoma da linhagem Af293 de *A. fumigatus* usando Tophat2 (Kim et al. 2013) no modo específico de fita. A saturação do esforço de sequenciamento foi avaliada pela contagem do número de junções exon-exon detectadas em diferentes níveis de subamostragem do total de leituras de alta qualidade, usando RSeQC (Wang et al. 2012). Todas as amostras alcançaram saturação de junções exon-exon conhecidas. Para avaliar a abundância de transcritos, as leituras exônicas foram contadas de uma forma específica de fita usando a biblioteca Rsubread (Liao et al. 2013) do Bioconductor (Huber et al. 2015). A identificação de genes diferencialmente expressos foi realizada com EdgeR (Robinson et al. 2010), controlando para uma FDR de 0,01. Os *Fold changes* e as significâncias estatísticas de todos os genes para cada comparação são mostrados no Material Suplementar do artigo de Fabri et al. (2021). A análise de enriquecimento de Gene Ontology (GO) foi realizada usando a ferramenta KOBAS <kobas.cbi.pku.edu.cn> (Xie et al. 2011). A análise de agrupamento dos genes expressos de forma diferencial foi realizada usando agrupamento hierárquico no software Multiple Experiment Viewer (MeV)

(<<http://mev.tm4.org/>>).

3.8.23 Análise de espectrometria de massas de metabólitos secundários

A análise de de espectrometria de massas dos metabólitos secundários foi conduzida no laboratório da professora Taícia Fill, localizado no Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da UNICAMP. Para a análise, as amostras das linhagens selvagem e *xyIP::hsfA* foram induzidas como descrito na análise de RNA-Seq e a metodologia utilizada foi descrita anteriormente em Costa et al. (2019). O micélios liofilizados e macerados foram diluídos em metanol e analisados em um espectrômetro de massas Termo Scientific QExactive® Hybrid Quadrupole-Orbitrap. As análises foram realizadas no modo positivo com intervalo m/z de 115 a 1500, voltagem capilar de 3,4 kV, temperatura capilar de entrada de 280°C, lente S 100V. 5 µl de cada amostra foram injetados no espectrômetro, utilizando como fase estacionária uma coluna Termo Scientific Accucore C18 2,6 µm (2,1 mm × 100 mm), e como fase móvel: 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila (B). Perfil de eluição (A/B): 95/5 até 2/98 em 15 minutos, espera de 5 minutos, até 95/5 em 1,2 minutos e espera por 7,8 min. O tempo total de corrida foi de 29 minutos para cada corrida e a taxa de fluxo de 0,2 ml/min. A análise de MS/MS foi realizada pela dissociação induzida por colisão com intervalo m/z de 100 a 800 e a energia de colisão variou de 10 a 50 v. As amostras foram infundidas diretamente por eletrospray com taxa de fluxo de 5,0 µl/min. Os dados de MS e MS/MS foram processados com o software Xcalibur (versão 3.0.63) desenvolvido pela Termo Fisher Scientific e plotados em gráficos utilizando o software GraphPad Prism.

3.8.24 Teste de virulência em *Galleria mellonella*

Larvas de *Galleria mellonella* foram obtidas por meio da criação de mariposas adultas, seguindo a metodologia de Fuchs et al. (2010). Os ensaios de virulência foram conduzidos como descrito previamente (Pereira Silva et al. 2017). Larvas de *G. mellonella* de tamanho semelhante (aproximadamente 250-400 mg) foram selecionadas e mantidas em jejum em placas de Petri a 37°C, no escuro, por 24 horas antes do uso. Os conídios das linhagens selvagem, $\Delta sdeB$, $\Delta sdeB::sdeB^+$ e $tet_{OFF}::hsfA$ foram obtidos após crescimento em meio YAG por dois dias, colhidos em PBS e filtrados em Miracloth (Calbiochem). Para investigar

a virulência de *A. fumigatus* contra *G. mellonella*, 1×10^6 conídios de cada linhagem foram inoculados na hemolinfa da última pró-pata à esquerda das larvas no último estágio larval de desenvolvimento (instar), usando seringa Hamilton (7000,5KH). Para reprimir o promotor *tet*_{OFF}, 10 µg/ml de doxiciclina foram inoculados juntamente com os conídios em parte das larvas. Doze indivíduos foram utilizados para cada condição. Larvas inoculadas apenas com 5 µl de PBS ou doxiciclina 10 µg/ml foram usadas como grupos controles. Em seguida, as larvas foram incubadas em placas de Petri a 37°C no escuro por até 15 dias. A morte das larvas foi avaliada diariamente, sendo consideradas mortas aquelas que apresentaram ausência de movimento em resposta ao toque.

3.8.25 Análises estatísticas

A análise estatística dos dados experimentais de RT-qPCR, microscopia eletrônica de transmissão, formação de biofilme, ensaio de XTT e determinação da concentração de lipídios foi feita através do software GraphPad Prism (versão 8.0) utilizando-se *one-way* ou *two-way* ANOVA e o teste de Sidak e/ou Dunnet (*post hoc*). Para as curvas de sobrevivência dos ensaios de virulência, os testes Log-rank Mantel-Cox e Gehan-Breslow-Wilcoxon foram empregados. As diferenças foram consideradas significativas a partir de um *p* valor $\leq 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Módulo 4.1 Caracterização funcional do fator de transcrição HsfA de *A. fumigatus*

4.1.1 Construção das linhagens mutantes *xyIP::hsfA* e *tetOFF::hsfA*

Para a identificação do homólogo do gene *hsf1* em *A. fumigatus*, foi realizada uma análise do tipo BLASTp no banco de dados do genoma da linhagem selvagem A1163 de *A. fumigatus* usando as sequências proteicas de Hsf1 de *S. cerevisiae* e *C. albicans*, o que resultou em uma única ORF com similaridade significativa. O homólogo potencial, Afu5g01900 (denominado *hsfA*), compartilha 30% de identidade e 51% de similaridade com Hsf1 de *S. cerevisiae* e 27% de identidade e 46% de similaridade com Hsf1 de *C. albicans*. Além disso, HsfA apresenta identidade significativa com Hsf1 de *A. nidulans* e *Aspergillus niger* (70% de identidade e 79% de similaridade; e 74% de identidade e 83% de similaridade, respectivamente). A região HsfA com a identidade mais elevada compreende o domínio de ligação ao DNA do tipo HSF tanto da proteína de levedura quanto humana (Veri et al., 2018), dos resíduos 150 a 252 (2.8e-28; Pfam 00447). A Figura 8 mostra o alinhamento de todas essas proteínas, destacando os principais domínios. Percebe-se que há maior conservação dos domínios regulatórios centrais, o que inclui o domínio de ligação ao DNA do tipo hélice-volta-hélice alada, imprescindível para a ligação de Hsf1 ao DNA durante sua atividade como fator de transcrição.

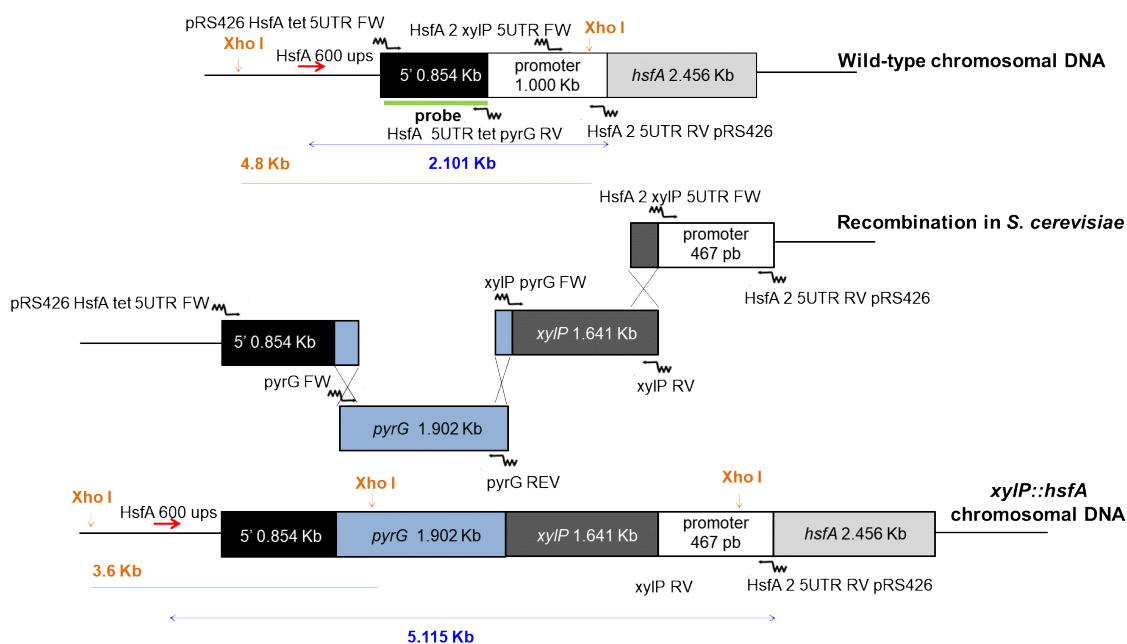


Figura 8. Alinhamento de proteínas homólogas a HsfA. Comparação da sequência de aminoácidos deduzida de HsfA em *A. fumigatus* (Afu5g01900) com as sequências de Hsf1 de *S. cerevisiae* (YGL073W), *C. albicans* (C1_09170W_A), *Schizosaccharomyces pombe* (SPAC2E12.02), *A. nidulans* (AN8035), *A. niger* (An16g01760), *C. neoformans* (CNAG_07460) e humano (Hs_SGRK2; NP_001186193.1), as quais foram alinhadas utilizando uma ferramenta Clustal Ω (Waterhouse et al. 2009). Os resíduos idênticos estão sombreados em tons de azul. Linha vermelha: domínio de ligação ao DNA em humanos (15-120 aa); linha verde: domínio de ligação ao DNA de hélice-volta-hélice alada em levedura (169-275 aa) (ID de acesso: G3DSA: 1.10.10.10); linha azul: domínio zipper de leucina em humano (137-212 aa); linha laranja: região espiralada necessária para oligomerização (326-424 aa); linha roxa tracejada: domínios de ativação transcricional amino-terminal e carboxi-proximal em levedura (40-147 aa e 583-783 aa, respectivamente); triângulos amarelos: sítios de fosforilação em leveduras (serinas e treoninas). Informações retiradas de Veri et al. (2018b) e do website *Yeast Genome Database* (<<https://www.yeastgenome.org/locus/S000003041/protein>>).

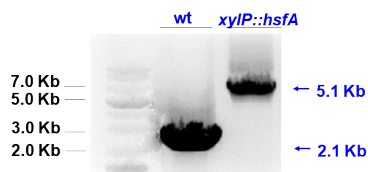
Anteriormente, em nosso laboratório, tentou-se deletar o gene *hsfA* em *A. fumigatus* por meio da construção do mutante nulo Δ *hsfA* durante o Projeto de Iniciação Científica do aluno, mas, apesar de muitas tentativas, não foi possível obtê-lo. Além disso, também não foi possível realizar qualquer edição na região 5'UTR do gene *hsfA* com o objetivo de substituir o promotor nativo por promotores induzíveis na intenção de controlar a expressão do gene *hsfA* de maneira condicional. Foram feitas construções com os promotores induzíveis *niiA* (do gene que codifica a enzima nitrato redutase) (Hu et al. 2007), *tet_{ON}* (promotor responsivo à tetraciclina) (Helmschrott et al. 2013) e *alcA* (do gene que codifica a enzima álcool desidrogenase em *A. nidulans*) (Waring et al. 1989), mas nenhum candidato de transformação positivo foi obtido (dados não mostrados). Estes dados indicam que *hsfA* é essencial, que o promotor alternativo pode não satisfazer os requisitos celulares para a expressão deste fator de transcrição e que a região 5' *upstream* do gene deve ser muito importante para a expressão de *hsfA* em *A. fumigatus*. Em outras palavras, por ser um sítio importante de regulação da transcrição, a presença do promotor nativo desse gene na região 5'UTR pode ser indispensável para o correto funcionamento do locus *hsfA*.

Por essa razão, novos cassetes condicionais foram construídos, mas desta vez mantendo-se parte da região promotora original de *hsfA* (de 467 pb) antes do gene. Para tanto, foram construídos e transformados concomitantemente dois cassetes de substituição: o cassete *xyIP::hsfA* (Figura 9), no qual o gene *hsfA* está sob o controle transcricional do promotor do gene que codifica a enzima xilose redutase de *P. chrysogenum* (*xyIP*) (Zadra et al. 2000), que é regulado pela concentração de xilose presente no meio; e também o cassete *tet_{OFF}::hsfA* (Figura 10), no qual o gene *hsfA* está sob o controle transcricional do sistema promotor *tet_{OFF}* (Peng et al. 2018), o qual é reprimido por tetraciclina (ou pelo análogo doxiciclina) e ativado na ausência dos mesmos, sendo uma variação do promotor *tet_{ON}*. Com essa nova estratégia, a transformação de ambos os cassetes resultou em candidatos positivos, que foram validados por PCR e *Southern blot*, não deixando dúvidas de que a região promotora é de fato importante para o funcionamento do locus *hsfA*.

A



B



C

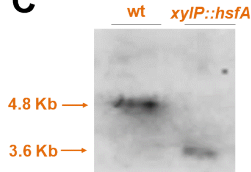


Figura 9. Construção e validação do mutante *xyIP::hsfA*. (A) Os fragmentos independentes usados na obtenção do cassete foram adquiridos por PCR utilizando os *primers* indicados na figura, e recombinao em *S. cerevisiae*. (B) PCR de validação do candidato a *xyIP::hsfA* após transformação em *A. fumigatus*. Utilizaram-se os *primers* HsfA 600 ups e HsfA 2 5UTR RV pRS426, que amplificam os fragmentos mostrados em azul em (A), confirmando a obtenção do mutante condicional. (C) Análise de *Southern blot* do candidato a *xyIP::hsfA* utilizando a região 5'UTR como sonda e a enzima de restrição *XhoI* para a obtenção dos fragmentos mostrados em laranja em (A).

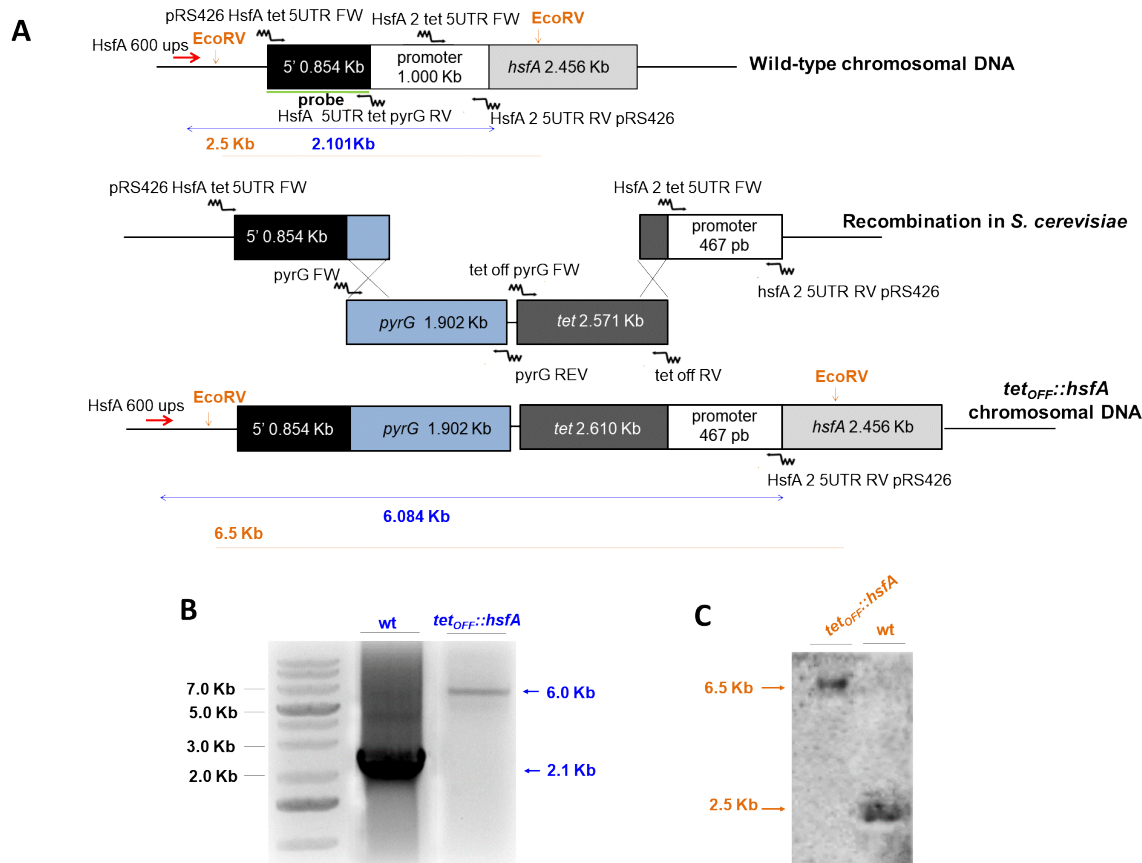


Figura 10. Construção e validação do mutante *tet_{OFF}::hsfA*. (A) Os fragmentos independentes usados na obtenção do cassete foram adquiridos por PCR utilizando os *primers* indicados na figura, e recombinados em *S. cerevisiae*. (B) PCR de validação do candidato a *tet_{OFF}::hsfA* após transformação em *A. fumigatus*. Utilizaram-se os *primers* HsfA 600 ups e HsfA 2 5UTR RV pRS426 (B), que amplificam os fragmentos indicados em azul em (A), confirmando a obtenção do mutante condicional. (C) Análise de *Southern blot* do candidato a *tet_{OFF}::hsfA* utilizando a região 5'UTR como sonda e a enzima de restrição *EcoRV* para a obtenção dos fragmentos mostrados em laranja em (A).

Antes da realização de qualquer teste fenotípico ou outro experimento com as linhagens mutantes condicionais *xyIP::hsfA* e *tet_{OFF}::hsfA*, validou-se o correto funcionamento dos promotores condicionais e a possibilidade de induzir e reprimir a expressão do gene *hsfA*. Para tanto, foram feitas análises de RT-qPCR. Para a análise do promotor *xyIP*, as linhagens selvagem e *xyIP::hsfA* foram crescidas a 180 rpm por 24 horas em MM líquido contendo 1% de xilose a 37°C. A seguir, o fungo foi centrifugado, lavado em água ultrapura autoclavada por duas vezes e colocado em frascos contendo MM líquido ou MM sem glicose e suplementado com diferentes concentrações de xilose. As amostras foram incubadas por mais 4 horas até serem filtradas e congeladas. Já para a análise do sistema promotor *tet_{OFF}*, as linhagens selvagem e *tet_{OFF}::hsfA* foram crescidas a 180 rpm por 24 horas em MM líquido contendo 1% de glicose a 37°C. A seguir, adicionaram-se em cada frasco diferentes concentrações de doxiciclina, e as

amostras foram incubadas por mais 4 horas até serem filtradas e congeladas. O mRNA total de todas as amostras foi extraído, tratado e transcrito em cDNA para as análises de RT-qPCR. Como esperado, a ausência de xilose reprimiu o promotor *xyIP* na linhagem *xyIP::hsfA* enquanto a presença da mesma foi suficiente para superexpressar o gene *hsfA* (Figura 11A). 0.06% de xilose foi a concentração ideal encontrada para induzir a expressão de *hsfA* no mutante *xyIP::hsfA* de maneira quase equivalente à expressão na linhagem selvagem. Analogamente, a presença de doxiciclina no meio reprimiu o sistema promotor *tet_{OFF}* na linhagem *tet_{OFF}::hsfA*, enquanto a ausência de doxiciclina induziu a expressão de *hsfA* (Figura 11B). Tendo em vista que a ausência de doxiciclina no meio superexpressa o gene *hsfA* no mutante *tet_{OFF}::hsfA* em uma grande escala (26 vezes mais que a linhagem selvagem), optou-se por trabalhar apenas com a linhagem *xyIP::hsfA*, que apresentou uma maior facilidade no controle transcricional do gene *hsfA*, facilitando o trabalho de caracterização fenotípica da linhagem.

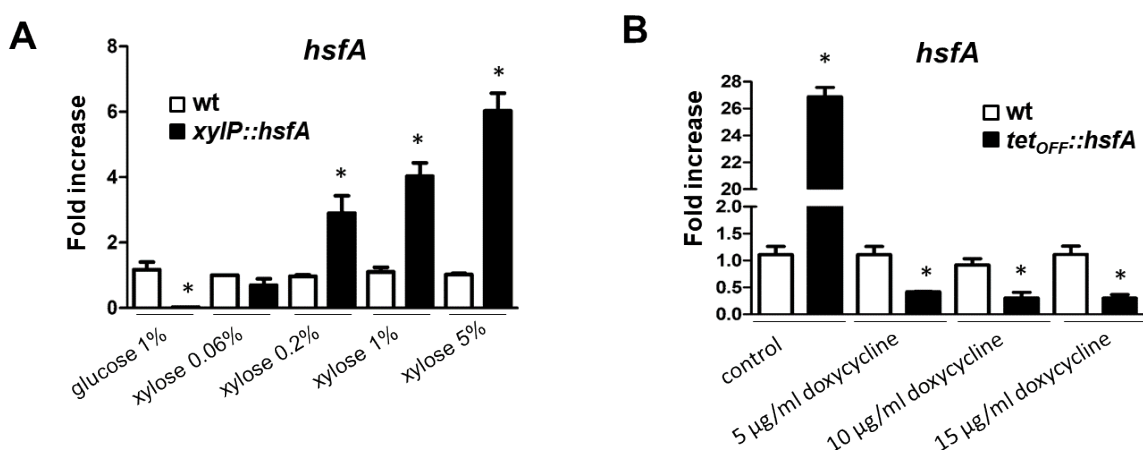


Figura 11. Análise da expressão do gene *hsfA* por RT-qPCR nos mutantes condicionais *xyIP::hsfA* e *tet_{OFF}::hsfA*. (A) A expressão de *hsfA* é reprimida na ausência de xilose e induzida na presença da mesma na linhagem *xyIP::hsfA*. (B) A expressão de *hsfA* é induzida na ausência de doxiciclina e reprimida na presença da mesma na linhagem *tet_{OFF}::hsfA*. O mRNA total foi avaliado por RT-qPCR e normalizado pelo gene da γ -tubulina. Os dados são provenientes de duas replicatas experimentais e independentes (Média \pm DP). O *Fold increase* de cada condição representa o mRNA total normalizado em relação aos pontos da linhagem selvagem (wt). * significa p valor $\leq 0,05$ em relação ao ponto da mesma condição na linhagem selvagem (One-Way ANOVA).

4.1.2 Caracterização funcional do mutante *xyIP::hsfA* em *A. fumigatus*

4.1.2.1 O gene *hsfA* é essencial para o crescimento normal e para a termotolerância de *A. fumigatus*

Primeiramente, para avaliar se a repressão da *hsfA* causa alterações na germinação e na estrutura das hifas de *A. fumigatus*, foi conduzido um experimento de microscopia óptica em que as linhagens selvagem e *xyIP::hsfA* foram cultivadas em MM contendo diferentes concentrações de xilose durante 12 horas a 37°C. Como esperado, a ausência de xilose inibiu a germinação do mutante condicional (Figura 12). Em contraste, o mutante *xyIP::hsfA* começou a germinar com o aumento da concentração de xilose, alcançando um crescimento comparável ao da linhagem selvagem na concentração de 0,1% de xilose no meio. Exceto pela inibição da germinação em baixas concentrações de xilose, não foi observada nenhuma alteração nas hifas da linhagem mutante. Para efeito de comparação, em meio sem glicose, mas com xilose 1%, o mutante condicional cresceu normalmente sem o surgimento de qualquer alteração estrutural da hifa.

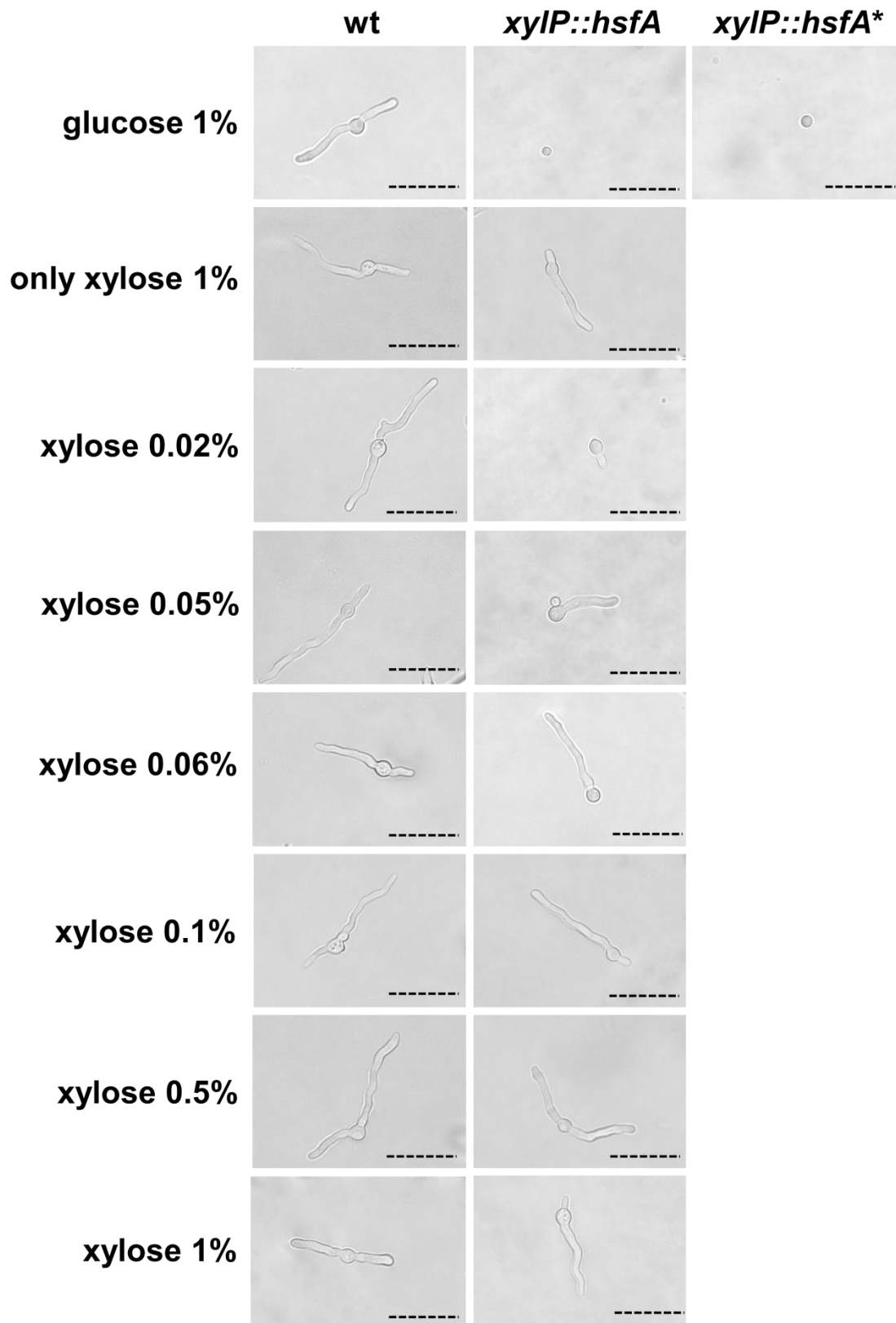


Figura 12. HsfA é essencial para a germinação de *A. fumigatus*. As linhagens selvagem e *xyIP::hsfA* foram cultivadas por 12 horas a 37°C em placas do tipo *Glass Bottom Dishes* contendo 2 ml de MM suplementado com diferentes concentrações de xilose, ou apenas xilose no lugar da glicose. As lamínulas foram lavadas, fixadas sobre uma lâmina com radiação UV e analisadas em microscópio óptico Zeiss (aumentos de 100x). Barras: 10 µm. * crescimento a 37°C por 36 horas.

Como a termotolerância é uma característica fundamental da patogênese de *A. fumigatus* (Bhabhra and Askew 2005) e HsfA pode ser um pilar importante em sua manutenção, inicialmente buscou-se entender o papel desempenhado pelo gene *hsfA* na promoção da termotolerância. Com o intuito de avaliar possíveis defeitos de crescimento vegetativo do mutante condicional, bem como a interferência da temperatura neste crescimento, realizou-se a análise do crescimento radial do mutante *xyIP::hsfA* em diferentes temperaturas. Pode-se observar que a 30°C, isto é, em condição basal, a linhagem *xyIP::hsfA* na condição de repressão (0% de xilose) apresentou crescimento reduzido se comparado à linhagem selvagem. Este crescimento, no entanto, ficou equiparável ao da linhagem selvagem quando foi adicionada uma pequena concentração de xilose ao meio (0,03%). A 37°C, porém, o mutante condicional foi incapaz de crescer na condição de repressão, o que mostra a grande importância do gene *hsfA* para o fungo. O crescimento desse mutante se igualou ao da linhagem selvagem apenas quando pelo menos 0,06% de xilose foi adicionado ao meio. A suscetibilidade do mutante *xyIP::hsfA* foi ainda maior a 48°C, pois o mesmo conseguiu crescer adequadamente apenas quando 0,1% de xilose foi adicionado ao meio (Figura 13). Além disso, pode-se perceber que a adição de xilose no meio não alterou o crescimento da linhagem selvagem, permanecendo assim como um controle confiável. Em conclusão, esse resultado sugere que quanto maior a temperatura, maior a necessidade de expressão de *hsfA* em *A. fumigatus*, o que significa que *hsfA* é essencial para a termotolerância. Considerando os resultados de RT-qPCR apresentados na Figura 11A, pode-se inferir que mesmo em repressão (ausência de xilose), uma pequena expressão de *hsfA* é mantida no mutante *xyIP::hsfA* a 30°C, e mesmo sendo muito baixa, ela é suficiente para permitir o crescimento desta linhagem (Figura 13), ainda que de forma limitada. No entanto, este crescimento é consideravelmente inferior ao apresentado pela linhagem selvagem, sugerindo que o gene *hsfA*, assim como seus ortólogos em *S. cerevisiae* e *C. albicans*, é de fato essencial para o crescimento normal de *A. fumigatus*.

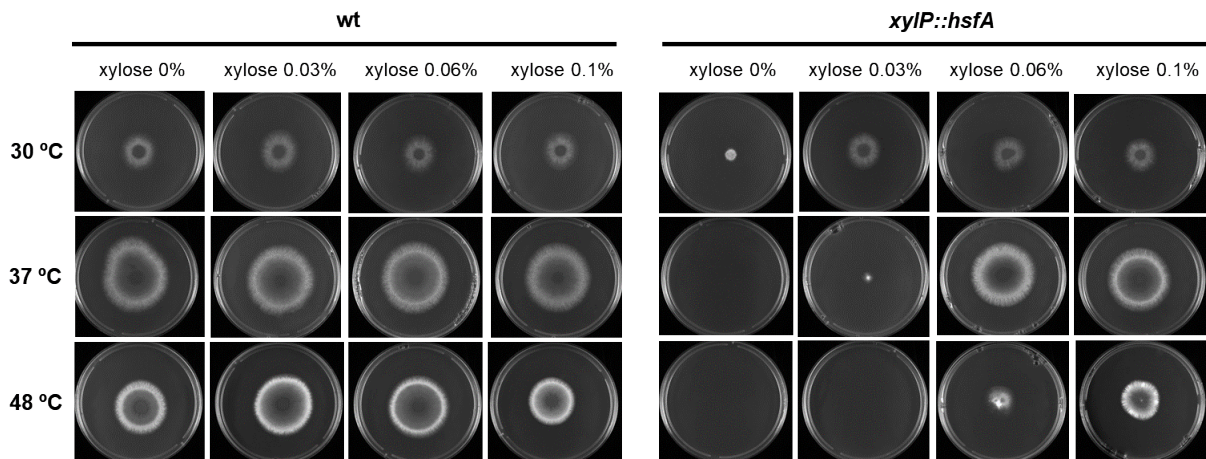


Figura 13. *hsfA* é essencial para o crescimento normal e a termotolerância de *A. fumigatus*. 1×10^4 conídios das linhagens selvagem e *xyIP::hsfA* foram inoculados em MM sólido contendo as concentrações indicadas de xilose e incubados a 30, 37 ou 48°C por 72 horas.

4.1.2.2 HsfA exerce papel na adaptação ao estresse de parede celular e no remodelamento da parede celular

Resultados anteriores em nosso laboratório indicaram que os mutantes da via CWI de *A. fumigatus* são menos tolerantes ao estresse de temperatura e que a sinalização de PkcA, a proteína quinase inicial da via CWI, é necessária para a adaptação precoce a esse estresse (Rocha et al. 2020b). Para obter maiores informações sobre os efeitos iniciais e prolongados do choque de temperatura sobre a parede celular, a organização da parede celular na linhagem selvagem foi analisada antes e depois do choque de temperatura de 48°C por meio de microscopia eletrônica de transmissão (Figura 14A). Como resultado, foi observado um aumento notável na espessura da parede celular do fungo após a exposição ao choque de temperatura. Surpreendentemente, esse aumento foi perceptível logo após 5 minutos de exposição à alta temperatura, resultando em um aumento de 27% na espessura da parede celular. De forma consistente, esse aumento foi mais evidente após 10-15 min (aumento de 60%) e 60 min (aumento de 75%) do início do estresse térmico (Figura 14B). Esses resultados sugerem que o aumento repentino da temperatura desencadeia o remodelamento da parede celular, indicando que essa estrutura é altamente dinâmica e responsiva às flutuações da temperatura circundante, potencialmente subjacente a um mecanismo de sobrevivência para neutralizar o choque de temperatura representado pela expansão dramática da parede celular.

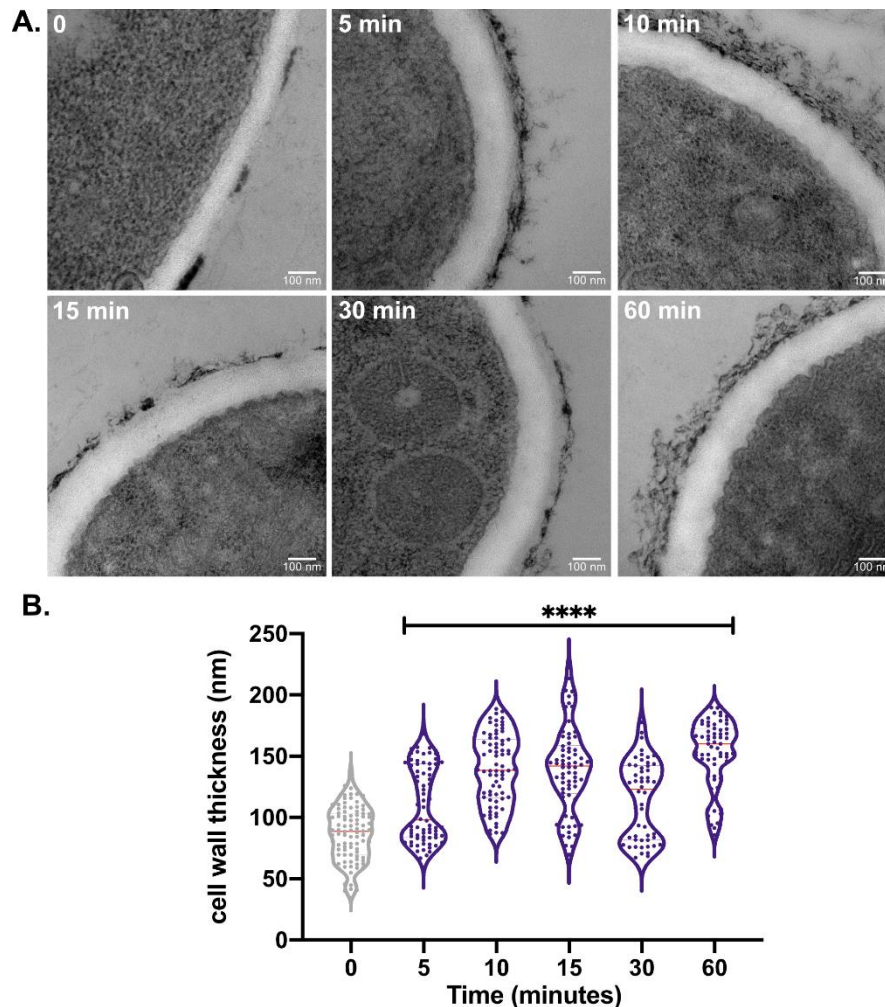


Figura 14. O estresse térmico causa o remodelamento e o espessamento da parede celular de *A. fumigatus*. A linhagem selvagem de *A. fumigatus* cresceu estaticamente por 30 horas a 30°C. Em seguida, as amostras foram expostas ao choque térmico de 48°C por 5, 10, 15, 30 ou 60 minutos e preparadas para a análise de microscopia eletrônica de transmissão (A). O controle foi deixado a 30°C. (B) Gráfico da espessura da parede celular nas condições testadas. Os resultados são apresentados como média \pm DP. * $p \leq 0,0001$ (One-Way ANOVA, com pós-teste de Dunnet).

Como a via CWI também é ativada pelo estresse de temperatura (Verna et al. 1997; Zu et al. 2001; Lam et al. 2013) e Hsf1 parece regular a expressão de genes envolvidos na formação e remodelamento da parede celular em *S. cerevisiae* em resposta ao choque de temperatura (Imazu and Sakurai 2005; Yamamoto et al. 2005), foram realizados testes radiais da linhagem *xyIP::hsfA* com drogas que perturbam a parede e a membrana celular. Aqui, porém, decidiu-se utilizar apenas uma concentração sub-inibitória de xilose a fim de avaliar o efeito da perda de função do gene *hsfA* nestas condições de estresse. Isso teve que ser feito porque, como mostrado acima, a forte repressão de *hsfA* afeta totalmente o crescimento da linhagem *xyIP::hsfA* a 37°C. Dessa forma, nos testes apresentados a partir de agora, foi utilizada a concentração de 0,06% de

xilose no meio de cultivo, já que nesta concentração o crescimento da linhagem mutante é equiparável ao da linhagem selvagem a 37°C, mas consideravelmente reduzido a 48°C, como pode ser visto na Figura 9. Entre as drogas testadas, CASP é uma equinocandina semissintética e, por isso, inibe a síntese de β -1,3-glucana (Perlin 2011), enquanto CR e CFW ligam-se às cadeias de quitinas, interferindo na montagem da parede celular (Roncero and Duran 1985; Kopecka and Gabriel 1992). Cafeína (CAF) por sua vez não possui um mecanismo de ação completamente elucidado, mas acredita-se que ela tem como alvo o complexo de proteínas TOR quinases, as quais também são importantes para a sinalização da via CWI (Levin 2011). Já o SDS é um detergente aniônico que, além de desestabilizar a membrana plasmática, também desnatura proteínas da parede celular. Ainda que de forma bastante sutil, o mutante *xyIP::hsfA* na condição sub-inibitória apresentou maior sensibilidade para todas as drogas estressoras da parede celular testadas, com destaque para CR, CAF e CASP, bem como para o estressor de membrana celular SDS (Figura 15A-B). O biofilme maduro do mutante condicional sob repressão também foi mais suscetível ao CASP, principalmente após 30 minutos de tratamento (Figura 15C). Estes resultados sugerem que o fator de transcrição HsfA também é importante para a manutenção da integridade da parede celular.

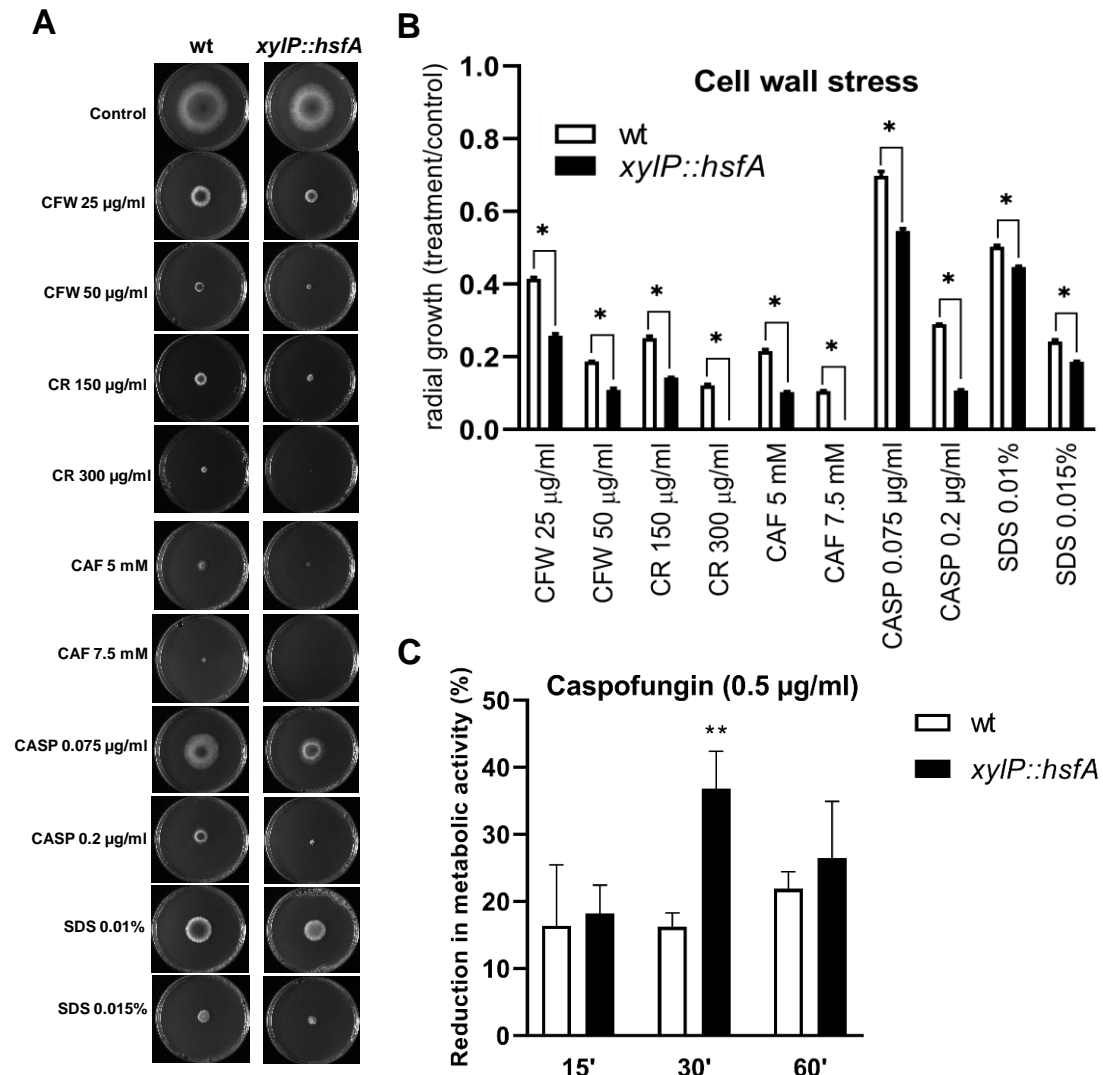


Figura 15. O mutante *xyIP::hsfA* é mais suscetível ao estresse de parede celular. (A) 1×10^4 conídios das linhagens selvagem e *xyIP::hsfA* foram inoculados em MM sólido acrescido de 0,06% de xilose e diferentes concentrações de Calcofluor White (CFW), Congo red (CR), cafeína (CAF), caspofungin (CASP) e dodecil sulfato de sódio (SDS). As placas foram incubadas a 37°C por 72 horas e fotografadas. (B) A razão do crescimento radial da condição tratada para a condição controle foi calculada e plotada no gráfico. Os resultados foram expressos como média \pm DP, $n = 3$. * $p \leq 0,0001$ (*two-way ANOVA* e pós-teste de Sidak). (C) Gráfico da redução da atividade metabólica do biofilme das linhagens selvagem e *xyIP::hsfA* na presença de caspofungin, medida pelo reagente XTT. Os biofilmes foram obtidos crescendo cada linhagem por 18 horas em MM suplementado com xilose 1% a 37°C e reprimidos em MM por 4 horas a 37°C. Posteriormente, as placas foram submetidas ao estresse de parede celular causado por caspofungin pelos tempos indicados. Os resultados foram expressos como média \pm DP, $n = 3$. ** $p \leq 0,01$ (*two-way ANOVA* e pós-teste de Sidak) em comparação com a linhagem selvagem no mesmo tempo.

Para estudar o papel de *hsfA* e os impactos do choque térmico e do estresse da parede celular sobre a parede celular de *A. fumigatus*, as linhagens selvagens e *xyIP::hsfA* foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão em diferentes condições. Conforme mostrado na Figura 16, a presença de xilose no meio não alterou a espessura da parede celular da

linhagem selvagem. No entanto, como esperado, a indução do choque térmico por 15, 30 ou 60 minutos, assim como o tratamento com CASP, aumentaram a espessura da parede celular da linhagem selvagem em 25%. O mutante *xyIP::hsfA*, por outro lado, possui parede celular naturalmente mais espessa (15%) em comparação com a linhagem selvagem na condição basal (30°C) sob repressão (glicose 1%), o que não ocorre na presença de xilose 0,06%. Embora a espessura da parede celular do mutante tenha aumentado durante o choque térmico e o estresse da parede celular, esse espessamento foi muito mais moderado (aproximadamente 15%), provavelmente devido à já maior espessura da parede celular na condição basal. O aumento na parede celular de *C. albicans* também foi observado em mutantes condicionais de *hsf1* (Nair et al. 2017) e *hsp90* (Leach et al. 2012a), que é um dos principais alvos transcricionais de Hsf1. Esses resultados sugerem que HsfA é necessário para a arquitetura típica da parede celular de *A. fumigatus* em condições basais, ainda que a perda de função de *hsfA* retém a capacidade de remodelar a ultraestrutura da parede celular quando desafiado com choque térmico e estresse da parede celular.

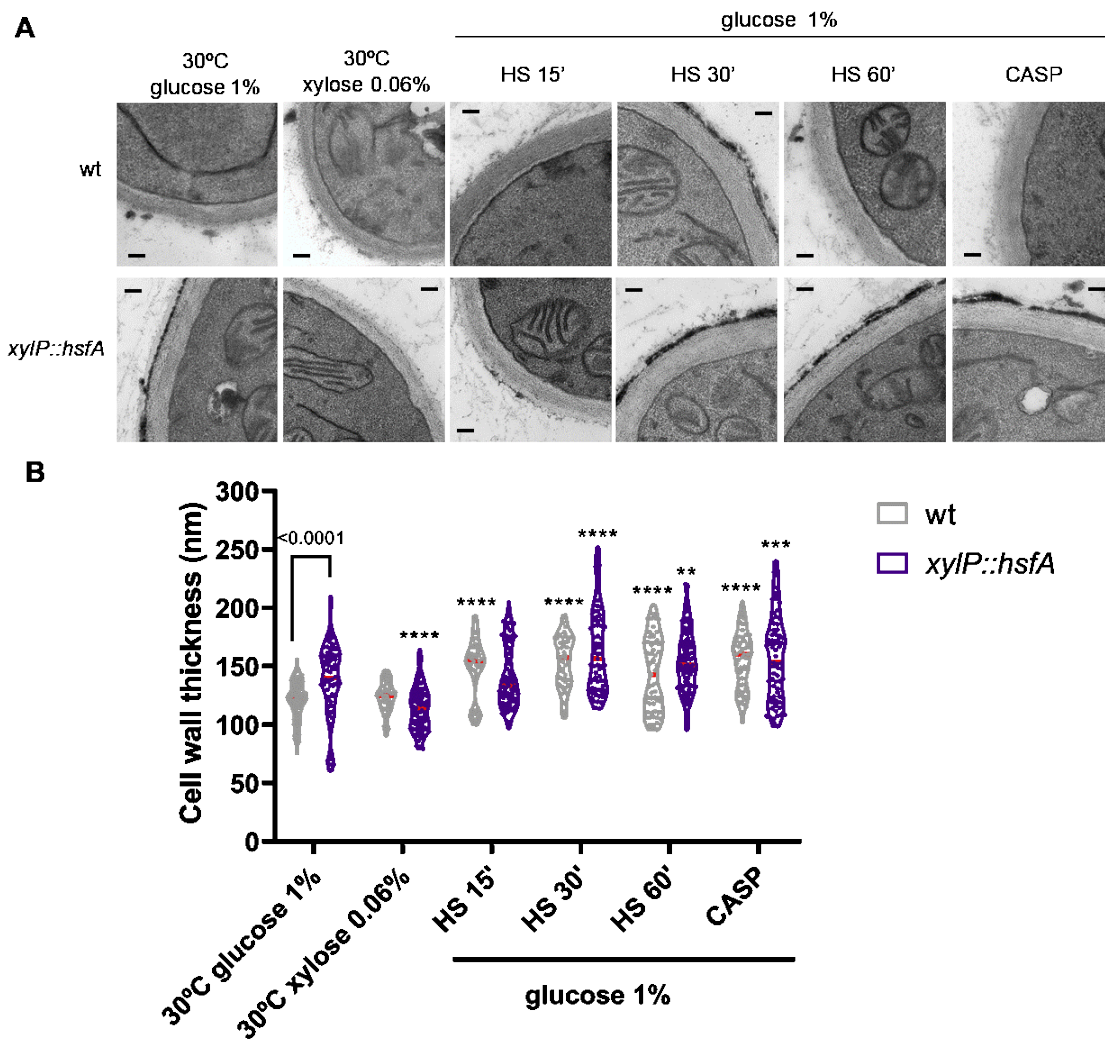


Figura 16. A repressão de *hsfA* leva ao aumento da espessura da parede celular de *A. fumigatus*. As linhagens selvagem e *xyIP::hsfA* cresceram estaticamente em MM suplementado com xilose 1% por 36 horas a 30°C. A seguir, as amostras foram lavadas e reprimidas (em MM) ou induzidas (em MM sem glicose, mas com xilose 0,06%) por 4 horas. Em seguida, as amostras reprimidas foram submetidas ao choque térmico a 48°C por 15, 30 ou 60 minutos, ou submetidas ao estresse de parede celular com caspofungin 2 µg/ml por 60 min, e preparadas para a análise de microscopia eletrônica de transmissão (A). O controle foi deixado a 30°C. (B) Gráfico da espessura da parede celular nas condições testadas. Os resultados são apresentados como média ± SEM. * $p \leq 0,001$ (*two-way* ANOVA com pós-teste de Sidak em relação à mesma linhagem na condição controle (glicose 1% a 30°C)). A barra sobrescrita com $p \leq 0,0001$ indica comparação significativa entre as duas linhagens na mesma condição (*two-way* ANOVA com pós-teste de Sidak). Barras: 100 nm.

4.1.2.3 HsfA é importante na tolerância ao estresse oxidativo e de retículo endoplasmático

Entre os diferentes tipos de estresse que o fungo *A. fumigatus* encontra ao adentrar o sistema respiratório humano, existe o estresse oxidativo por radicais livres e espécies reativas do oxigênio (EROs) proveniente do processo inflamatório desencadeado pela resposta imune do hospedeiro (Steinbach et al. 2012). Para investigar se o fator de transcrição HsfA é importante na depuração

do estresse oxidativo, testes fenotípicos com as mesmas linhagens também foram executados utilizando agentes que provocam estresse oxidativo à célula, como menadiona, paraquat, diamida e o próprio peróxido de hidrogênio. Paraquat e menadiona formam peróxido e superóxido no ciclo redox que ocorre intracelularmente (Smith 1987; Criddle et al. 2006), enquanto diamida oxida cisteínas em cistinas, ou seja, afeta as pontes dissulfeto das proteínas (Kosower et al. 1969). A linhagem *xyIP::hsfA* apresentou maior sensibilidade a todos os compostos testados, exceto paraquat (Figura 17), sugerindo uma correlação entre resposta ao choque térmico e estresse oxidativo. Estes resultados mostram que o fator de transcrição de choque térmico HsfA, além do papel na termotolerância, também é importante na tolerância ao estresse oxidativo exógeno. A relação entre esse fator de transcrição e o estresse oxidativo já foi relatada algumas vezes na literatura. Em *S. cerevisiae* e *C. albicans*, por exemplo, o domínio de ligação HSE para Hsf1 foi encontrado em promotores de muitos genes de resposta ao estresse oxidativo (Albrecht et al. 2010; Leach et al. 2016). A fosforilação e a atividade transcricional de Hsf1 também são induzidas em *S. cerevisiae* na presença de estresse oxidativo (Liu and Thiele 1996).

Além disso, as linhagens foram expostas ao Fludioxonil, um fungicida usado na agricultura que possui um mecanismo de ação relacionado à osmorregulação e a via HOG (Kanetis et al. 2008), e *xyIP::hsfA* também se mostrou mais sensível a esse composto (Figura 17B).

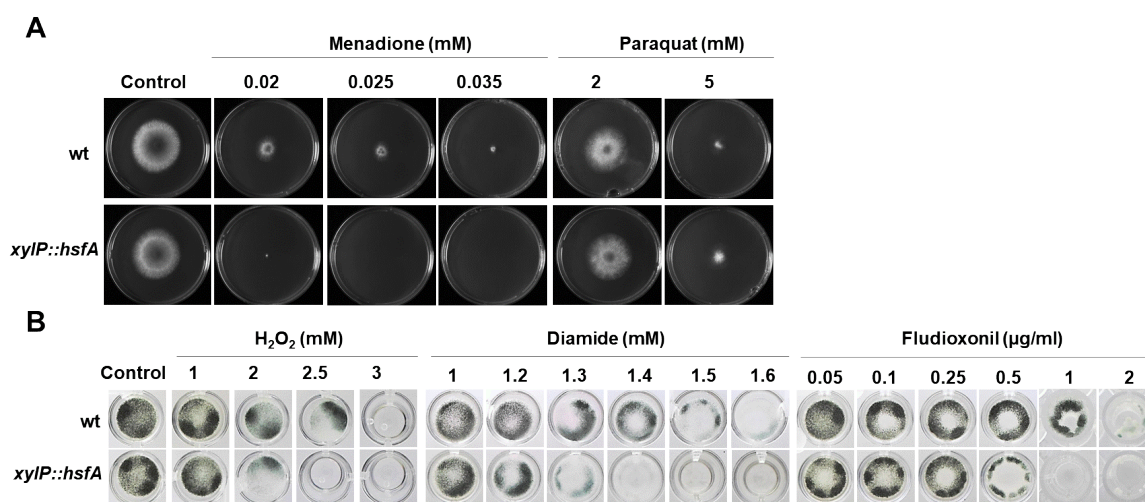


Figura 17. HsfA exerce função na tolerância ao estresse oxidativo. 1×10^4 conídios das linhagens selvagem e *xyIP::hsfA* foram inoculados em placas de Petri contendo MM sólido (A) ou placas de 96 poços contendo MM líquido (B), todas acrescidas de 0,06% de xilose e diferentes

concentrações de menadiona, paraquat, peróxido de hidrogênio (H₂O₂), Fludioxonil ou diamida. As placas foram incubadas a 37°C por 72 horas e fotografadas.

Ademais, como mostrado na Figura 18, o mutante *xyIP::hsfA* foi bem mais sensível que a linhagem selvagem ao estresse de retículo provocado por ditioneitol (DTT), um agente estressor de retículo que afeta o dobramento correto das proteínas por meio da redução das ligações dissulfeto, interferindo na sua forma e transporte do retículo endoplasmático até o complexo de Golgi (Pakula et al. 2003). Esse resultado sugere que HsfA tem papel sobre a manutenção da homeostase do retículo endoplasmático, possivelmente ativando a transcrição de chaperonas que auxiliam o *refolding* de proteínas.

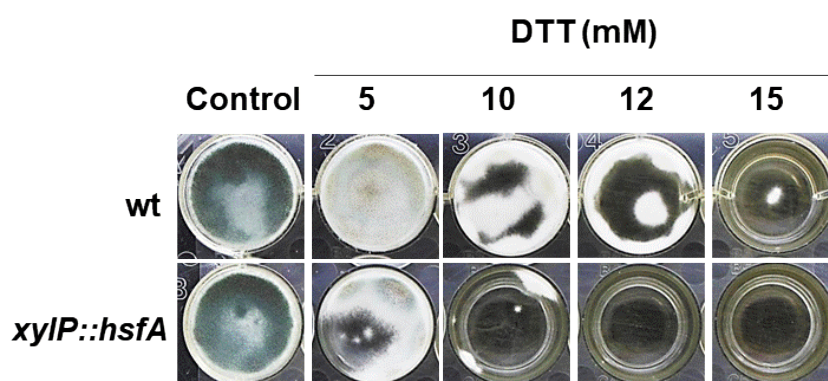


Figura 18. O mutante *xyIP::hsfA* é mais sensível ao estresse de retículo. 1 × 10⁴ conídios das linhagens selvagem e *xyIP::hsfA* foram inoculados em placas de 24 poços contendo 2 ml de MM líquido acrescido de 0,06% de xilose e diferentes concentrações de ditioneitol (DTT). As placas foram incubadas a 37°C por 72 horas e fotografadas.

A expressão das chaperonas HSPs é induzida por diferentes estresses, inclusive o osmótico (Tereshina 2005; Cole and Meyers 2011). Por essa razão, além de ser submetida ao estresse térmico, de parede celular e oxidativo, a linhagem *xyIP::hsfA* também foi exposta ao estresse osmótico, utilizando altas concentrações de sorbitol para gerar essa perturbação. Contudo, este mutante não aparentou ser muito sensível a esse tipo de estresse, havendo apenas uma pequena diminuição no diâmetro das colônias se comparadas às da linhagem selvagem, sem significância estatística (dados não mostrados). Esse resultado sugere que HsfA não tem grande relevância para a adaptação ao estresse osmótico. De fato, acredita-se que os fatores de transcrição Msn2 e Msn4 (e não Hsf1) sejam os responsáveis pela ativação transcricional das pequenas HSPs durante a resposta ao estresse osmótico em *S. cerevisiae* (Fernandes et al. 2004; Lee et al. 2008).

Como foi visto anteriormente que a resposta ao choque de temperatura e as HSPs influenciam na resposta a metais pesados em diferentes organismos (Neumann et al. 1994; Uenishi et al. 2006; Fu et al. 2012), a linhagem mutante também foi exposta ao estresse por altas concentrações de metais. No entanto, não houve diferença de sensibilidade entre o mutante *xyIP::hsfA* e a linhagem selvagem nessa condição (dados não mostrados).

4.1.3 *hsfA* interage geneticamente com os genes *pkcA*, *mpkA* e *sakA*

As vias CWI e HOG são cascatas de sinalização altamente conservadas com algumas funções sobrepostas no que se refere à adaptação ao estresse de parede celular e térmico (Altwasser et al. 2015; Rocha et al. 2015; Bruder Nascimento et al. 2016). Além disso, as cascatas MAPK associadas a essas vias de sinalização se conectam com o fator de transcrição Hsf1 por meio da ação da chaperona Hsp90 em *S. cerevisiae* e *C. albicans* (Truman et al. 2007; Leach et al. 2012a). Com o objetivo de descobrir possíveis interações genéticas entre *hsfA* e os genes que constituem estas vias, duplos mutantes foram construídos pela introdução do cassete de substituição *xyIP::hsfA* na linhagem *pkcA^{G579R} pyrG-* (Rocha et al. 2015; Rocha et al. 2020b), e introdução dos cassetes $\Delta mpkA$ (Valiante et al. 2008) e $\Delta sakA$ (Altwasser et al. 2015) na linhagem *xyIP::hsfA*. Enquanto PkcA é a proteína quinase apical, MpkA é a MAPK da via CWI. Saka por sua vez é o homólogo de Hog1 de levedura, a MAPK da via HOG. Testes fenotípicos com essas linhagens na presença de estresse térmico (Figura 19A) mostraram que *mpkA* e *sakA* interagem geneticamente com *hsfA*, tendo em vista a maior sensibilidade dos duplos mutantes desses genes às temperaturas de 37°C e 48°C, em comparação com as linhagens parentais em uma mesma concentração de xilose. Evidências de interação entre *pkcA* e *hsfA* só foram encontradas na concentração de 0,03% de xilose a 37°C. Esses resultados, em conjunto com outros já obtidos em nosso laboratório (Rocha et al. 2020b), sugerem uma estreita relação entre a via CWI e a resposta ao choque térmico.

Essas mesmas linhagens foram expostas ao estresse de parede celular provocado por CR (dados não mostrados) e CASP (Figura 19B), e ao estresse de membrana celular provocado por SDS (dados não mostrados). Nitidamente, em todas essas condições, *mpkA* e *sakA* interagiram geneticamente com *hsfA*. *pkcA* e *hsfA* também pareceram estar interagindo em menor escala. O mesmo

experimento foi conduzido na presença do estresse de parede celular provocado por CFW (dados não mostrados), com resultados semelhantes. Esses resultados mostram que o fator de transcrição HsfA age em conjunto com as vias CWI e HOG na resposta ao estresse de parede celular. Consistentemente, quando a concentração de xilose foi aumentada para 0,1-0,5%, o crescimento dos duplos mutantes foi completamente resgatado, indicando que a restauração da expressão de *hsfA* para os níveis da linhagem selvagem é suficiente para recuperar totalmente o fenótipo na ausência de *pkcA*, *mpkA* ou *sakA*. Esses resultados também apontam que MpkA e SakA não são essenciais para a ativação de HsfA durante a termoadaptação e estresse da parede celular.

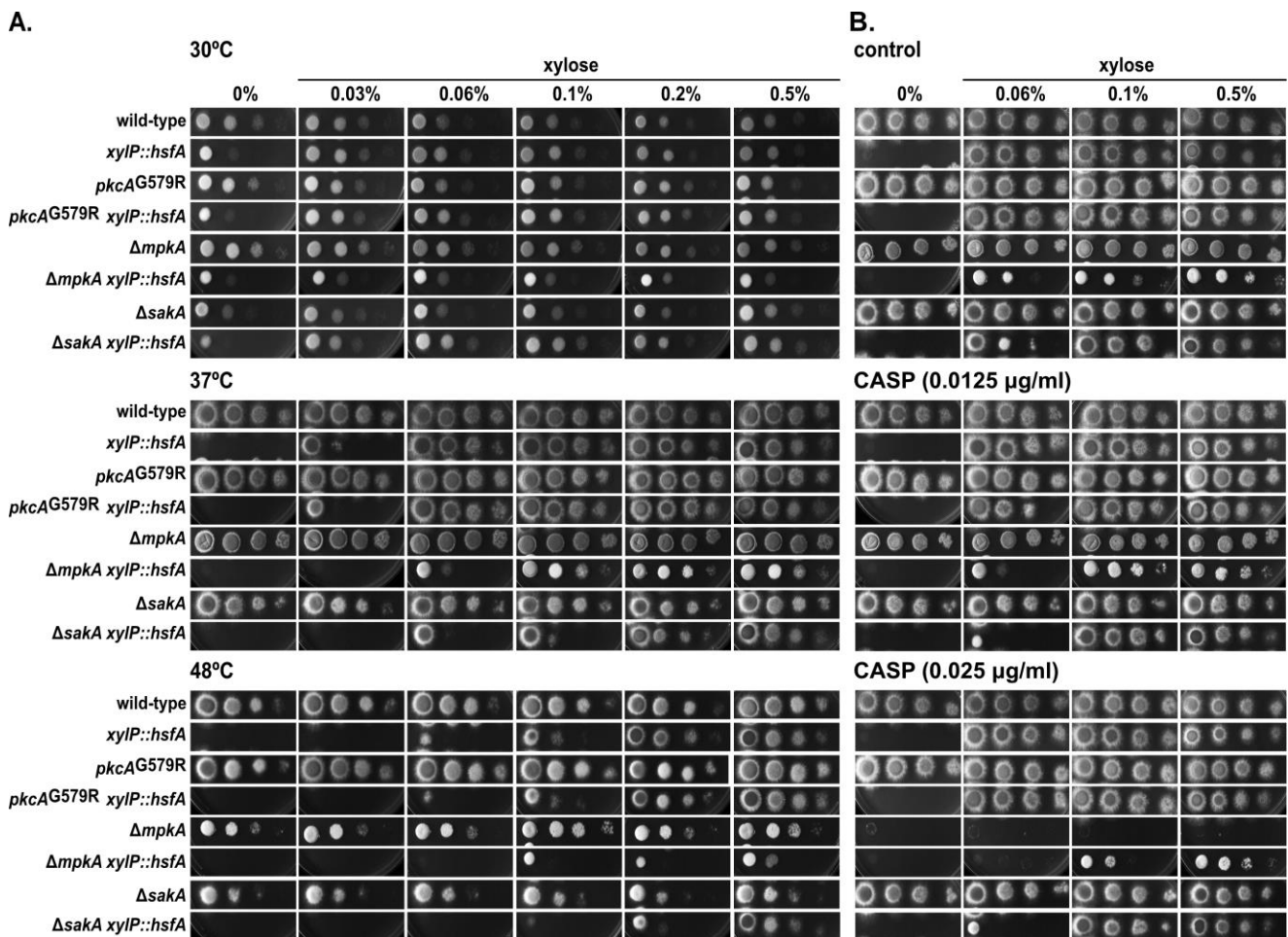


Figura 19. *hsfA* interage geneticamente com *pkcA*, *mpkA* e *sakA* durante o estresse de temperatura e de parede celular. (A) A quantidade indicada de conídios das linhagens selvagem, *xyIP::hsfA*, *pkcAG579R*, *pkcAG579R xyIP::hsfA*, $\Delta mpkA$, $\Delta mpkA xyIP::hsfA$, $\Delta sakA$ e $\Delta sakA xyIP::hsfA$ foi inoculada em MM sólido contendo diferentes concentrações de xilose e as placas foram incubadas a 30, 37 ou 48°C por 48 horas. (B) A quantidade indicada de conídios de cada linhagem foi inoculada em MM sólido contendo diferentes concentrações de xilose e de caspofungin (CASP), e as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas.

4.1.4 HsfA e Hsp90 agem em conjunto para lidar com o choque térmico e o estresse de parede celular por meio da via CWI

Para melhor avaliar o papel de HsfA na termotolerância e resposta ao estresse de parede celular, a expressão gênica de *hsfA* na linhagem selvagem de *A. fumigatus* durante o choque de temperatura e o estresse de parede celular foi investigada por RT-qPCR. Também foram avaliados os níveis de mRNA do gene *hsp90*, que é um dos alvos transcricionais mais significativos de Hsf1 em eucariotos (Erkine et al. 1999; Leach et al. 2016; Prodromou 2016). Durante o choque de temperatura de 37°C, poucas diferenças transcricionais significativas foram notadas para esses genes. Apenas *hsp90* foi induzido após 30 min do início do estresse (Figura 20A). No entanto, o acúmulo de mRNA de *hsfA* e *hsp90* foi rapidamente induzido em resposta ao choque de temperatura de 48°C (Figura 20B), com *hsfA* atingindo expressão máxima após 15 min e *hsp90* após 30 min do início do choque de temperatura em comparação com a condição controle (30°C), indicando que a célula fúngica reconhece a mudança de temperatura e induz a ativação do promotor dos genes *hsfA* e *hsp90*, iniciando a resposta celular apropriada. De fato, em levedura, é no intervalo de 5 a 15 minutos após o início do choque térmico que ocorre a ligação de Hsf1 na maioria dos seus alvos transcricionais (Hahn et al. 2004), o que pode justificar a rápida indução na expressão do homólogo desse gene poucos minutos após a mudança de temperatura. Após atingir o pico, os níveis de mRNA de *hsfA* diminuem ao longo do tempo, enquanto altos níveis de expressão de *hsp90* são sustentados até 60 min depois do início do choque térmico. Esses resultados são consistentes com o papel de HsfA como um fator de transcrição potencialmente regulado positivamente quando a inibição de *hsfA* mediada por Hsp90 é aliviada durante o choque de temperatura, culminando com a subsequente transcrição de HSPs, incluindo Hsp90. Ademais, esse padrão de expressão transcricional de *hsp90* durante o choque térmico foi muito semelhante ao observado em *C. albicans* anteriormente (Leach et al. 2012c). Considerando os resultados de RT-qPCR da linhagem selvagem, é possível observar que tanto o gene *hsfA* quanto o gene *hsp90* seguem um padrão de expressão bem parecido no choque a 48°C, indicando que a resposta de ambos é temporalmente conectada no estresse de temperatura.

Quando as células foram expostas ao estresse de parede celular induzido pela adição de concentrações crescentes de CASP, os níveis de mRNA de *hsfA* foram significativamente aumentados na presença de 2 µg/ml e 4 µg/ml da droga em comparação com a condição controle (Figura 20C). Curiosamente, o acúmulo de *hsp90* nessas condições não mudou significativamente em comparação ao controle não tratado. Um perfil de expressão semelhante para ambos os genes foi observado quando diferentes concentrações de CR foram adicionadas (Figura 20D), onde um aumento na abundância de mRNA de *hsfA* foi detectado nas concentrações entre 50 µg/ml e 200 µg/ml. Esses resultados indicam que *hsfA* é necessário para lidar com o estresse da parede celular, mas sem um aumento dramático na abundância de mRNA de *hsp90*, sugerindo um mecanismo regulador diferente para este fator de transcrição na presença de dano à parede celular em comparação ao estresse de temperatura.

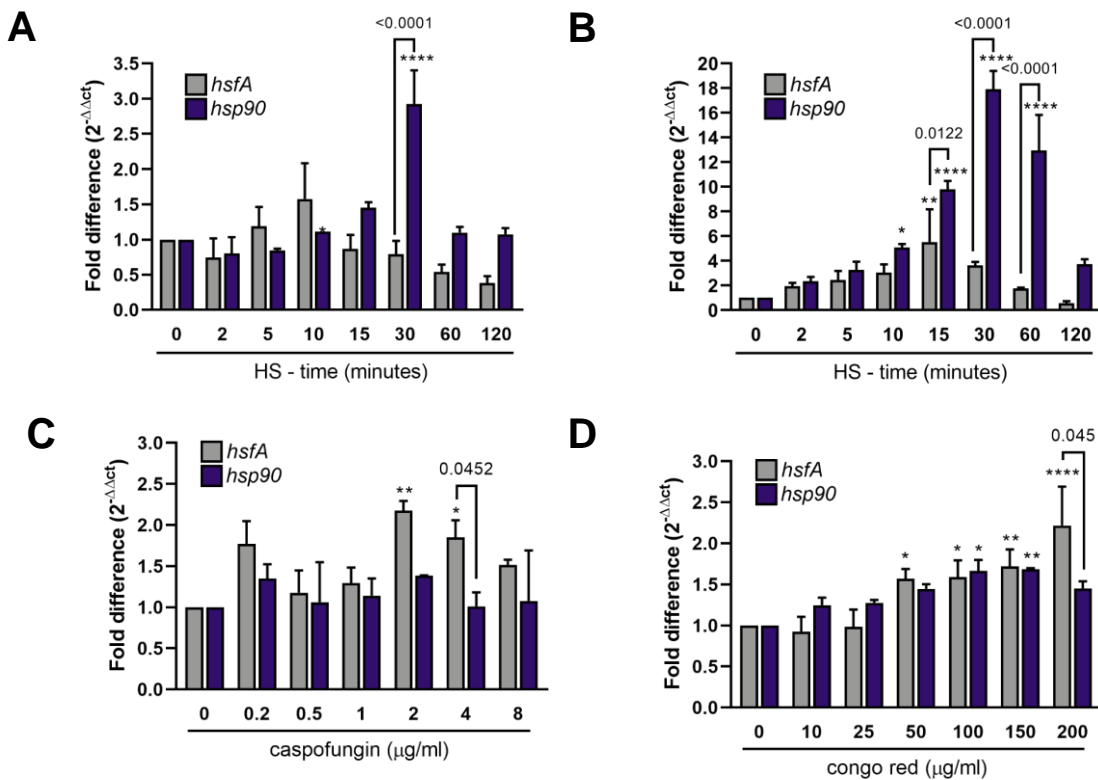


Figura 20. A expressão dos genes *hsfA* e *hsp90* responde ao choque de temperatura e ao estresse de parede celular. A expressão de *hsfA* e *hsp90* foi investigada por RT-qPCR. (A-B) A linhagem selvagem foi cultivada em MM por 24 horas a 30°C e submetida ao choque térmico pelos intervalos de tempo indicados (min) a 37°C (A) ou 48°C (B). A linhagem selvagem foi cultivada em YG por 16 horas a 37°C, e o estresse da parede celular foi provocado usando concentrações crescentes de caspofungin por 60 min (C) ou congo red por 30 min (D). O *Fold change* de cada gene representa o mRNA total normalizado em relação ao mesmo gene na condição controle. Média ± SD (n = 3) são mostrados. Diferenças significativas foram observadas usando *two-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Sidak. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e **** $p \leq 0,0001$ indicam diferenças significativas comparando-se o mesmo gene nas condições tratado e controle. As diferenças entre os genes são indicadas pelas barras.

Com o intuito de verificar o comportamento da linhagem *xyIP::hsfA* durante a inibição de um dos principais alvos do fator de transcrição HsfA, as linhagens selvagem e *xyIP::hsfA* foram expostas à droga radicicol. Este é um inibidor farmacológico clássico da Hsp90 que se liga ao sítio de ligação do ATP no domínio amino-terminal da proteína Hsp90, inibindo sua função (He et al. 2013). Além disso, em *S. cerevisiae* e *C. albicans*, a inibição de Hsp90 provoca a ativação defeituosa da via CWI (Truman et al. 2007; Leach et al. 2012a). O crescimento das linhagens neste experimento foi monitorado pelo indicador Alamar Blue™ Cell Viability Reagent (Thermo Fisher Scientific), um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedade redox, cuja forma oxidada é azul (célula não viável) e a forma reduzida é rósea (célula viável). Pode-se notar na Figura 21 que o mutante condicional *xyIP::hsfA* apresentou nitidamente uma maior sensibilidade à droga em comparação à linhagem selvagem, mostrando que a inibição de Hsp90 somada à repressão de HsfA compromete o crescimento fúngico. Este resultado aponta para a existência de uma interação genética entre *hsfA* e *hsp90*, como já esperado.

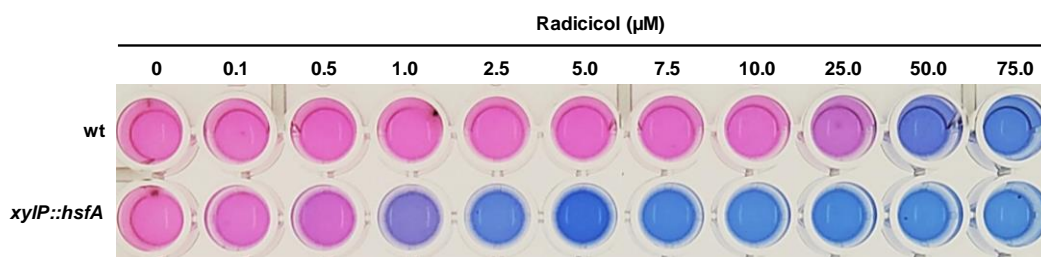


Figura 21. O mutante *xyIP::hsfA* é sensível à inibição da Hsp90. 1×10^4 conídios das linhagens selvagem e *xyIP::hsfA* foram cultivados em MM líquido suplementado com 0,06% de xilose e diferentes concentrações de radicicol durante 48 horas a 37°C. A inibição do crescimento foi inspecionada visualmente por meio do indicador *Alamar blue*™ adicionado na concentração de 10% a cada poço. A coloração azul indica ausência de crescimento na presença deste indicador.

A seguir, para o estudo da expressão da proteína HsfA em diferentes condições, foi construída a linhagem *hsfA::luc*, a qual foi utilizada em experimentos de ensaio de luciferase. Para esta construção, a proteína luciferase foi fusionada à porção C-terminal da proteína HsfA e o mutante obtido foi devidamente validado (Figura 22).

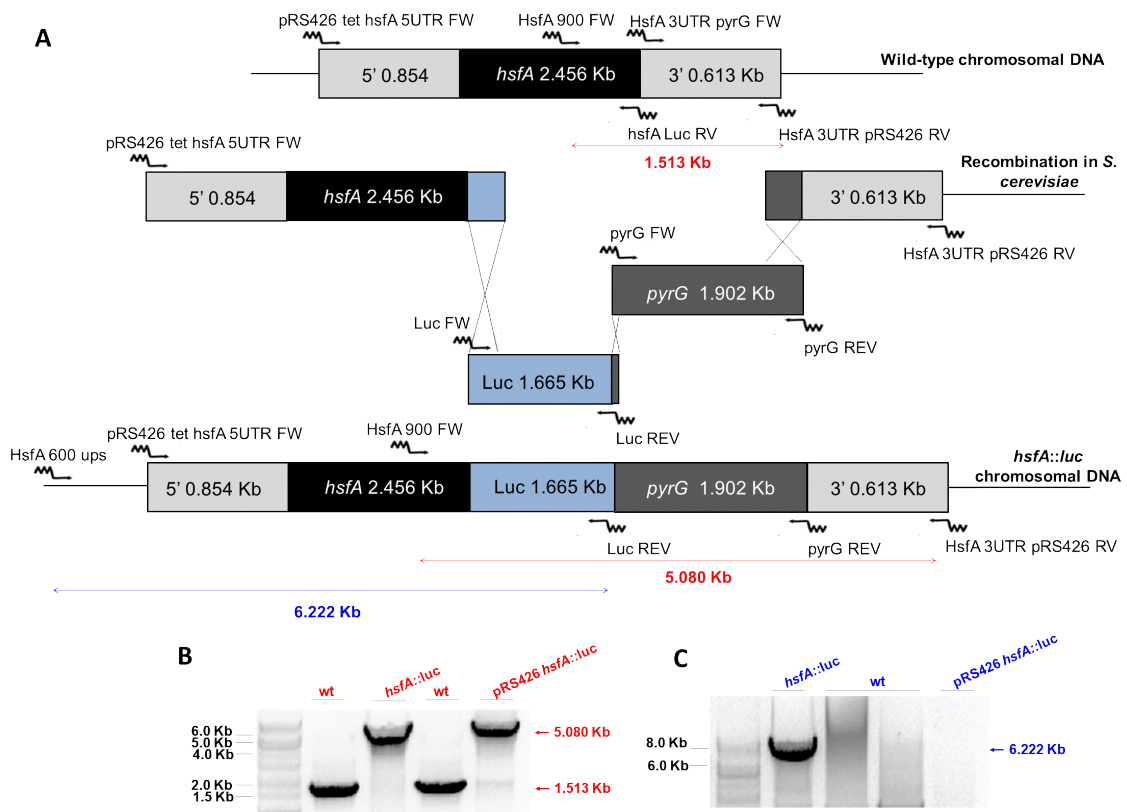


Figura 22. Construção e validação do mutante *hsfA::luc*. (A) Os fragmentos independentes usados na obtenção do cassete foram adquiridos por PCR utilizando os *primers* indicados na figura, e recombinaados em *S. cerevisiae*. (B-C) PCRs de validação do candidato a *hsfA::luc* após transformação em *A. fumigatus*. Utilizaram-se os *primers* *hsfA* 900 FW e *hsfA* 3UTR pRS426 RV (B) e *hsfA* 600 ups e *luc* REV (C), que amplificam os fragmentos indicados em (A), confirmando a obtenção do mutante.

Dadas as interações genéticas sinteticamente doentes relatadas acima entre *hsfA* e os genes da via CWI, e com a intenção de investigar possíveis conexões entre o fator de transcrição HsfA e as proteínas que perfazem a via CWI, duplos mutantes foram também gerados contendo a construção *hsfA::luc* no *background* genético das mutações dos genes da via CWI (*pkcA*^{G579R} e Δ *mpkA*), e foram validados como mostrado na Figura 23.

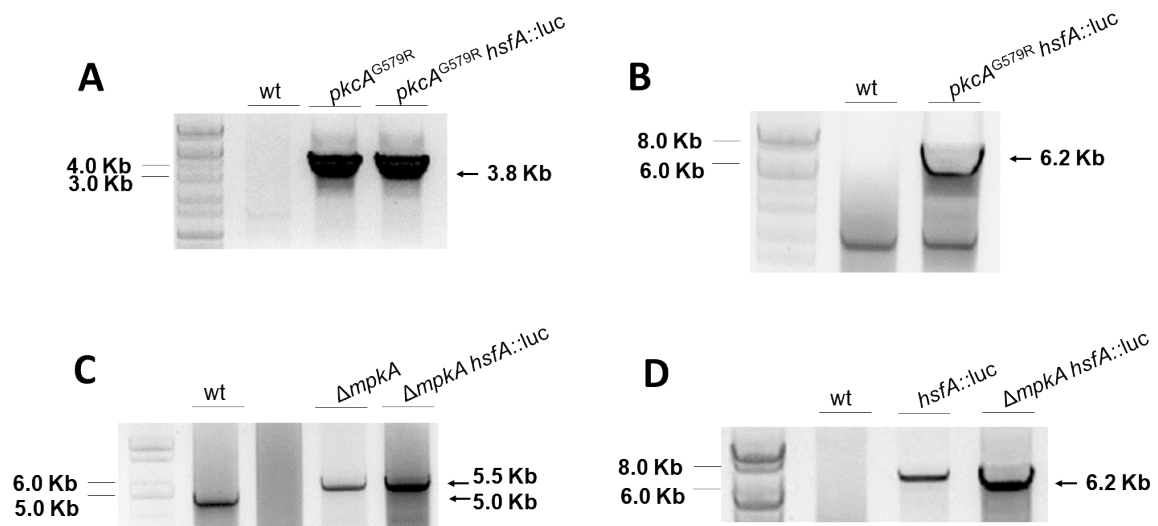


Figura 23. Validação dos duplos mutantes *pkcA*^{G579R} *hsfA::luc* e Δ *mpkA* *hsfA::luc*. (A-B) PCRs de validação do candidato a *pkcA*^{G579R} *hsfA::luc*. Utilizaram-se os *primers* *pkcA* GC FW e *pyrG* REV (A) para checar o lócus *pkcA* e *hsfA* 600 ups e *luc* REV (B) para checar o lócus *hsfA*. (C-D) PCRs de validação do candidato a *hsfA::luc* Δ *mpkA*. Utilizaram-se os *primers* *mpkA* 5F e *mpkA* 3R (C) para checar a deleção do lócus *mpkA* e *hsfA* 600 ups e *luc* REV (D) para checar o lócus *hsfA*.

A fim de avaliar como o comprometimento da via CWI pode afetar os níveis proteicos do fator de transcrição HsfA, experimentos de medição da atividade da luciferase foram conduzidos nas linhagens selvagem, *pkcA*^{G579R} *hsfA::luc* e Δ *mpkA* *hsfA::luc* em diferentes estresses. As linhagens *hsfA::luc*, *pkcA*^{G579R} *hsfA::luc* e Δ *mpkA* *hsfA::luc* foram cultivadas em microplacas e expostas ao choque térmico de 37°C (Figura 24A) e de 48°C (Figura 24B). Como esperado, pode-se observar que a expressão da proteína HsfA foi rapidamente induzida no *background* da linhagem selvagem em ambas as temperaturas, atingindo o pico de expressão 15 minutos após o início do choque térmico (Figura 24A-B). Estes resultados são consistentes com o pico da abundância de mRNA registrado nas mesmas condições para a linhagem selvagem e mostrado anteriormente na Figura 20. Foi possível verificar que algo semelhante acontece nas linhagens mutantes em ambas as temperaturas, mas o pico de expressão foi muito maior nos *backgrounds* genéticos *pkcA*^{G579R} e Δ *mpkA*, o que significa que na perda de função de genes da via CWI, uma maior quantidade de HsfA é preciso ser expressa para lidar com o choque térmico. Esses resultados destacam a importância da *hsfA* e da via CWI na termoadaptação de *A. fumigatus*.

Um experimento semelhante de atividade da luciferase foi conduzido com as mesmas linhagens sendo expostas ao estresse de parede celular provocado

por CASP (Figura 24C-D). Analisando a luminescência medida apenas no *background* selvagem (linhagem *hsfA::luc*), já é possível observar um crescimento considerável no nível de expressão de HsfA quando o fungo foi exposto ao CASP (Figura 24C-D), mas apenas 60 minutos após o início do estresse. Esse resultado sinaliza que, de fato, o fator de transcrição HsfA é importante e necessário na resposta ao estresse de parede celular. Esse aumento da expressão foi ainda mais significativo nos *backgrounds* dos mutantes de genes da via da parede celular *pkcA*^{G579R} e $\Delta mpkA$ (Figura 24C-D), sugerindo que o comprometimento da via CWI induz ainda mais a expressão de HsfA durante o estresse de parede celular. Assim, é possível concluir que *pkcA* e *mpkA* não são essenciais para a expressão de HsfA, e a perda de função dessas quinases aumenta o acúmulo de HsfA, possivelmente por meio de mecanismos compensatórios não descritos, mas necessários para reter a integridade da parede celular e a termotolerância.

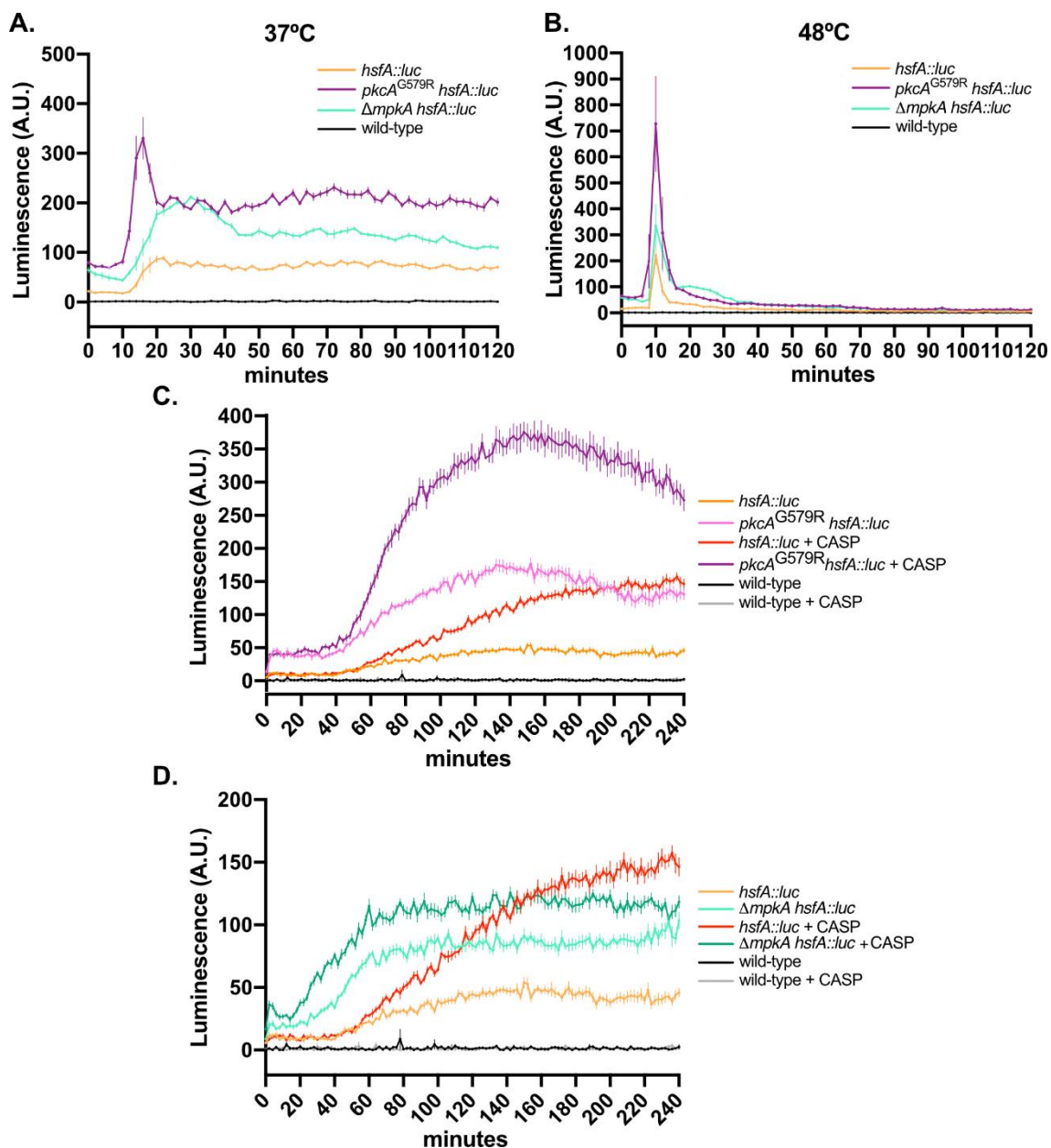


Figura 24. A perda de função dos reguladores da via CWI aumenta a expressão de HsfA em biofilmes de *A. fumigatus* durante o choque de temperatura e o estresse de parede celular. (A, B) Ensaio de atividade da luciferase das linhagens *hsfA::luc*, *pkcA^{G579R} hsfA::luc* e $\Delta mpkA hsfA::luc$ durante o choque de temperatura de 37°C (A) e 48°C (B). (C, D) Ensaio de atividade da luciferase das linhagens *pkcA^{G579R} hsfA::luc* (C) e $\Delta mpkA hsfA::luc$ (D) durante o estresse de parede celular causado por CASP. A linhagem selvagem sem o gene da luciferase foi usada como controle negativo em todos os experimentos. Média \pm SEM ($n \geq 8$) são mostrados. Os resultados foram normalizados pelo número de conídios (2×10^5 por ensaio) e são expressos como luminescência (unidades arbitrárias). CASP: caspofungin (2 μ g/ml).

Para a investigação do papel da chaperona molecular Hsp90 durante o estresse térmico e de parede celular, decidiu-se também construir o mutante simples *hsp90P::luc*, no qual o promotor de *hsp90* está fusionado ao gene da luciferase no locus do gene *pyrG* de *A. fumigatus* (Figura 25), como descrito em Rocha et al. (2016). Com essa linhagem mutante, foi possível analisar a

expressão do gene *hsp90* em diferentes condições, por meio do sinal de luminescência da reação da luciferase, e correlacioná-la à expressão de HsfA.

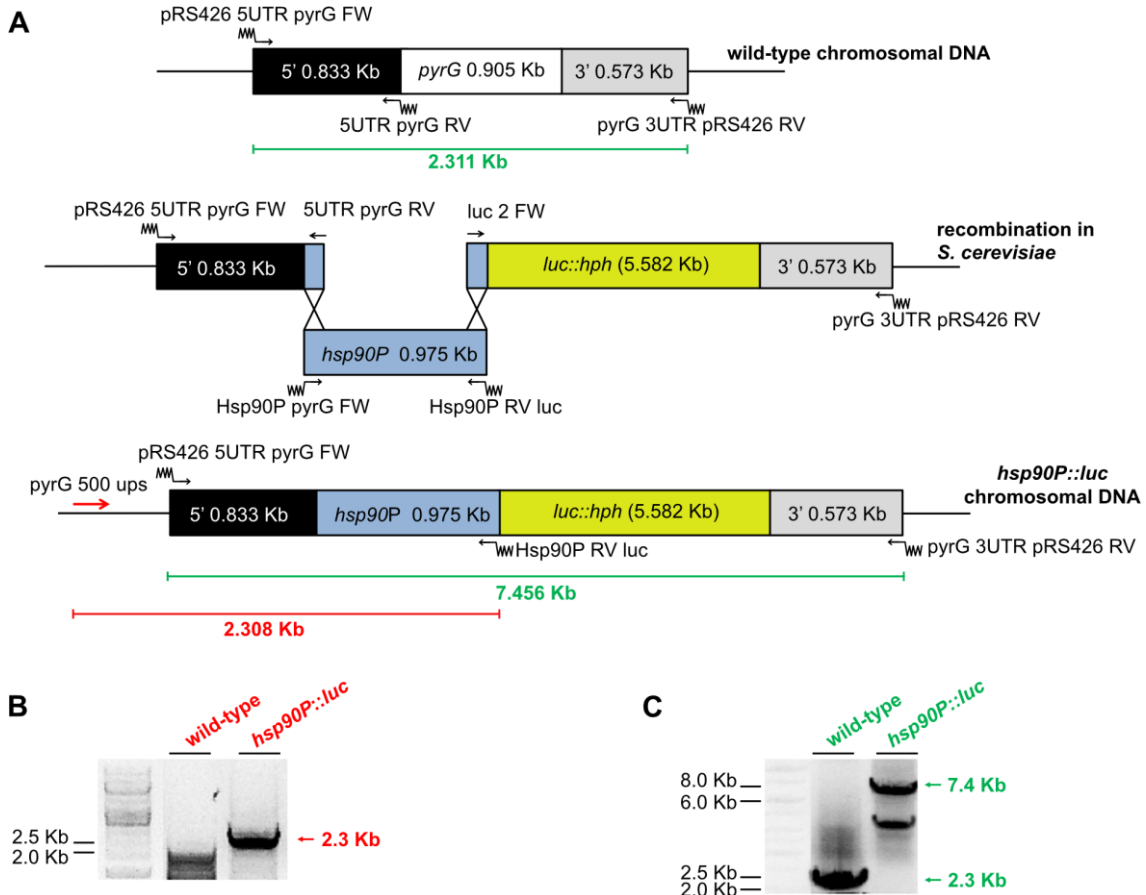


Figura 25. Construção e validação do mutante *hsp90P::luc*. (A) Os fragmentos independentes usados na obtenção do cassete foram adquiridos por PCR utilizando os *primers* indicados na figura, e recombinados em *S. cerevisiae*. (B-C) PCRs de validação do candidato a *hsp90P::luc* após transformação em *A. fumigatus*. Utilizaram-se os *primers* pyrG 500 ups e *hsp90P* RV luc (B) e pRS426 5UTR pyrG FW e pyrG 3UTR pRS426 RV (C), que amplificam os fragmentos indicados em (A), confirmando a obtenção do mutante.

Para gerar ainda maior conhecimento sobre a relação entre termotolerância e parede celular, o cassete *hsp90P::luc* também foi transformado nos mutantes de genes que compõe a via CWI (*pkcA*^{G579R}, Δ *mpkA* e Δ *rlmA*), gerando duplos mutantes que foram validados por PCR (Figura 26A-D). Adicionalmente, o cassete *hsp90P::luc* também foi transformado na linhagem *xyIP::hsfA* para o estudo da dependência transcricional de *hsp90* pelo fator de transcrição HsfA (Figura 26E-F).

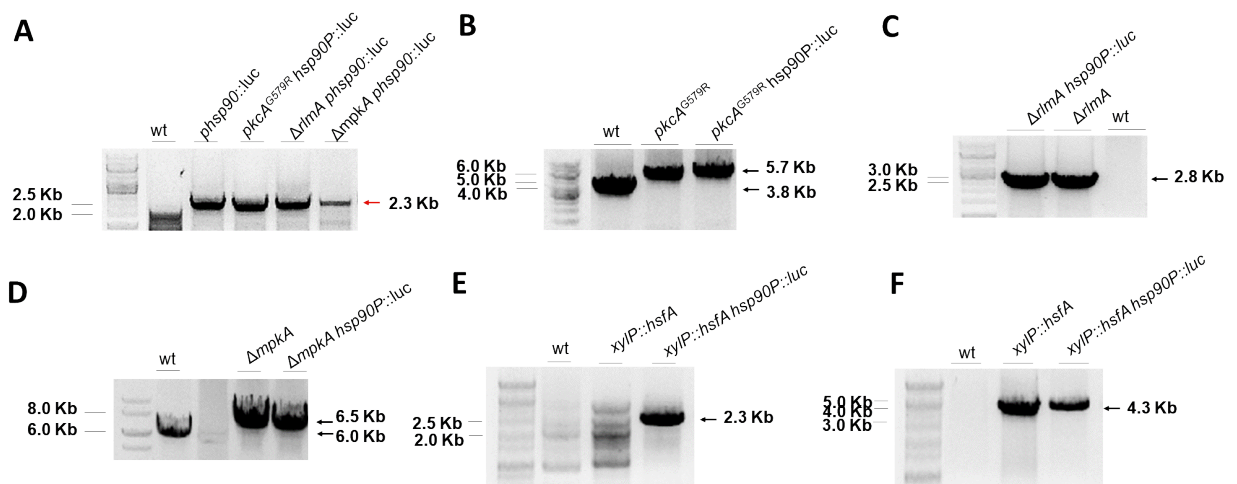


Figura 26. Validação dos duplos mutantes *pkcA*^{G579R} *hsp90P::luc*, *ΔrlmA hsp90P::luc*, *ΔmpkA hsp90P::luc* e *xylP::hsfA hsp90P::luc*. (A) PCR utilizando os primers *pyrG* 500 ups e *hsp90P* RV luc para validar o locus *pyrG* contendo o promotor da *hsp90* fusionado ao gene da luciferase em todos os duplos mutantes. (B) Validação do locus *pkcA* utilizando os primers *pkcA* GC FW e *Afu5g11970* 3R. (C) Validação do locus *rlmA* utilizando os primers *rlmA* 600 ups e *pyrG* 200 REV. (D) Validação do locus *mpkA* utilizando os primers *mpkA* 600 ups e *mpkA* 3R. (E-F) Validação da linhagem *xylP::hsfA hsp90P::luc*. Utilizaram-se os primers *pyrG* 500 ups e *hsp90* REV luc para checar o locus *pyrG* no qual o cassete *hsp90P::luc* foi introduzido (E) e *hsfA* 5 FW e *xylP* REV para checar o locus *hsfA* (F). Outras PCRs com diferentes primers foram realizadas para comprovar a obtenção dos duplos mutantes (dados não mostrados).

A chaperona molecular Hsp90 é uma proteína que conecta Hsf1 e a via de integridade da parede celular em leveduras, pois, por ser um importante alvo transcrricional de Hsf1, a Hsp90 atua na termotolerância, mas também foi mostrado que ela regula genes que participam da manutenção da integridade da parede celular (Truman et al. 2007; Leach et al. 2012a). Para a obtenção de maiores informações a respeito da importância da proteína Hsp90 para *A. fumigatus* e sua conexão com a via da integridade da parede celular, ensaios de atividade da luciferase foram conduzidos com as linhagens acima descritas. Dessa forma, as linhagens selvagem, *hsp90P::luc*, *pkcA*^{G579R} *hsp90P::luc*, *ΔrlmA hsp90P::luc* e *ΔmpkA hsp90P::luc* foram cultivados em microplacas e expostas ao choque térmico ou ao estresse de parede celular, como descrito em Materiais e Métodos. A 37°C, como esperado, pode-se observar que a transcrição do gene da Hsp90 foi rapidamente induzida em todas as linhagens de maneira muito semelhante, atingindo o pico de expressão 15-20 minutos após o início do choque térmico (Figura 27A). O destaque ficou por conta da linhagem *ΔmpkA hsp90P::luc*, que apresentou um sinal de luciferase bem maior, até mesmo na condição basal (30°C). A 48°C (Figura 27B), um pico de atividade de *hsp90P* ocorreu mais cedo em todas as linhagens mutantes em comparação com o

background selvagem, e este efeito foi mais evidente durante a deleção de *rlmA*. Semelhante aos resultados obtidos a 37°C, a maior indução de *hsp90P* ocorreu na linhagem $\Delta mpkA$. Em conjunto, esses dados confirmaram os resultados de nosso laboratório de que a resposta ao choque de temperatura no biofilme de *A. fumigatus* é desregulada quando a via CWI está prejudicada (Rocha et al. 2020b) e revelaram também que *pkcA* e *mpkA* são os principais sensores para a ativação compensatória da expressão de *hsfA* e *hsp90*.

Um experimento semelhante de atividade da luciferase foi conduzido com as mesmas linhagens sendo expostas ao estresse de parede celular provocado por CASP (Figura 27C-E). Analisando a luminescência medida apenas no *background* selvagem (linhagem *hsp90P::luc*), já é possível observar um crescimento considerável no nível de expressão de *hsp90* quando o fungo foi exposto ao CASP (Figura 27C-E), sinalizando que, de fato, a chaperona Hsp90 é importante e necessária na resposta ao estresse de parede celular. Esse aumento da expressão é ainda mais significativo nos backgrounds dos mutantes de genes da via CWI, principalmente na linhagem $\Delta mpkA$ (Figura 27D). Interessantemente, o sinal da luciferase aumentou mais tardiamente na linhagem $\Delta rlmA$ (Figura 27E) e foi mantido em níveis elevados após o sinal de atividade de *hsp90P* diminuir nos outros mutantes da via CWI. Assim, os ensaios de luciferase indicam que a expressão de HsfA e Hsp90 está conectada e ambas trabalham em resposta ao choque de temperatura e ao estresse de parede celular. Além disso, os resultados sugerem um papel direto de HsfA no controle da expressão de genes envolvidos na adaptação celular a essas condições de estresse, conforme observado pelo aumento compensatório na expressão de HsfA nos mutantes da via CWI.

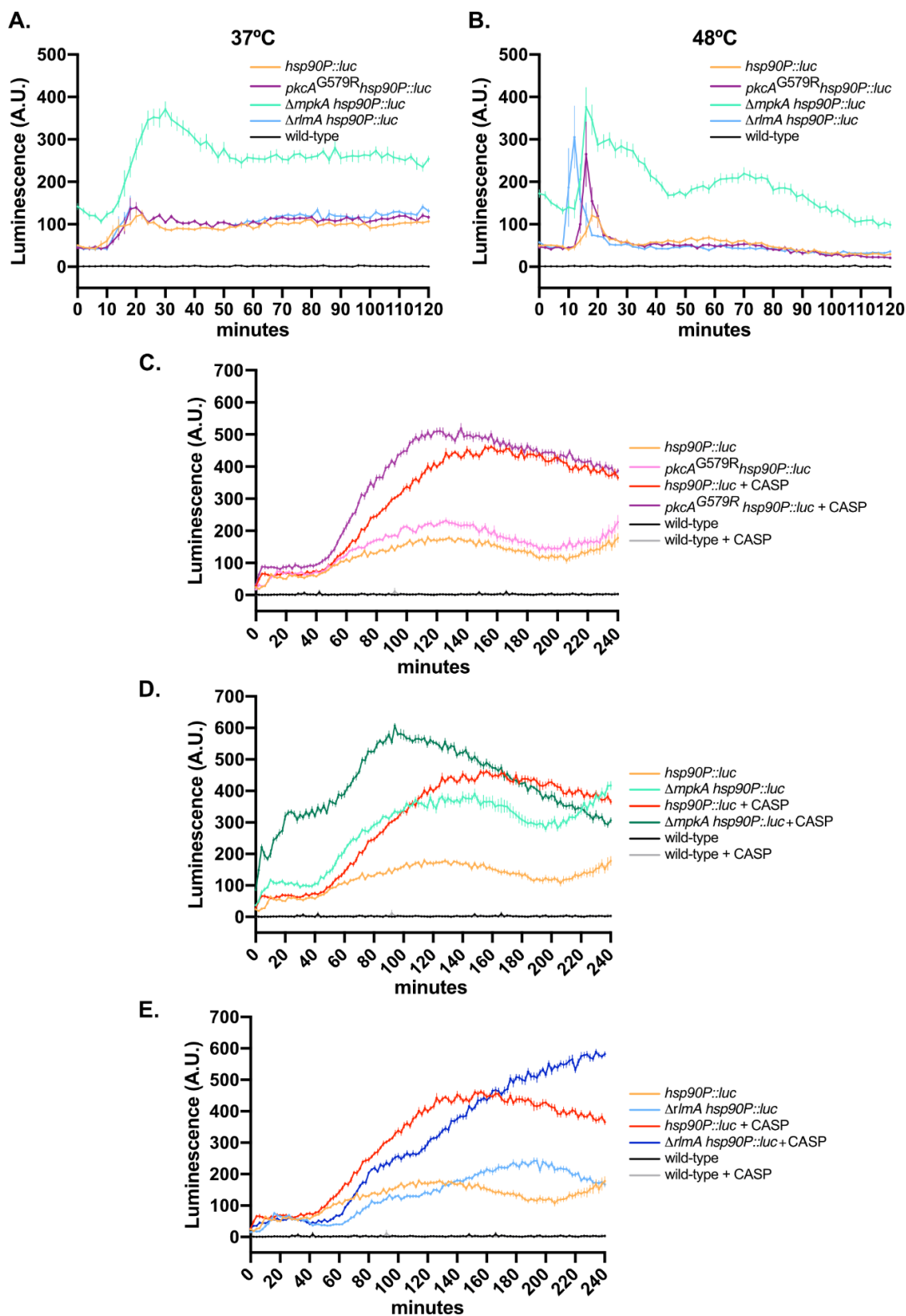


Figura 27. A perda de função dos reguladores da via CWI aumenta a expressão de *hsp90* em biofilmes de *A. fumigatus* sob o choque de temperatura e o estresse na parede celular. (A, B) Ensaio de atividade da luciferase das linhagens *hsp90P::luc*, *pkcA^{G579R} hsp90P::luc*, *ΔmpkA hsp90P::luc* e *ΔrlmA hsp90P::luc* durante o choque de temperatura de 37°C (A) e 48°C (B). (C-E) Ensaio de atividade da luciferase das linhagens *pkcA^{G579R} hsp90P::luc* (C), *ΔmpkA hsp90P::luc* (D) e *ΔrlmA hsp90P::luc* (E) durante o estresse de parede celular causado por CASP. A linhagem selvagem sem o gene da luciferase foi usada como controle negativo em todos os experimentos. Média ± SEM (n ≥ 8) são mostrados. Os resultados foram normalizados pelo número de conídios (2 × 10⁵ por ensaio) e são expressos como luminescência (unidades arbitrárias). CASP: caspofungin (2 µg/ml).

Além disso, foi visto anteriormente em nosso laboratório que esse padrão de expressão na linhagem selvagem sob estresse térmico também se reflete em análises de *Western blot* para a proteína Hsp90 (Rocha et al. 2020b).

Para o estudo da dependência transcricional de *hsp90* pelo fator de transcrição HsfA, o duplo mutante *xyIP::hsfA hsp90P::luc* foi exposto ao choque de temperatura de 48°C tanto na ausência quanto na presença de xilose em um ensaio de luciferase. Como visto anteriormente, o choque de temperatura de 48°C provocou a indução da expressão de *hsp90* na linhagem *hsp90P::luc*, atingindo um pico no tempo de 20 minutos (Figura 24A). Este resultado independe da fonte de carboidrato presente no meio de cultivo, e foi exatamente o mesmo apresentado pelo duplo mutante *xyIP::hsfA hsp90P::luc* na condição de indução, ou seja, na presença de xilose. Na condição de repressão, no entanto, foram notáveis uma pequena antecipação e um grande aumento desse pico de luminescência (curva azul da Figura 28). Assim, pode-se concluir que a perda de função de *hsfA* exige uma elevada indução da expressão de *hsp90* como resposta celular ao choque de temperatura. Em outras palavras, a presença de HsfA faz com que não seja necessária uma alta expressão de *hsp90* nessa condição de choque de temperatura. Curiosamente, este resultado difere do observado em *C. albicans* (Nicholls et al. 2009).

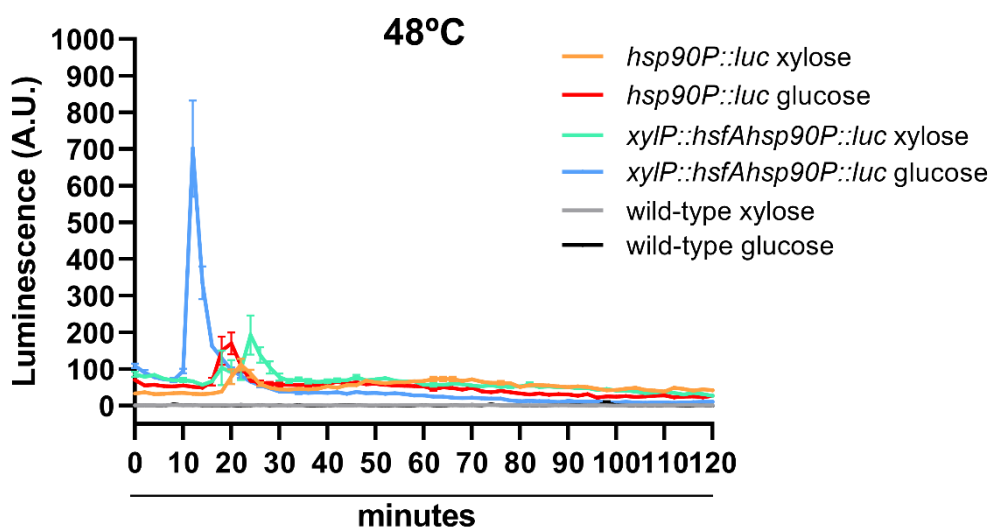


Figura 28. A repressão de *hsfA* aumenta a expressão de *hsp90* durante o choque de temperatura. Ensaio de atividade da luciferase das linhagens selvagem, *hsp90P::luc* e *xyIP::hsfA hsp90P::luc* expostas ao choque térmico de 48°C. Média \pm SEM ($n \geq 8$) são mostrados. Os resultados foram normalizados pelo número de conídios (2×10^5 por ensaio) e são expressos como luminescência (unidades arbitrárias).

É válido mencionar que todas as linhagens contendo o gene repórter da luciferase não mostraram defeitos de crescimento em comparação com as linhagens parentais (Figura 29), indicando que os alelos substituídos são totalmente funcionais.

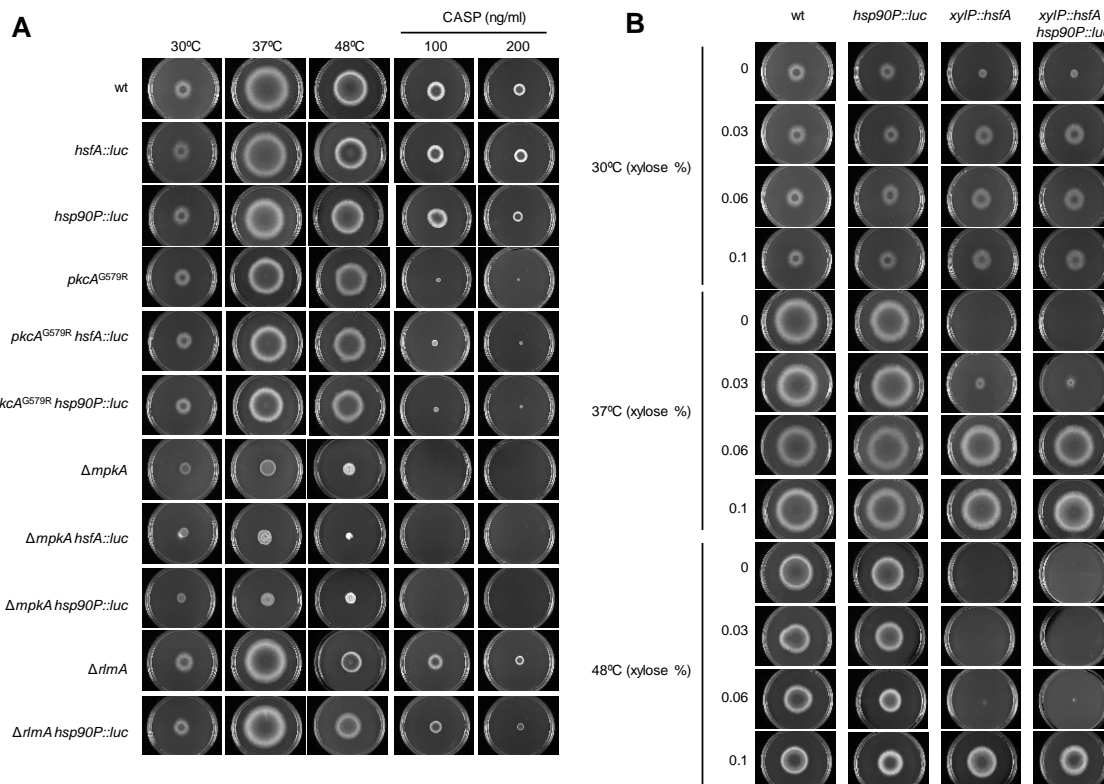


Figura 29. Fenótipo de crescimento dos mutantes simples e duplos de *hsfA::luc* e *hsp90P::luc*. (A) 1×10^4 conídios de cada linhagem foram inoculados em MM sólido e incubados nas temperaturas indicadas por 96 h. Placas com diferentes concentrações de CASP foram incubadas a 37°C por 96 h. (B) 1×10^4 conídios de cada linhagem foram inoculados em MM sólido suplementado com diferentes concentrações de xilose e incubados nas temperaturas indicadas por 96 h.

4.1.5 HsfA modula a expressão de genes envolvidos na adaptação ao choque térmico, ao estresse de parede celular e à homeostase da membrana plasmática

Com o objetivo de avaliar a expressão gênica de possíveis alvos transcricionais dependentes de HsfA, os transcriptomas das linhagens selvagem e *xyIP::hsfA* foram investigados durante a exposição ao choque de temperatura de 48°C por 15 e 60 min, na condição de repressão (presença de glicose e ausência de xilose). O choque térmico causou uma rápida modulação da expressão gênica, uma vez que 1362 genes foram regulados positivamente ($\log_2FC \geq 1,0$), enquanto 1499 genes foram regulados negativamente ($\log_2FC \leq -1,0$) na linhagem selvagem após 15 min do início do choque térmico. Após 60

min, esses números aumentaram para 1384 e 1549, respectivamente (Figura 30A-B). Na linhagem *xyIP::hsfA* sob repressão, 1375 genes foram regulados positivamente ($\log_2FC \geq 1,0$) enquanto 1729 genes foram regulados negativamente ($\log_2FC \leq -1,0$) após 15 min do início do choque de temperatura. Após 60 min, esses números diminuíram para 1136 e 1474, respectivamente (Figura 30A-B).

Após a realização da análise de *Gene Ontology* (GO) de categorias enriquecidas de Processos Biológicos anotados em *A. fumigatus*, pode-se perceber que o mutante *xyIP::hsfA* apresentou um enriquecimento semelhante à linhagem selvagem após 15 min do início do choque de temperatura. Ambas as linhagens apresentaram regulação transcricional positiva de genes envolvidos na resposta celular ao calor, dobramento e redobramento de proteínas (Figura 30C-D), que são processos biológicos ativados em resposta ao aumento da temperatura (Albrecht et al. 2010). Alguns desses genes também foram expressos diferencialmente no nível proteico na linhagem selvagem sob o choque térmico, como as chaperonas Hsp90 (Afu5g04170), Hsp30 (Afu3g14540), Hsp70 (Afu1g07440), Hsp60 (Afu2g09290), Hsp78 (Afu1g11180), Hsp88 (Afu1g12610), Ssc70 (Afu2g09960) e Sti1 (Afu7g01860), conforme relatado anteriormente (Albrecht et al. 2010). A resposta inicial frente ao choque de temperatura também causou a regulação positiva de genes envolvidos nos processos de biossíntese de glucana e organização ou biogênese da parede celular em ambas as linhagens (Figura 30C-D), incluindo o fator de transcrição da via CWI *rlmA* (Afu3g08520), a subunidade catalítica da β -1,3-glucana sintase *fksA* (Afu6g12400), as β -1,3-glucanosiltransferases *gelA* (Afu2g01170) e *gel7* (Afu6g12410), as quitina sintases *chsE* (Afu2g13440), *chsF* (Afu8g05630) e *csmB* (Afu2g05630) e a MAPK da via de sinalização HOG, *pbs2* (Afu1g15950). Esses resultados estão de acordo com a remodelação da parede celular observada durante o choque de temperatura e mostrada na Figura 14. Em contraste, apenas a linhagem selvagem apresentou enriquecimento de genes envolvidos na biossíntese de trealose (Figura 30C), sugerindo a participação de HsfA neste processo. Concomitantemente, a ubiquitinação de proteínas e a resposta ao estresse do retículo endoplasmático foram processos enriquecidos apenas no mutante *xyIP::hsfA* (Figura 30D). Entre os genes regulados negativamente após 15 min do choque térmico, houve um enriquecimento nos

processos de biogênese ribossomal e tradução em ambas as linhagens (Figura 30C-D), sugerindo uma diminuição da síntese de proteínas para sustentar a termo adaptação. A análise de GO de genes regulados negativamente também mostrou enriquecimento nos processos de biossíntese de ergosterol e de ácidos graxos insaturados, mas dessa vez apenas na linhagem selvagem (Figura 30C). Esses achados refletem o equilíbrio celular para superar o aumento da fluidez da membrana causado pelo aumento da temperatura e sugerem que HsfA tem um papel na homeostase lipídica e no equilíbrio no conteúdo da proporção de ácidos graxos saturados/insaturados exigido pelo choque de temperatura.

Após 60 min do início do choque térmico, os genes regulados positivamente em ambas as linhagens foram enriquecidos para diferentes processos metabólicos, como reparo de DNA, biossíntese de RNA e transcrição, enquanto os genes regulados negativamente estavam envolvidos na montagem ribossomal e tradução (Figura 30C-D). Curiosamente, apenas a linhagem selvagem reteve o enriquecimento de genes regulados positivamente envolvidos na resposta ao choque de temperatura após 60 min, apoiando a evidência de um papel tardio de HsfA durante o estresse térmico. Novamente, os processos biossintéticos de lipídios e ergosterol foram regulados negativamente apenas na linhagem selvagem. A assimilação de ferro e a resposta celular à privação de íons de ferro também foram processos negativamente regulados e exclusivos da linhagem selvagem (Figura 30C), o que está de acordo com estudos anteriores que mostraram uma relação entre Hsf1 e a abundância de ferro celular em *C. albicans* (Nair et al. 2017; Nair et al. 2018).

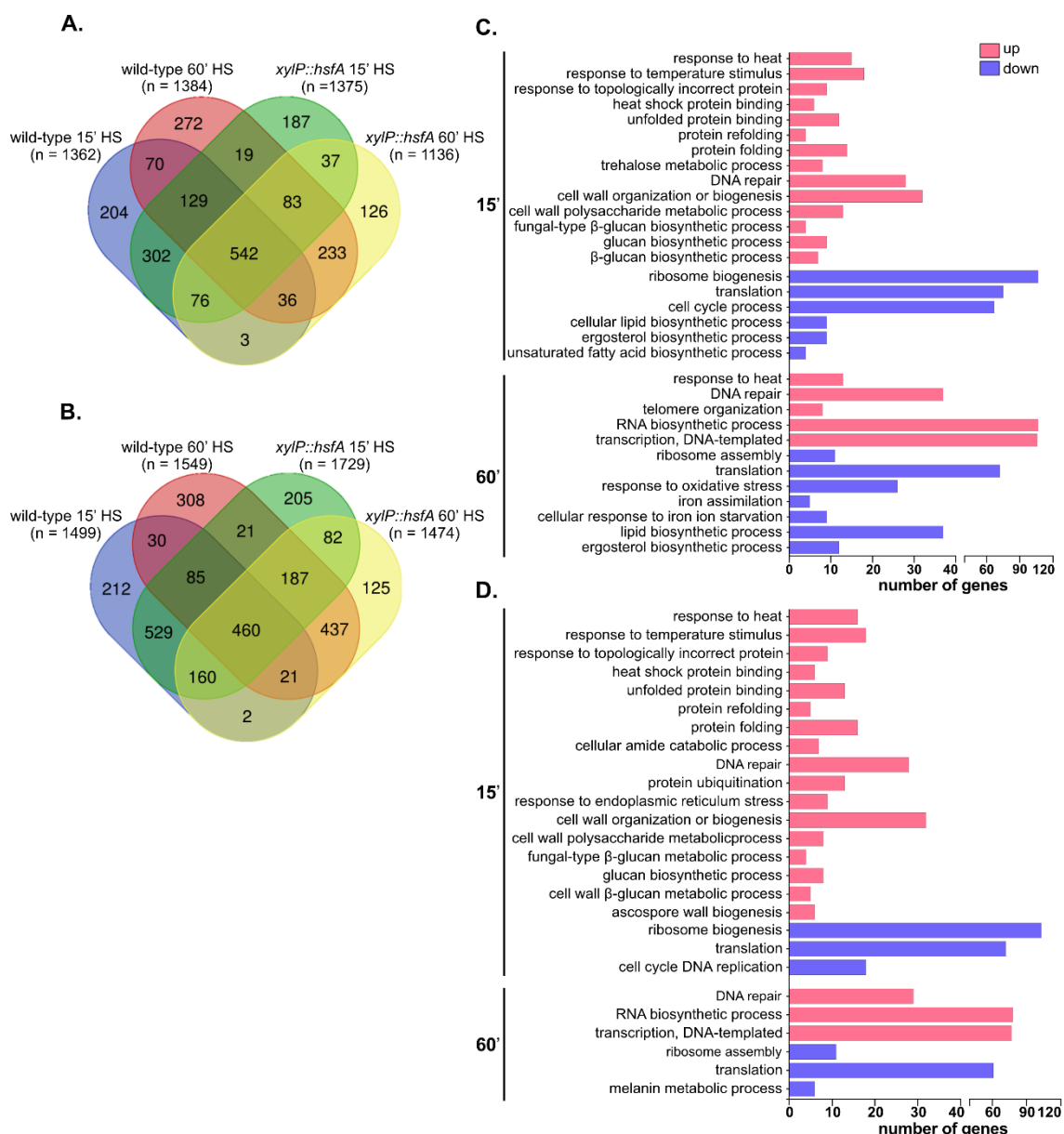


Figura 30. Resposta transcricional global das linhagens selvagem e *xylIP::hsfA* durante o choque de temperatura. (A-B) Diagramas de Venn que descrevem o número de genes regulados positivamente ($\log_2FC \geq 1,0$) (A) e negativamente ($\log_2FC \leq -1,0$) (B) nas linhagens selvagem e *xylIP::hsfA* após 15 min e 60 min do início do choque térmico. (C) Seleção de termos de Gene Ontology (GO) de Processos Biológicos enriquecidos por meio de genes diferencialmente expressos ($\log_2FC \geq 1,0$ ou $\log_2FC \leq -1,0$) na linhagem selvagem durante o choque de temperatura (por 15 min e 60 min), em comparação com a condição controle (30°C). (D) Seleção de termos de Gene Ontology (GO) de Processos Biológicos enriquecidos por meio de genes diferencialmente expressos ($\log_2FC \geq 1,0$ ou $\log_2FC \leq -1,0$) na linhagem *xylIP::hsfA* durante o choque de temperatura (por 15 min e 60 min), em comparação com a condição controle (30°C). Para a lista completa de termos de GO, consultar o Material Suplementar do artigo de Fabri et al. (2021).

Posteriormente, para identificar genes cuja expressão foi diretamente influenciada por *hsfA*, o mutante *xylIP::hsfA* cultivado em condição repressiva (ausência de xilose) foi comparado diretamente com a linhagem selvagem. Assim, pode-se observar que vários genes foram modulados tanto na condição

controle (30°C) quanto durante o estresse de temperatura (Figuras 31 e 32). Alguns desses foram constitutivamente reprimidos ou induzidos na linhagem mutante, incluindo o gene *hsfA*, que, como esperado, foi reprimido ao longo do experimento. Interessantemente, quatro genes da via de biossíntese do metabólito secundário piripiropeno (*pyr4*, *pyr5*, *pyr6* e *pyr9*) foram altamente induzidos na linhagem mutante (Figura 31B). De forma consistente, outros genes pertencentes a este mesmo cluster, como *pyr1* (Afu6g13920), *pyr3* (Afu6g13940) e *pyr8* (Afu6g14000), foram regulados positivamente tanto na condição controle quanto 60 minutos após o início do choque térmico [Material Suplementar do artigo de Fabri et al. (2021)]. Esses dados sugerem que HsfA desempenha um papel na biossíntese desse meroterpenóide.

Focando nos genes com participação na organização da parede celular, pode-se notar que poucos genes envolvidos na biossíntese da parede celular foram modulados, como a α -1,3-glucana sintase *ags2* (Afu2g11270) e a quitina sintase *chsG* (Afu3g14420), os quais foram regulados positivamente, e a β -1,3-glucanosiltransferase *gel7* (Afu6g12410) e a quitina sintase *chsB* (Afu4g04180), que foram regulados negativamente em pelo menos uma condição. Em contraste, uma série de genes envolvidos no remodelamento da parede celular foram identificados, incluindo as β -1,3-exoglucanases *exg1* (Afu1g03600) e *exg6* (Afu6g13270), a glicosil hidrolase Afu4g13770, as quitinases *chiA1* (Afu5g03760), Afu5g03960 e Afu5g06840 e as glucanases *eg12* (Afu6g11600), *aspf9* (Afu1g16190), *exgO* (Afu1g14450), Afu1g12560, Afu8g06830, Afu2g14490 e Afu8g06360 (Figura 32C). A maioria desses genes relacionados à parede celular sofreu repressão após 15 min do início do choque de temperatura, quando a expressão de HsfA atinge seu pico (Figuras 20B e 24B), sugerindo que HsfA tem um papel na ativação transcricional de tais genes e é importante para o metabolismo da parede celular durante a termo adaptação.

Conforme esperado, muitas HSPs, como *sti1* (Afu7g01860), *hsp10* (Afu8g05880), *scf1* (Afu1g17370), *hsp78* (Afu1g11180), *hsp104* (Afu1g15270), *hsp30/42* (Afu3g14540), *hsp20/26* (Afu5g10270) e *hsp30* (Afu6g06470), foram reprimidas na linhagem mutante em comparação com a linhagem selvagem (Figura 32D), indicando que estas são também alvos transcricionais putativos de HsfA. Além disso, vários genes relacionados ao metabolismo lipídico, principalmente aqueles envolvidos na biossíntese de ergosterol e ácidos graxos, foram negativamente regulados na linhagem *xyIP::hsfA*, especialmente durante a condição controle e 15 min de choque térmico (Figura 32E), indicando uma alteração do rearranjo da membrana plasmática celular para aumentar sua fluidez em resposta ao choque térmico (Leach and Cowen 2014) na linhagem mutante. Ademais, genes do metabolismo de sideróforos, moléculas que quelam átomos de ferro, também foram consideravelmente modulados e puderam ser divididos em dois grupos: um contendo genes regulados negativamente na condição basal e 15 min de choque térmico; e outro compreendendo genes regulados positivamente após 60 min do início do choque térmico (Figura 32F). Este último grupo coincide com a repressão dos termos GO relacionados ao metabolismo de ferro identificada na linhagem selvagem nesta mesma condição

(Figura 32C). Experimentos independentes de RT-qPCR validaram os resultados de RNA-Seq para seis genes selecionados que representam as quatro categorias de GO mostradas na Figura 32, sendo estes: *hsfA*, *hsp30*, *ags2*, *chsG*, *ppoC* e *sidA* (APÊNDICE A, Figura A1).

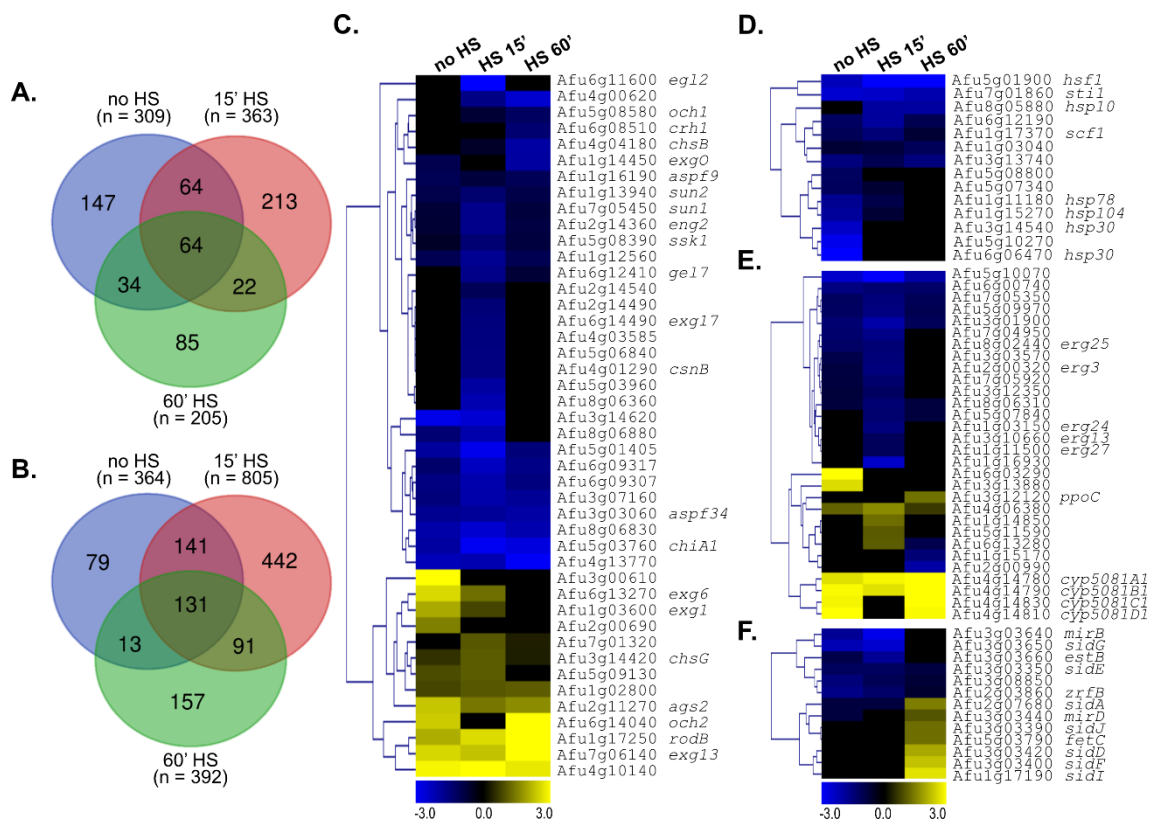


Figura 32. A repressão de *hsfA* impacta a expressão de genes relacionados à resposta ao choque térmico, parede celular, lipídios e metabolismo do ferro. (A-B) Diagramas de Venn comparando os genes regulados positivamente ($\log_2FC \geq 1,0$) (A) e negativamente ($\log_2FC \leq -1,0$) (B) no mutante *xylP::hsfA* em relação à linhagem selvagem na ausência e presença de choque de temperatura (15 min ou 60 min). (C-F) Análise de agrupamento hierárquico mostrando seleções de genes expressos de forma diferencial ($\log_2FC \geq 1,0$ ou $\log_2FC \leq -1,0$). Os *heat maps* estão divididos por processos e categorias de interesse: biossíntese e organização da parede celular (C); resposta ao choque térmico, atividade chaperona e dobramento de proteína (D); metabolismo lipídico (E); e metabolismo do ferro (F). Todos os *heat maps* foram criados na plataforma *Multiple Experiment Viewer* (MeV), usando agrupamento hierárquico e distância euclidiana.

Coletivamente, os resultados da análise de RNA-Seq sugeriram fortemente que o estresse de temperatura causa grandes mudanças no transcriptoma de *A. fumigatus* e o fator de transcrição HsfA é um regulador chave na modulação de um número significativo desses genes, sendo especialmente importante para a resposta ao choque de temperatura, para o remodelamento da parede celular, a homeostase da membrana plasmática e o metabolismo do ferro.

4.1.6 A superexpressão de *hsfA* altera a expressão gênica mesmo na ausência do choque de temperatura

O transcriptoma do mutante *xyIP::hsfA* na condição de indução, isto é, na presença de xilose, também foi investigado. A análise de GO de genes regulados diferencialmente nas linhagens selvagem e *xyIP::hsfA*, ambos à temperatura basal (30°C) e na presença de xilose, mostrou que a superexpressão de *hsfA*, mesmo na ausência do choque de temperatura, induziu a expressão de genes relacionados à resposta celular ao calor, biossíntese de glucana e biossíntese de trealose e, novamente, a repressão de genes pertencentes ao processo biossintético de ácidos graxos, especialmente os insaturados (Tabela 20). Esses resultados sugerem que esses genes que pertencem à resposta celular ao calor (como *hsp60* e *hsp90*), ao processo biossintético de glucana [como as α -1,3-glucano sintases *ags2* (Afu2g11270) e *ags3* (Afu1g15440), e a β -1,3-glucanosiltransferase *gelA* (Afu2g01170)] e à biossíntese de trealose [como a trealose-6-fosfato sintase *tpsB* (Afu2g04010)] são alvos transcricionais putativos de HsfA. Assim, a indução da expressão de *hsfA* sem um estresse térmico perceptível ainda desencadeia a resposta ao choque de temperatura, induzindo genes importantes para a manutenção da parede celular e reprimindo genes envolvidos no metabolismo dos ácidos graxos insaturados.

Além disso, a repressão de genes envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários específicos, como fumagilina e triacetilfusarinina C (Tabela 20), sugere um possível papel regulador negativo de HsfA na síntese desses metabólitos. Uma vez que a categoria de GO de processo biossintético de toxinas também foi reprimida no mutante *xyIP::hsfA* na condição permissiva, HsfA pode desempenhar papel regulador sobre os mecanismos de defesa de *A. fumigatus*.

Tabela 20. Um resumo dos termos de GO enriquecidos entre os genes que foram regulados positivamente ou negativamente na comparação entre a linhagem *xyIP::hsfA* e a linhagem selvagem a 30°C sob indução (xilose).

GO ID	Description	p-value	Classes	Regulation	nº of genes
GO:0046351	disaccharide biosynthetic process	0.0007	BP	Up	6

GO:0005992	trehalose biosynthetic process	0.0007	BP	Up	6
GO:0051087	chaperone binding	0.002	MF	Up	5
GO:0034605	cellular response to heat	0.0103	BP	Up	8
GO:0009250	glucan biosynthetic process	0.0116	BP	Up	6
GO:0006582	melanin metabolic process	0.0137	BP	Up	4
GO:0009408	response to heat	0.0306	BP	Up	8
GO:0042440	pigment metabolic process	0.0348	BP	Up	7
GO:0009266	response to temperature stimulus	0.0373	BP	Up	9
GO:0035834	indole alkaloid metabolic process	0.0377	BP	Up	4
GO:0042438	melanin biosynthetic process	0.0484	BP	Up	3
GO:1902086	fumagillin biosynthetic process	1E-06	BP	Down	12
GO:0055085	transmembrane transport	2E-06	BP	Down	89
GO:1901503	ether biosynthetic process	1E-05	BP	Down	12
GO:0010106	cellular response to iron ion starvation	0.0002	BP	Down	10
GO:0006067	ethanol metabolic process	0.0032	BP	Down	6
GO:0000272	polysaccharide catabolic process	0.0062	BP	Down	16
GO:0016054	organic acid catabolic process	0.0105	BP	Down	19
GO:0006636	unsaturated fatty acid biosynthetic process	0.0125	BP	Down	4
GO:0006567	threonine catabolic process	0.0125	BP	Down	4
GO:0006633	fatty acid biosynthetic process	0.0172	BP	Down	9
GO:0033212	iron assimilation	0.0125	BP	Down	4
GO:1900551	N',N'',N'''-triacetylfusarinine	0,018054	BP	Down	4

	C biosynthetic process				
GO:0009403	toxin biosynthetic process	0.0264	BP	Down	13
GO:0042440	pigment metabolic process	0.0264	BP	Down	10
GO:0045461	sterigmatocystin biosynthetic process	0.0471	BP	Down	10

A lista completa está no Material Suplementar do artigo de Fabri et al. (2021). BP = *Biological Process* (Processo Biológico); MF = *Molecular Function* (Função Molecular).

4.1.7 HsfA e o metabolismo secundário de *A. fumigatus*

Os fungos são capazes de produzir uma gama de metabólitos secundários, e muitos destes ainda nem foram estudados. Esses compostos atuam em uma variedade de funções, como comunicação, desenvolvimento, defesa e fator de virulência [revisado em Macheleidt et al. (2016)]. A regulação da síntese dos metabólitos secundários fúngicos é complexa e envolve diferentes reguladores transcricionais, controles epigenéticos e vias de sinalização [revisado em Macheleidt et al. (2016)], como, por exemplo, as vias MAPK como a via CWI (Valiante et al. 2009; Jain et al. 2011; Valiante et al. 2016; Rocha et al. 2021). Em *A. fumigatus*, a temperatura também pode exercer um efeito regulatório na produção desses compostos, como verificado em estudos da última década (Berthier et al. 2013; Sekonyela et al. 2013; Sueiro-Olivares et al. 2015; Lind et al. 2016; Hagiwara et al. 2017). Além disso, evidências do papel da temperatura sobre a síntese de alguns desses metabólitos foram observadas na análise de RNA-Seq anterior (Figura 31 e Tabela 20). Por essa razão, resolveu-se investigar por HPLC-MS/MS a produção de metabólitos secundários das linhagens selvagem e *xyIP::hsfA* durante o choque térmico, tanto na condição permissiva (xilose) quanto repressiva (glicose). A Figura 33 mostra todos os compostos diferencialmente produzidos nas condições testadas. O APÊNDICE B traz as informações de cada um desses metabólitos.

Fumitremorginas são um grupo de metabólitos derivados do triptofano, prolina e ácido mevalônico que possuem atividade biológica, inclusive como toxina [revisado em Li (2011)]. Seu *cluster* biossintético compreende a molécula precursora brevianamida F e uma variedade de alcalóides prenilados derivados, como fumitremorginas A e B, triprostatinas A e B e demetoxifumitremorgina C

(Maiya et al. 2006). A concentração de todos esses metabólitos diminuiu durante o choque térmico em ambas as linhagens, tanto na presença de xilose quanto de glicose (Figura 33A). Esses resultados estão de acordo com os dados da análise de RNA-Seq que mostraram uma repressão dos genes desse *cluster* biossintético durante o choque térmico [Material Suplementar do artigo de Fabri et al. (2021)]. Curiosamente, em ambas as linhagens, houve sempre mais desses metabólitos na presença de glicose do que na presença de xilose, mostrando que a fonte de carbono por si só já alterou a síntese desses compostos. De uma maneira geral, o mutante *xyIP::hsfA* sintetizou menores quantidades desses metabólitos em comparação com a linhagem selvagem, independente do nível de indução do promotor *xyIP*, o que também está de acordo com os dados de RNA-Seq [Material Suplementar do artigo de Fabri et al. (2021)].

Sideróforos são pequenos peptídeos que quelam o átomo de ferro com alta afinidade e que são necessários para a sua captação do meio ambiente (Haas et al. 2008). Sua síntese em *A. fumigatus* é regulada pelas vias CWI e Tor [revisado em Macheleidt et al. (2016)]. *A. fumigatus* produz quatro sideróforos do tipo oligopeptídeo hidroxamato: triacetilfusarinina C e fusarinina C para a aquisição extracelular de ferro; e ferricrocina e hidroxiferricrocina para o armazenamento intracelular do mesmo (Szigeti et al. 2014). Interessantemente, triacetilfusarinina C e ferricrocina são sabidamente necessários para a virulência fúngica (Schrettl et al. 2007). Foi observado na análise de HPLC que enquanto a abundância de ferricrocina pareceu não variar durante o choque térmico nas linhagens selvagem e *xyIP::hsfA*, a síntese de triacetilfusarinina C foi nitidamente reprimida durante o choque de temperatura em ambas as linhagens na presença de glicose e também na linhagem selvagem na presença de xilose (Figura 33B). Digno de nota, a quantidade de ambos os metabólitos apresentada pelo mutante *xyIP::hsfA* em ambas as fontes de carbono foi bem menor que a sintetizada pela linhagem selvagem, especialmente na presença de glicose. Estes resultados vão de acordo com a análise de RNA-Seq que mostrou a repressão de genes envolvidos no metabolismo de ferro na linhagem selvagem durante o choque térmico (Figura 30) e na relação *xyIP::hsfA*/wt no tempo de 15 minutos de choque térmico (Figura 32E), e na condição basal (30°C) na presença de glicose (Figura 32E) e xilose (Tabela 20). Em conjunto, esses dados reafirmam que a

temperatura e HsfA são importantes para a regulação do metabolismo de ferro em *A. fumigatus*.

As fumiquinazolininas são uma família de alcaloides citotóxicos produzidos por *A. fumigatus*. Além de serem tóxicas a algumas células humanas, elas também possuem atividade antifúngica e antimicrobiana, sendo importantes para a defesa contra microrganismos do ambiente (Li et al. 2012). Durante o choque térmico, a concentração de fumiquinazolinina C/D praticamente não variou em nenhuma condição, ao passo que fumiquinazolinina A/B apresentou uma tendência de diminuição em ambas as alinhagens (Figura 33C), o que vai de acordo com a análise de RNA-Seq [Material Suplementar do artigo de Fabri et al. (2021)] Novamente, o mutante *xyIP::hsfA* pareceu sintetizar menores concentrações desses metabólitos em comparação com a linhagem selvagem independentemente da fonte de carbono. É válido mencionar, no entanto, que a linhagem *xyIP::hsfA* apresentou uma grande abundância desses metabólitos em crescimento a 37°C tanto na presença de xilose quanto de glicose (dados não mostrados), por motivos ainda desconhecidos.

Piripiropenos são toxinas que inibem a enzima citosólica acetil-CoA acetiltransferase (Hu et al. 2014), que está envolvida na síntese de colesterol. Como mostrado anteriormente, genes desse *cluster* estão bastante induzidos na relação *xyIP::hsfA/wt* (Figura 31B). Os metabólitos piripirope E, O, A e G também se acumularam mais no mutante *xyIP::hsfA*, mas apenas na condição basal (30°C) e na presença de glicose (Figura 33D), uma vez que suas abundâncias reduziram durante o choque térmico. Independente dessas diferenças, os resultados sugerem que HsfA possui uma função inibitória sobre a síntese desse grupo de metabólitos secundários.

Apesar de genes dos *clusters* biossintéticos da fumagilina e esterimagtocistina terem sido reprimidos na comparação *xyIP::hsfA/wt* na condição basal (30°C) na presença de xilose (Tabela 20), nenhuma alteração significativa na concentração desses metabólitos foi detectada nas análises de HPLC.

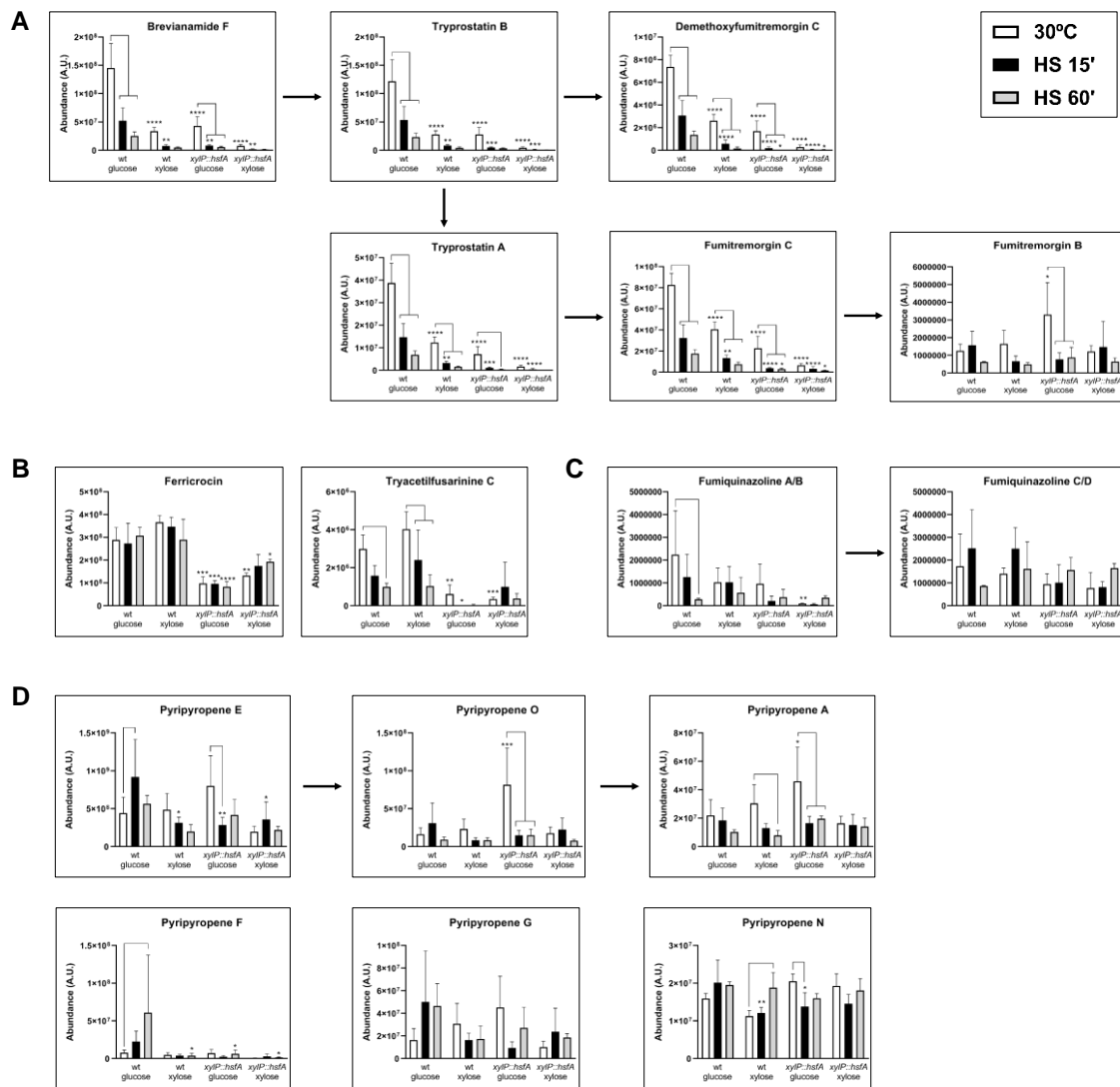


Figura 33. Gráficos da quantificação de uma seleção de metabólitos secundários nas linhagens selvagem e *xyIP::hsfA*. Os metabólitos secundários das linhagens selvagem e *xyIP::hsfA*, crescendo em glicose ou xilose, e na presença ou não do choque de temperatura foram extraídos e quantificados por espectrometria de massas. (A) Metabólitos secundários da via de biossíntese de fumitremorgina produzidos diferencialmente em pelo menos uma condição testada. (B) Sideróforos produzidos diferencialmente em pelo menos uma condição testada. (C) Fumiquinazolinas produzidas diferencialmente em pelo menos uma condição testada. (D) Metabólitos secundários da via de biossíntese de piripropenes produzidos diferencialmente em pelo menos uma condição testada. As setas indicam conversões enzimáticas entre os metabólitos. As barras indicam diferenças estatisticamente significativas com $p \leq 0,05$ (*Two-way* ANOVA, com pós-teste de Sidak). * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ e **** $p \leq 0,0001$ indicam comparações significativas com a linhagem selvagem na glicose, na mesma condição.

4.1.8 O mutante *tet_{OFF}::hsfA* apresenta virulência atenuada quando reprimido

Para investigar a potencial influência de HsfA sobre a patogenicidade de *A. fumigatus*, um modelo animal invertebrado, *G. mellonella*, foi utilizado. Além disso, fez-se uso do mutante *tet_{OFF}::hsfA*, pois, como já descrito anteriormente, é possível injetar doxiciclina nas larvas de *G. mellonella* para modular a ativação

do promotor *tet* (Zhang et al. 2018), ao passo que estudos de virulência com o promotor *xyIP* neste modelo ainda não foram descritos na literatura. Pode-se observar que a infecção com a linhagem selvagem resultou em 100% de mortalidade das larvas após sete dias do início da infecção, tanto na presença quanto na ausência de doxiciclina (Figura 34). O mesmo aconteceu na infecção com o mutante *tet_{OFF}::hsfA* na ausência de doxiciclina, ou seja, na condição de indução da expressão de *hsfA*. Já a infecção com o mutante *tet_{OFF}::hsfA* na presença de doxiciclina (condição de repressão de *hsfA*), houve uma redução de 25% na taxa de mortalidade das larvas, as quais perduraram pelo menos até o décimo quinto dia de experimento. Esses dados sugerem que HsfA pode ser necessário para a patogenicidade de *A. fumigatus*.

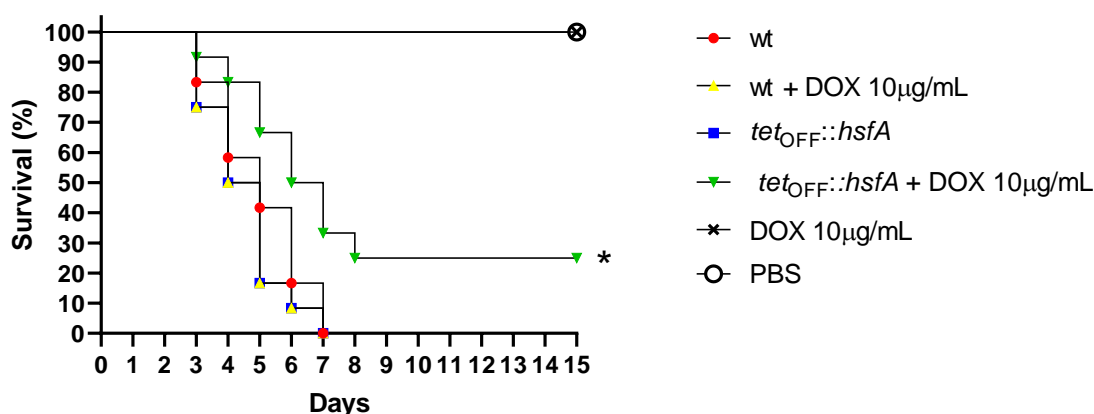


Figura 34. HsfA é importante para a virulência em *Galleria mellonella*. Curva de sobrevivência cumulativa do modelo *Galleria mellonella* infectado com as linhagens selvagem (wt) e *tet_{OFF}::hsfA*. Para a infecção das larvas, 10⁶ conídios foram inoculados em 10 larvas para cada condição testada. Doxiciclina (DOX) na concentração de 10 µg/ml foi adicionada em parte das larvas para reprimir o promotor *tet_{OFF}*. A solução de PBS e DOX 10 µg/ml foram usadas como controles negativos. * $p \leq 0,05$ da diferença da comparação entre *tet_{OFF}::hsfA* + DOX 10 µg/ml e todas as outras condições, ou seja, wt, wt + DOX 10 µg/ml e *tet_{OFF}::hsfA* (testes Log-rank Mantel-Cox e Gehan-Breslow-Wilcoxon).

4.1.9 Construção de mutantes de fusão de HsfA e expressão heteróloga da proteína HsfA

Como parte deste trabalho, um mutante de fusão C-terminal de HsfA com o epítipo 3xFLAG, 3xHA e/ou GFP seria construído para o estudo do perfil de expressão da proteína HsfA por *Western blot* e para a realização de experimentos de ChIP-qPCR a fim de se descobrir alvos transcricionais de HsfA. Para tanto, cassetes de fusão *hsfA::3xFLAG*, *hsfA::3xHA* e *hsfA::GFP* foram construídos e transformados em *A. fumigatus*, seguindo a mesma metodologia descrita previamente. Apesar de inúmeros candidatos terem sido obtidos e

validados positivamente por PCR diagnóstica e sequenciamento, nenhum apresentou proteína HsfA detectável em análises de *Western blot*, inviabilizando a utilização dos mesmos (dados não mostrados). Estudos anteriores mostraram que a região C-terminal de Hsf1 de *S. cerevisiae* é importante para a sua regulação e, por isso, é recomendável realizar a fusão na região N-terminal (Hashikawa et al. 2006). Decidiu-se então construir os cassetes 3×FLAG::*hsfA* e GFP::*hsfA* para a subsequente transformação em *A. fumigatus*. Porém, novamente, foram obtidos candidados positivamente validados por PCR diagnóstica, mas que não geraram sinal nas análises de *Western blot* (dados não mostrados). Curiosamente, até mesmo a proteína HsfA::LUC do mutante *hsfA::luc* já mencionado não pode ser detectada utilizando o anticorpo α-LUC (dados não mostrados), ainda que o sinal de luminescência dessa linhagem e dos duplo mutantes tenha sido quantificado nos ensaios de luciferase.

Dado o insucesso na obtenção de um mutante de fusão funcional, decidiu-se iniciar o processo de expressão heteróloga de HsfA em sistema bacteriano para a sua subsequente purificação e futura produção de um anticorpo α-HsfA de *A. fumigatus*. Para tanto, um plasmídeo pET15b contendo a sequência com códons otimizados do cDNA de *hsfA* foi sintetizado (Bio Basic) e transformado nas linhagens bacterianas BL21 (DE3) Rosetta™ e BL21 (DE3) pLysS. Diferentes condições de expressão em ambas as linhagens foram testadas, mas não foi possível obter a expressão da proteína recombinante com cauda de histidina (dados não mostrados). A seguir, inseriu-se a sequência com códons otimizados do cDNA de *hsfA* no vetor pGEX-4T1, o qual geraria uma proteína HsfA com cauda GST, conforme obtido anteriormente em *S. cerevisiae* (Erkine et al. 1996). Tal plasmídeo foi então transformado na linhagem bacteriana BL21 (DE3) Rosetta™ e o transformante positivo foi inicialmente submetido a diferentes condições indutoras da expressão proteica em pequena escala. Como mostra a Figura 35A-B, a proteína recombinante HsfA com cauda GST (massa molecular de HsfA: 86,9 kDa; massa molecular de HsfA::GST: 113 kDa) foi expressa na fração solúvel em todas as temperaturas testadas (18°C, 30°C e 37°C) utilizando 0,5 e 1 mM de IPTG, respectivamente. Em uma análise de *Western blot* utilizando o anticorpo α-GST (34860; Qiagen), também foi possível observar a correta expressão da proteína recombinante (Figura 35C). Foi escolhida então a condição de 30°C e 1 mM de IPTG para a expressão de HsfA

em maior escala (1 litro de cultura), seguida de sua purificação utilizando a coluna cromatográfica GSTrap (GE Healthcare) e também o *slurry* Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare). Ambas as metodologias, no entanto, não resultaram na purificação da proteína HsfA::GST (Figura 35D). A princípio, a proteína parece não ter se ligado na coluna ou na resina.

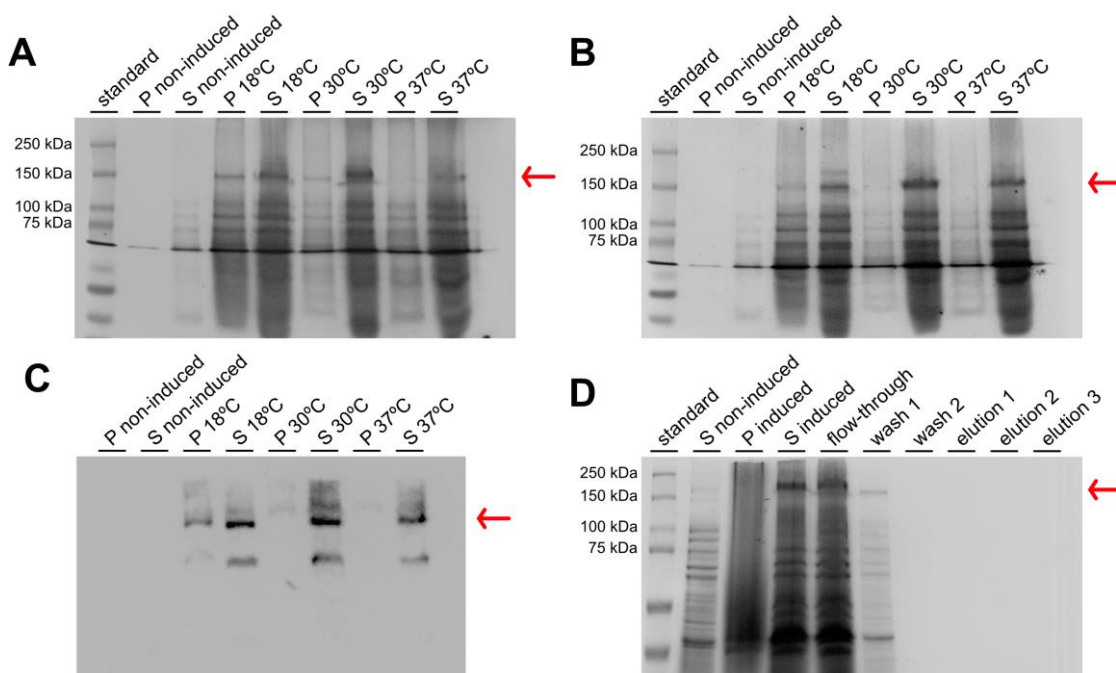


Figura 35. Análise da expressão e purificação da proteína HsfA-GST. (A-B) A linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta™ foi transformada com o vetor pGEX-4T1 contendo a sequência otimizada do cDNA de *hsfA*. A bactéria foi cultivada a 37°C a 180 rpm em 50 ml de LB líquido contendo 100 µg/mL de ampicilina e 34 µg/mL de cloranfenicol até uma DO_{600nm} entre 0,6 e 0,8. A seguir, foram retirados 5 ml da cultura (controle não induzido) e ao restante da cultura foi acrescentando IPTG a uma concentração final de 0,5 mM (A) ou 1 mM (B) para a indução da expressão proteica. Em seguida, a expressão ocorreu a 18°C por 20 horas, 30°C por 6 horas ou 37°C por 6 horas. As amostras foram centrifugadas e lisadas em tampão de lise contendo 30 µg/ml de lisozima por meio de sonização por 2 minutos (pulsos de 10 segundos com intervalos de 50 segundos). Em seguida, o lisado foi centrifugado, separou-se as frações insolúveis (pellet - P) e solúveis (sobrenadante - S) e todas as amostras foram separadas em SDS-PAGE 10%. As setas indicam a proteína HsfA::GST (113 kDa). (C) Análise de *Western blot* da expressão com 1 mM de IPTG da proteína recombinante HsfA com cauda GST, por meio da utilização do anticorpo α -GST (34860; Qiagen). (D) SDS-PAGE da corrida das amostras após purificação utilizando o *slurry* Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare). Para a purificação, foi induzido e lisado 1 litro de amostra. A ligação da proteína com o *slurry* se deu *overnight* a 4°C. A seguir, a resina foi lavada duas vezes e eluída com 10 mM, 20 mM e 30 mM de glutathione.

Apesar da não obtenção do mutante de fusão e da ineficácia da purificação da proteína HsfA recombinante para a síntese de um anticorpo α -HsfA, o estudo da expressão proteica de HsfA foi possível graças à utilização da linhagem mutante *hsfA::luc*, como mostrado acima. Dessa forma, os experimentos comuns de *Western blot* puderam ser substituídos pelos ensaios de luciferase. Contudo, objetivos como a investigação do nível de fosforilação (ativação) de HsfA em

diferentes condições, a análise da possível interação física entre HsfA e Hsp90 por co-imunoprecipitação e a análise dos alvos transcricionais de HsfA por imunoprecipitação de cromatina não puderam ser cumpridos, devido aos problemas relatados nesta sessão. Tais experimentos poderiam ajudar a concluir melhor o papel e a relação de HsfA e Hsp90 nos estresses de temperatura e de parede celular. No entanto, os dados da análise de RNA-Seq e dos ensaios de luciferase descritos acima forneceram informações importantes para este estudo e contornaram parcialmente esses problemas.

4.1.10 Discussão

A emergência de novas doenças associadas ao surgimento de espécies termotolerantes de microrganismos patogênicos é uma consequência iminente das mudanças de temperatura provenientes do aquecimento global (Garcia-Solache and Casadevall 2010). Populações de morcegos e sapos, por exemplo, estão em elevado risco de sofrerem colonização fúngica devido às mudanças nas temperaturas corporal e ambiental (Casadevall 2012). Além disso, recentemente tem sido proposto que doenças causadas por *Candida auris* podem ser o primeiro exemplo de novas doenças fúngicas emergentes do aquecimento global por meio da aquisição da característica termotolerante (Casadevall et al. 2019). Apesar da endotermia ser um mecanismo de proteção dos mamíferos contra infecções fúngicas (Robert and Casadevall 2009; Bergman and Casadevall 2010), fungos termofílicos como *A. fumigatus* são capazes de superar esse obstáculo, indicando que a termotolerância nessa espécie pode estar relacionada à expressão de genes de resposta ao estresse que suportam a sua persistência no hospedeiro. No entanto, as consequências celulares da adaptação de *A. fumigatus* ao calor, os impactos na organização da parede celular e a participação das vias de sinalização que coordenam esses dois eventos não são totalmente entendidos.

Recentemente, foi demonstrado que além da regulação da biossíntese e manutenção da parede celular, a atividade da via CWI é modulada durante a regulação precoce da termotolerância de *A. fumigatus*, e mostrou-se que Hsp90 é necessária para essa relação, interagindo com as principais proteínas da cascata CWI (Rocha et al. 2020b). Hsp90 é fundamental para a resposta eucariótica ao choque de temperatura ao promover o dobramento e montagem

de proteínas recém-sintetizadas (Taipale et al. 2010). Uma vez que o fator de transcrição conservado Hsf1 controla a transcrição de *HSP90*, (Sarge et al. 1993; Eastmond and Nelson 2006; Nicholls et al. 2009; Leach et al. 2016), neste projeto foi identificado e caracterizado o suposto homólogo de *HSF1* em *A. fumigatus*, bem como sua função na termotolerância e na resposta associada ao estresse de parede celular, a qual parece ser um mecanismo chave da resposta fúngica ao calor (Figura 36).

Aqui, foram fornecidas fortes evidências de que um resultado do estresse térmico é o espessamento exacerbado da parede celular em *A. fumigatus* (Figuras 14 e 16), acompanhado pela indução de genes envolvidos na biogênese e remodelamento da parede celular (Figura 30). Esses resultados sugerem que a expansão da parede celular é necessária para sustentar a termoadaptação sem a perda de viabilidade e deve ocorrer rapidamente, uma vez que o espessamento desta estrutura foi detectado logo após cinco minutos do início da exposição ao choque de temperatura (Figura 14). O aumento da espessura da parede celular também foi relatado recentemente em hifas de biofilmes de *C. albicans* durante o estresse térmico moderado (Ikezaki et al. 2019). No entanto, deve-se considerar também que esse processo de rearranjo da parede celular observado nos tempos iniciais do choque térmico pode ser um evento não dirigido exclusivamente pela atividade da via CWI ou pela atividade transcricional de HsfA. Ele também pode estar relacionado, por exemplo, a mudanças físicas na superfície celular, como o aumento do movimento browniano de moléculas de água ou expansão de proteínas e polissacarídeos da parede celular. Experimentos adicionais são necessários para abordar esta hipótese. No entanto, esses dados apontam que as alterações morfológicas da parede celular durante o choque térmico resultam potencialmente em modificações na síntese ou exposição de açúcares específicos na superfície celular, como α -glucana, β -glucana, quitina, manoproteínas ou galactosaminogalactana (Figura 30). Em *C. albicans*, a repressão da expressão de *HSP90* em um mutante condicional *tetO-HSP90* leva ao aumento da detecção de quitina por ensaio de fluorescência de ligação ao CFW (Nair et al. 2017). Uma vez que os conídios invasores de *A. fumigatus* germinam e eventualmente proliferam em condições de alta temperatura dentro do hospedeiro em comparação com o nicho ambiental, tal adaptação da parede celular também pode existir durante as etapas iniciais da

infecção fúngica e pode ser determinante para o reconhecimento imunológico. No entanto, as consequências dessas alterações para o reconhecimento imunológico do fungo ainda precisam de investigação rigorosa.

Curiosamente, os dados apresentados nesta tese demonstram que a capacidade da parede celular de ser remodelada durante o estresse térmico ou tratamento com CASP foi mantida no mutante *xyIP::hsfA*, indicando que este processo não é totalmente dependente do fator de transcrição HsfA, apesar de o mutante condicional *xyIP::hsfA* ser sensível a agentes que danificam a parede celular, incluindo CASP. No entanto, na condição basal (30°C), a repressão de *hsfA* provocou instantaneamente um espessamento da parede celular (Figura 16), de maneira semelhante aos mutantes condicionais de *HSF1* (Nair et al. 2017) e de *HSP90* (Leach et al. 2012a) em *C. albicans*. Além disso, o espessamento da parede celular no mutante *xyIP::hsfA* foi completamente resgatado quando a expressão de *hsfA* foi restaurada pela baixa concentração de xilose, novamente reforçando o *crosstalk* entre a resistência ao calor e a estrutura da parede celular. Apesar do aumento sutil na expressão de *hsfA* registrado na linhagem selvagem desafiada com CASP e CR (Figura 20), um pico na abundância de mRNA de *hsfA* ocorreu após 15 min do início do choque térmico, coincidindo com o maior espessamento da parede celular e o aumento concomitante da expressão de *hsp90* (Figuras 20B e 27B). Padrões semelhantes de expressão gênica são observados para outros fatores de transcrição, que sofrem mudanças transcricionais mínimas, mas são regulados pós-transcricionalmente. Nesse caso, os *pools* intracelulares desses fatores de transcrição provavelmente são mantidos constantes o tempo todo para responder rapidamente ao estresse. Um cenário semelhante pode ser o caso de HsfA na presença de estresse de parede celular. Em linha com esta ideia, mudanças muito ligeiras na concentração de xilose podem resgatar o fenótipo letal condicional do mutante *xyIP::hsfA*, sugerindo que níveis baixos de *hsfA* fornecem um benefício de sobrevivência (Figuras 13 e 19). Assim, experimentos adicionais são necessários para elucidar se a regulação pós-transcricional de HsfA em vez da ativação transcricional é o evento chave para lidar com o estresse da parede celular, incluindo a investigação do estado de fosforilação e atividade de HsfA em resposta a agentes que danificam a parede celular.

Concomitantemente às mudanças dramáticas na estrutura da parede celular, foi observado o aumento da expressão de *hsp90* em resposta à regulação positiva de *hsfA*, seguida por uma queda subsequente no acúmulo de mRNA de *hsfA* (Figuras 20, 27 e 28), sugerindo que o ciclo de *feedback* esperado entre HsfA e Hsp90 descrito em *C. albicans* também ocorre em *A. fumigatus* (Nicholls et al. 2009; Leach et al. 2012a; Leach et al. 2016). De forma consistente, os níveis proteicos de Hsp90 permanecem altos até 240 min após o início do choque térmico (Rocha et al. 2020b). Além disso, HsfA também mostrou ser importante no controle da expressão de genes que codificam HSPs (Figura 32D) e enzimas envolvidas na biossíntese de trealose (Figura 30C), que juntos fazem parte da resposta canônica ao choque de temperatura (Al-Bader et al. 2010; Takahashi et al. 2017). No entanto, os genes que codificam chaperonas como *hsp60*, *hsp70* e *hsp90*, embora modulados pelo choque térmico, não foram significativamente impactados pela repressão de *hsfA* [Material Suplementar do artigo de Fabri et al. (2021)], diferentemente do que foi observado em *C. albicans* (Nicholls et al. 2009; Leach et al. 2016). Possivelmente o pequeno aumento nos níveis de mRNA de *hsfA* registrados nas amostras do mutante condicional sob repressão [aumento de 1,5 vezes; 15 min de choque térmico, Material Suplementar do artigo de Fabri et al. (2021)] pode ter provocado a regulação positiva dessas HSPs na linhagem *xylP::hsfA*. A hipótese de que outros fatores de transcrição podem estar agindo também deve ser considerada. Fatores de transcrição humanos envolvidos na resposta imune, como STAT1, STAT3, NF-IL6 e NF-κB, por exemplo, podem induzir a expressão de *HSP90*, sinergicamente ou antagonisticamente ao HSF1 [revisado em Prodromou (2016)].

Os resultados deste trabalho indicam ainda que o espessamento da parede celular é uma consequência do choque térmico e os mecanismos pelos quais HsfA participa deste evento estão interligados com as principais vias de sinalização que controlam a integridade celular, incluindo as vias CWI e HOG. A interação genética sinteticamente doente entre *hsfA* e *mpkA* ou *sakA*, tanto durante o estresse de temperatura quanto o de parede celular, mas não da mesma forma com o alelo hipomórfico *pkcA^{G579R}*, sugere que essas MAPKs atuam a montante de *hsfA* em resposta a esses estresses.

No entanto, os ensaios de luciferase mostrados acima indicaram que PkcA e MpkA não são cruciais para a ativação de HsfA, uma vez que a expressão e

atividade de HsfA e *hsp90P* foi induzida durante o tratamento com choque térmico e CASP nos *backgrounds* genéticos dos mutantes da via CWI (Figuras 24 e 27). Esse resultado sugere que o comprometimento funcional de qualquer componente da via CWI é suficiente para aumentar a expressão de HsfA para provavelmente ativar alvos a jusante, e alguns destes podem ser compartilhados com a via CWI. Outra observação deste estudo é que o sinal de HsfA foi mais intenso no *background* *pkcA*^{G579R} em ambas as condições de estresse. Em contraste, a atividade de *hsp90P* foi mais intensa no mutante Δ *mpkA* apenas no choque térmico, uma vez que os sinais registrados nas linhagens *pkcA*^{G579R} e Δ *mpkA* foram comparáveis na presença de CASP. Esses resultados apontam novamente para o papel crucial de PkcA na adaptação inicial ao choque térmico, conforme descrito anteriormente (Rocha et al. 2020b). Apoiando essa ideia, a superexpressão de *PKC1*^{*pkcA*}, mas não das MAPKs *MPK1*^{*mpkA*}, *MKK1*^{*mkk1*} e *BCK1*^{*bck1*} em *S. cerevisiae* pode suprimir os defeitos de um mutante do gene *HSF1*^{*hsfA*} em resposta ao estresse térmico, o que significa que a sinalização emergente de Pkc1 e não da cascata de MAPK regulada por Pkc1 foi necessária para a supressão de *HSF1* (Imazu and Sakurai 2005). Embora se conheça uma coleção de quinases que fosforilam e modulam a atividade de Hsf1 em *S. cerevisiae* [revisado em (Veri et al. 2018b)], as enzimas que fosforilam HsfA de *A. fumigatus* durante o choque de temperatura ou estresse da parede celular ainda são desconhecidas, exigindo, portanto, mais experimentos (Figura 36).

Digno de nota, a análise de RNA-Seq indicou que HsfA também é importante para a homeostase da membrana plasmática diante do aumento de temperatura (Figuras 30 e 32). Uma vez que a membrana plasmática fúngica se adapta às mudanças de temperatura [revisado em Fabri et al. (2020)], os resultados apresentados acima sugerem que HsfA tem um papel repressor na biossíntese de ergosterol e lipídios em geral, principalmente os ácidos graxos insaturados, indicando que este fator de transcrição pode regular as alterações químicas e, conseqüentemente, físicas da membrana plasmática durante o choque térmico. Não surpreendentemente, uma ligação molecular entre a síntese de ácidos graxos e a resposta ao choque de temperatura governada por Hsf1 em *C. albicans* foi descrita anteriormente (Leach and Cowen 2014) e constitui um campo aberto de investigação em *A. fumigatus*.

Em resumo, este módulo da tese mostrou que o fator de transcrição HsfA é essencial e contribui para a manutenção da parede celular. Foi observada uma conexão entre HsfA-Hsp90 e a via CWI, e que as quinases PkcA e MpkA não são essenciais para a ativação de HsfA durante os estresses de parede celular e térmico. Além disso, genes modulados por HsfA foram identificados, incluindo aqueles relacionados à resposta ao choque de temperatura, à biogênese da parede celular, ao metabolismo lipídico e à homeostase do ferro. Tais resultados reforçam o conceito de que a adaptação da parede celular contribui para a termotolerância de *A. fumigatus* por meio de um mecanismo integrado que abrange a resposta ao choque térmico e a regulação das vias de sinalização em fungos.

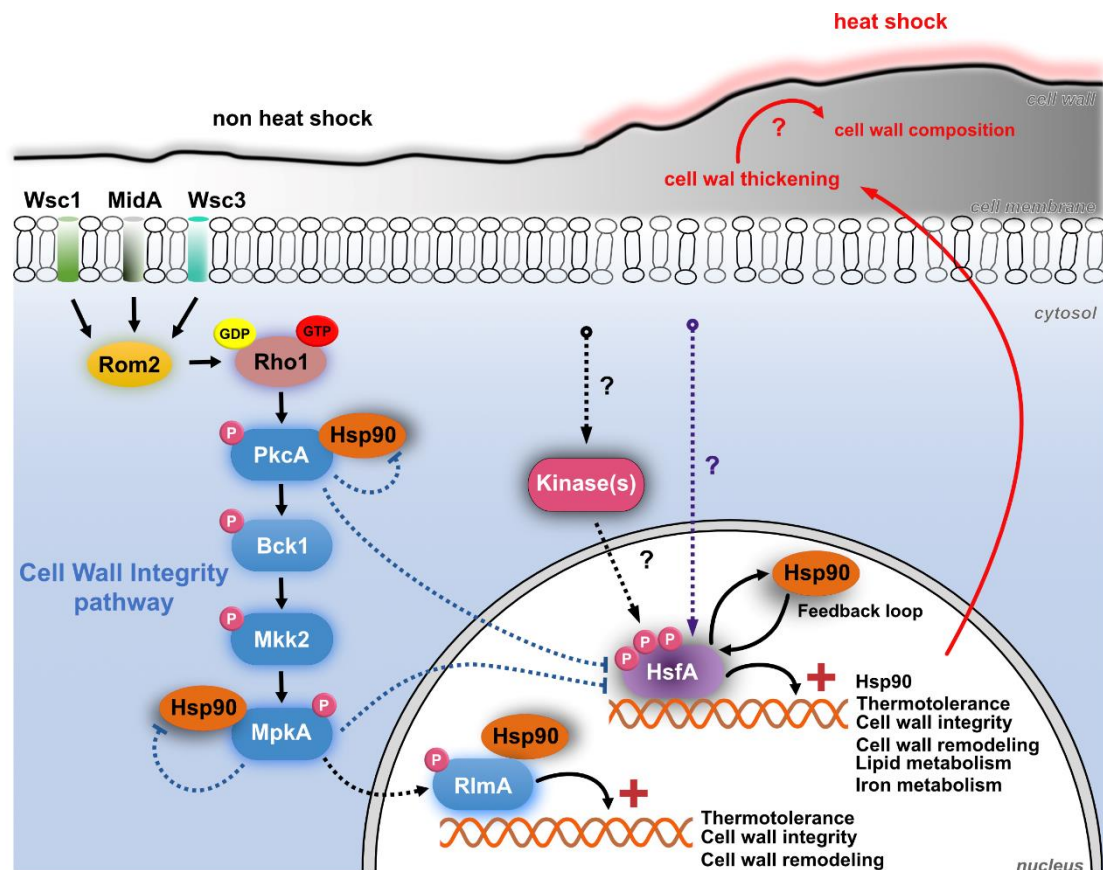


Figura 36. Esquema da relação entre HsfA-Hsp90 e a via CWI em *A. fumigatus* durante o choque de temperatura. A via CWI é ativada durante a adaptação inicial ao choque térmico, possivelmente por meio do mecanossensor MidA localizado na membrana celular. Este sinal atinge Rom2, um fator de troca de nucleotídeo de guanina, e a pequena Rho GTPase Rho1, levando à ativação de PkcA e da via CWI. Esses eventos culminam com a fosforilação da MAPK MpkA, que por sua vez fosforila o fator de transcrição RlmA, ativando (+) a transcrição de genes importantes para a termotolerância, integridade e remodelamento da parede celular. As proteínas da via CWI PkcA, MpkA e RlmA são clientes constitutivos de Hsp90. Uma consequência direta do choque de temperatura é o espessamento da parede celular após cinco minutos do aumento da temperatura, o que pode ter consequências no remodelamento da parede celular e exposição de carboidratos à superfície celular. No entanto, essas consequências ainda precisam ser investigadas (ponto de interrogação vermelho). Além disso, a membrana plasmática se torna

mais fluida em resposta ao choque térmico. Embora não sejam necessárias para a ativação de HsfA, PkcA e MpkA regulam negativamente a expressão de HsfA e Hsp90, tanto durante o choque térmico (setas azuis tracejadas) quanto sob estresse de parede celular induzido por Caspofungin (não mostrado na Figura). O aumento resultante na abundância de proteínas HsfA e Hsp90 nos mutantes dos genes *pkcA* e *mpkA* ocorre possivelmente por meio de mecanismos compensatórios não descritos acompanhados pela ativação de cascatas de sinalização adicionais para reter a via CWI e a termotolerância (linha tracejada roxa). Diante do estresse térmico, a abundância de HsfA aumenta e desencadeia a expressão de genes relacionados à termotolerância, integridade da parede celular, remodelamento da parede celular, metabolismo de lipídios e ferro. Um de seus alvos transcricionais, Hsp90, também é induzido para lidar com o choque de temperatura e auxiliar na estabilização de proteínas clientes. Após cerca de 15-30 minutos de choque térmico, os níveis de HsfA diminuem, possivelmente devido à ação de Hsp90 no circuito de *feedback* regulatório. Esse mecanismo regulatório compreende a interação proteína-proteína entre Hsf1 e Hsp90 (não investigada aqui), que é revertida durante o choque térmico, quando os níveis da proteína Hsp90 aumentam e se desacoplam de Hsf1 para auxiliar no enovelamento das proteínas clientes. A atividade de Hsf1 permanece até que Hsp90 se ligue novamente a Hsf1, regulando negativamente Hsf1. A hiperfosforilação (não investigada aqui) é outro evento regulatório que modula a atividade transcricional de ortólogos de HsfA em outros patógenos fúngicos. As proteínas quinases responsáveis pela fosforilação de HsfA ainda são desconhecidas em *A. fumigatus*. Este diagrama é baseado nos dados deste projeto e nas referências (Dichtl et al. 2012; Leach et al. 2012a; Rocha et al. 2020a; Rocha et al. 2020b).

Módulo 4.2 Caracterização funcional da dessaturase de ácidos graxos SdeA e do pseudogene *sdeB* de *A. fumigatus*

4.2.1 Identificação do homólogo SdeA^{Ole1} em *A. fumigatus* e construção das linhagens *xyIP::sdeA*, *sdeA::GFP* e *sdeA::3xHA*

Em *A. nidulans*, duas stearyl-CoA $\Delta 9$ -dessaturases codificadas pelos genes *sdeA* e *sdeB* foram previamente identificadas (Wilson et al. 2004). Uma análise do genoma de *A. fumigatus* usando as sequências proteicas de Ole1 de *S. cerevisiae*, Ole1 de *S. pombe*, Ole1 de *C. albicans*, SdeA de *A. nidulans*, SdeA de *A. niger*, SdeA de *A. oryzae* e SCD1 e SCD5 de *Homo sapiens* como sequências de consulta revelou que *A. fumigatus* possui também dois genes codificadores de dessaturases do tipo $\Delta 9$ putativos: Afu7g05920 e Afu7g05350. O primeiro (Afu7g05920) é o homólogo mais próximo (Figura 37) e foi nomeado como *sdeA* para ser consistente com a nomenclatura anterior de *Aspergillus*. A proteína codificada por esse gene possui homologia significativa com Ole1 de levedura (53% de identidade e 72% de similaridade, e-value de 3e-161), Ole1 de *C. albicans* (56% de identidade e 74% de similaridade, e-value de 0.0), Ole1 de *S. pombe* (57% de identidade e 98% de similaridade, e-value de 0.0), SCD1 do ser humano (40% de identidade e 57% de similaridade, e-value de 1e-66) e especialmente SdeA de *A. nidulans* (92% de identidade e 95% de similaridade, e-value de 0.0), *A. niger* (92% de identidade e 100% de similaridade, e-value de 0.0) e *A. oryzae* (93% de identidade e 100% de similaridade, e-value de 0.0). Além disso, SdeA de *A. fumigatus* SdeA compartilha com as outras enzimas o domínio da dessaturase de ácido graxo, o qual compreende a porção mais semelhante e conservada entre as sequências de aminoácidos analisadas, e o domínio do tipo citocromo b5, o qual não é encontrado em mamíferos (Figura 37).

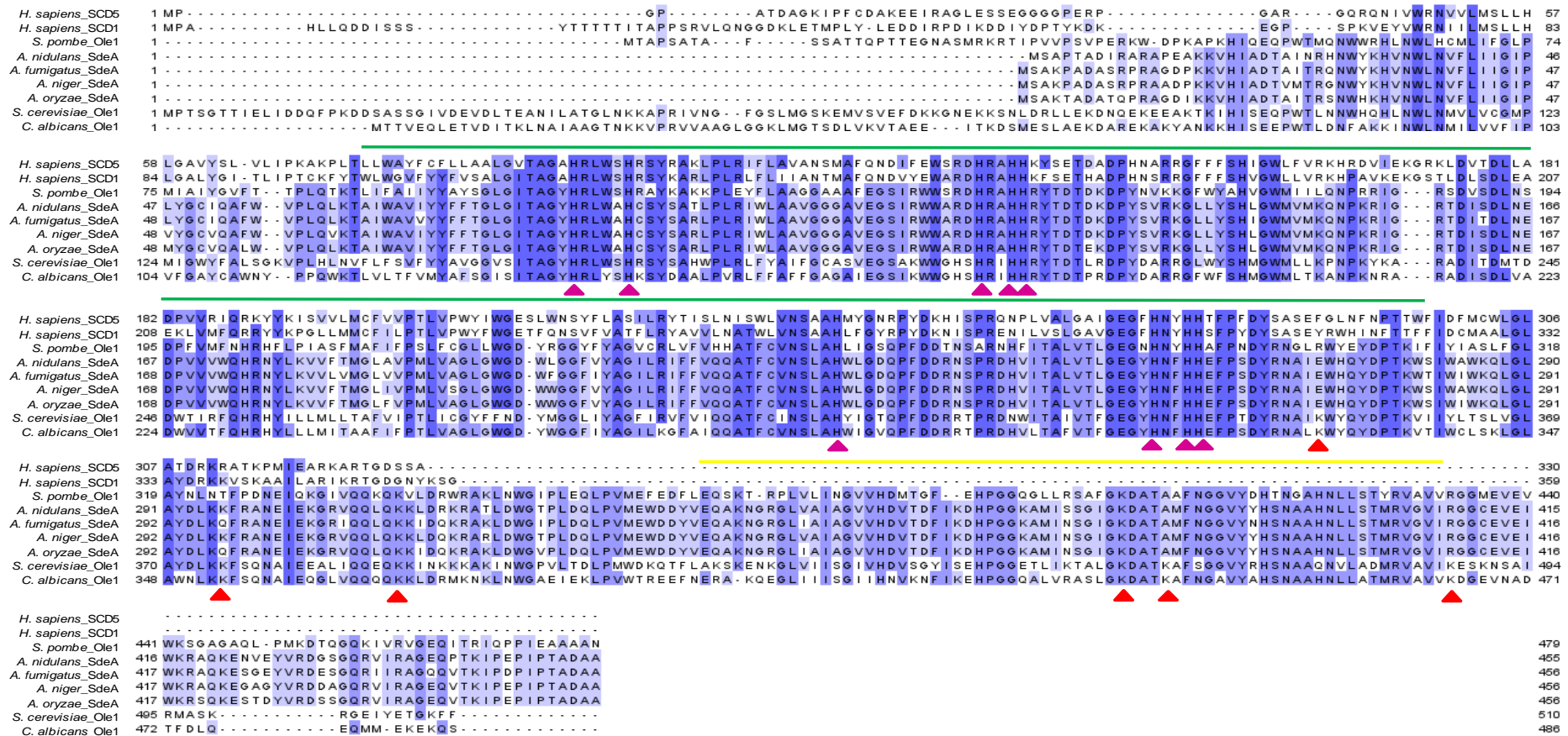


Figura 37. Alinhamento e comparação das seqüências de aminoácidos dos homólogos de Ole1 em diferentes organismos. As seqüências deduzidas de SdeA de *A. fumigatus* (Afu7g05920), Ole1 de *S. cerevisiae* (YGL055W), Ole1 de *S. pombe* (SPCC1281.06c), Ole1 de *C. albicans* (C1_08360C), SdeA de *A. nidulans* (AN6731), SdeA de *A. niger* (An07g01960), SdeA de *A. oryzae* (AO090005000456) e SCD1 (NCBI ID: 6319) e SCD5 de *Homo sapiens* (NCBI ID: 79966) foram alinhadas utilizando a ferramenta Clustal Ω (Waterhouse et al. 2009). Os resíduos idênticos são representados em tons de azul. As setas vermelhas indicam as lisinas que são ubiquitinadas na proteína Ole1 de levedura. As setas rosas indicam resíduos de histidina conservados que, como descrito em humano (Wang et al. 2015), coordenam átomos de ferro durante a reação enzimática que culmina na atividade dessaturase de seus substratos. O traço verde representa o domínio da dessaturase de ácidos graxos na proteína Ole1 de levedura (Pfam PF00487, 142aa-359aa), enquanto o traço amarelo mostra o domínio do tipo *cytochrome b5-like heme/steroid binding* na proteína Ole1 de levedura (Pfam PF00173, 419aa-486aa).

Para investigar o papel da enzima estearoil-CoA dessaturase SdeA no fungo *A. fumigatus*, objetivou-se inicialmente construir o mutante nulo $\Delta sdeA$ com o intuito de utilizá-lo em experimentos genéticos e bioquímicos. Contudo, nenhum candidato de transformação positivo foi obtido, sugerindo a possível essencialidade do gene *sdeA* em *A. fumigatus*, assim como seus homólogos em *S. cerevisiae* e *C. albicans* (Stukey et al. 1990; Krishnamurthy et al. 2004). Por esse motivo, assim como feito para o mutante *xyIP::hsfA*, decidiu-se construir um cassete condicional *xyIP::sdeA*, no qual o gene *sdeA* está sob o controle do promotor do gene da xilose redutase de *P. chrysogenum* (*xyIP*) (Zadra et al. 2000), o qual é regulado pela concentração de xilose presente no meio. O candidato obtido foi validado por PCR e *Southern blot*, como mostrado na Figura 38.

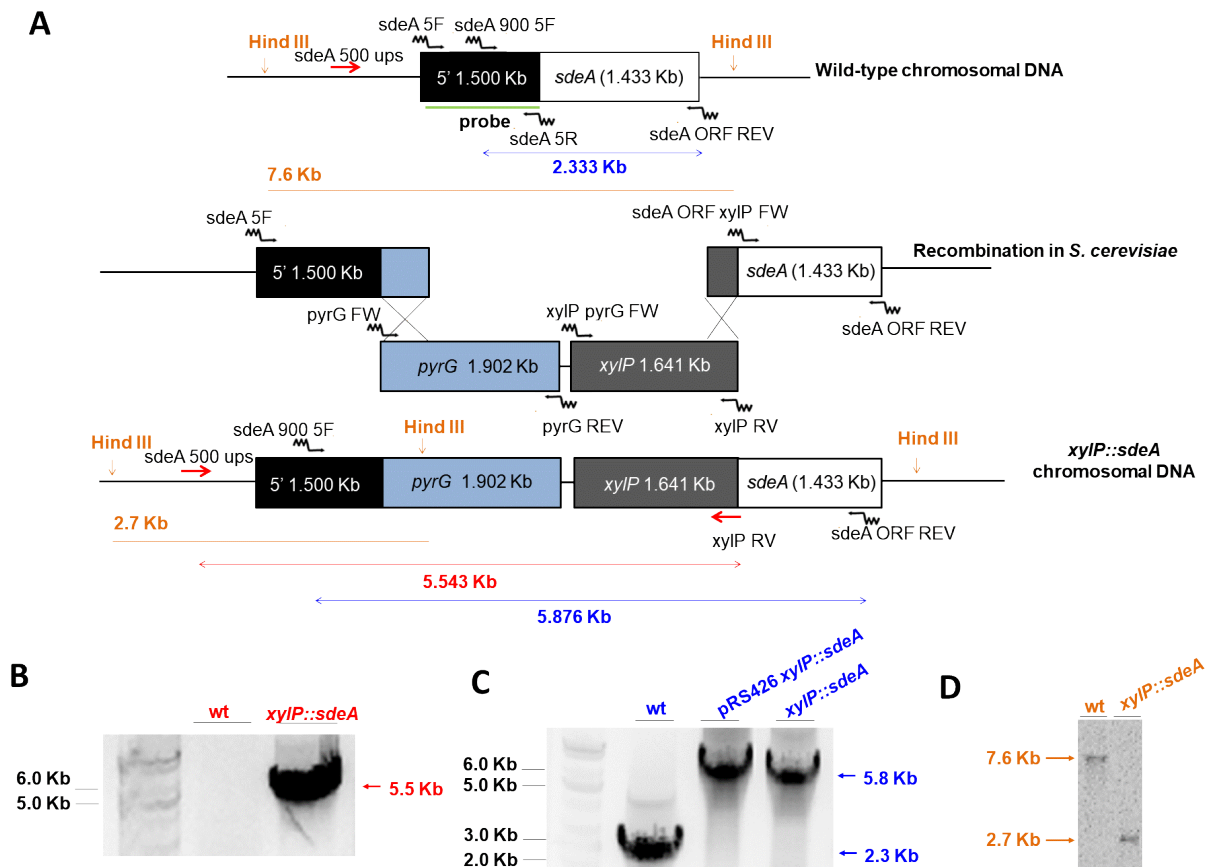


Figura 38. Construção e validação do mutante *xyIP::sdeA*. (A) Os fragmentos independentes usados na obtenção do cassete foram adquiridos por PCR utilizando os *primers* indicados na figura, e recombinados em *S. cerevisiae*. (B-C) PCRs de validação do candidato a *xyIP::sdeA* após transformação em *A. fumigatus*. Utilizaram-se os *primers* *sdeA* 500 ups e *xyIP* RV (B) e *sdeA* 900 5F e *sdeA* ORF REV (C), que amplificam os fragmentos indicados em vermelho e azul, respectivamente, confirmando a obtenção do mutante condicional. O plasmídeo pRS426 contendo o cassete *xyIP::sdeA* foi utilizado como controle positivo em (C). (D) Análise de *Southern blot* do candidato a *xyIP::sdeA* utilizando a região 5'UTR como sonda e a enzima de restrição *HindIII* para a obtenção dos fragmentos mostrados em laranja em (A).

Uma vez obtida a linhagem mutante *xyIP::sdeA*, esta foi submetida a uma análise de RT-qPCR para verificar o correto funcionamento do promotor *xyIP*. Para a análise do promotor *xyIP*, as linhagens selvagem e *xyIP::sdeA* foram crescidas a 180 rpm por 24 horas em MM líquido contendo 1% de xilose a 37°C. A seguir, o micélio foi centrifugado, lavado em água ultrapura autoclavada por duas vezes e colocado em frascos contendo MM ou MM sem glicose e suplementado com diferentes concentrações de xilose. As amostras foram incubadas por mais 4 horas até serem filtradas e congeladas. O mRNA total de todas as amostras foi extraído, tratado e transcrito em cDNA para as análises de RT-qPCR. Como mostrado na Figura 39, a repressão do promotor pela ausência de xilose no meio de fato reprimiu consideravelmente a expressão de *sdeA*, enquanto a adição de xilose induziu significativamente a expressão do mesmo gene, validando o funcionamento do promotor condicional. A expressão de *sdeA* na linhagem selvagem permaneceu constante independentemente da concentração de xilose.

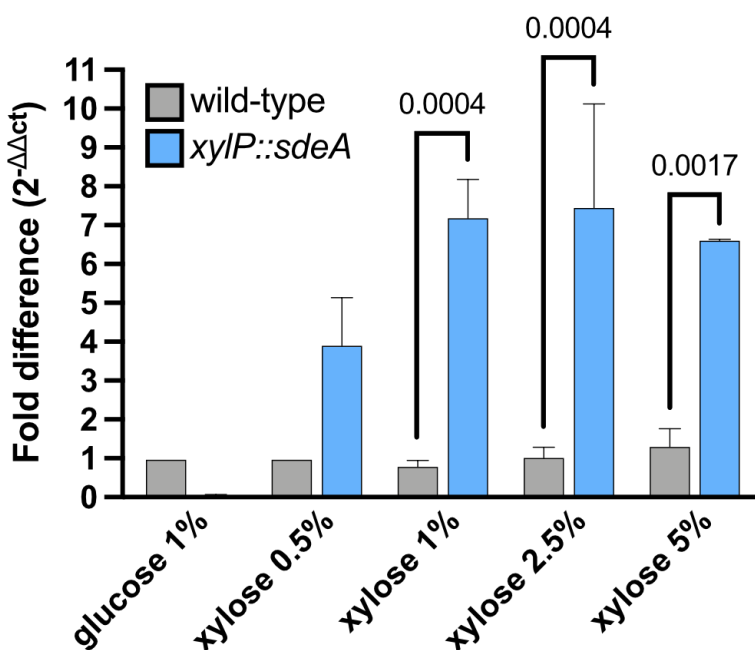


Figura 39. Análise da expressão do gene *sdeA* por RT-qPCR no mutante condicional *xyIP::sdeA*. A expressão de *sdeA* é reprimida na ausência de xilose e induzida na presença da mesma na linhagem *xyIP::sdeA*. O mRNA total foi avaliado por RT-qPCR e normalizado pelo gene da β -tubulina. Os dados são provenientes de duas replicatas experimentais e independentes (Média \pm DP). O *Fold difference* de cada condição representa o mRNA total normalizado em relação à amostra glicose 1% da linhagem selvagem (wt). As barras indicam diferença estatisticamente significativa, sobrescritas com o *p* valor de cada comparação (*Two-way* ANOVA com pós-teste de Sidak).

Para a realização do estudo funcional da proteína SdeA por meio de experimentos de *Western blot* e também da localização subcelular da mesma por microscopia de fluorescência, foi construída a linhagem *sdeA::GFP*, na qual o gene *sdeA* está em fusão C-terminal com o gene da proteína GFP. O mutante positivo foi confirmado por PCR e *Western blot* (Figura 40).

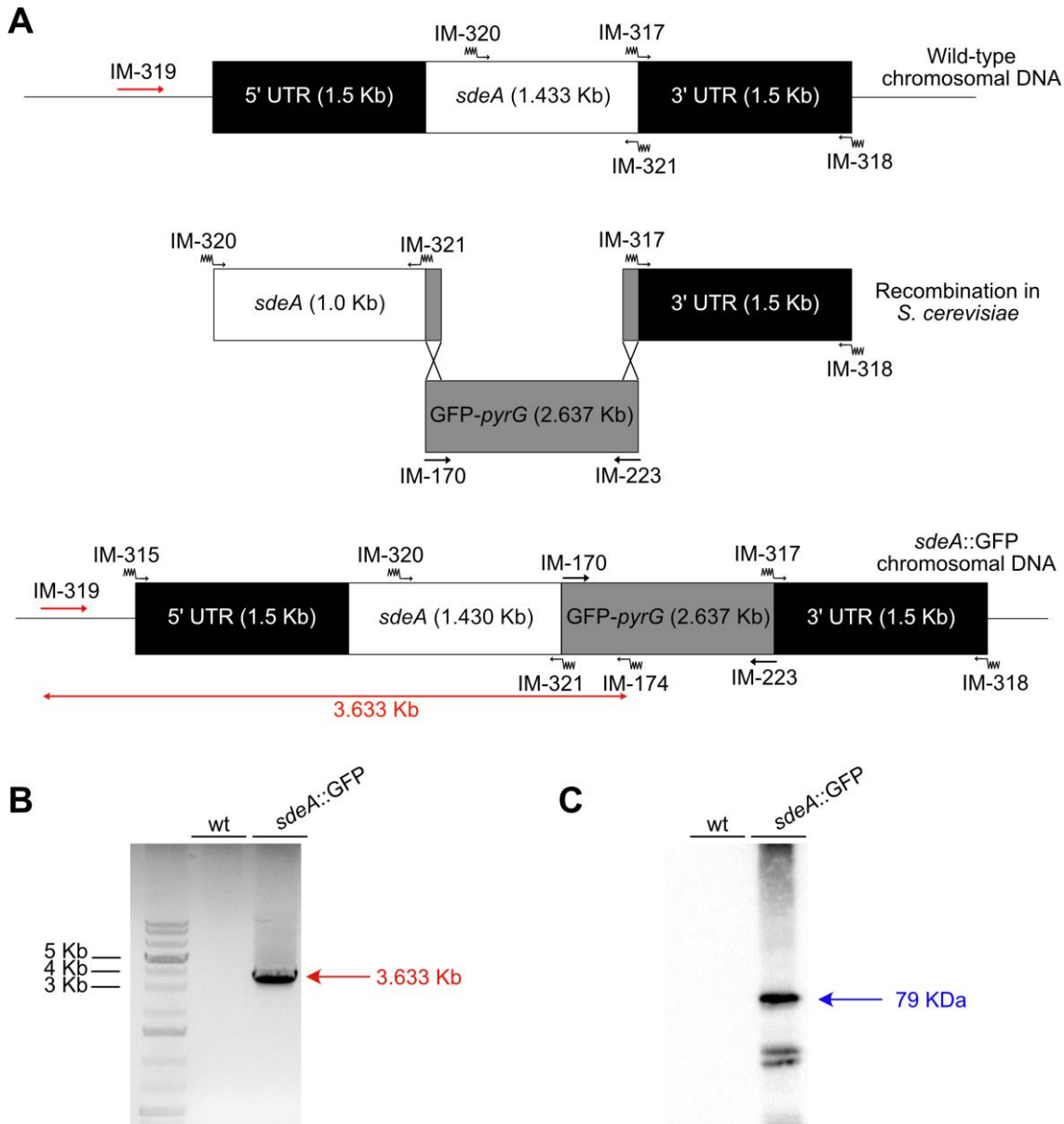


Figura 40. Construção e validação do mutante *sdeA::GFP*. (A) Os fragmentos independentes usados na obtenção do cassete foram adquiridos por PCR utilizando os *primers* indicados na figura, e recombinados em *S. cerevisiae*. (B) PCR de validação do candidato a *sdeA::GFP* após transformação em *A. fumigatus*. Utilizaram-se os *primers* IM-319 e IM-174, que amplificam o fragmento indicado em vermelho, confirmando a obtenção do mutante. (C) Análise de *Western blot* do extrato bruto proteico do candidato a *sdeA::GFP*. Utilizou-se um anticorpo α -GFP para a detecção da proteína SdeA::GFP de 79 kDa.

Semelhantemente, também foram construídos o mutante simples *sdeA::3xHA* e o duplo mutante *xyIP::hsfA sdeA::3xHA*, nos quais o gene *sdeA*

está em fusão C-terminal com o epítipo 3xHA. Os candidatos positivos foram confirmados por PCR e *Western blot* (Figura 41). Essas linhagens foram utilizadas em experimentos de *Western blot* para a investigação do efeito da repressão de *hsfA* sobre a proteína SdeA.

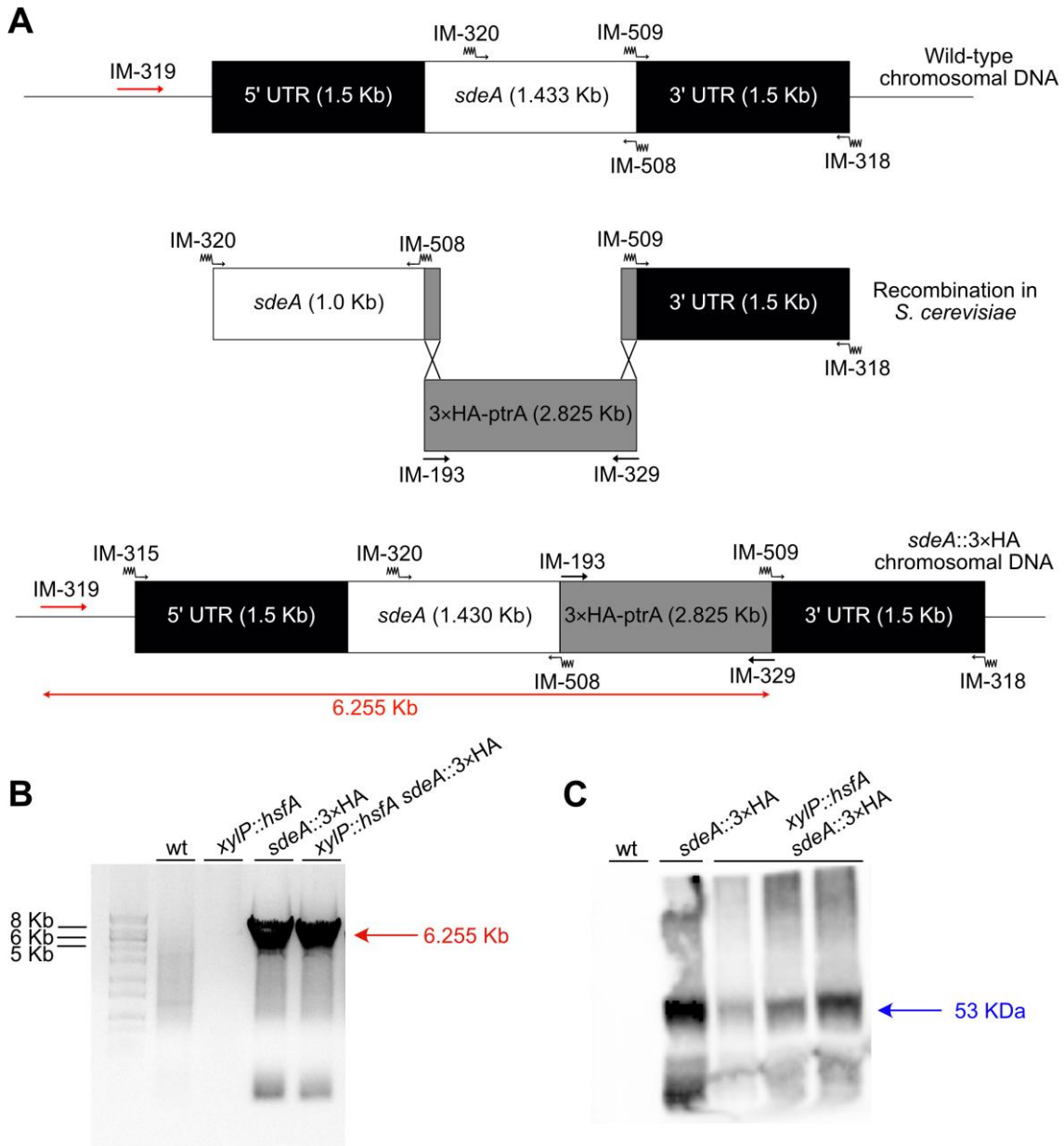


Figura 41. Construção e validação do mutante *sdeA::3xHA* e do duplo mutante *xyIP::hsfA sdeA::3xHA*. (A) Os fragmentos independentes usados na obtenção do cassete foram adquiridos por PCR utilizando os *primers* indicados na figura, e recombinados em *S. cerevisiae*. (B) PCR de validação dos candidatos a *sdeA::3xHA* e *xyIP::hsfA sdeA::3xHA* após transformação em *A. fumigatus*. Utilizaram-se os *primers* IM-319 e IM-329, que amplificam o fragmento indicado em vermelho, confirmando a obtenção dos mutantes. (C) Análise de *Western blot* do extrato bruto proteico dos candidatos a *sdeA::3xHA* e *xyIP::hsfA sdeA::3xHA*. Utilizou-se um anticorpo α -HA para a detecção da proteína SdeA::3xHA de 53 kDa.

Todas esses mutantes de fusão, ou seja, os mutantes simples *sdeA::GFP* e *sdeA::3xHA*, bem como o duplo mutante *xyIP::hsfA sdeA::3xHA*, foram

expostas ao estresse de temperatura (Figura 42) e de parede celular (dados não mostrados) e não apresentaram defeitos de crescimento em comparação com as linhagens parentais, indicando que os alelos substituídos são totalmente funcionais.

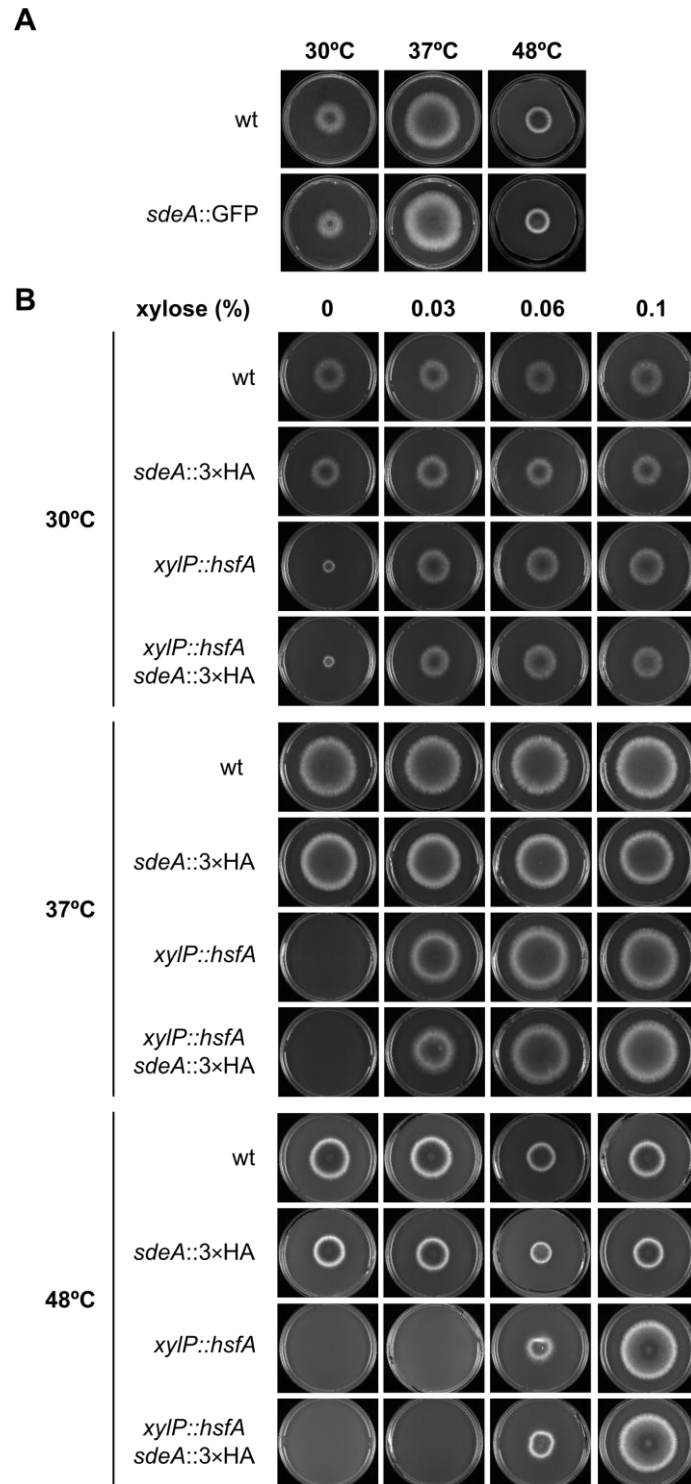


Figura 42. Fenótipo de crescimento dos mutantes *sdeA::GFP*, *sdeA::3xHA* e *xyIP::hsfA sdeA::3xHA*. (A) 1×10^4 conídios de cada linhagem foram inoculados em MM sólido e incubados nas temperaturas indicadas por 96 h. (B) 1×10^4 conídios de cada linhagem foram inoculados em MM sólido suplementado com diferentes concentrações de xilose e incubados nas temperaturas indicadas por 96 h.

4.2.2 A proteína SdeA está localizada no retículo endoplasmático

A seguir, a distribuição celular da proteína SdeA em germinantes de *A. fumigatus* foi analisada por microscopia de fluorescência. A 30°C, a linhagem *sdeA::GFP* produziu um sinal fluorescente forte concentrado ao redor dos núcleos das hifas (Figura 43). Esse padrão é consistente com observações anteriores de proteínas de *A. fumigatus* localizadas no retículo endoplasmático perinuclear (Song et al. 2016; Roundtree et al. 2020). No entanto, é possível notar que, além da localização perinuclear, alguma fluorescência pode ser detectada em uma rede alongada pelo citoplasma, a qual caracteriza o retículo endoplasmático periférico (Roundtree et al. 2020). Apesar de sua localização no retículo endoplasmático, a proteína SdeA não apresenta em sua estrutura primária a sequência de direcionamento ao retículo endoplasmático [Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL)] (Munro and Pelham 1987), nem variações dessa sequência C-terminal encontradas em *S. cerevisiae* (HDEL) (Pelham et al. 1988) e *S. pombe* (ADEL) (PROSITE PDOC00014), o que também não ocorre na proteína Ole1 de levedura. Digno de nota, a distribuição da proteína SdeA::GFP não foi alterada quando os germinantes foram expostos ao choque de temperatura ou a drogas estressoras de membrana como cerulenina e anfotericina B (dados não mostrados).

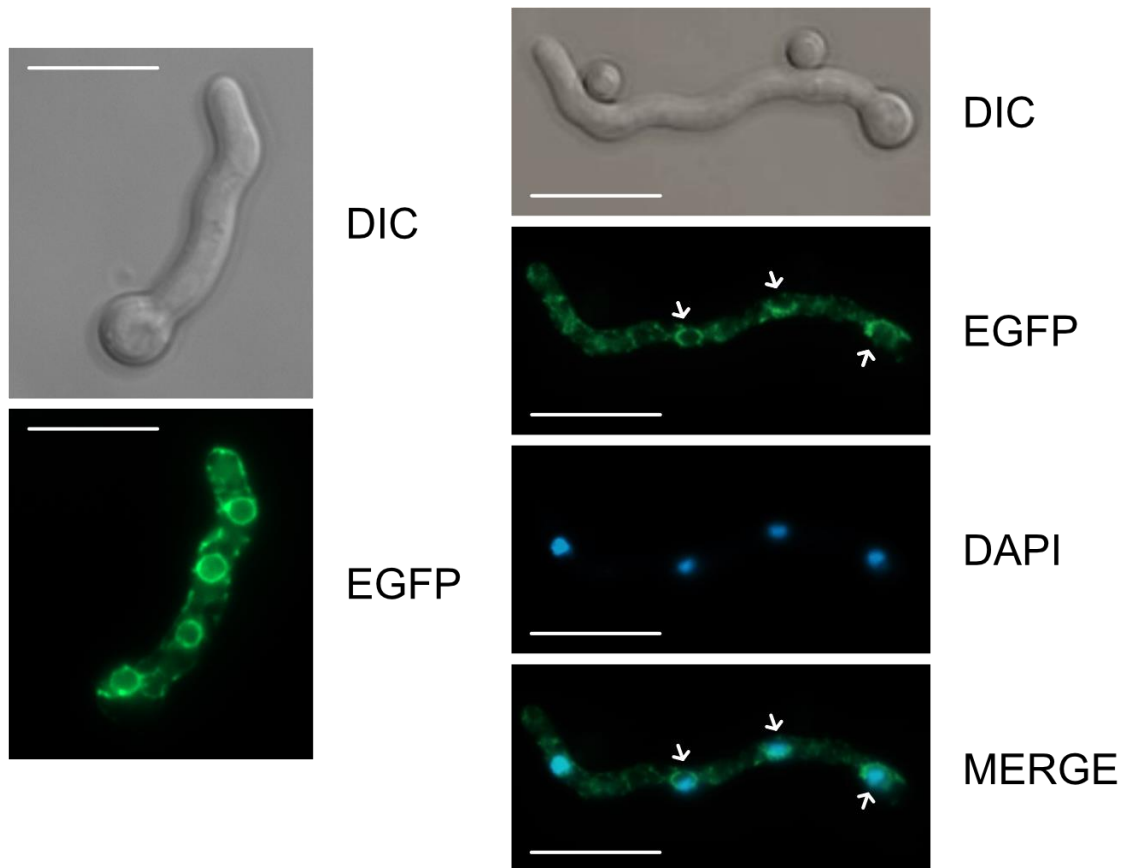


Figura 43. A proteína SdeA está localizada no retículo endoplasmático. Microscopia de fluorescência realizada com a linhagem *sdeA::GFP* crescida em MM por 12 horas a 30°C. A proteína GFP foi visualizada usando um conjunto de filtros 38 HE (Carl Zeiss) e objetiva de óleo de imersão com ampliação de 100x. As imagens foram capturadas com uma câmera AxioCam MRm (Zeiss) e processadas com o software ZEN. À direita, a sobreposição das imagens EGFP e DAPI (que marca os núcleos) mostra que a proteína SdeA::GFP se acumula mais nitidamente na região perinuclear, como apontado pelas setas. DIC: *Differential Interference Contrast*. Barras: 10 µm.

4.2.3 Caracterização funcional do mutante *xyIP::sdeA* de *A. fumigatus*

4.2.3.1 O gene *sdeA* é essencial em *A. fumigatus*

Para avaliar se a repressão de *sdeA* causa alguma alteração na germinação e estrutura das hifas de *A. fumigatus*, um experimento de microscopia óptica foi conduzido, no qual tanto a linhagem selvagem quanto o mutante *xyIP::sdeA* foram cultivados em MM contendo diferentes concentrações de xilose por 12 horas a 37°C. A ausência de xilose inibiu totalmente a germinação do mutante condicional (Figura 44), mesmo após 36 horas de cultivo (imagem *). Foi possível observar germinação do mutante *xyIP::sdeA* apenas a partir da concentração de 0,5% de xilose, apesar de ainda terem sido observados conídios que não germinaram nessa concentração. O mutante condicional alcançou um crescimento comparável ao da linhagem selvagem na concentração de 2,5% de xilose. Com exceção da inibição da germinação em

concentrações mais baixas de xilose, nenhuma alteração nas hifas da linhagem mutante foi observada. Para efeito de comparação, em meio sem glicose, mas com 1% de xilose, o mutante *xyIP::sdeA* cresceu normalmente sem o aparecimento de qualquer tipo de alteração estrutural nas hifas.

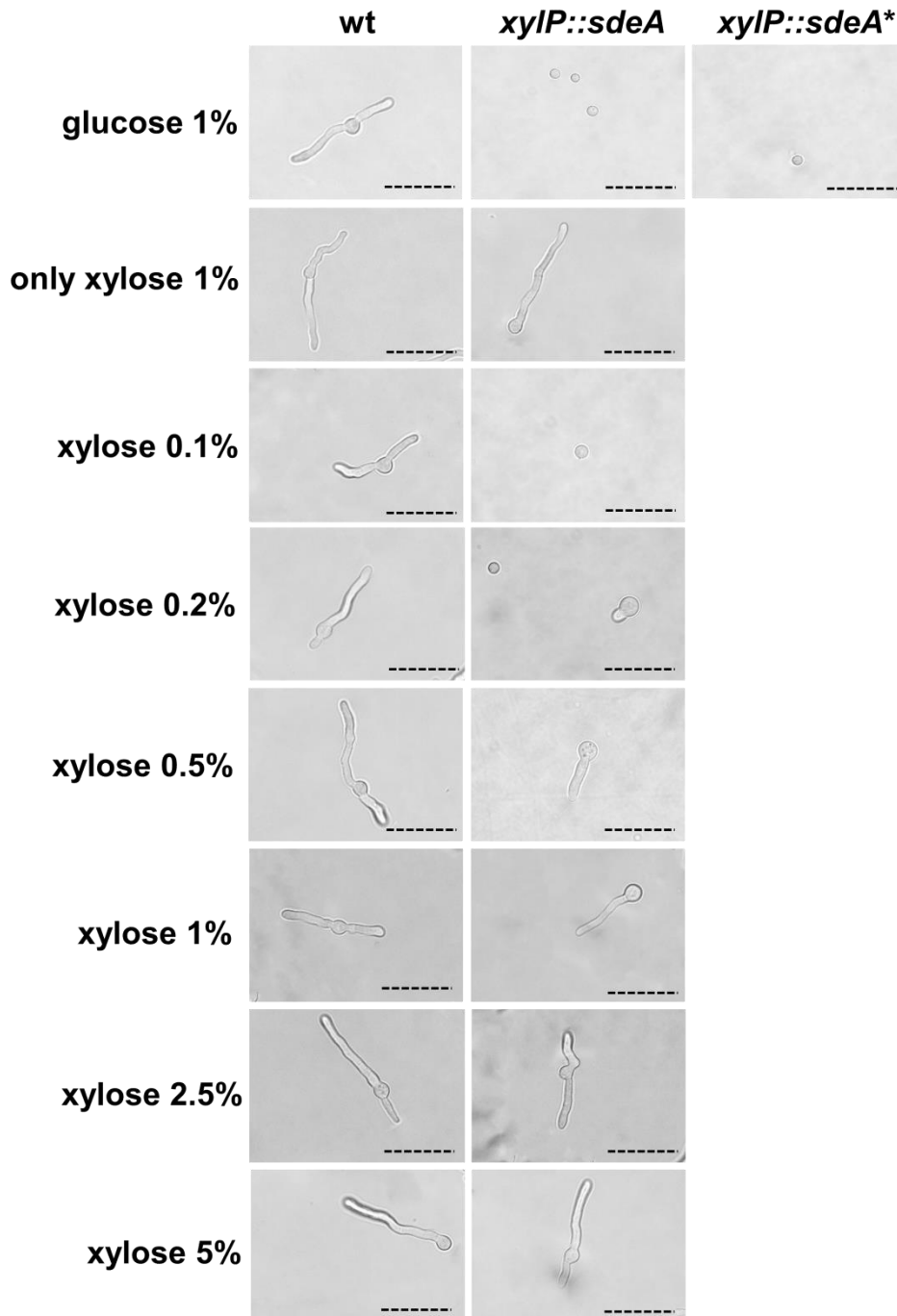


Figura 44. SdeA é essencial para a germinação de *A. fumigatus*. As linhagens selvagem e *xyIP::sdeA* foram cultivadas por 12 horas a 37°C em placas do tipo *Glass Bottom Dishes* contendo 2 ml de MM suplementado com diferentes concentrações de xilose, ou apenas xilose no lugar da glicose. As lamínulas foram lavadas, fixadas sobre uma lâmina com radiação UV e analisadas em microscópio óptico Zeiss (aumentos de 100x). Barras: 10 µm. * crescimento a 37°C por 36 horas.

A seguir, iniciou-se a investigação da importância do gene *sdeA* para o crescimento fúngico em diversas condições de estresse, utilizando para isso o mutante condicional em testes fenotípicos. O primeiro teste realizado foi o de temperatura, no qual tanto a linhagem selvagem quanto o mutante *xyIP::sdeA* foram inoculados em MM contendo diferentes concentrações de xilose e incubados em diferentes temperaturas por 72 horas. Como pode ser visto na Figura 45, o mutante condicional foi incapaz de crescer na ausência de xilose em todas as temperaturas testadas. Esse resultado mostra que *sdeA* é um gene essencial em *A. fumigatus*, a exemplo do que ocorre com seus genes homólogos em *S. cerevisiae* (Stukey et al. 1989) e *C. albicans* (Krishnamurthy et al. 2004), mas diferentemente de *A. nidulans* (Wilson et al. 2004). Este resultado foi o mesmo obtido em uma publicação recente (Wang et al. 2021). Pequenas concentrações de xilose já foram suficientes para o crescimento do mutante condicional, mas este crescimento não se igualou ao crescimento da linhagem selvagem, ou seja, mesmo com 5% de xilose, o fungo *xyIP::sdeA* não cresceu tão bem quanto a linhagem selvagem a 37°C. A 48°C, no entanto, o mutante condicional recuperou o mesmo crescimento apresentado pela linhagem selvagem em altas concentrações de xilose, mas apresentou uma significativa redução na produção de conídios, como pode ser visto pela sua coloração branca (Figura 45). O fato de o crescimento radial do mutante condicional a 48°C ter sido semelhante ao da linhagem selvagem sugere que a expressão de *sdeA* pode ser de menor importância para o fungo em maiores temperaturas. Considerando que temperaturas elevadas aumentam por si só a fluidez das membranas biológicas, uma menor produção de ácidos graxos insaturados é necessária nesta condição, o que pode justificar a menor necessidade de expressão de *sdeA*. Já a diminuição do número de conídios no mutante *xyIP::sdeA* em altas temperaturas sugere que *sdeA* pode ter um papel importante na regulação da conidiação do *A. fumigatus*, uma vez que mesmo a 37°C o mutante condicional também apresentou menor produção de conídios que a linhagem selvagem.

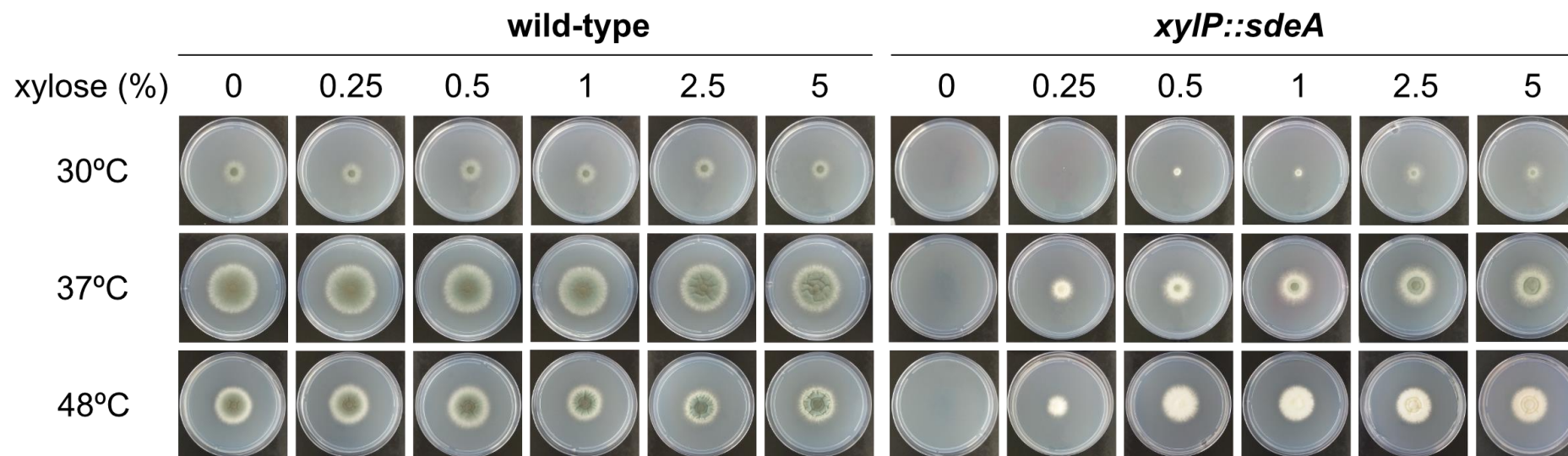


Figura 45. *sdeA* é essencial em *A. fumigatus* e tem papel sobre a conidição. 1×10^4 conídios das linhagens selvagem e *xyIP::sdeA* foram inoculados em MM sólido contendo as concentrações indicadas de xilose e as placas foram incubadas a 30, 37 ou 48°C por 72 horas.

4.2.3.2 O biofilme maduro do mutante *xyIP::sdeA* apresenta redução da atividade metabólica na presença de caspofungin

Para a caracterização fenotípica da linhagem *xyIP::sdeA* em outras condições de estresse, decidiu-se utilizar apenas uma concentração sub-inibitória de xilose a fim de avaliar o efeito da perda de função do gene *sdeA* nestas condições de estresse, como feito anteriormente para o mutante *xyIP::hsfA*. Como o mutante *xyIP::sdeA* não cresce normalmente mesmo em concentrações mais altas de xilose (Figura 45), a análise dos testes de caracterização fenotípica desta linhagem seriam desafiadores em qualquer concentração de xilose escolhida. Dessa forma, foi utilizada a concentração de 2,5% de xilose nos testes fenotípicos apresentados a partir de agora, tendo em vista que esta foi a menor concentração de xilose testada em que a linhagem mutante atingiu seu crescimento radial máximo e mais próximo ao da linhagem selvagem (Figura 45).

Para averiguar a importância de SdeA para a manutenção da viabilidade da parede celular de *A. fumigatus* e a relação entre a composição lipídica da membrana plasmática e a parede celular, a linhagem *xyIP::sdeA* foi exposta a diferentes drogas que perturbam a parede celular (CR, CFW, CAF e CASP), e o seu crescimento foi analisado pelo teste fenotípico do tipo *drop test* na condição sub-inibitória (2,5% de xilose). Contudo, o mutante *xyIP::sdeA* não apresentou diferença de sensibilidade para nenhuma das drogas estressoras de parede celular testadas em comparação com a linhagem selvagem (Figura 46).

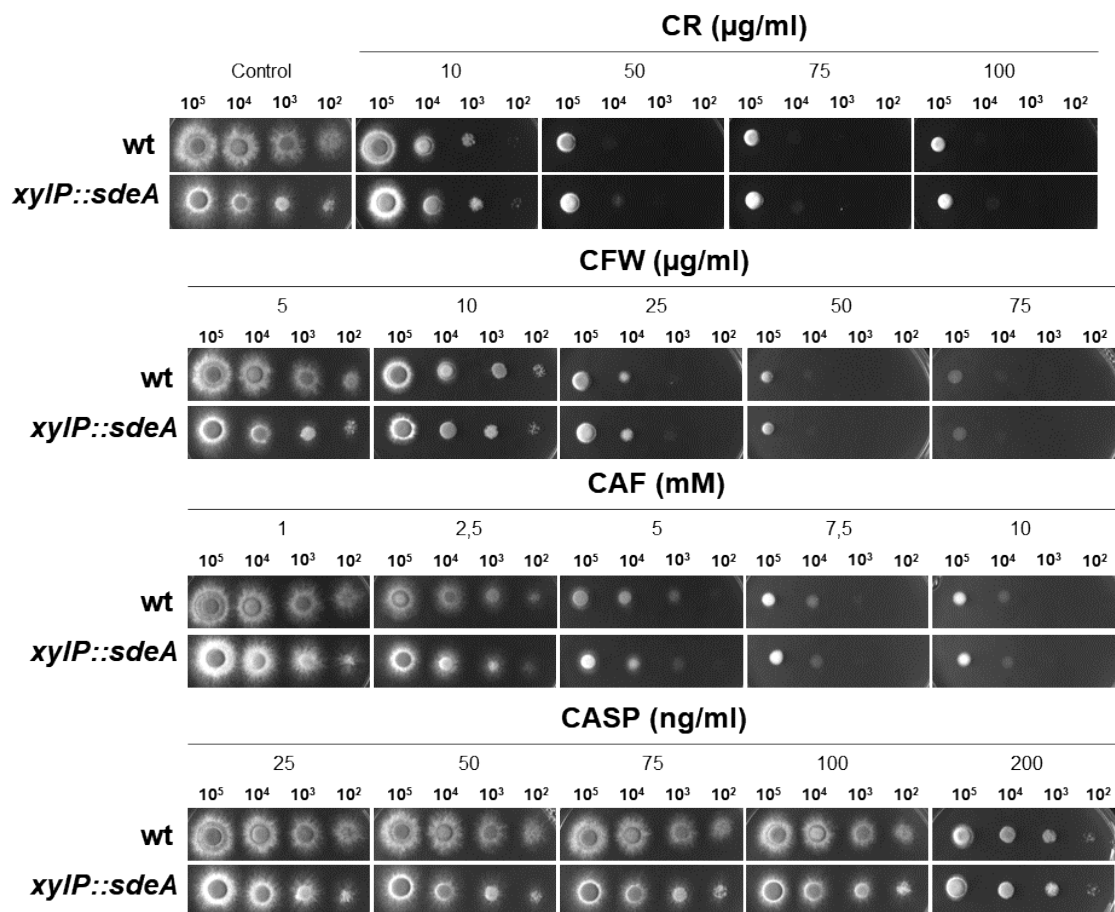


Figura 46. O gene *sdeA* parece não ser importante para a resposta ao estresse de parede celular. A quantidade indicada de conídios de cada linhagem foi inoculada em placas contendo MM suplementado com 2,5% de xilose e as concentrações indicadas de congo red (CR), Calcofluor White (CFW), cafeína (CAF) e caspofungin (CASP). As placas permaneceram a 37°C por 48 horas.

Apesar desse resultado, o biofilme maduro da linhagem *xyIP::sdeA* foi exposto ao CASP, a fim de se investigar a taxa de atividade metabólica do mesmo durante o estresse de parede celular após 4 horas em repressão. Como resultado, foi possível observar que o biofilme do mutante condicional apresentou redução de aproximadamente 60% da atividade metabólica na presença de CASP em todos os tempos testados, enquanto a linhagem selvagem não apresentou redução maior que 20% (Figura 47). Este resultado sugere que a perda de função de *sdeA* torna a célula fúngica bastante suscetível ao estresse de parede celular na forma de biofilme, o que posiciona o gene *sdeA* como um possível sensibilizador da célula frente ao dano da parede celular causado por CASP.

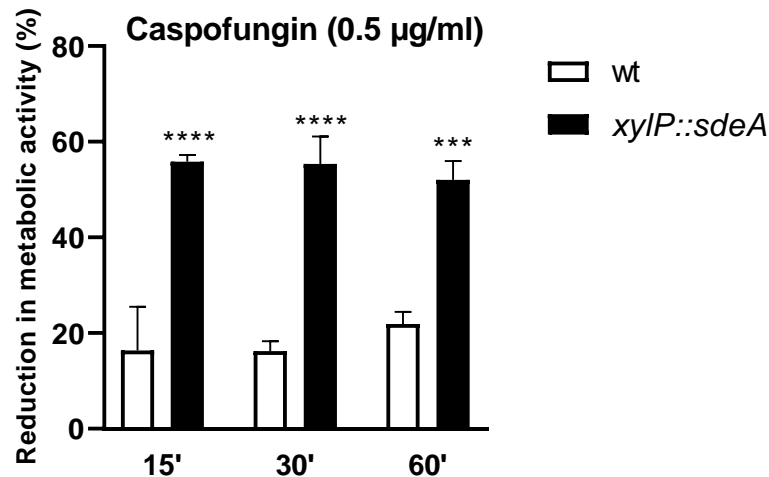


Figura 47. A perda de função de *sdeA* leva à redução de viabilidade do biofilme de *A. fumigatus* na presença de caspofungin. Gráfico da redução da atividade metabólica do biofilme das linhagens selvagem e *xyIP::sdeA* na presença de caspofungin, medida pelo reagente XTT. Os biofilmes foram obtidos crescendo cada linhagem por 18 horas em MM suplementado com xilose a 37°C e reprimidos em MM por 4 horas a 37°C. Posteriormente, as placas foram submetidas ao estresse de parede celular causado por caspofungin pelos tempos indicados (15, 30 e 60 minutos). Os resultados foram expressos como média ± DP, n = 3. *** $p \leq 0,001$ e **** $p \leq 0,0001$ (*two-way ANOVA* e pós-teste de Sidak) em comparação com a linhagem selvagem no mesmo tempo.

Com a intenção de verificar se a proteína SdeA atua em outras funções celulares, a linhagem *xyIP::sdeA* também foi exposta a altas concentrações de sorbitol (condição de estresse osmótico), DTT (causa estresse de retículo), ZnSO₄ (causa estresse por altas concentrações de metais), mas não apresentou alteração de sensibilidade a estas substâncias se comparada à linhagem selvagem (dados não mostrados).

4.2.3.3 O mutante *xyIP::sdeA* apresenta diferenças na sensibilidade ao estresse oxidativo

Testes fenotípicos com a mesma linhagem também foram executados utilizando agentes que provocam estresse oxidativo à célula, como menadiona, paraquat, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e diamida. Como resultado, a linhagem *xyIP::sdeA* não apresentou aumento da sensibilidade ao paraquat, foi um pouco mais sensível ao H₂O₂ e consideravelmente mais sensível à diamida (Figura 48). Surpreendentemente, o mutante condicional foi mais resistente à menadiona (Figura 48A). Curiosamente, esse fenótipo de maior resistência à menadiona já foi observado em uma levedura em que o gene homólogo *OLE1* está superexpresso (Nasution et al. 2017). Tendo em vista esses resultados, *sdeA*

parece exercer função na adaptação ao estresse oxidativo, mas a participação desse gene na resposta ao estresse oxidativo e no balanço redox da célula deverá ser investigada no futuro.

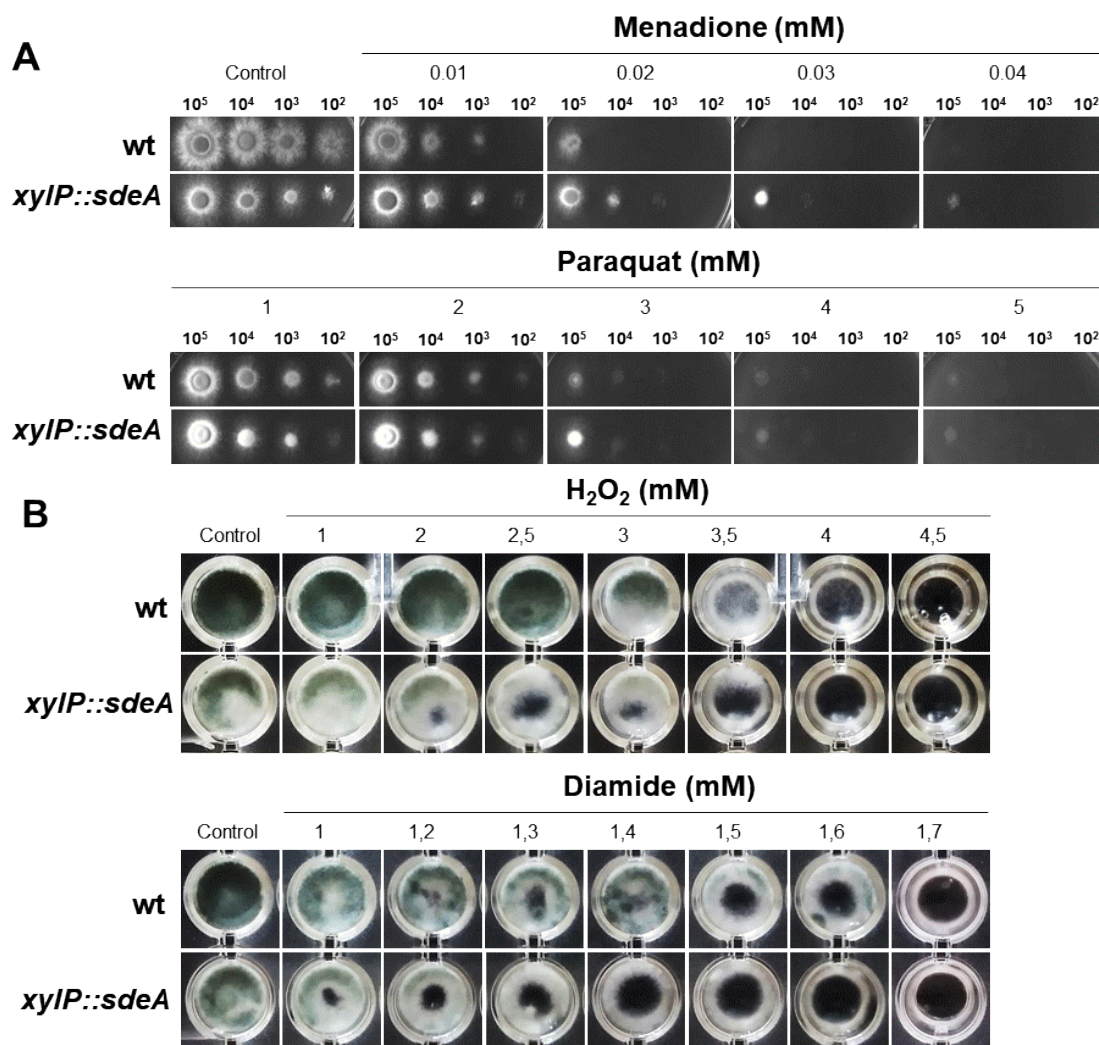


Figura 48. O mutante *xyIP::sdeA* apresenta diferentes níveis de sensibilidade a drogas que provocam estresse oxidativo. (A) 1×10^4 conídios das linhagens selvagem e *xyIP::sdeA* foram inoculados em MM sólido contendo 2,5% de xilose e as concentrações indicadas de menadiona e paraquat. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. (B) 1×10^4 conídios das linhagens selvagem e *xyIP::sdeA* foram inoculados em MM líquido contendo 2,5% de xilose e as concentrações indicadas de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e diamida. As placas foram incubadas a 37°C por 72 horas.

4.2.4 SdeA é necessário para a síntese de ácidos graxos insaturados

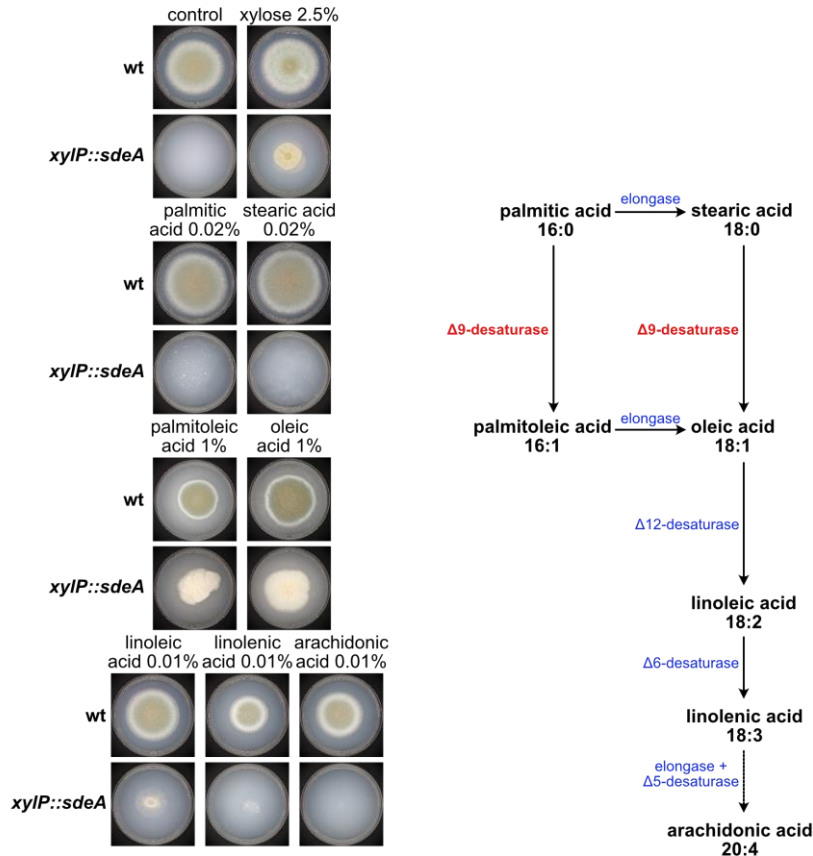
A fim de investigar a função predita de SdeA na síntese de ácidos graxos e na homeostase da membrana plasmática, foi realizado um ensaio fenotípico utilizando diferentes suplementações de ácidos graxos e diferentes drogas estressoras da membrana plasmática. A via de biossíntese de ácidos graxos em fungos é mostrada na Figura 49A, com ênfase na enzima $\Delta 9$ -dessaturase, o suposto homólogo de SdeA. Na mesma figura, pode ser visto que o mutante

xyIP::sdeA não cresceu na ausência de xilose (condição controle, com 1% de glicose), como observado anteriormente (Figura 45), ou na presença de ácidos graxos saturados, como ácido palmítico (16:0) e esteárico (18:0). Porém, o crescimento dessa linhagem foi viável na presença dos ácidos palmitoleico e oleico, que são ácidos graxos monoinsaturados de 16 e 18 carbonos, respectivamente. Em outras palavras, o mutante condicional é auxotrófico para os ácidos palmitoleico e oleico, embora ainda sejam observados problemas de conidiação quando a linhagem é crescida na presença desses ácidos graxos. Já na presença de ácidos graxos com duas ou mais insaturações, o mutante *xyIP::sdeA* cresceu muito mal, sugerindo que os principais produtos da enzima SdeA são, como esperado, os ácidos graxos monoinsaturados e não os polinsaturados. Esses resultados confirmam que SdeA é essencial para a síntese de ácidos graxos insaturados. Vale ressaltar que maiores concentrações de todos os ácidos graxos inibiram o crescimento de ambas as linhagens (dados não mostrados), por possuírem potencial atividade antifúngica [revisado em Qiu et al. (2021)].

A seguir, a sensibilidade do mutante *xyIP::sdeA* frente ao estresse de membrana foi testada na presença de alguns agentes que afetam constituintes específicos da membrana. O SDS é um detergente aniônico que atua solubilizando a membrana plasmática e desnaturando proteínas da membrana e da parede celular (le Maire et al. 2000). Uma vez exposto ao SDS, o mutante *xyIP::sdeA* apresentou uma leve sensibilidade em comparação à linhagem selvagem (Figura 49B). Azóis são compostos que inibem a síntese de ergosterol, um importante componente das membranas plasmáticas (Levi-Strauss et al. 2001). Triazóis como voriconazol e fluconazol são bastante empregados como antifúngicos, inclusive no tratamento da aspergilose. Curiosamente, o mutante *xyIP::sdeA* não apresentou diferenças de sensibilidade a tais drogas em comparação com a linhagem selvagem (dados não mostrados). Além dos azóis, a anfotericina B, que afeta a permeabilidade da membrana plasmática e o gradiente de íons, tem sido por muito tempo uma das primeiras opções de drogas adotadas para tratar infecções fúngicas (Noble et al. 2010). Como pode ser visto na Figura 49B, o mutante condicional apresentou uma sensibilidade consideravelmente maior a este composto do que a linhagem selvagem. Outros componentes imprescindíveis das membranas celulares são os esfingolipídios,

cuja síntese é inibida pela droga miriocina. A síntese de uma classe especial de esfingolípídios, as inositolfosforil ceramidas (IPCs), por sua vez, é inibida pela aureobasidina A. Interessantemente, a linhagem *xyIP::sdeA* foi sensível à miriocina (Figura 49B), mas não à aureobasidina A (dados não mostrados). Finalmente, cerulenina e trans-chalcona são compostos que inibem a síntese de ácidos graxos e afetam também a síntese de esteróis (Omura 1976; Bitencourt et al. 2013). Como esperado, a linhagem *xyIP::sdeA* foi consideravelmente sensível a esses compostos em comparação com a linhagem selvagem (Figura 49B). Em conjunto, estes resultados confirmam a importância de SdeA para a membrana plasmática, não somente no que se refere aos ácidos graxos, mas também a outras classes lipídicas como esfingolípídios, por exemplo.

A



B

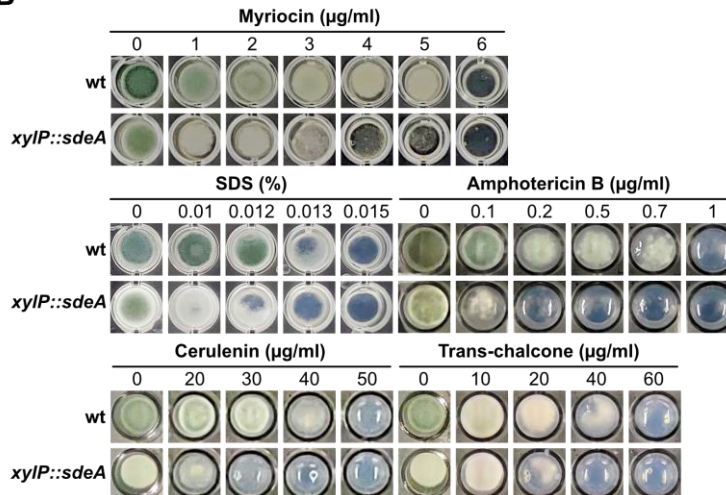


Figura 49. O mutante *xyIP::sdeA* é auxotrófico para ácidos graxos monoinsaturados e sensível ao estresse de membrana plasmática. (A) Crescimento radial das linhagens selvagem e *xyIP::sdeA* na presença de diferentes concentrações de ácidos graxos saturados (ácido palmítico e esteárico), monoinsaturados (ácido palmitoleico e oleico) e poli-insaturados (ácido linoleico, linolênico e araquidônico). 1×10^4 conídios das linhagens selvagem e *xyIP::sdeA* foram inoculados no centro de placas de Petri contendo MM sólido suplementado com as concentrações indicadas de xilose ou ácidos graxos e incubadas a 37°C por 96 horas. À direita, a via biossintética de ácidos graxos em fungos. Em vermelho, o suposto homólogo da enzima SdeA. (B) Teste fenotípico do mutante *xyIP::sdeA* na presença de estresse de membrana plasmática. 1×10^4 conídios das linhagens selvagem e *xyIP::sdeA* foram inoculados em MM sólido contendo 2,5% de xilose e as concentrações indicadas das drogas miriocina, SDS, anfotericina B, cerulenina e trans-chalcona. As placas foram incubadas a 37°C por 72 horas.

4.2.5 A perda de função de *sdeA* compromete o *pool* de fosfolipídios de *A. fumigatus*

Como mencionado acima, SdeA é o homólogo putativo de Ole1 de *S. cerevisiae*, uma Δ^9 -ácido graxo dessaturase que catalisa a formação de insaturações em cadeias de ácidos graxos saturados (Stukey et al. 1990). Com a intenção de verificar mais profundamente o que ocorre com a constituição da membrana plasmática de *A. fumigatus* durante o choque térmico e a perda de função de *sdeA*, as linhagens selvagem e *xyIP::sdeA* foram submetidas ao choque de temperatura e a uma análise lipidômica. Por meio de espectrometria de massas e do uso de diferentes padrões internos, foi possível discernir e quantificar diferentes espécies lipídicas celulares.

Primeiramente, três classes de fosfolipídios foram quantificadas: fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilserina (PS), que são três dos quatro fosfolipídios mais abundantes em espécies fúngicas (a outra classe é a do fosfatidilinositol) (Gealt et al. 1989; Ejsing et al. 2009). Enquanto PC é encontrado principalmente no folheto exoplasmático ou externo da membrana celular, PE e PS são encontrados no folheto interno (citoplasmático) da bicamada lipídica (Yang et al. 2018). A razão PC/PE é importante para a integridade da membrana, porque enquanto PC tem propriedades estabilizadoras, PE forma fases hexagonais diferentes das bicamadas (Gryz et al. 2019). PS, por outro lado, fornece uma carga superficial negativa às membranas devido à natureza ácida de seu grupo principal (Yang et al. 2018). O APÊNDICE C (Figura C1-A) mostra a proporção das três classes de fosfolipídios tanto na linhagem selvagem como no mutante *xyIP::sdeA* na condição basal (30°C, sob repressão por glicose). Semelhantemente a outras espécies de fungos (Gealt et al. 1989), PC é a classe fosfolipídica mais abundante em *A. fumigatus*. Pode-se observar que apesar da perda de função de *sdeA* ter levado a uma redução significativa na quantidade de fosfolipídios, o mutante possui a mesma proporção de PC, PE e PS que a linhagem selvagem.

Durante o choque térmico, no entanto, as linhagens apresentaram perfis lipídicos contrastantes (APÊNDICE C, Figura C1-A). Na linhagem selvagem, a quantidade total dos três tipos de fosfolipídios diminuiu durante o choque térmico, apresentando uma pequena recuperação após 60 minutos do início do choque de temperatura. Esse comportamento é esperado, uma vez que se sabe que o

choque térmico diminui a quantidade de fosfolipídios em diferentes espécies de fungos (Tereshina et al. 2013; Ianutsevich et al. 2016; Peter et al. 2017; Ianutsevich and Tereshina 2019). Além disso, quanto maior a temperatura de cultivo, menor a proporção de fosfolipídios em levedura (Klose et al. 2012). Esse resultado também está de acordo com a análise de RNA-Seq feita anteriormente, na qual foi observada uma repressão na expressão de genes envolvidos na biossíntese de lipídios na linhagem selvagem durante o choque térmico (Figura 30). Curiosamente, PE foi a classe de fosfolipídios que mais reduziu durante o choque térmico. Já foi levantada a hipótese de que essa diminuição no conteúdo de PE em temperaturas mais elevadas provavelmente equilibra a curvatura intrínseca da membrana (Renne and de Kroon 2018). O mutante *xyIP::sdeA*, por outro lado, naturalmente possui menos fosfolipídios do que a linhagem selvagem a 30°C e, durante o choque térmico, o mutante condicional acumulou mais fosfolipídios, principalmente PC, um comportamento oposto ao da linhagem selvagem (APÊNDICE C, Figura C1-A). Este resultado mostra que a repressão de *sdeA* afeta consideravelmente a síntese de fosfolipídios durante o choque térmico.

As Figuras C1-B-D do APÊNDICE C mostram os *heat maps* de quantificação individual para cada espécie de PC, PE e PS, respectivamente, nas linhagens selvagem e *xyIP::sdeA* durante o choque térmico. Pode-se notar muitas diferenças entre as linhagens, principalmente nas espécies mais abundantes. Quando a temperatura aumenta, uma das primeiras reações celulares esperadas é a diminuição da síntese de ácidos graxos insaturados para manter as propriedades da membrana plasmática. Como em *A. fumigatus* *sdeA* é um dos supostos homólogos de *OLE1*, o gene que codifica uma esteroil-CoA dessaturase, os fosfolipídios foram agrupados de acordo com o grau de saturação das cadeias de ácidos graxos em três categorias: lipídios saturados, lipídios com uma ou duas insaturações (em cadeias diferentes, neste último caso) e lipídios com três ou mais insaturações (Figura 50). Isso foi feito para facilitar a análise do efeito da repressão de *sdeA* sobre esses fosfolipídios específicos. Em primeiro lugar, é interessante notar que a maioria dos fosfolipídios de *A. fumigatus* possui cadeias de ácidos graxos insaturados, especialmente com três ou mais insaturações, como pode ser visto nos valores do eixo Y nos gráficos da Figura 50. Com exceção de PE, a abundância de

fosfolipídios saturados aumentou durante o choque térmico na linhagem selvagem (Figura 50), embora a concentração total de fosfolipídios tenha diminuído durante o choque térmico (APÊNDICE C, Figura C1-A). Esse aumento na proporção de lipídios saturados era esperado e já foi observado em outras espécies de fungos (Peter et al. 2017). Contrariamente, a concentração de fosfolipídios insaturados diminuiu na linhagem selvagem durante o choque térmico, independentemente do grau de insaturação e da classe de fosfolipídios. O aumento seguinte da concentração dessas espécies no tempo de 60 minutos sugere que, após algum tempo, o metabolismo dos fosfolipídios tende a retornar à condição basal após a adaptação ao choque térmico. Este resultado está de acordo com a análise de RNA-Seq, na qual observou-se uma repressão de genes envolvidos na biossíntese de ácidos graxos insaturados durante o choque térmico (Figura 30). Esses resultados também estão de acordo com estudos anteriores em leveduras que mostraram que a proporção de ácidos graxos insaturados diminuiu com o aumento da temperatura (Okuyama et al. 1979; Martin et al. 2007). Tais alterações podem ocorrer para ajustar a fluidez da membrana plasmática durante o choque térmico, garantindo a sobrevivência e o funcionamento da célula.

Já no mutante *xyIP::sdeA*, o acúmulo de PC e PS saturados foi muito maior do que na linhagem selvagem durante a condição basal, 30°C (Figura 50). Esse resultado era esperado, pois, com a repressão de *sdeA*, o qual codifica uma dessaturase de ácidos graxos, menos ácidos graxos insaturados devem ser sintetizados, o que levaria ao acúmulo de ácidos graxos saturados e, conseqüentemente, fosfolipídios com cadeias saturadas. Curiosamente, durante o choque térmico, os fosfolipídios saturados se comportaram de forma diferente aos da linhagem selvagem: enquanto PC e PS diminuíram, PE aumentou. Conseqüentemente, o mutante *xyIP::sdeA* acumulou proporcionalmente menos fosfolipídios insaturados do que a linhagem selvagem na condição controle (30°C), reforçando o papel da SdeA como uma dessaturase de ácido graxo. Estes resultados se assemelham aos obtidos em outras espécies de fungos. Em *A. nidulans*, por exemplo, a deleção do homólogo *sdeA* induziu o acúmulo de ácidos graxos saturados e também uma diminuição na quantidade de ácidos graxos insaturados (Wilson et al. 2004). A deleção do homólogo *sdeB*^{OLE1} também levou a uma redução na produção de ácidos graxos insaturados (Wilson

et al. 2004). Em *C. albicans*, a repressão do homólogo *OLE1*^{OLE1} diminuiu a porcentagem de ácidos graxos com uma insaturação e também diminuiu a fluidez da membrana plasmática (Krishnamurthy et al. 2004). Surpreendentemente, a superexpressão de *OLE1* também diminuiu a fluidez (Krishnamurthy et al. 2004). Além disso, a deleção do homólogo *OLE2*^{OLE1} também diminuiu a fluidez, mas não alterou a abundância de ácidos graxos insaturados (Krishnamurthy et al. 2004).

Surpreendentemente, a concentração de todas as classes de fosfolipídios insaturados aumentou no mutante condicional *xyIP::sdeA* durante o choque térmico, diferentemente da linhagem selvagem (Figura 50). Considerando que a análise prévia de RNA-Seq mostrou que ocorre uma repressão genética de *sdeA* na linhagem selvagem durante o choque de temperatura [Material Suplementar do artigo de Fabri et al. (2021)], esses resultados sugerem que há outra dessaturase responsável por essas insaturações em *A. fumigatus*. E, de fato, existe um suposto ortólogo de *sdeA*, o gene *Afu7g05350*, ainda não caracterizado nesse fungo. É importante mencionar que outras espécies, como *A. nidulans*, também possuem duas $\Delta 9$ -ácido graxo dessaturases (as chamadas SdeA e SdeB) (Wilson et al. 2004). No entanto, por que a síntese de fosfolipídios insaturados aumentou na linhagem *xyIP::sdeA* durante o choque térmico ainda é uma questão em aberto. Isso pode ter sido necessário para corrigir o equilíbrio entre os lipídios saturados e insaturados desse mutante, embora essa resposta não explique o motivo dessa linhagem ter se comportado de maneira oposta à linhagem selvagem no que se refere à síntese dessas moléculas.

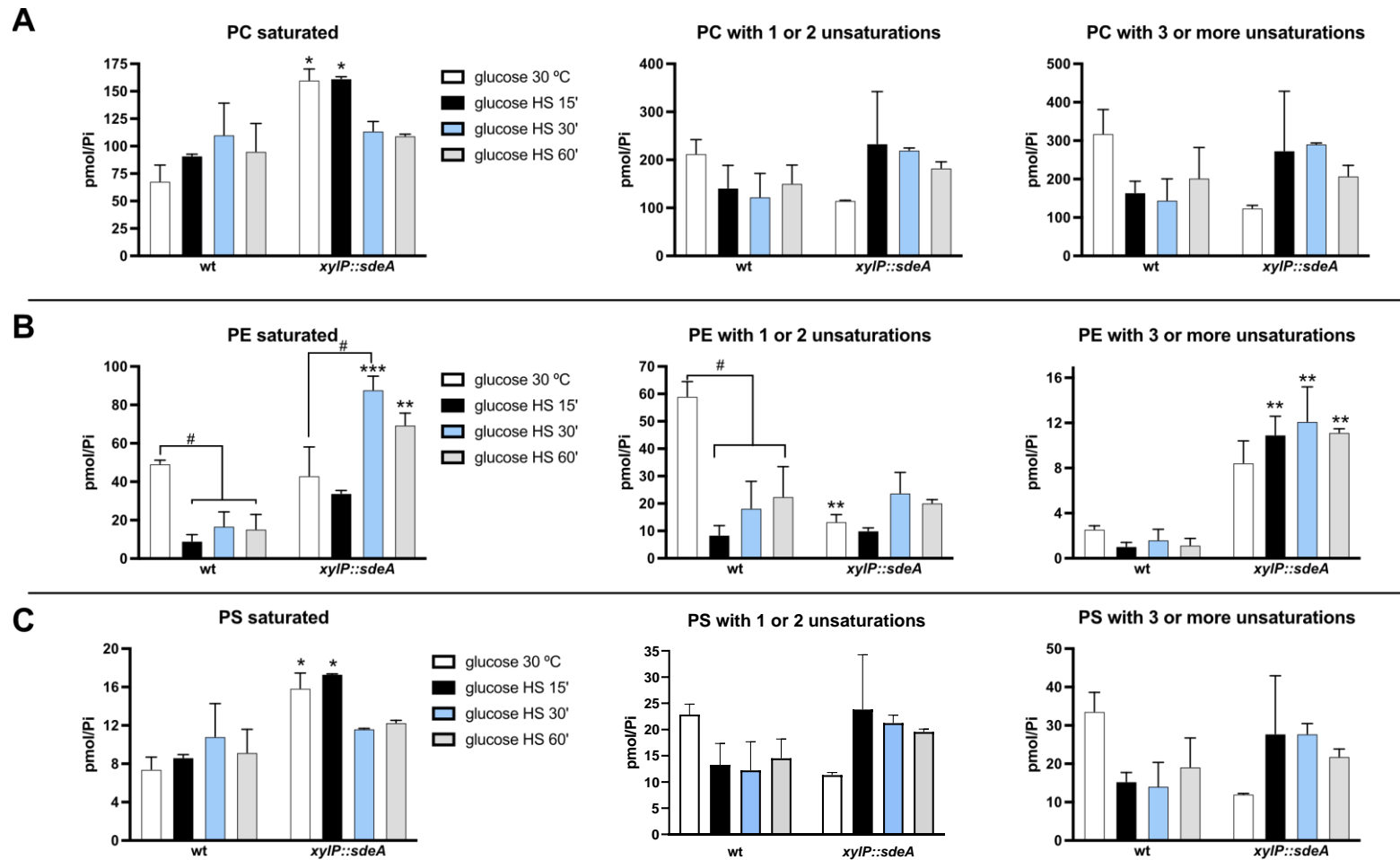


Figura 50. A perda de função de *sdeA* altera a proporção de fosfolípidios saturados e insaturados. Gráficos das concentrações de fosfolípidios fosfatidilcolina (PC) (A), fosfatidiletanolamina (PE) (B) e fosfatidilserina (PS) (C) das linhagens selvagem e *xyIP::sdeA*, durante o choque térmico. As espécies lipídicas foram agrupadas de acordo com o grau de saturação das cadeias de ácidos graxos: lípidios saturados, lípidios com uma ou duas insaturações ou lípidios com três ou mais insaturações. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$ (*Two-way ANOVA* com teste de Sidak em relação à linhagem selvagem na mesma condição). As barras sobrescritas com # indicam comparações significativas dentro da mesma linhagem.

Embora seja conhecido que o tamanho das cadeias de ácidos graxos de fosfolípidios aumenta com o aumento da temperatura, aqui nenhuma mudança evidente foi encontrada na proporção de fosfolípidios em relação ao tamanho das cadeias de ácidos graxos durante o choque térmico (dados não mostrados), provavelmente porque as mudanças quanto ao nível de saturação foram favorecidas.

4.2.6 Identificação do pseudogene *sdeB* e construção dos mutantes $\Delta sdeB$, *xyIP::sdeA* $\Delta sdeB$ e *sdeA::GFP* $\Delta sdeB$

Dada a existência de dois genes codificadores de dessaturases do tipo $\Delta 9$ putativos em *A. fumigatus*, os genes Afu7g05920 (*sdeA*) e Afu7g05350, e o fato de que, como observado anteriormente (Figura 50), uma outra $\Delta 9$ -dessaturase pode ser necessária para a síntese de ácidos graxos insaturados, principalmente durante o choque de temperatura, decidiu-se investigar funcionalmente o gene Afu7g05350, aqui chamado *sdeB*. A sequência proteica do produto codificado por este gene compartilha significativa homologia com a proteína SdeA (54% de identidade e 71% de similaridade, e-value de 1e-120), sendo a proteína mais semelhante a SdeA em *A. fumigatus* e, portanto, seu putativo ortólogo. Estas informações, no entanto, são válidas apenas para o genoma da linhagem Af293. Quando se trata da linhagem A1163, da qual foi derivada a linhagem *akuB*^{Ku80} utilizada neste trabalho para a construção de todos os mutantes, tal gene (chamado nesta linhagem de AFUB_090930) é considerado um pseudogene, sem sequência proteica definida (<https://fungidb.org/fungidb/app/record/gene/AFUB_090930>). Por conseguinte, SdeB não pode ser a princípio considerada uma $\Delta 9$ -dessaturase, já que não temos elementos experimentais neste trabalho ou na literatura indicando que este pseudogene pode ser traduzido.

Apesar dessa variação genética entre as principais linhagens modelo para o estudo de *A. fumigatus*, seguiu-se com o estudo da função de *sdeB* como uma primeira abordagem para entender se há redundância no processo de inserção de insaturações em ácidos graxos neste fungo. Para tanto, a sequência gênica de 1116 pb referente ao gene *sdeB* da linhagem Af293 foi totalmente deletada do genoma da linhagem A1163 de *A. fumigatus*, tanto na linhagem selvagem como também nas linhagens mutantes *xyIP::sdeA* e *sdeA::GFP*, como mostrado

na Figura 51. Dessa forma, os duplo mutantes *xyIP::sdeA ΔsdeB* e *sdeA::GFP ΔsdeB* puderam ser obtidos.

A seguir, para confirmar que os fenótipos da linhagem $\Delta sdeB$ foram causados pela perda de *sdeB*, também foi gerada uma linhagem complementante por meio da reintrodução ectópica do pseudogene *sdeB* no mutante $\Delta sdeB$, o que foi confirmado por PCR (Figura 51D).

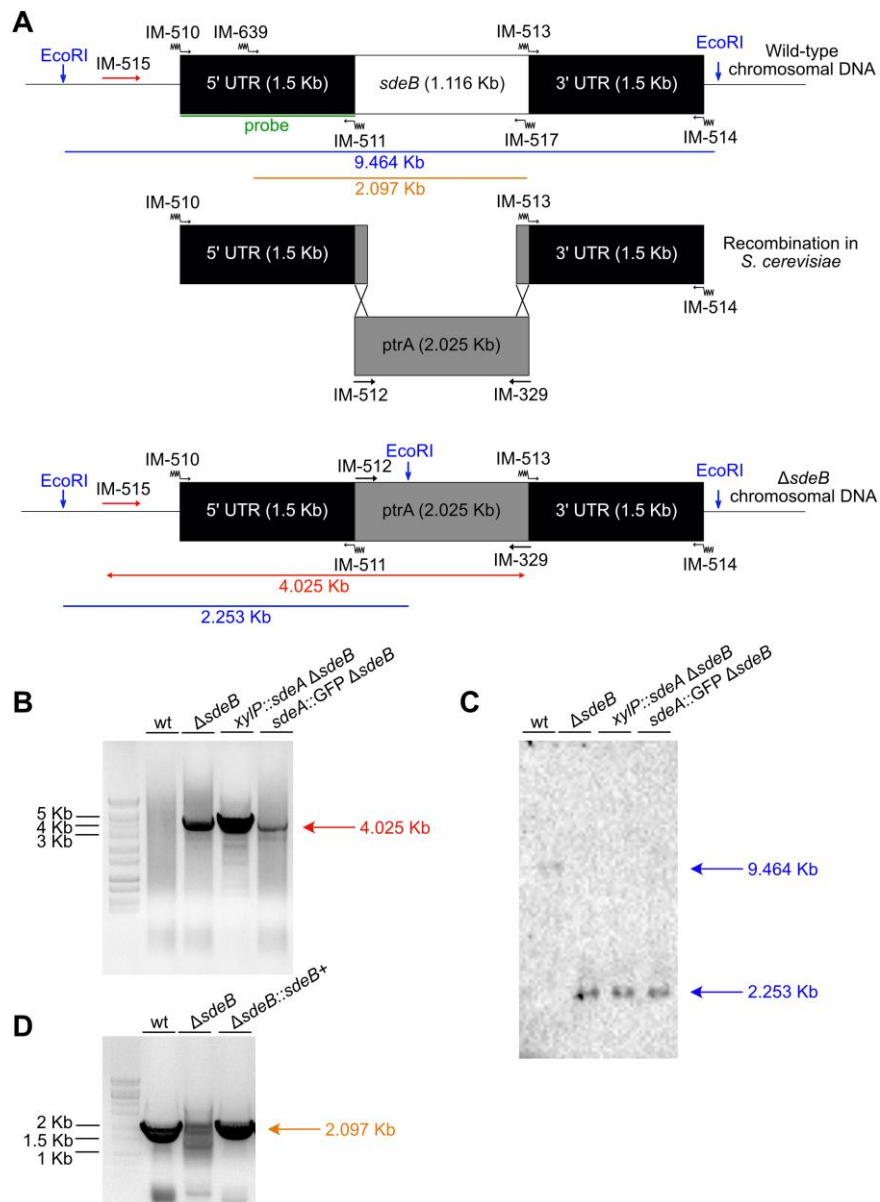


Figura 51. Construção e validação do mutante $\Delta sdeB$ e dos duplo mutantes *xyIP::sdeA ΔsdeB* e *sdeA::GFP ΔsdeB*. (A) Os fragmentos independentes usados na obtenção do cassete foram adquiridos por PCR utilizando os *primers* indicados na figura, e recombinados em *S. cerevisiae*. (B) PCR de validação dos candidatos a $\Delta sdeB$, *xyIP::sdeA ΔsdeB* e *sdeA::GFP ΔsdeB* após transformação em *A. fumigatus*. Utilizaram-se os *primers* IM-515 e IM-329, que amplificam o fragmento indicado em vermelho, confirmando a obtenção dos mutantes. (C) Análise de *Southern blot* dos candidatos a $\Delta sdeB$, *xyIP::sdeA ΔsdeB* e *sdeA::GFP ΔsdeB* utilizando a região 5'UTR como sonda e a enzima de restrição *EcoRI* para a obtenção dos fragmentos mostrados em azul. (D) PCR de validação do complementante $\Delta sdeB::sdeB^+$, após transformação no mutante $\Delta sdeB$. Utilizaram-se os *primers* IM-639 e IM-517, que amplificam o fragmento indicado em laranja, confirmando a obtenção do complementante.

4.2.7 O mutante $\Delta sdeB$ não é suscetível aos estresses térmico, de parede celular, de membrana plasmática e oxidativo

Como primeiro passo no processo de caracterização do mutante $\Delta sdeB$, um teste fenotípico do tipo radial foi conduzido em diferentes temperaturas. Como mostrado na Figura 52, o mutante nulo $\Delta sdeB$ se comportou da mesma forma que a linhagem selvagem nas três temperaturas testadas, sugerindo que o pseudogene *sdeB* não exerce papel na resposta termotolerante de *A. fumigatus*.

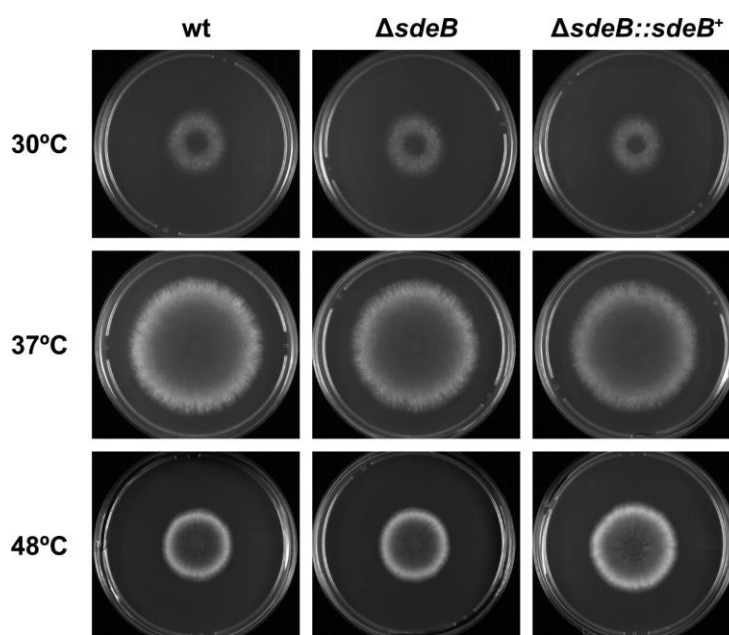


Figura 52. *sdeB* não é importante para a tolerância ao estresse térmico em *A. fumigatus*. 1×10^4 conídios das linhagens selvagem, $\Delta sdeB$ e $\Delta sdeB::sdeB^+$ foram inoculados em placas de Petri contendo 20 ml de MM sólido e incubados a 30, 37 ou 48°C por 96 horas.

Para verificar se a perda de função de *sdeB* causaria alteração no crescimento polarizado de *A. fumigatus*, as linhagens selvagem, $\Delta sdeB$ e $\Delta sdeB::sdeB^+$ foram incubadas a 37°C por 4, 6, 8 ou 10 horas e a taxa de germinação foi investigada por microscopia óptica de campo claro. Foram considerados conídios com crescimento polarizado aqueles que mostravam protuberância (tubo germinativo) em sua superfície. Como resultado, esse experimento mostrou que a taxa de germinação do mutante $\Delta sdeB$ é bem semelhante à da linhagem selvagem, sendo apenas um pouco maior no tempo de 8 horas (Figura 53A).

A seguir, a capacidade de formação de biofilme das mesmas linhagens foi avaliada por meio da utilização de cristal violeta. Biofilmes são comunidades complexas de microrganismos associados e firmemente aderidos a uma

superfície ou substrato por meio de uma matriz extracelular polimérica, e sua formação é um pré-requisito para o desenvolvimento de doenças invasivas [revisado em Morelli et al. (2021)]. Microrganismos infecciosos organizados na forma de biofilme tendem a ser mais resistentes ao sistema imune do hospedeiro e ao uso de antimicrobianos. Hoje, é amplamente aceito que o micélio fúngico, em algumas condições, tem características semelhantes aos biofilmes bacterianos, pois o micélio fúngico que cresce aderido a uma superfície é uma rede multicelular complexa, densa e revestida por uma matriz extracelular, a qual, em *A. fumigatus* é composta por galactomanana, α -1,3-glucanas, galactosaminogalactana, monossacarídeos, polióis e proteínas (Beauvais et al. 2007). Esses biofilmes são de particular importância clínica, uma vez que exibem recalcitrância a tratamentos com drogas antifúngicas (Seidler et al. 2008; Kowalski et al. 2020). Assim, foi investigado aqui se a deleção do pseudogene *sdeB* poderia causar alguma alteração na adesão de *A. fumigatus*. Para isso, a capacidade de formação inicial do biofilme foi quantificada pelo ensaio de adesão em placas de poliestireno. Contudo, não foi observada nenhuma diferença na capacidade de adesão da linhagem $\Delta sdeB$, como mostrado na Figura 53B.

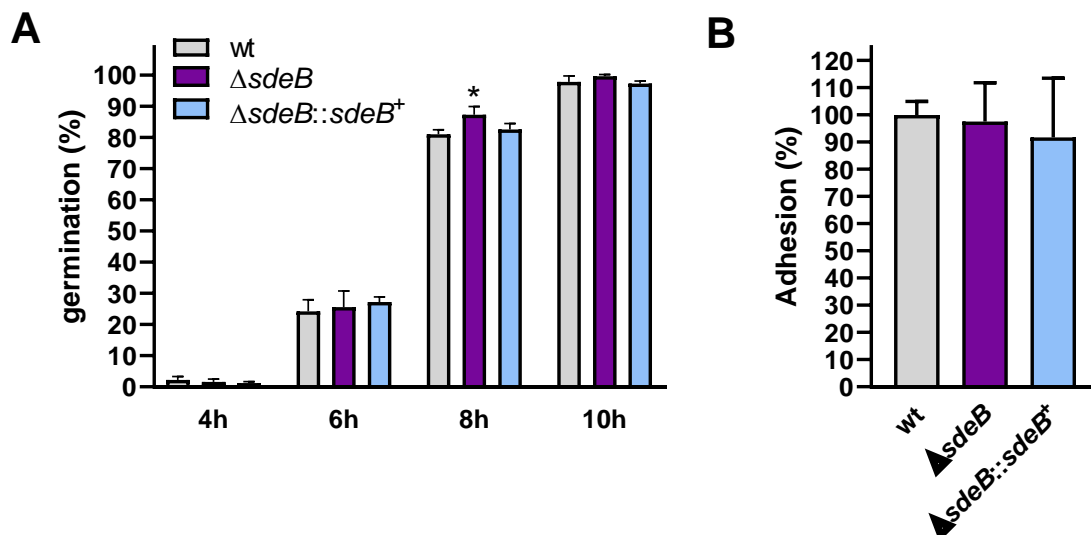


Figura 53. O mutante $\Delta sdeB$ possui capacidade de germinação e adesão similares à linhagem selvagem. (A) Para a determinação do crescimento polarizado, 1×10^5 conídios de cada linhagem foram inoculados em 2 ml de MM a 37 °C por 4, 6, 8 ou 10 horas, e por meio de microscopia óptica foi determinada a porcentagem de conídios germinados em cada condição. Os resultados indicam a média \pm desvio padrão de cinco repetições. * $p \leq 0,05$ (Two-way ANOVA com teste de Sidak em relação à linhagem selvagem na mesma condição). (B) 1×10^5 conídios de cada linhagem foram inoculados em placas de 96 poços pretas por 24 horas a 37°C. A formação do biofilme foi avaliada pela absorbância do cristal violeta (DO_{570nm}) e normalizada pela taxa de crescimento de cada linhagem detectada por *Alamar blue*TM, sendo os valores expressos como porcentagem de adesão considerando 100% para a linhagem selvagem. Os experimentos foram realizados em doze repetições e os resultados são expressos como média \pm desvio padrão.

Para averiguar a importância de *sdeB* para a manutenção da viabilidade da parede celular de *A. fumigatus*, as linhagens selvagem, $\Delta sdeB$ e $\Delta sdeB::sdeB^+$ foram expostas a diferentes drogas que perturbam a parede celular (CR, CFW, CAF e CASP), e os seus crescimentos foram analisados pelo teste fenotípico do tipo *drop test*. Semelhantemente ao mutante *xyIP::sdeA*, o mutante $\Delta sdeB$ não apresentou diferença de sensibilidade para nenhuma das drogas estressoras de parede celular testadas em comparação com as linhagens selvagem e complementante (dados não mostrados). A linhagem $\Delta sdeB$ também não apresentou sensibilidade ao estresse osmótico provocado por altas concentrações de Sorbitol (dados não mostrados). Estes resultados sugerem que *sdeB* não é necessário para a resposta aos estresses de parede celular e osmótico.

Testes fenotípicos com as mesmas linhagens foram conduzidos utilizando agentes que provocam estresse oxidativo, como menadiona, paraquat, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e diamida. Mais uma vez, a linhagem $\Delta sdeB$ não apresentou sensibilidade ou resistência a nenhum desses compostos (dados não mostrados), sugerindo que *sdeB* também não é importante para a resposta ao estresse oxidativo.

Finalmente, investigou-se o papel de *sdeB* na homeostase da membrana plasmática. As linhagens selvagem, $\Delta sdeB$ e $\Delta sdeB::sdeB^+$ foram expostas ao estresse de membrana plasmática provocado por diferentes drogas: o detergente SDS, oazol fluconazol, o inibidor da síntese de ergosterol lovastatina, o polieno anfotericina B, o inibidor da síntese de esfingolipídios miriocina, o inibidor da síntese de esfingolipídios complexos aureobasidina A e os inibidores da síntese de ácidos graxos cerulenina e trans-chalcona. Surpreendentemente, o mutante nulo $\Delta sdeB$ não foi suscetível a nenhum desses agentes (Figura 54). Em conjunto, estes resultados sugerem que *sdeB* não é importante para a resposta ao estresse de membrana plasmática, função esta que deve ser mais desempenhada por SdeA. Esses resultados ainda vão de encontro com a classificação de *sdeB* como um pseudogene.

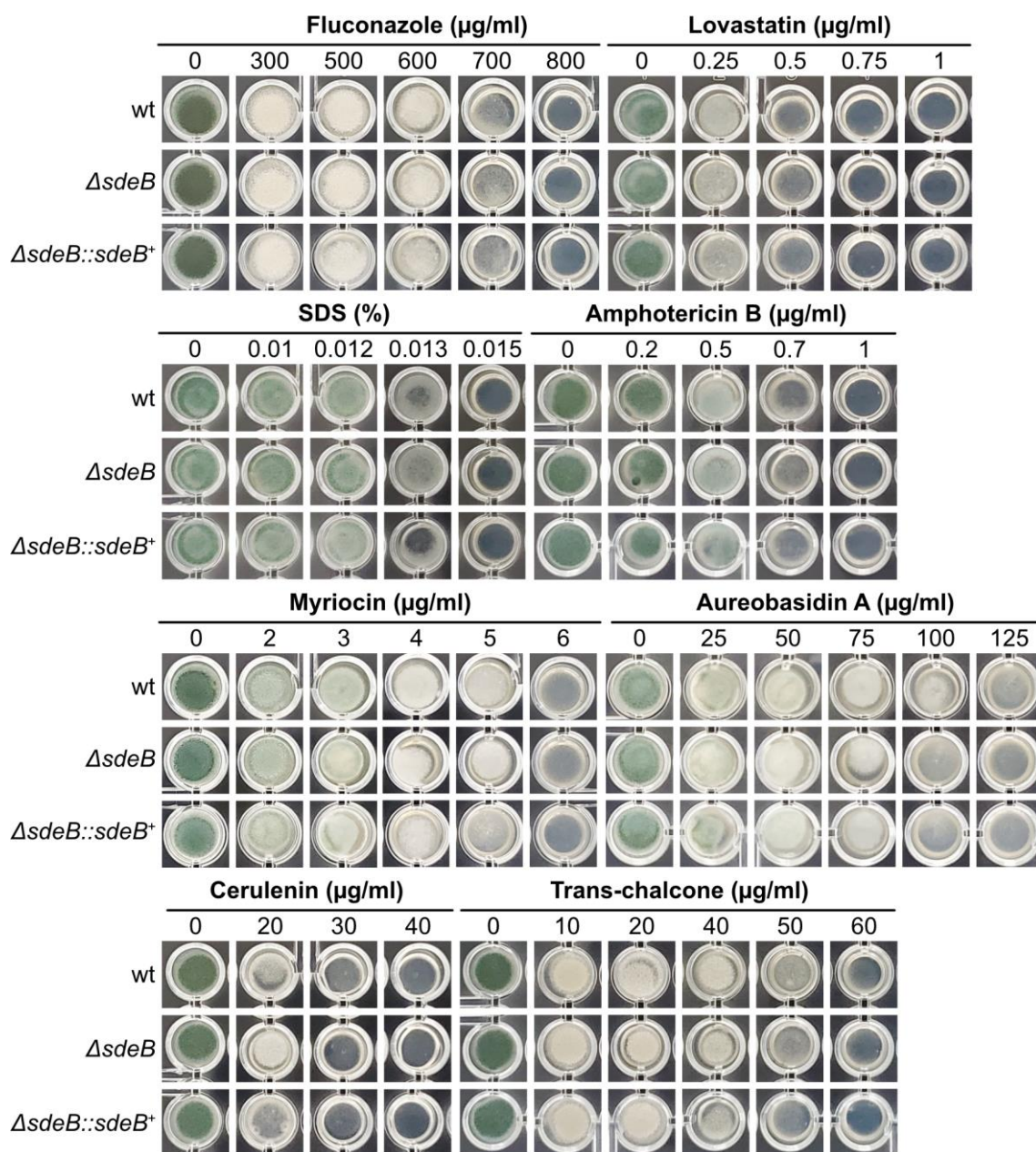


Figura 54. O mutante $\Delta sdeB$ não é sensível ao estresse de membrana plasmática. Teste fenotípico do mutante $\Delta sdeB$ na presença de estresse de membrana plasmática. 1×10^4 conídios das linhagens selvagem, $\Delta sdeB$ e $\Delta sdeB::sdeB^+$ foram inoculados em MM sólido contendo as concentrações indicadas das drogas fluconazol, lovastatina, SDS, anfotericina B, miriocina, aureobasidina A, cerulenina e trans-chalcona. As placas foram incubadas a 37°C por 72 horas.

4.2.8 O mutante $\Delta sdeB$ é hipervirulento em *G. mellonella*

Apesar da não identificação de um fenótipo diferencial claro da linhagem $\Delta sdeB$, a potencial influência de *sdeB* sobre a patogenicidade de *A. fumigatus* foi investigada no modelo invertebrado *G. mellonella*. Pode-se observar que a infecção com as linhagens selvagem e $\Delta sdeB::sdeB^+$ resultou em 100% de mortalidade das larvas após oito dias do início da infecção (Figura 55). Já a infecção com o mutante $\Delta sdeB$ levou todas as larvas à morte muito mais cedo,

no quarto dia de experimento. Esse experimento foi repetido mais uma vez e os mesmos resultados foram obtidos (dados não mostrados). Esses dados sugerem que o pseudogene *sdeB* regula negativamente a patogenicidade de *A. fumigatus*, uma vez que sua deleção agiliza o processo de infecção e morte do hospedeiro.

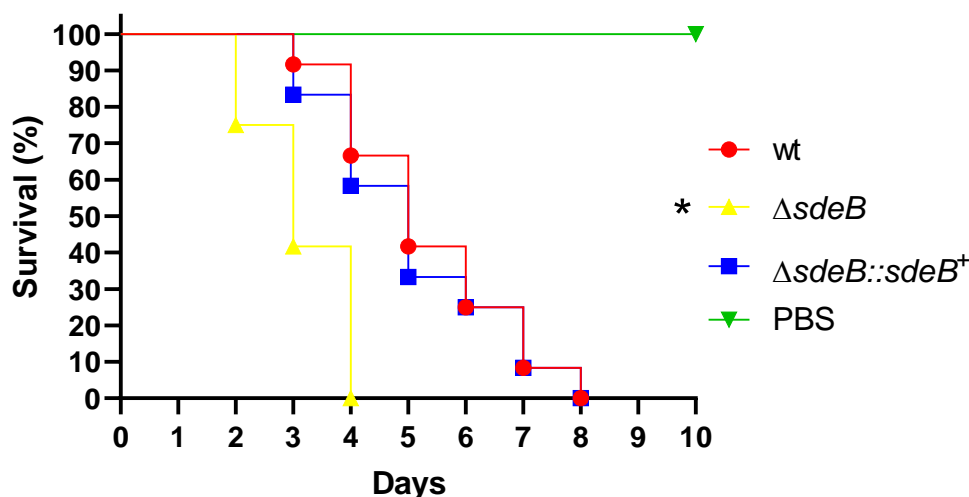


Figura 55. *sdeB* regula negativamente a virulência de *A. fumigatus* em larvas de *G. mellonella*. Curva de sobrevivência cumulativa das linhagens selvagem (wt), $\Delta sdeB$ e $\Delta sdeB::sdeB^+$ em larvas da mariposa modelo *Galleria mellonella*. Para a infecção das larvas, 10^6 conídios foram inoculados em 12 larvas para cada condição testada. A solução de PBS foi usada como controle negativo. * $p \leq 0,01$ da diferença da comparação entre $\Delta sdeB$ e todas as outras condições (testes Log-rank Mantel-Cox e Gehan-Breslow-Wilcoxon).

4.2.9 *sdeA* e *sdeB* interagem geneticamente e suas expressões são interdependentes

A seguir, com o objetivo de descobrir possíveis interações genéticas entre *sdeA* e *sdeB*, foram realizados testes fenotípicos com as linhagens selvagem, *xyIP::sdeA*, $\Delta sdeB$ e *xyIP::sdeA* $\Delta sdeB$ na presença de diferentes temperaturas de crescimento (Figura 56). Vale ressaltar que mesmo que *sdeB* seja um pseudogene não traduzido no genoma da linhagem A1163, este experimento poderia revelar alguma relevância dessa sequência no genoma, pois a porção 5'UTR do pseudogene guarda similaridade com o domínio de ligação do tipo citocromo b5 (grupo heme) da proteína SdeA, necessário para a atividade da dessaturase. Os resultados mostraram que o duplo mutante *xyIP::sdeA* $\Delta sdeB$ se comportou de maneira bastante semelhante ao parental *xyIP::sdeA* nas temperaturas testadas, com exceção da temperatura de 30°C, na qual o duplo mutante foi mais sensível, tendo em vista a sua maior sensibilidade em concentrações menores de xilose (0,15, 0,25 e 0,35%), em comparação com as

linhagens parentais (Figura 56B). Esses resultados sugerem que *sdeA* e *sdeB* interagem geneticamente em *A. fumigatus*, suportando as evidências genéticas de que se tratam de gene e pseudogene, respectivamente, envolvidos no mesmo processo bioquímico. A ausência de sensibilidade do duplo mutante em temperaturas elevadas faz sentido, pois, como já mencionado, a síntese de insaturações em ácidos graxos é um processo reprimido em temperaturas elevadas, sendo mais importante em temperaturas mais baixas. Dessa forma, a função de *sdeA* e *sdeB* é mais importante em temperaturas amenas e não nas mais altas, o que explica o fenótipo da linhagem *xyIP::sdeA ΔsdeB* a 30°C. O duplo mutante *xyIP::sdeA ΔsdeB* também foi ligeiramente mais sensível ao inibidor da síntese de ácidos graxos trans-chalcona (dados não mostrados) do que as linhagens parentais, havendo, portanto, interação genética entre *sdeA* e *sdeB* também nessa condição.

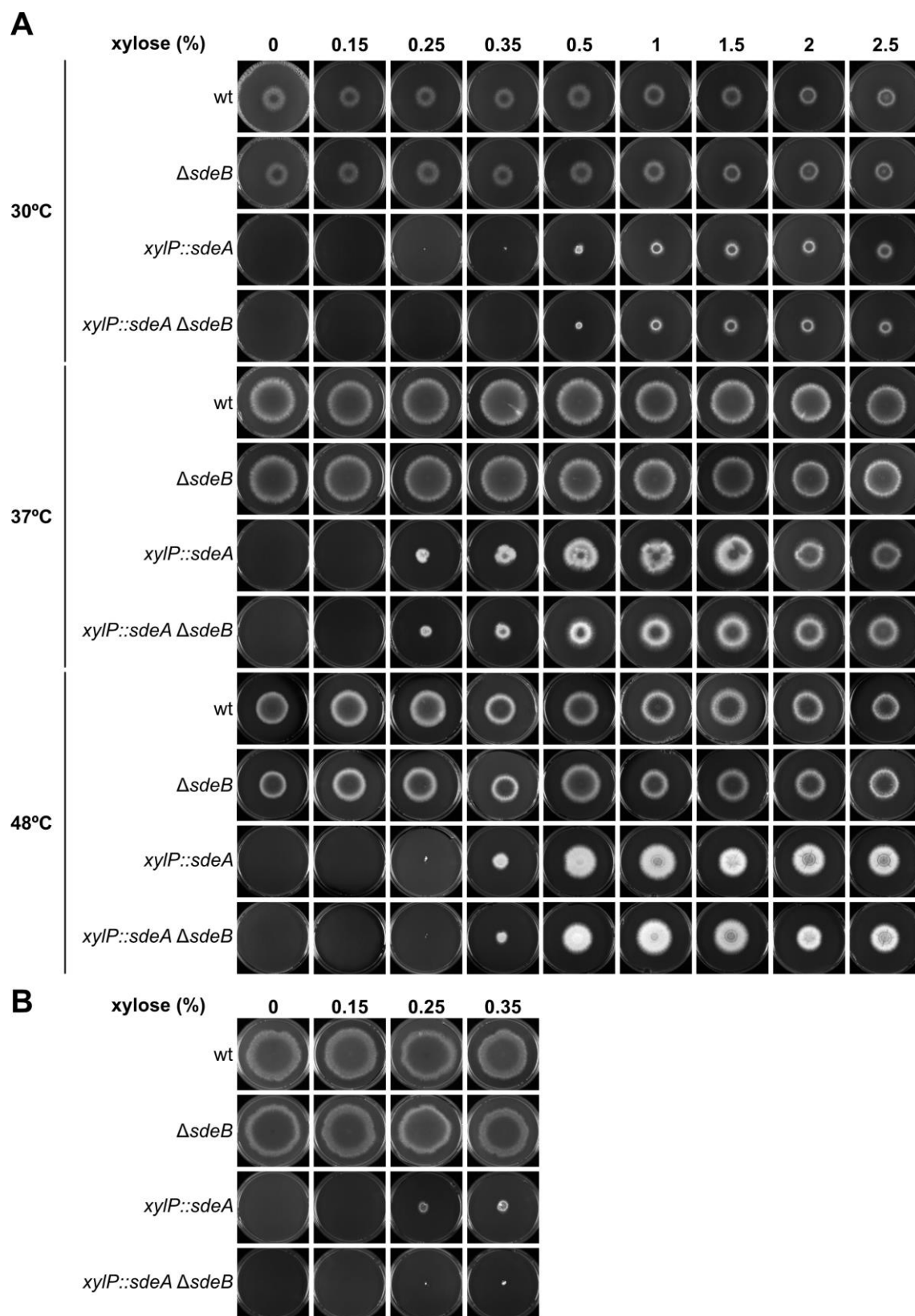


Figura 56. *sdeA* interage geneticamente com *sdeB* a 30°C. 1×10^4 conídios das linhagens selvagem, *xyIP::sdeA*, $\Delta sdeB$ e *xyIP::sdeA ΔsdeB* foram inoculados em MM sólido contendo diferentes concentrações de xilose e as placas foram incubadas a 30, 37 ou 48°C por 4 dias (A) ou a 30°C por 7 dias (B).

A fim de se tentar entender melhor o papel de ambos, *sdeA* e *sdeB*, na regulação mútua da sua expressão, análises de RT-qPCR foram conduzidas nas linhagens selvagem, *xyIP::sdeA* e Δ *sdeB* durante o choque de temperatura. Primeiramente, como mostrado na Figura 57A, nota-se que a expressão de *sdeA* na linhagem selvagem foi reprimida durante o choque de temperatura. Os níveis de mRNA de *sdeA* caíram drasticamente após 15 minutos do início do choque térmico e parecem aumentar lentamente nos tempos seguintes. Portanto, *sdeA* foi mais expresso na condição basal, isto é, na temperatura de 30°C. Por sua vez, a expressão de *sdeB* na linhagem selvagem seguiu um comportamento oposto: aumentou após 15 minutos do início do choque térmico e diminuiu nos tempos seguintes (Figura 57B). Estes resultados sugerem que o pseudogene *sdeB* pode ser transcrito e, realmente, compensar a função de *sdeA* quando este está reprimido, especialmente nos primeiros momentos do choque térmico. Interessantemente, o gene *sdeB* foi pelo menos três vezes mais induzido na linhagem *xyIP::sdeA* sob repressão (sem xilose), independente da presença ou ausência do choque térmico (Figura 57A). Esse resultado sugere que a repressão de *sdeA* causa uma resposta celular compensatória que culmina na maior expressão gênica de *sdeB*, a fim de possivelmente suprir a ausência da dessaturase principal (SdeA). O oposto, contudo, não ocorreu, isto é, no *background* genético da deleção de *sdeB*, os níveis de *sdeA* durante o choque de temperatura permaneceram equiparáveis aos da linhagem selvagem (Figura 57B). Esse resultado reafirma a função secundária que *sdeB* exerce em detrimento do gene *sdeA*, já que sua deleção não é sentida à nível transcricional. No entanto, análises de *Western blot* mostraram que a deleção de *sdeB* levou ao aumento do nível proteico basal de SdeA (Figura 57C), sugerindo que a ausência de *sdeB* pode induzir a síntese de ácidos graxos pela indução da expressão de SdeA como um mecanismo compensatório.

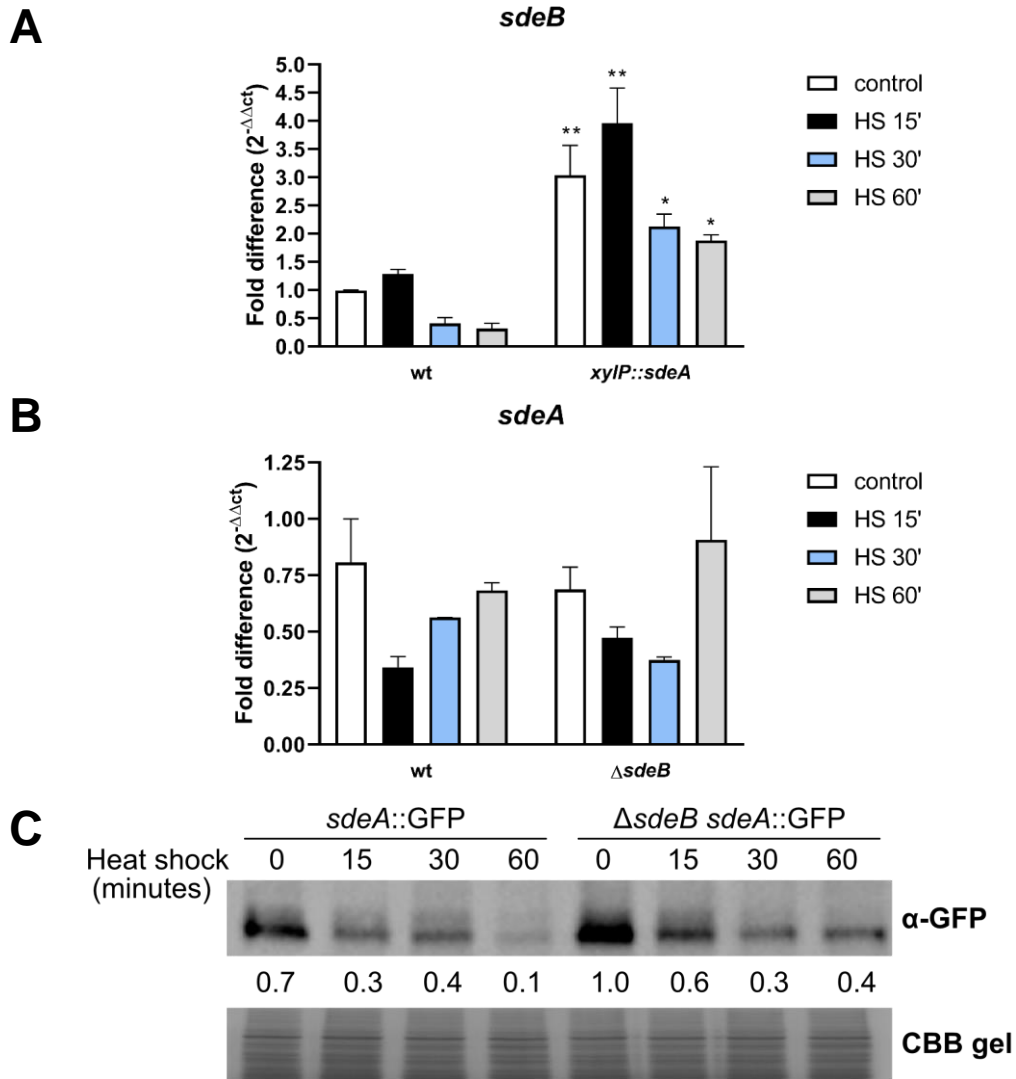


Figura 57. *sdeB* é induzido na repressão de *sdeA* e *SdeA* é induzido na ausência de *sdeB*. A expressão gênica de *sdeB* (A) é fortemente induzida na linhagem *xyIP::sdeA*, enquanto a expressão de gênica de *sdeA* (B) é praticamente inalterada no mutante $\Delta sdeB$. O mRNA total foi avaliado por RT-qPCR e normalizado pelo gene da β -tubulina. Os dados são provenientes de duas replicatas experimentais e independentes (Média \pm DP). O *Fold difference* de cada condição representa o mRNA total normalizado em relação ao ponto controle da linhagem selvagem (wt) a 30°C. * $p \leq 0,05$ e ** $p \leq 0,01$ indicam comparações significativas entre as linhagens wt e *xyIP::sdeA* no mesmo intervalo de tempo (*Two-way ANOVA*, com pós-teste de Sidak). (C) A produção proteica de *SdeA* é induzida no *background* genético da deleção de *sdeB*. O anticorpo α -GFP foi usado para reconhecer a proteína *SdeA::GFP* na análise de *Western blot* durante o choque de temperatura. Os valores de expressão são arbitrários e calculados por densitometria usando ImageJ. O gel de coomassie (CBB gel) foi utilizado como controle de carregamento.

4.2.10 Discussão

As membranas plasmáticas são compostas basicamente por fosfolipídios, esteróis, esfingolipídios e proteínas. Os ácidos graxos são essenciais para a constituição estrutural de moléculas lipídicas como fosfolipídios e esfingolipídios, podendo ser saturados (contêm apenas ligações simples) ou insaturados (contêm uma ou mais ligações duplas). Estes últimos são os principais

componentes estruturais das membranas celulares, desempenhando papéis significativos na manutenção da estrutura celular e da fluidez da membrana (Pereira et al. 2003). A introdução de ligações duplas nas cadeias de hidrocarbonetos dos ácidos graxos é feita por dessaturases de ácidos graxos, as quais são encontradas em bactérias, fungos, plantas e animais. Tais enzimas podem ser solúveis, como a dessaturase proteína transportadora de acila de plantas, ou ligadas a membranas, como as $\Delta 5$ -, $\Delta 6$ -, $\Delta 9$ -, $\Delta 12$ - e $\Delta 15$ -dessaturases de ciano bactérias, fungos, plantas superiores, insetos e mamíferos (Tang et al. 2018). Enquanto as dessaturases solúveis usam tioésteres da proteína transportadora de acila como substratos e ferredoxina como doador de elétrons, as ligadas a membranas utilizam ácidos graxos esterificados em lipídios complexos como substratos e o citocromo b5 como doador de elétrons (Tang et al. 2018).

A. fumigatus possui oito dessaturases de ácidos graxos (Tang et al. 2018). Neste trabalho, foi identificada e caracterizada a $\Delta 9$ -ácido graxo dessaturase SdeA, homólogo de Ole1 de levedura. Como verificada na análise bioinformática, esta proteína possui os dois domínios característicos de dessaturases ligadas a membranas: o domínio dessaturase de ácidos graxos e o domínio do tipo citocromo b5 (Figura 37), além da microscopia de fluorescência da proteína SdeA::GFP ter confirmado sua localização no retículo endoplasmático (Figura 43). Além disso, SdeA possui motivos do tipo "caixa" de histidinas (HXXXXH e HXXHH) no domínio dessaturase de ácidos graxos, os quais são compartilhados e conservados na maioria das enzimas desse grupo (Figura 37) (Wang et al. 2015).

Como observado em *S. cerevisiae* (Stukey et al. 1990), *C. albicans* (Krishnamurthy et al. 2004) e até mesmo recentemente em *A. fumigatus* (Wang et al. 2021), *sdeA* é um gene essencial cuja deleção é inviável, a menos que seja feita a suplementação exógena de ácidos graxos monoinsaturados. A capacidade do mutante *xyIP::sdeA* sob repressão de crescer na presença de ácido oleico e palmitoleico (Figura 49) corrobora esses resultados e reafirma SdeA como uma $\Delta 9$ -dessaturase, já que os ácidos graxos oleico e palmitoleico possuem uma instauração na posição 9 da cadeia de hidrocarboneto. Aqui, foi observado também que *sdeA* é importante para a conidiação (reprodução assexuada) de *A. fumigatus*, uma vez que o mutante condicional *xyIP::sdeA*

conidiou pouco em baixas concentrações de xilose e a 48°C (Figura 45). Esse resultado está de acordo com o que foi observado em *A. nidulans*, no qual um mutante nulo $\Delta sdeA$ apresentou reduzida conidiação (Wilson et al. 2004). Semelhantemente, o homólogo de *sdeA* em *C. albicans* (*OLE1*) também está associado à formação de clamidósporos (Krishnamurthy et al. 2004), que são igualmente importantes para a reprodução assexuada. Contudo, tais problemas na produção de conídios em *A. fumigatus* puderam ser observados mesmo na presença de ácidos graxos monoinsaturados (Figura 49A), o que mostra que a produção endógena de ácido oleico e palmitoleico é indispensável para a sobrevivência do fungo *A. fumigatus*, e não pode ser totalmente compensada pela sua adição exógena. Este resultado foi corroborado recentemente por um outro trabalho independente (Wang et al. 2021).

Estudos já mostraram que os ácidos graxos também estão envolvidos nos níveis de eficácia de alguns medicamentos antifúngicos (Ells et al. 2009; Mishra et al. 2014; Wang et al. 2021). A falta de suscetibilidade do mutante *xyIP::sdeA* a drogas que causam estresse de parede celular e oxidativo (Figuras 46 e 48) sugere que *sdeA* não é importante para esses processos. No entanto, é válido mencionar que uma alta concentração de xilose foi utilizada nestes testes para permitir que o crescimento do mutante condicional fosse comparável ao da linhagem selvagem, o que pode ter influenciado os resultados, uma vez que a expressão de *sdeA* é induzida nessa condição. Este é um problema inerente da utilização do promotor condicional *xyIP*. A análise de XTT (Figura 47), por sua vez, apontou que a perda de função de *sdeA* tem consequência direta sobre a viabilidade do biofilme de *A. fumigatus* na presença da equinocandina CASP, sugerindo que *sdeA* talvez tenha sim função sobre a resposta ao estresse da parede celular.

Ademais, o mutante *xyIP::sdeA* foi bastante vulnerável à inibição da síntese de ácidos graxos e ao polieno estressor de membrana plasmática anfotericina B (Figura 49B). Em contrapartida, a mesma linhagem não apresentou fenótipo diferente da linhagem selvagem na presença dos azóis voriconazol e fluconazol (dados não mostrados). Na literatura, existem trabalhos com resultados divergentes quanto à ação dos ácidos graxos sobre a suscetibilidade fúngica a agentes antifúngicos. A adição exógena dos ácidos graxos oleico (18:1), linoleico (18:2) e linolênico (18:3) foi capaz de aumentar a resistência de *A. fumigatus* ao

azol itraconazol (Wang et al. 2021). Contudo, o mesmo não foi observado na presença da equinocandina CASP, que afinge a parede celular (Wang et al. 2021). Por sua vez, a adição exógena do ácido graxo araquidônico (20:4) aumentou os níveis de ergosterol em *C. albicans* e *Candida dublininensis*, mas apesar disso aumentou a suscetibilidade do biofilme desses microrganismos ao polieno anfotericina B e ao azol clotrimazol (Ells et al. 2009). O mesmo ácido graxo diminuiu a formação de biofilmes dos patógenos *C. glabrata*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* na presença de terbinafina, um antifúngico que também inibe a síntese de esteróis (Mishra et al. 2014). Talvez o grau de insaturação do ácido graxo pode ser determinante para conferir suscetibilidade ou resistência a drogas antifúngicas que têm a membrana plasmática como alvo. De qualquer forma, mais estudos na área são necessários para esclarecer esses resultados.

Recentemente, Wang et al. (2021) constataram que a superexpressão de *sdeA* leva ao acúmulo de ácidos graxos insaturados e à redução da bundância de ácidos graxos saturados em *A. fumigatus*. Os resultados da análise de lipidômica desta tese também mostraram que a perda de função de *sdeA* tem impacto direto sobre a síntese dos fosfolipídios, uma vez que os ácidos graxos são seus constituintes principais. Em concordância com os resultados da superexpressão de *sdeA*, a perda de função desse gene levou ao acúmulo de fosfolipídios saturados e à redução de fosfolipídios insaturados (Figura 50), mostrando que SdeA é extremamente importante para a constituição dos principais lipídios de membrana e provavelmente para a sua homeostase. O aumento dos níveis dos fosfolipídios insaturados neste mutante condicional durante o choque de temperatura, um fenômeno diferente do comportamento natural da linhagem selvagem, apontou para a possível existência e atividade de uma outra dessaturase nessas condições e, por isso, o putativo ortólogo de *sdeA*, *sdeB*, também foi caracterizado neste trabalho. Contudo, uma atualização recente no banco de dados de genomas de fungos (FungiDB) indicou que *sdeB* é, na verdade, um pseudogene. Apesar disso, *sdeA* e *sdeB* interagiram geneticamente a 30°C (Figura 56), temperatura na qual a necessidade por ácidos graxos insaturados é mais necessária do que em temperaturas mais elevadas. O aumento dos níveis de mRNA do pseudogene *sdeB* durante a perda de função de *sdeA* (Figura 57) confirmam que ambos devem atuar em conjunto na

dessaturação de ácidos graxos, uma vez que *sdeB* pareceu compensar a ausência de *SdeA*. Contudo, a forma como este pseudogene pode atuar para influenciar na adaptação térmica e, possivelmente, regular os níveis de ácidos graxos ainda precisa ser estudado. Sabe-se muito pouco sobre a função de pseudogenes, principalmente em fungos [revisado em Cheetham et al. (2020)]; por isso, propor um mecanismo de ação do pseudogene *sdeB* constituiria um outro e complexo trabalho. Curiosamente, *A. nidulans* possui os dois genes, *sdeA* e *sdeB*, funcionais (Wilson et al. 2004). O mesmo parece ser válido para a linhagem Af293 de *A. fumigatus*, embora estes genes não tenham sido caracterizados funcionalmente nesta linhagem. Ao contrário do mutante condicional de *sdeA*, a deleção de *sdeB* não levou a nenhum fenótipo característico, tanto na presença do estresse de parede celular e osmótico, quanto durante o estresse oxidativo e de membrana plasmática, sugerindo que este seja de fato um pseudogene que desempenha um papel secundário e menos importante que *sdeA*. Em concordância com esses resultados, Wilson et al. (2004) constataram anteriormente que a perda de função do gene *sdeB* leva a menos fenótipos associados em comparação com a perda de função de *sdeA* em *A. nidulans*, apesar de ainda reduzir os níveis de ácidos graxos insaturados e aumentar a abundância dos ácidos graxos saturados.

Apesar desse papel secundário, a deleção do pseudogene *sdeB* foi hipervirulenta em modelo invertebrado (Figura 55), mostrando que este pseudogene regula negativamente a patogenicidade de *A. fumigatus*. Esse resultado não é tão surpreendente, já que os ácidos graxos são constituintes funcionais de fatores de virulência de vários patógenos. Na bactéria patogênica *Listeria monocytogenes*, por exemplo, ácidos graxos saturados são necessários para a produção do fator de virulência listeriolisina O, o qual atua formando poros nas membranas de macrófagos e fagócitos (Sun et al. 2012). O metabolismo de ácidos graxos é também essencial para a virulência de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium marinum* (Schweizer and Choi 2011; Rodrigues 2012; Ericson et al. 2017; Herndon et al. 2020; Mondino et al. 2020; Dong et al. 2021). Em fungos, a perda dos genes *FAS1* e *FAS2*, que codificam ácidos graxos sintazes, atenua significativamente a virulência de *C. albicans*, *C. neoformans* e *C. parapsilosis* em camundongos (Zhao et al. 1996; Zhao et al. 1997; Chayakulkeeree et al.

2007; Nguyen et al. 2009). Já a adição exógena do ácido graxo saturado palmitato (16:0) inibe a formação de biofilme, a hidrofobicidade da superfície celular e a síntese de ergosterol em *C. tropicalis*, os quais são conhecidos fatores de virulência (Prasath et al. 2020). Os ácidos graxos insaturados também são essenciais para a virulência de *C. parapsilosis*, uma vez que a deleção de *OLE1* nesse organismo prejudicou o crescimento invasivo, a formação de pseudo-hifas e a virulência em camundongos e aumentou a suscetibilidade a macrófagos (Nguyen et al. 2011). Semelhantemente, a repressão de *OLE1* em *C. albicans* também impactou em sua virulência em modelo murino (Xu et al. 2009). Além disso, a inibição química de Ole1 por meio do ácido graxo diino-furano EV-086 derivado de plantas foi eficaz contra o aparecimento de dermatofitose cutânea causada por *Trichophyton menagrophytes* em porquinhos-da-índia (Knechtle et al. 2014). A perda de função de $\Delta 12$ - e $\Delta 15$ -dessaturases nesse patógeno, por sua vez, não impactou na sua virulência (Murayama et al. 2006). Infelizmente, a essencialidade do gene *sdeA* e a impossibilidade de utilizar o mutante *xyIP::sdeA* em estudos de virulência não permitiram estudar o papel desse gene na patogenicidade de *A. fumigatus*. Contudo, em conjunto, os dados acima sugerem que a participação de ácidos graxos como estimuladores da virulência de microrganismos patogênicos pode ser mais complexa do que o esperado e precisar de constante regulação, de tal forma que estudos complementares ainda são necessários para seu melhor entendimento.

Módulo 4.3 A relação entre termotolerância e a composição da membrana plasmática de *A. fumigatus*

4.3.1 A repressão de *hsfA* aumenta a abundância de fosfolipídios insaturados e de esfingolipídios

A membrana plasmática é uma das primeiras estruturas celulares a detectar flutuações de temperatura, alterando consideravelmente sua composição química, fluidez e outras propriedades na adaptação à mudança de temperatura (Ernst et al. 2020). Dentre seus constituintes, os fosfolipídios se destacam por ditarem o estado fluido das membranas biológicas, sendo amplamente aceito que tanto o grau de insaturação quanto o tamanho das cadeias de ácidos graxos de fosfolipídios aumentam quando a temperatura aumenta (Okuyama et al. 1979; Shapiro and Cowen 2012; Leach and Cowen 2014). Após a confirmação de que o fator de transcrição HsfA é determinante para a manutenção da termotolerância, adaptação ao choque térmico e manutenção da integridade da parede celular de *A. fumigatus* (Módulo 1), decidiu-se investigar seu papel na homeostase da membrana plasmática. Como já apresentado, a repressão de *hsfA* na linhagem *xyIP::hsfA* levou a alterações na expressão de genes envolvidos na síntese de lipídios (Figura 32).

Diante desse resultado, as linhagens selvagem e *xyIP::hsfA* foram expostas ao estresse de membrana plasmática para a investigação do papel de HsfA na resposta a esse tipo de estresse (Figura 58). Interessantemente, o mutante *xyIP::hsfA* foi levemente suscetível aos azóis fluconazol e voriconazol, mas consideravelmente suscetível ao polieno anfotericina B, ao inibidor da síntese de esfingolipídios miriocina e ao inibidor da síntese de esfingolipídios complexos aureobasidina A. No entanto, a mesma linhagem apresentou nível de sensibilidade semelhante à linhagem selvagem na presença de inibidores da síntese de ácidos graxos (cerulenina e trans-chalcona). Em conjunto, estes resultados sugerem que HsfA é importante para a resposta ao estresse de membrana plasmática e pode desempenhar alguma função na síntese de alguns constituintes da membrana plasmática, especialmente os esfingolipídios.

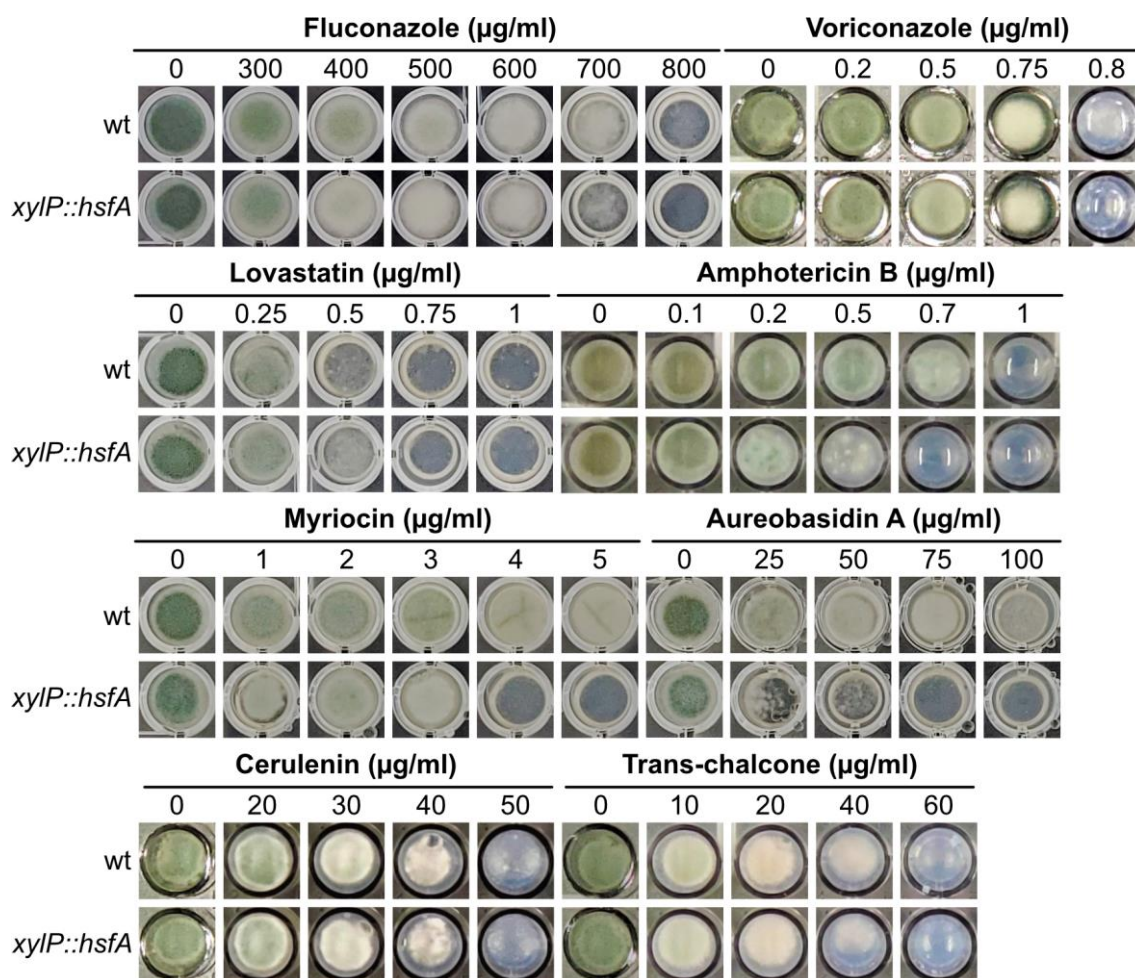


Figura 58. O mutante *xyIP::hsfA* é sensível ao estresse de membrana plasmática. Teste fenotípico do mutante *xyIP::hsfA* na presença de estresse de membrana plasmática. 1×10^4 conídios das linhagens selvagem e *xyIP::hsfA* foram inoculados em MM sólido contendo 0,06% de xilose e as concentrações indicadas das drogas fluconazol, voriconazol, lovastatina, anfotericina B, miriocina, aureobasidina A, cerulenina e trans-chalcona. As placas foram incubadas a 37°C por 72 horas.

Por essa razão, como uma primeira abordagem para entender a função de HsfA na regulação das alterações estruturais da membrana durante o choque térmico em *A. fumigatus*, a concentração de espécies esfingolípídicas foi quantificada na linhagem *xyIP::hsfA* sob repressão e durante o choque de temperatura. No mesmo experimento, a linhagem *xyIP::sdeA* também teve suas espécies esfingolípídicas quantificadas, uma vez que este mutante condicional foi sensível à inibição da síntese de esfingolípídios (Figura 49). Os esfingolípídios são uma classe de lipídios de membrana que muitas vezes funcionam tanto como componentes estruturais quanto moléculas de sinalização [revisado em Fernandes et al. (2018)]. A indução do choque térmico não teve impacto significativo na quantidade de esfingolípídios totais na linhagem selvagem de *A. fumigatus* (Figura 59), um resultado diferente daquele constatado em levedura,

na qual foi observado um aumento na abundância de esfingolipídios em temperaturas mais elevadas [revisado em Fabri et al. (2020)]. No entanto, no mutante *xylP::hsfA*, houve um aumento substancial na concentração de esfingolipídios totais durante o choque térmico, de maneira semelhante ao que ocorre em linhagens selvagens de *S. cerevisiae* (Dickson et al. 1997; Jenkins et al. 1997; Cowart et al. 2003). Esse resultado sugere que o gene *hsfA* afeta a síntese de esfingolipídios, principalmente durante o choque térmico. Uma possível explicação para esses resultados pode residir no fato de *A. fumigatus* ser um fungo termofílico e termotolerante, enquanto as leveduras não são tão adaptadas ao choque térmico. É possível que a linhagem selvagem de *A. fumigatus* pode não ter alterado sua abundância de esfingolipídios no choque térmico porque a célula fúngica manteve sua integridade termotolerante funcional. Na linhagem *xylP::hsfA*, porém, na qual a capacidade de termotolerância é prejudicada devido à repressão de *hsfA* (Figura 13), foi possível observar um aumento na quantidade de esfingolipídios de forma muito semelhante ao que foi visto em leveduras. Isso sugere que a perda de controle da capacidade termotolerante pela inibição de *hsfA* afeta o metabolismo de esfingolipídios durante o choque térmico, e a célula acumula mais esfingolipídios para recuperar a termotolerância ou pelo menos sobreviver ao choque térmico, seja de maneira direta ou, mais provavelmente, indireta. Em acordo com essa hipótese, linhagens mutantes de *S. cerevisiae* sem esfingolipídios são hipersensíveis ao calor (Patton et al. 1992), reforçando a importância dos esfingolipídios durante a adaptação ao choque térmico. Além disso, mutantes de *A. nidulans* de genes da via esfingolipídica apresentaram menor crescimento em temperaturas mais elevadas (Fernandes et al. 2016), e o mesmo foi observado em um mutante da quinase YpkA que controla a biossíntese de esfingolipídios em *A. fumigatus* (Fabri et al. 2018). Nesse sentido, *hsfA* seria então um dos mais importantes reguladores da manutenção da termotolerância celular e sua ausência altera o metabolismo dos esfingolipídios durante a adaptação ao choque térmico. O fato de que o conteúdo total de esfingolipídios da linhagem *xylP::sdeA* também permaneceu constante durante o choque térmico (Figura 59), de forma semelhante à linhagem selvagem, destaca mais uma vez o efeito que a perda da função de *hsfA* causou na concentração de esfingolipídios e reforça a hipótese de que essa consequência está relacionada ao

comprometimento da capacidade termotolerante. Digno de nota, o mutante *xyIP::sdeA* pareceu acumular menos esfingolípídios totais do que a linhagem selvagem, mas sem diferença estatisticamente significativa.

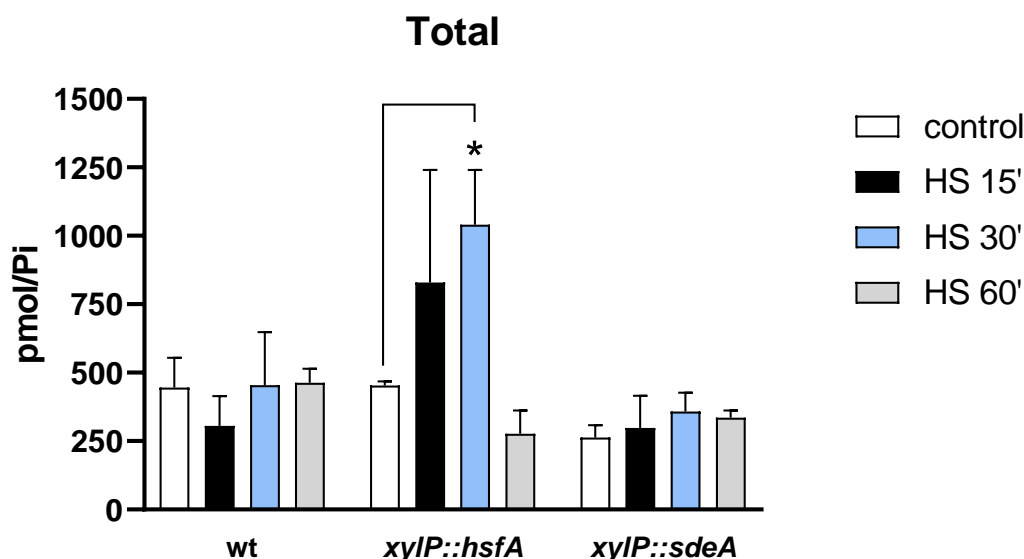


Figura 59. A abundância de esfingolípídios aumenta na linhagem *xyIP::hsfA* durante o choque térmico. Esfingolípídios totais das linhagens selvagem, *xyIP::hsfA* e *xyIP::sdeA* foram extraídos e quantificados por espectrometria de massas, e os valores foram normalizados pelos níveis de fosfato inorgânico (Pi). A barra indica diferença estatisticamente significativa dentro da mesma linhagem com $p \leq 0,05$ (*Two-way ANOVA*, com pós-teste de Sidak). * $p \leq 0,05$ (*Two-way ANOVA* com teste de Sidak em relação à linhagem selvagem na mesma condição).

Contudo, pode-se sugerir que tais diferenças no conteúdo de esfingolípídios entre as linhagens selvagem e *xyIP::hsfA* podem ser devido a outras consequências além do aumento na síntese de esfingolípídios em si. De fato, geralmente três tipos de alterações celulares podem levar a mudanças na concentração dos intermediários da via esfingolípídica: (i) o aumento na biossíntese *de novo* de esfingolípídios, que reflete principalmente no aumento da abundância dos primeiros intermediários da via (dihidroesfingosina, dihidroceramida e fitoesfingosina); (ii) a diminuição do processo de degradação dos esfingolípídios, que resulta no acúmulo de intermediários, principalmente aqueles mais ao término da via (glucosilceramida e inositolfosforil ceramida); (iii) e também a ocorrência de uma fragilidade da membrana plasmática, o que pode facilitar e aumentar a quantidade de esfingolípídios extraídos. Para o último caso, o aparente aumento na concentração de esfingolípídios na linhagem mutante não seria devido ao aumento em sua biossíntese, mas sim ao fato de que a repressão de *hsfA* poderia ter facilitado de alguma forma a extração de esfingolípídios e, conseqüentemente, uma maior concentração desses lipídios

seria observada. Porém, como os valores de concentração obtidos para todas as linhagens foram normalizados pela concentração de fosfato inorgânico (Pi), em que não foram observadas diferenças discrepantes entre as linhagens, esses resultados sugerem que de fato o aumento na concentração de esfingolipídios na linhagem *xyIP::hsfA* (Figura 59) foi em decorrência do aumento da biossíntese *de novo* apenas durante o choque térmico. O fato de o mutante *xyIP::hsfA* na condição controle (barra branca) apresentar valores de concentração próximos aos apresentados pela linhagem selvagem corrobora esta conclusão. Além disso, a Figura 60 mostra os gráficos de cada classe de esfingolipídio medida e aponta que a concentração de praticamente todas elas aumentou no mutante *xyIP::hsfA* em pelo menos um ponto do choque térmico, especialmente as glicosilceramidas que, por sinal, foram as principais responsáveis pela elevação dos níveis de esfingolipídios totais na linhagem *xyIP::hsfA*, devido sua maior concentração. A Figura D1 do APÊNDICE D corrobora essa conclusão mostrando a concentração das espécies individuais de esfingolipídios medidas. É válido ainda mencionar que também foi feita a quantificação dos esfingolipídios das linhagens selvagem, *xyIP::hsfA* e *xyIP::sdeA* na presença de estresse de parede celular provocado por 300 µg/ml de CR ou 2 µg/ml de CASP, mas não houve diferenças significativas entre as linhagens e em comparação com a condição controle (dados não mostrados). Esta informação reforça a ideia de que a perda da capacidade termotolerante foi a principal responsável pelos resultados apresentados pela linhagem *xyIP::hsfA* (Figura 59), e não outra possível característica inerente deste mutante.

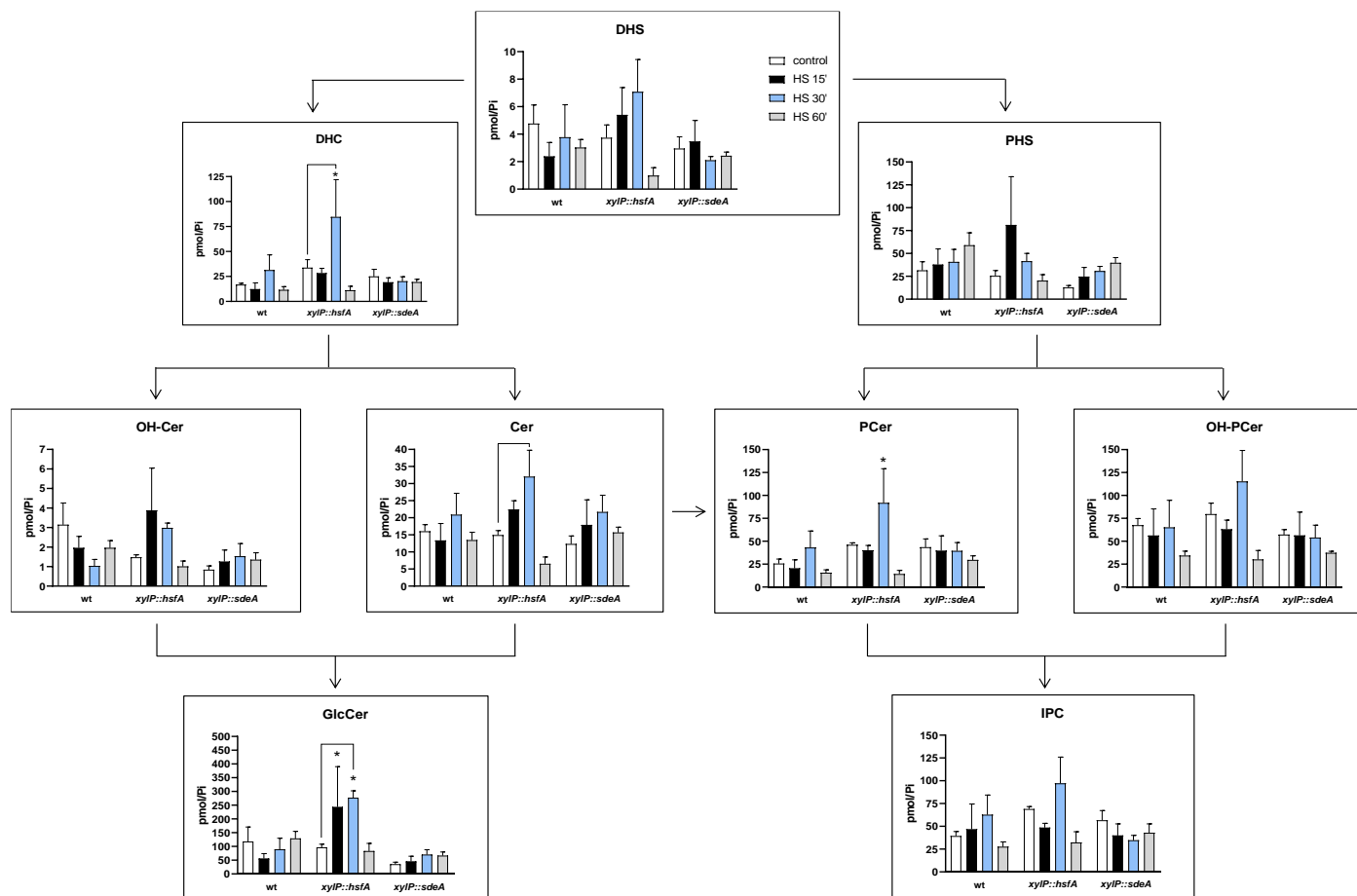
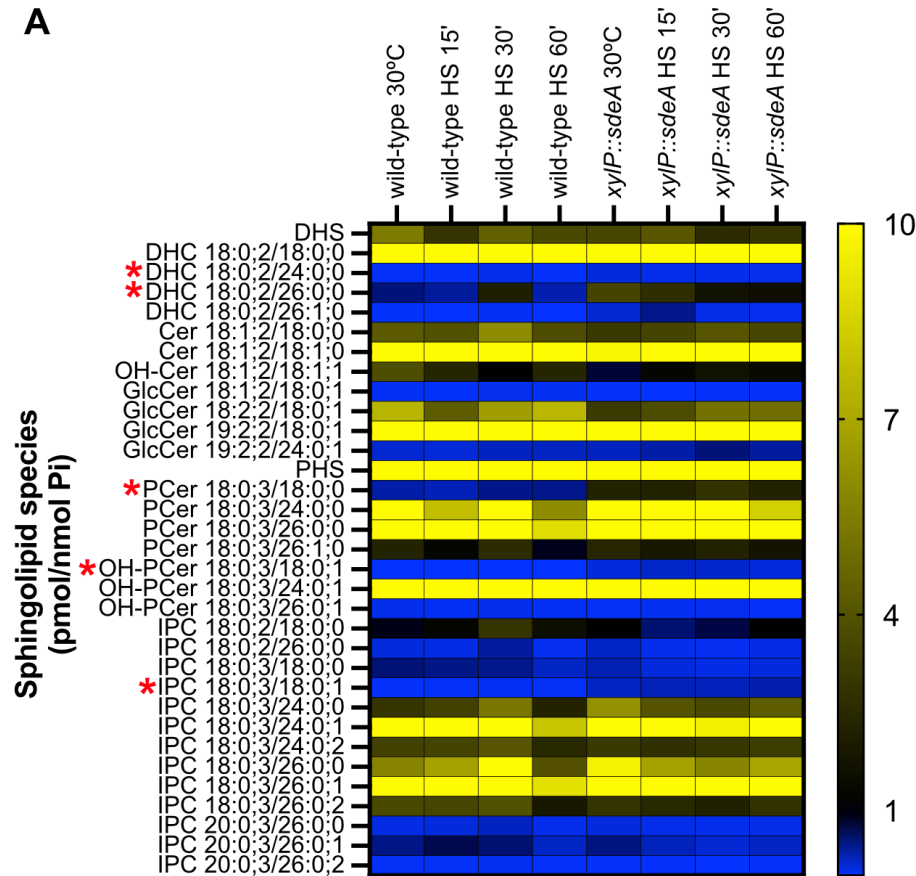


Figura 60. Gráficos da concentração das classes de esfingolipídios nas linhagens selvagem, *xyIP::hsfA* e *xyIP::sdeA*. As espécies de esfingolipídios das linhagens selvagem, *xyIP::hsfA* e *xyIP::sdeA* durante o choque térmico foram quantificadas por espectrometria de massas e agrupadas de acordo com a classe dos esfingolipídios. DHS: dihidroesfingosina; DHC: dihidroceramida; Cer: ceramida; GlcCer: glucosilceramida; OH-Cer: hidroxi-ceramida; PHS: fitoesfingosina; PCer: fitoceramida; OH-PCer: hidroxi-fitoceramida; IPC: inositolfosforil ceramida. A disposição dos gráficos segue o fluxo da via de biossíntese dos esfingolipídios em fungos. As barras indicam diferenças estatisticamente significativas com $p \leq 0,05$ (*Two-way ANOVA*, com pós-teste de Sidak). * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ e **** $p \leq 0,0001$ indicam comparações significativas entre as linhagens mutantes e a linhagem selvagem na mesma condição.

Com a Figura 60 ainda, pode-se notar que o choque de temperatura provocou o leve acúmulo de algumas classes de esfingolipídios na linhagem selvagem, como fitoesfingosina, dihidroceramida, ceramida, fitoceramida e inositolfosforil ceramida, e a diminuição de outras, como glucosilceramida, hidroxí-ceramida e dihidroesfingosina, e é possivelmente por isso que a quantidade total de esfingolipídios se manteve relativamente constante (Figura 59). Por outro lado, o choque térmico aumentou ligeiramente a abundância de fitoesfingosina, ceramida, hidroxí-ceramida e glucosilceramida e diminuiu ligeiramente a concentração de dihidroesfingosina e inositolfosforil ceramida na linhagem *xyIP::sdeA*, mas sem diferença estaticamente significativa. Assim, pode-se concluir que a repressão de *sdeA* não é tão importante para a síntese de esfingolipídios como para a síntese de fosfolipídios (Módulo 4.2).

Porém, a repressão de *sdeA* ainda trouxe consequências para a síntese de esfingolipídios. A Figura 61A mostra todas as espécies de esfingolipídios medidas. Os níveis de algumas espécies de dihidroceramidas, fitoceramidas e inositolfosforil ceramida (destacados em asteriscos vermelhos) foram maiores no mutante *xyIP::sdeA* em comparação com a linhagem selvagem. Em comum, todas estas espécies possuem uma cadeia de ácidos graxo saturado (Figura 61B), o que demonstra que a repressão da dessaturase SdeA não só resultou no acúmulo de fosfolipídios saturados (Figura 50), mas também no acúmulo de algumas espécies de esfingolipídios com cadeias de ácidos graxos saturados. Assim, ainda que de forma mais branda, SdeA também é importante para o metabolismo de esfingolipídios, principalmente no que se refere ao conteúdo de ácidos graxos ligados à base esfingoide.

A



B

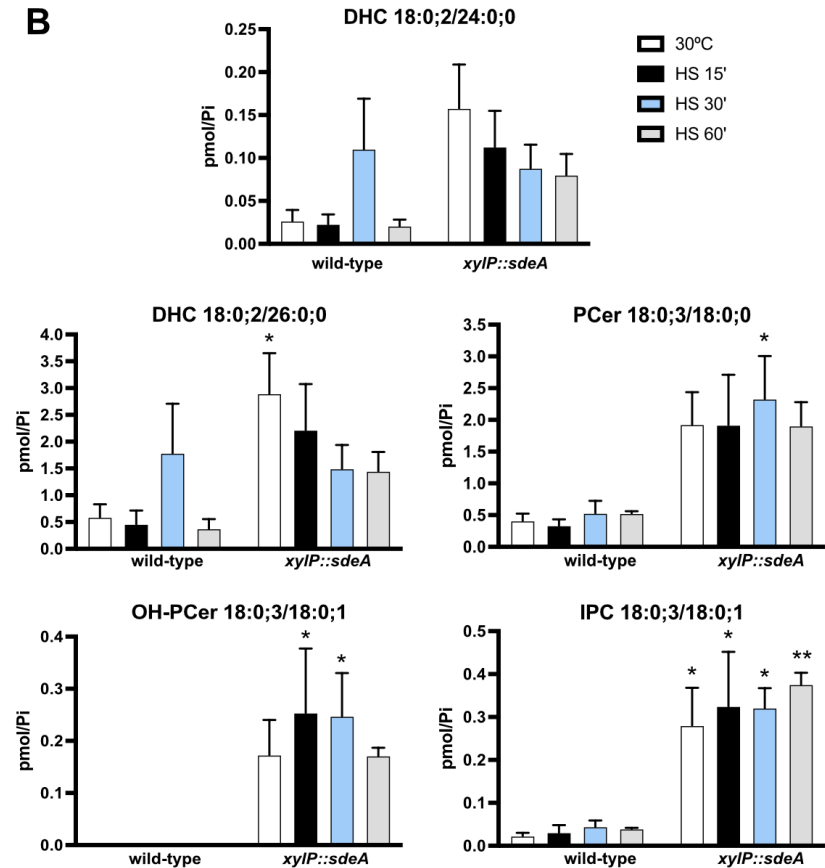


Figura 61. O mutante *xyIP::sdeA* acumula esfingolípídios com cadeias de ácido graxo saturadas. As espécies de esfingolípídios das linhagens selvagem e *xyIP::sdeA* durante o choque térmico foram medidas por espectrometria de massas. (A) Gráfico *heat map* mostrando a concentração de cada espécie medida. Os asteriscos vermelhos destacam as espécies cuja concentração foi bem maior na linhagem *xyIP::sdeA*. (B) Gráfico de barras destas mesmas espécies. DHS: dihidroesfingosina; DHC: dihidroceramida; Cer: ceramida; GlcCer: glucosilceramida; OH-Cer: hidroxi-ceramida; PHS: fitoesfingosina; PCer: fitoceramida; OH-PCer: hidroxi-fitoceramida; IPC: inositolfosforil ceramida. Todas as nomenclaturas de abreviações de esfingolípídios são expressas como “cadeia de base esfingoide/ácido graxo” no formato X:Y;Z (X, número de carbonos; Y, número de ligações duplas C-C; Z, número de grupos hidroxila). * $p \leq 0,05$ e ** $p \leq 0,01$ (Two-way ANOVA com teste de Sidak em relação à linhagem selvagem na mesma condição). O *heat map* foi criado utilizando o software GraphPad Prism.

A seguir, a linhagem *xyIP::hsfA* também foi submetida a uma análise de espectrometria de massas para a quantificação de espécies fosfolipídicas durante o choque de temperatura, da mesma maneira feita anteriormente para a linhagem *xyIP::sdeA*. Primeiramente, pode-se observar que o mutante *xyIP::hsfA*, sob repressão, acumulou mais fosfolipídios que a linhagem selvagem, principalmente PC e PS (APÊNDICE C, Figura C1-A), sugerindo a existência de um possível papel inibitório de HsfA sobre a síntese de fosfolipídios. As Figuras C1-B-D do APÊNDICE C mostram os *heat maps* de quantificação individual para cada espécie de PC, PE e PS, respectivamente, na mesma linhagem durante o choque térmico. De uma maneira geral, uma consequência direta da repressão de *hsfA* pareceu ser o aumento da porção insaturada de fosfolipídios. A Figura 62 mostra os gráficos de quantificação das espécies fosfolipídicas separadas pelo nível de saturação. Os níveis dos fosfolipídios saturados do mutante condicional foram muito semelhantes aos da linhagem selvagem durante o choque térmico, isto é, PC e PS saturados aumentaram enquanto PE saturados diminuíram no choque de temperatura (Figura 62), sugerindo que a repressão de *hsfA* não interfere na síntese de fosfolipídios saturados. No entanto, foi possível notar um aumento na abundância de PC e PS insaturados no mutante condicional na condição controle (30°C) em comparação com a linhagem selvagem, ainda que estatisticamente não significativo. Além disso, surpreendentemente, a concentração dessas espécies, isto é, PC e PS insaturados, aumentou consideravelmente no mutante *xyIP::hsfA* após 30 minutos do início do choque de temperatura, um comportamento oposto ao apresentado pela linhagem selvagem. Os níveis de PE insaturados, por sua vez, foram semelhantes aos da linhagem selvagem, apesar da ocorrência do mesmo fenômeno no tempo de 30 minutos. Tais resultados estão de acordo com a análise de RNA-Seq feita anteriormente, na qual foi verificado que a superexpressão de *hsfA* (crescimento a 30°C na presença de xilose) causa uma repressão na expressão de genes envolvidos na síntese de lipídios insaturados (Tabela 20). Como nesta análise lipidômica *hsfA* foi reprimido, o efeito é oposto: uma maior expressão desses genes, sugerida pelo aumento da síntese de fosfolipídios insaturados.

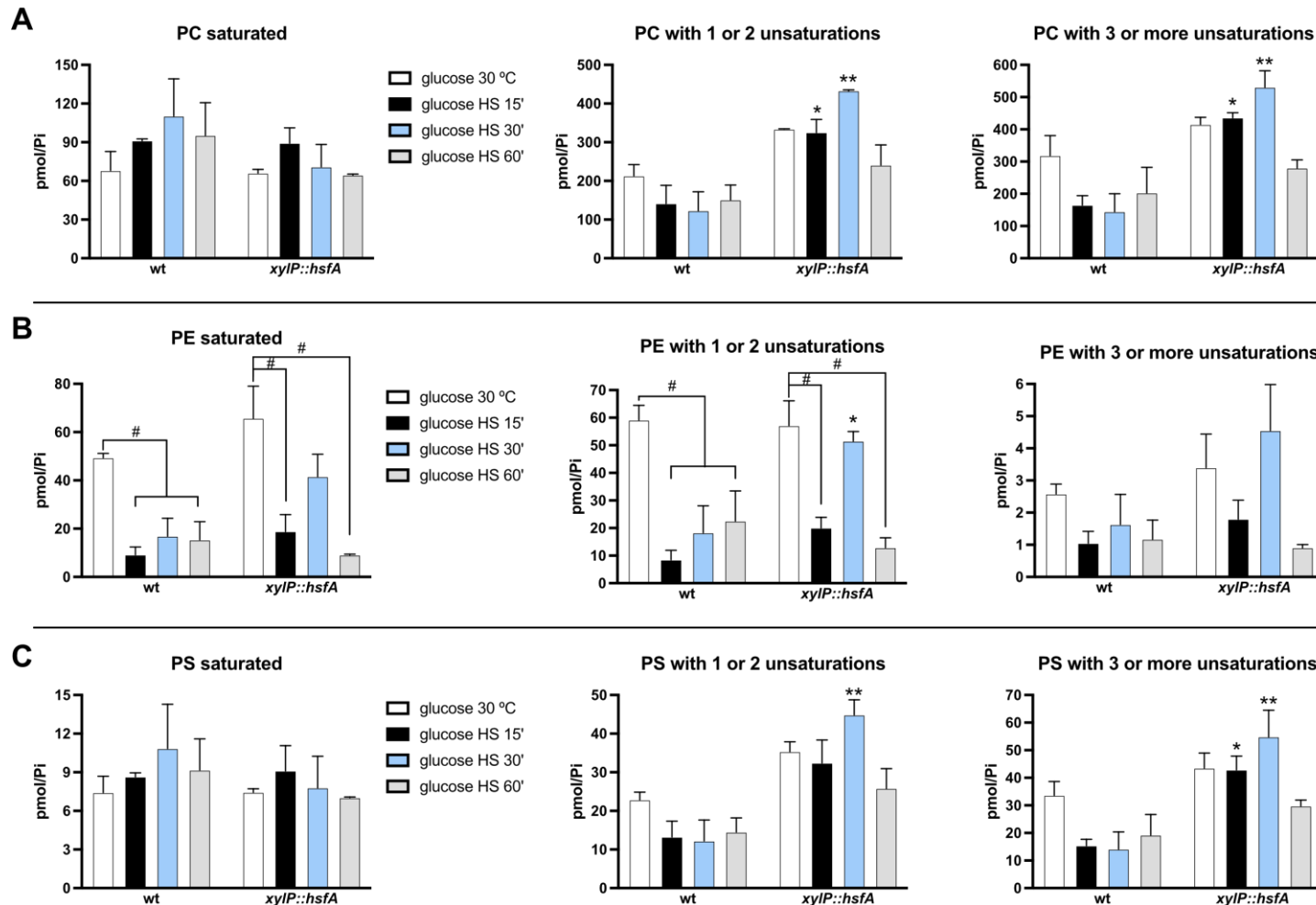


Figura 62. A perda de função de *hsfA* altera a proporção de fosfolípidios insaturados durante o choque de temperatura. Gráficos das concentrações de fosfolípidios fosfatidilcolina (PC) (A), fosfatidiletanolamina (PE) (B) e fosfatidilserina (PS) (C) das linhagens selvagem e *xyIP::hsfA*, durante o choque térmico. As espécies lipídicas foram agrupadas de acordo com o grau de saturação das cadeias de ácidos graxos: lípidios saturados, lípidios com uma ou duas insaturações ou lípidios com três ou mais insaturações. * $p \leq 0,05$ e ** $p \leq 0,01$ (*Two-way* ANOVA com teste de Sidak em relação à linhagem selvagem na mesma condição). As barras sobrescritas com # indicam comparações significativas dentro da mesma linhagem.

Assim, ainda que a inibição da síntese de ácidos graxos não tenha impactado fenotipicamente na linhagem *xyIP::hsfA* (Figura 58), os resultados da análise lipidômica sugerem que a inibição de *hsfA* afeta consideravelmente a síntese de fosfolipídios de membrana, principalmente aqueles com cadeias de ácido graxo insaturadas. Essas análises, então, apontam que de fato HsfA tem um papel regulador negativo na síntese de fosfolipídios insaturados, o que pode estar relacionado à função de SdeA.

4.3.2 HsfA controla a expressão de SdeA e *sdeB*

Para avaliar se HsfA desempenha função na expressão das enzimas dessaturases de ácidos graxos, foi conduzida uma análise de RT-qPCR na linhagem *xyIP::hsfA*. Como pode ser visto na Figura 63A, o gene *sdeA* foi reprimido durante o choque de temperatura na linhagem selvagem, algo esperado (vide Figura 57B) considerando que este gene está relacionado à síntese de ácidos graxos insaturados, os quais se acumulam menos e, portanto, são menos exigidos em altas temperaturas para estabilizar a fluidez da membrana (Okuyama et al. 1979; Martin et al. 2007; Peter et al. 2017; Fabri et al. 2020). Apesar de também ter sido reprimido na linhagem *xyIP::hsfA*, esse gene foi bem menos expresso na condição controle em comparação com a linhagem selvagem (Figura 63A), sugerindo que HsfA pode ter um impacto na expressão basal de *sdeA*. Por sua vez, a expressão de *sdeB* mostrou-se ligeiramente induzida após 15 minutos do início do choque de temperatura, mas foi reprimida nos tempos maiores de exposição ao choque térmico, tanto na linhagem selvagem quanto no mutante *xyIP::hsfA*. Porém, percebe-se que houve uma repressão significativa de *sdeB* na linhagem *xyIP::hsfA* se comparada com a linhagem selvagem, principalmente na condição controle (30°C) e no tempo de 15 minutos do choque térmico. Estes resultados mostram que HsfA exerce função positiva na expressão gênica de *sdeA* e *sdeB*, principalmente na condição basal. Contudo, estudos adicionais ainda são necessários para confirmar se essa função é direta ou indireta. A princípio, esta conclusão parece contradizer o resultado da Figura 62, uma vez que seria esperada a indução de *sdeA* e *sdeB* na linhagem *xyIP::hsfA*, resultando em maiores níveis de fosfolipídios insaturados.

Para avaliar se o perfil de expressão da proteína SdeA durante o choque de temperatura reflete o perfil transcricional, a linhagem *sdeA::3xHA* foi submetida ao choque de temperatura a 48°C e suas proteínas extraídas para a realização de um ensaio de *Western blot*. O mesmo foi realizado com o duplo mutante *xyIP::hsfA sdeA::3xHA* em condição de repressão (ausência de xilose). A Figura 63B mostra que a proteína SdeA foi bem mais expressa na linhagem parental selvagem (*sdeA::3xHA*) do que na linhagem *xyIP::hsfA sdeA::3xHA*, tanto na condição basal quanto nos primeiros momentos do choque de temperatura, mostrando que *hsfA* é necessário para correta expressão de SdeA. Este resultado está de acordo com a análise de RT-qPCR, a qual indicou que os níveis de mRNA de *sdeA* também são menores no *background* genético do *xyIP::hsfA*. Além disso, essa análise sugere também que o aumento nos níveis de fosfolípidios insaturados na linhagem *xyIP::hsfA* (Figura 62) não deve ser consequência da atividade de SdeA, mas possivelmente de uma outra enzima dessaturase. Uma outra hipótese é a de que, durante o choque térmico, a linhagem *xyIP::hsfA* degrade lipídios insaturados complexos, acumulando mais fosfolípidios insaturados. Ambas teorias necessitam de futura validação.

Como relatado anteriormente, Hsp90 é o principal alvo transcricional de HsfA e uma proteína atuante na resposta ao choque térmico. Devido a sua atividade chaperona, Hsp90 é reconhecidamente uma proteína que se liga a muitas outras na adaptação ao choque de temperatura para ajudar no remodelamento ou renaturação dessas proteínas clientes. A fim de verificar *in vivo* se SdeA faz parte da clientela de Hsp90, um ensaio de co-imunoprecipitação foi realizado utilizando a resina GFP-Trap e a linhagem *sdeA::GFP* durante o choque de temperatura. As proteínas SdeA e Hsp90 interagiram fisicamente em todas as condições testadas, ou seja, tanto na condição basal de 30°C (em menor escala) quanto durante o choque de temperatura a 48°C (Figura 63C), mostrando que SdeA é uma proteína cliente de Hsp90. Essa interação foi posteriormente validada em nosso laboratório por meio de um experimento de proteômica (Rocha et al., dados não publicados). Esse resultado sugere uma relação mais próxima entre SdeA e a resposta termotolerante de *A. fumigatus*.

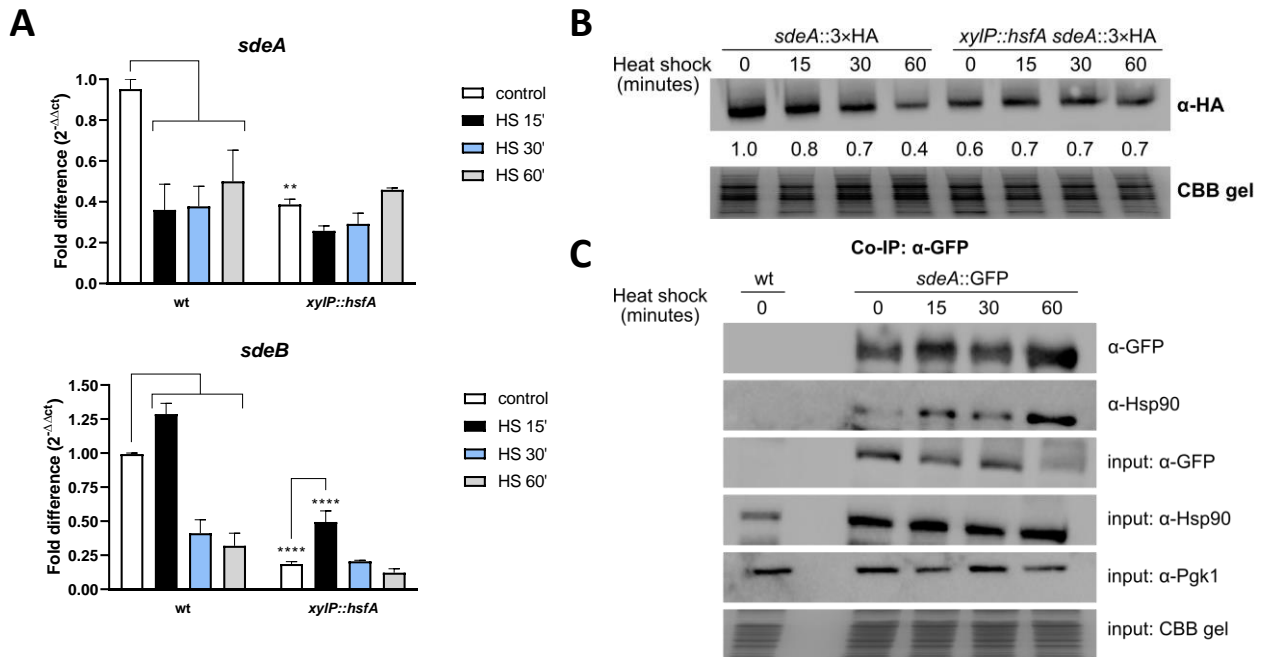


Figura 63. A repressão de *hsfA* reprime a expressão de *sdeA* e *sdeB*. (A) A expressão gênica de *sdeA* e *sdeB* é reprimida na linhagem *xyIP::hsfA*. O mRNA total foi avaliado por RT-qPCR e normalizado pelo gene da β -tubulina. Os dados são provenientes de duas replicatas experimentais e independentes (Média \pm DP). O *Fold difference* de cada condição representa o mRNA total normalizado em relação ao ponto controle da linhagem selvagem (wt). As barras indicam diferenças estatisticamente significativas dentro da mesma linhagem com $p \leq 0,05$ (Two-way ANOVA, com pós-teste de Sidak). ** $p \leq 0,01$ e **** $p \leq 0,0001$ indicam comparações significativas entre as linhagens wt e *xyIP::hsfA* no mesmo intervalo de tempo. (B) A produção proteica de SdeA é reprimida no *background* genético *xyIP::hsfA*. O anticorpo α -HA foi usado para reconhecer a proteína SdeA::3xHA na análise de *Western blot* durante o choque de temperatura. Os valores de expressão são arbitrários e calculados por densitometria usando ImageJ. O gel de coomassie (CBB gel) foi utilizado como controle de carregamento. (C) As proteínas SdeA e Hsp90 interagem fisicamente de forma constitutiva. A interação física entre as proteínas foi verificada por meio de co-immunoprecipitação e utilização dos anticorpos α -GFP, que detecta a proteína SdeA::GFP, e α -Hsp90. O gel de coomassie (CBB gel) e o anticorpo α -Pgk1 foram utilizados como controles de carregamento.

4.3.3 A perda de função de *sdeA* e *sdeB* induz a expressão de Hsp90

Algumas conexões entre a resposta ao choque térmico e o metabolismo dos ácidos graxos em fungos já foram anteriormente relatadas. A suplementação de ácido graxo saturado no meio de cultivo de *H. capsulatum*, por exemplo, aumentou a transcrição de *HSP70* e *HSP82* neste fungo durante o choque térmico, enquanto o tratamento com ácido graxo insaturado reduziu seus níveis (Carratu et al. 1996). Uma regulação negativa de *HSP70* no mesmo organismo também foi alcançada durante a superexpressão de *OLE1* (Porta et al. 2010). Diferentemente, a depleção de *OLE1* em *C. albicans* impediu a ativação completa do fator de transcrição de choque térmico Hsf1, o que diminuiu a expressão das HSPs em resposta ao choque térmico (Leach and Cowen 2014). Considerando estes estudos, resolveu-se investigar se *sdeA* e *sdeB* também

controlam a expressão de *hsfA* e de seu alvo transcricional *hsp90* em *A. fumigatus*. Por meio de um ensaio de RT-qPCR, pode-se observar que a repressão de *sdeA* praticamente não modificou a expressão de *hsfA* e *hsp90*, tanto na condição controle como durante o choque de temperatura (Figura 64A). O mesmo é válido para a deleção de *sdeB*, com exceção do tempo de 30 minutos após o choque térmico, no qual houve repressão significativa da expressão de *hsp90* na linhagem $\Delta sdeB$. A seguir, o nível proteico de Hsp90 nas linhagens *xyIP::sdeA* e $\Delta sdeB$ foi analisado por *Western blot*. Aqui, porém, foi constatada uma indução nos níveis de expressão de Hsp90 em ambos os mutantes se comparados com a linhagem selvagem, especialmente durante o choque de temperatura e principalmente no mutante *xyIP::sdeA* (Figura 64B). Esse resultado sugere que, ao contrário do que ocorre em *C. albicans* (Leach and Cowen 2014), *sdeA* e *sdeB* podem ter um papel regulatório negativo sobre a síntese de HSPs, no caso Hsp90, resultado este que se aproxima àqueles observados no fungo dimórfico *H. capsulatum* (Carratu et al. 1996; Porta et al. 2010).

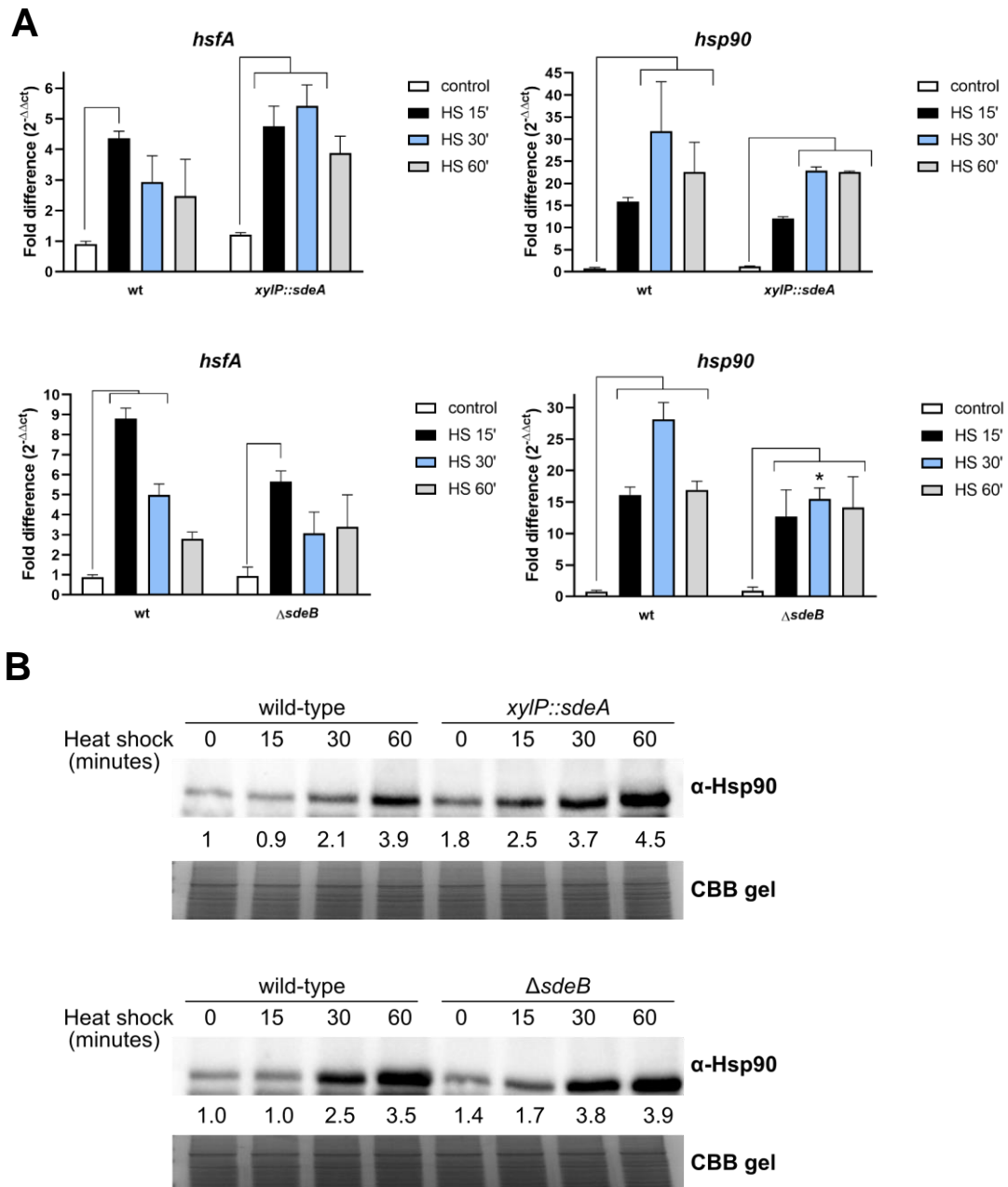


Figura 64. A perda de função de *sdeA* e *sdeB* induz os níveis da proteína Hsp90. (A) A expressão gênica de *hsfA* e *hsp90* sofre pouca variação nas linhagens *xyIP::sdeA* e $\Delta sdeB$. O mRNA total foi avaliado por RT-qPCR e normalizado pelo gene da β -tubulina. Os dados são provenientes de duas replicatas experimentais e independentes (Média \pm DP). O *Fold difference* de cada condição representa o mRNA total normalizado em relação ao ponto controle da linhagem selvagem (wt). As barras indicam diferenças estatisticamente significativas dentro da mesma linhagem com $p \leq 0,05$ (*Two-way* ANOVA, com pós-teste de Sidak). * $p \leq 0,05$ indica comparação significativa entre as linhagens wt e $\Delta sdeB$ no mesmo intervalo de tempo. (B) A produção proteica de Hsp90 é induzida nos *backgrounds* genéticos *xyIP::sdeA* e $\Delta sdeB$. O anticorpo α -Hsp90 foi usado para reconhecer a proteína Hsp90 na análise de *Western blot* durante o choque de temperatura. Os valores de expressão são arbitrários e calculados por densitometria usando ImageJ. O gel de coomassie (CBB gel) foi utilizado como controle de carregamento.

4.3.4 Discussão

Na resposta ao choque térmico clássica, chaperonas moleculares são induzidas para atuarem na diminuição da agregação de proteínas desnaturadas e auxiliarem a restauração de suas conformações nativas. Contudo, constatou-se nas últimas décadas que os níveis das HSPs podem ser modulados em função de alterações na membrana plasmática de procariotos a células de mamíferos, sem a ocorrência de choque térmico ou de desnaturação proteica (Carratu et al. 1996; Horvath et al. 1998; Balogh et al. 2005; Shigapova et al. 2005; Nagy et al. 2007; Porta et al. 2010). Além disso, muitas HSPs são encontradas associadas à membrana plasmática, estando as vezes localizadas em microdomínios lipídicos específicos, o que pode ser uma maneira que os organismos têm de compartimentalizar as HSPs próximas a outras proteínas de sinalização que respondem a receptores da superfície celular [revisado em Horvath et al. (2008)]. O conhecimento sobre essa relação entre a resposta ao choque térmico, a membrana plasmática e as vias de sinalização pode ser bastante vantajoso no tratamento de doenças, no desenvolvimento de drogas etc.

O estudo da interação complexa de múltiplas vias emergindo de fosfolipídios, esfingolipídios e colesterol tem ajudado a entender como o sinal da percepção do calor na membrana plasmática é transduzido para a ativação de Hsf1, levando finalmente à expressão de HSPs em células de mamíferos [revisado em Torok et al. (2014) e Fabri et al. (2020)]. Com relação ao metabolismo de ácidos graxos, Leach and Cowen (2014) observaram anteriormente que a depleção de *OLE1* impede a ativação completa de Hsf1 em *C. albicans* via E3 ubiquitina ligase Rsp5 (um regulador transcricional de *OLE1*), o que diminui a expressão de HSPs em resposta ao choque térmico. Apesar de não ter sido possível estudar a ativação de HsfA neste trabalho, foi observado que os níveis proteicos de Hsp90, o principal alvo transcricional de HsfA, foram induzidos pela perda de função do homólogo de *OLE1* em *A. fumigatus*, *sdeA*, e do pseudogene *sdeB* (Figura 64). Este resultado, portanto, pode sugerir a existência de um mecanismo regulatório diferente daquele observado em *C. albicans*, mas próximo àquele constatado em *H. capsulatum*, no qual a superexpressão de *OLE1* provocou a repressão da expressão gênica de *HSP70* (Porta et al. 2010).

Ademais, foi mostrado neste trabalho que o fator de transcrição HsfA desempenha um papel fundamental na homeostase da membrana plasmática, tanto na resposta ao estresse de membrana provocado por drogas como anfotericina B, miriocina e aureobasidina A (Figura 58), quanto na regulação da síntese de fosfolipídios insaturados (Figura 62) e esfingolipídios (Figura 59) durante o choque térmico. Tendo em vista o efeito mais proeminente de HsfA sobre a abundância de lipídios contendo ácidos graxos insaturados, a relação entre esse fator de transcrição e a $\Delta 9$ -dessaturase SdeA foi investigada, chegando-se à conclusão de que HsfA modula os níveis dessa dessaturase (Figura 63). Estes resultados sugerem que HsfA é necessário para a adaptação da membrana plasmática fúngica ao choque térmico e apontam para a existência de uma relação concisa entre a termotolerância e o metabolismo de ácidos graxos em *A. fumigatus*. Importaneamente, uma análise manual do genoma de *A. fumigatus* utilizando os motifs de ligação de Hsf1 encontrados em *C. albicans* (Leach et al. 2016) e *S. cerevisiae* (Albrecht et al. 2010) permitiu a constatação de que a região promotora de *sdeA* e *sdeB* possui ao menos um dos três mais importantes motifs de ligação de Hsf1 (dados não mostrados), apontando que HsfA pode de fato regular transcricionalmente estas dessaturases. Além disso, o resultado de que Hsp90 interage fisicamente com SdeA mostra que Hsp90 pode auxiliar a função de SdeA principalmente durante o choque térmico, quando a interação pareceu ser maior (Figura 63). Em concordância, Hsp90 de *C. albicans* interage fisicamente com as ácidos graxos sintases Fas1 e Fas2 (O'Meara et al. 2019), ao passo que Ole1 de *S. cerevisiae* interage fisicamente com Hsp82 (Millson et al. 2005), que faz parte da família das Hsp90.

Contudo, tendo em vista que, de uma maneira geral, os níveis de mRNA e proteicos de SdeA diminuem no choque térmico, uma vez que uma menor abundância de ácidos graxos insaturados, e consequentemente fosfolipídios e esfingolipídios insaturados, é necessária para a célula adaptar a fluidez da membrana plasmática a esta condição, SdeA não deve ser a enzima principal responsável pelo aumento dos níveis dos fosfolipídios insaturados no mutante *xyIP::hsfA* durante o choque de temperatura (Figura 62). Este papel pode caber a vias compensatórias não exploradas ou outras dessaturases que ainda precisam ser estudadas. Outras 6 dessaturases de ácidos graxos foram encontradas no genoma de *A. fumigatus* (Tang et al. 2018), sendo algumas delas

$\Delta 4$ -, $\Delta 5,6$ - ou $\Delta 12$ -dessaturases. Estas enzimas, no entanto, ainda carecem de caracterização. Analogamente, a hipótese de que uma degradação de lipídios complexos insaturados ocorre no mutante *xylP::hsfA* levando ao acúmulo de fosfolipídios insaturados durante o choque térmico também necessita de investigação.

Modulo 4.4 A relação entre a via de integridade da parede celular e a composição da membrana plasmática de *Aspergillus fumigatus*

4.4.1 A deleção das MAPKs *mpkA* e *sakA* provoca o acúmulo de esfingolipídios e ergosterol

Até aqui, este projeto identificou relações consistentes entre a resposta ao choque térmico e a manutenção da integridade da parede celular, bem como entre a resposta ao choque térmico e a homeostase da membrana plasmática de *A. fumigatus*. Tais relações demonstram a dependência e vínculo de diferentes proteínas e processos do metabolismo celular. Como último objetivo deste trabalho, a relação entre parede celular e membrana plasmática também foi alvo de estudo. Nos últimos anos, muitos trabalhos mostraram a existência de conexões interessantes entre moléculas lipídicas e a parede celular de fungos [revisado em Fabri et al. (2019)]. A via de biossíntese dos esfingolipídios, por exemplo, regula a atividade da via CWI em *C. neoformans* por meio da produção de diacilglicerol (Heung et al. 2004). Além disso, esfingolipídios são capazes de modular a resistência a equinocandinas, drogas estressoras da parede celular, em *C. albicans*, *C. glabrata* e *A. nidulans* (Healey et al. 2012; Healey et al. 2015). Por outro lado, a via CWI parece regular a resposta de resistência aos azóis em *C. albicans* (LaFayette et al. 2010), enquanto Mpk1 exerce função na biossíntese de fosfolipídios em leveduras (Nunez et al. 2008). Ademais, foi demonstrado que uma enzima chave da síntese de ácidos graxos de *S. cerevisiae*, também necessária para a produção de esfingolipídios, é controlada pela sinalização do fator de troca de GDP/GTP Rom2 da via CWI (Olson et al. 2015).

A fim de investigar os impactos do comprometimento da parede celular sobre alguns lipídios da membrana plasmática, os mutantes da via CWI de *A. fumigatus* (*pkcA*^{G579R}, Δ *mpkA* e Δ *rlmA*) e o mutante nulo da MAPK da via HOG (Δ *sakA*) foram submetidos à mesma análise lipidômica descrita no módulo anterior, em que esfingolipídios foram quantificados. Desta vez, o conteúdo de ergosterol dessas linhagens também foi quantificado. Os resultados da análise de esfingolipídios mostraram, primeiramente, que o estresse de parede celular causado por CR favorece o acúmulo de esfingolipídios na linhagem selvagem (ainda que sem significância estatística), mas o mesmo não ocorre na presença de CASP (Figura 65). Uma possível explicação para essa diferença é o amplo

espectro de ação e efeitos secundários do CR, que acabam afetando diversos processos celulares. Com relação às linhagens mutantes, enquanto *pkcA*^{G579R} e *ΔrlmA* apresentaram níveis ligeiramente mais elevados de esfingolípídios totais em comparação com a linhagem selvagem e os mesmos não foram muito afetados pelo estresse da parede celular, os mutantes *ΔmpkA* e *Δsaka* acumularam muito mais esfingolípídios em suas células, e tais quantidades aumentaram ainda mais na presença de CASP (Figura 65). Esse resultado sugere que as MAPKs das vias CWI e HOG desempenham um papel inibitório na síntese de esfingolípídios, uma vez que o fungo acumulou esfingolípídios na sua ausência. Curiosamente, foi observado anteriormente que tanto *mpkA* quanto *saka* interagem geneticamente com *ypkA*, um gene que codifica uma proteína quinase que regula a biossíntese de esfingolípídios (Fabri et al. 2018).

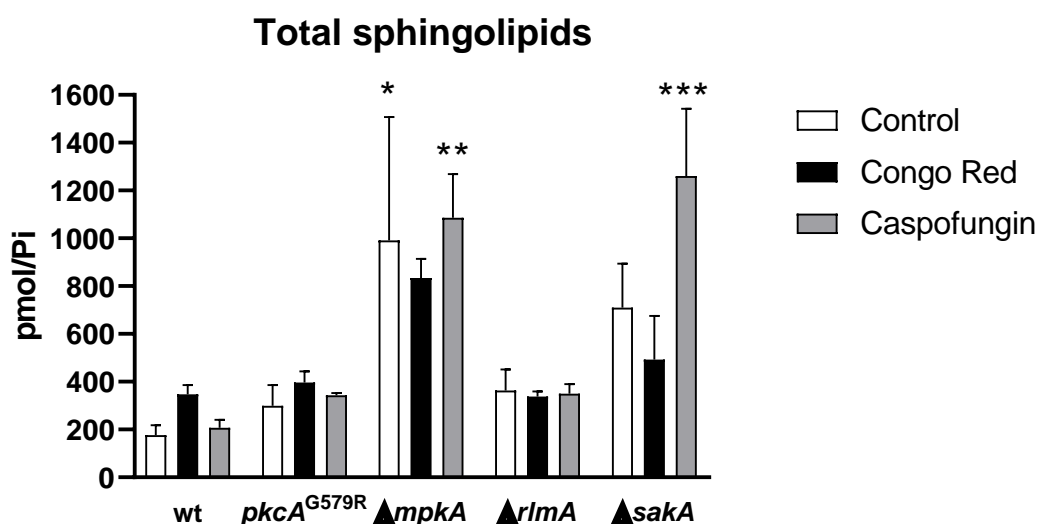


Figura 65. Os mutantes *ΔmpkA* e *Δsaka* acumulam mais esfingolípídios. As espécies de esfingolípídios das linhagens selvagem, *pkcA*^{G579R}, *ΔmpkA*, *ΔrlmA* e *Δsaka* na presença e ausência de estresse na parede celular foram medidas por espectrometria de massas e normalizadas pelos valores de fosfato inorgânico (Pi). * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$ (Two-way ANOVA com teste de Sidak em relação à linhagem selvagem na mesma condição).

A Figura 66, que mostra as espécies de esfingolípídios agrupadas em classes, confirma os resultados da Figura 65 e indica que os principais aumentos nas linhagens *ΔmpkA* e *Δsaka* foram nas concentrações de dihidroesfingosina, fitoesfingosina, ceramida e glucosilceramida, além de hidroxilceramida e hidroxilfitoceramida, o que sugere um aumento da síntese *de novo* de esfingolípídios. Como complemento, a Figura E1 do APÊNDICE E mostra as espécies individuais de esfingolípídios medidas. É importante notar que as espécies hidroxiladas de ceramidas e fitoceramidas (OH-Cer e OH-PCer) e as espécies

de glucosilceramida mais abundantes foram dramaticamente aumentadas na deleção de *mpkA*. Interessantemente, foi demonstrado anteriormente que as hidroxi-ceramidas exercem função na homeostase da membrana e na sinalização celular em diferentes tipos de células humanas (Kota and Hama 2014; Cha et al. 2016), enquanto as glucosilceramidas e outros glicosfingolipídios estão relacionados ao processo de germinação fúngica e filamentação (Fernandes et al. 2018), bem como a outros processos em diferentes organismos (Lingwood 2011). Assim, estes resultados sugerem uma possível relação integrada entre MpkA, SakA e a biossíntese de esfingolipídios nesses processos, e MpkA e SakA podem ser importantes moléculas de sinalização para a biossíntese de esfingolipídios.

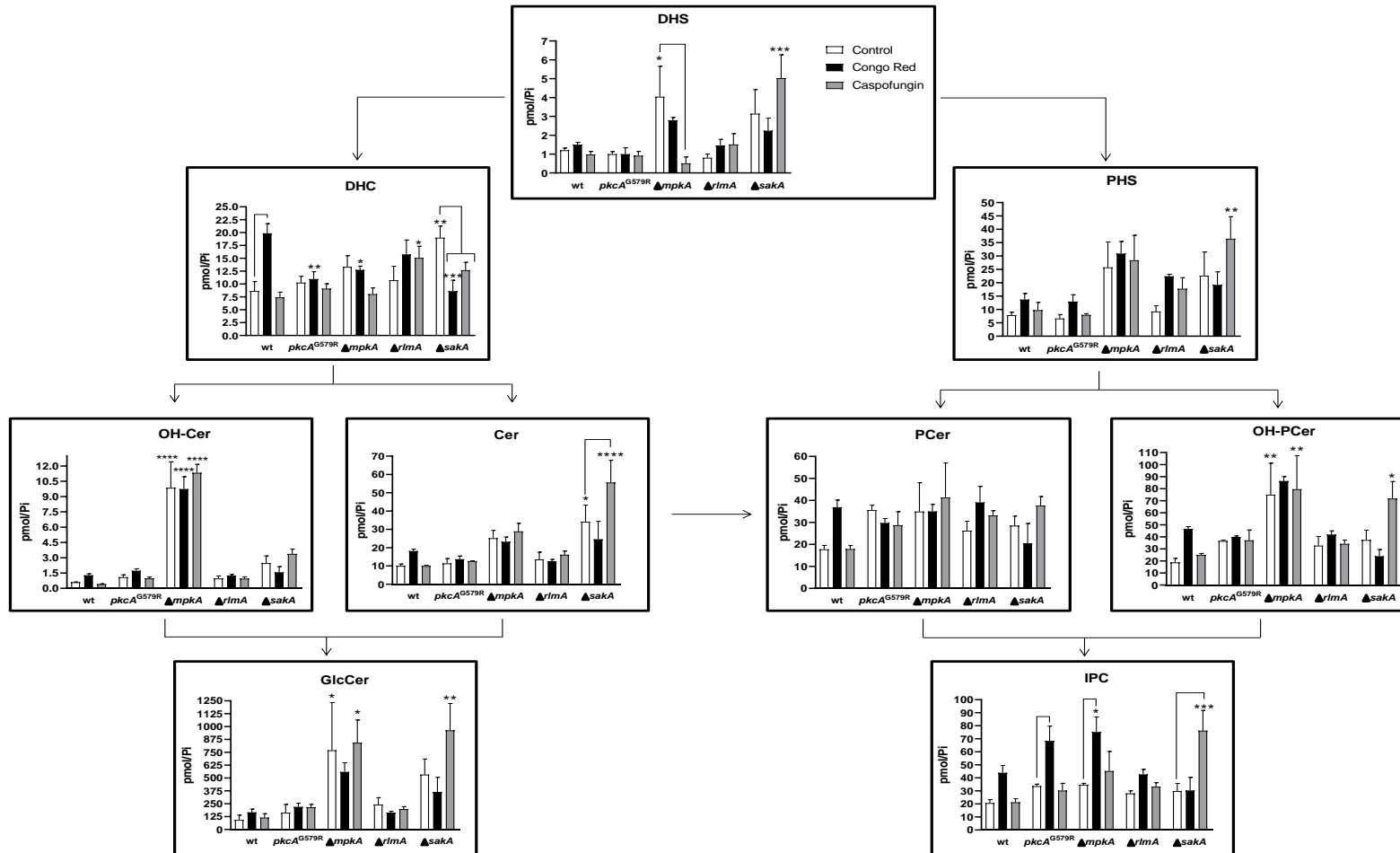


Figura 66. Gráficos da concentração de esfingolípídios nas linhagens selvagem, $\Delta saka$ e mutantes da via CWI separadas por classes. As espécies de esfingolípídios das linhagens selvagem, $pkcA^{G579R}$, $\Delta mpkA$, $\Delta rlmA$ e $\Delta saka$ na presença e ausência de estresse na parede celular causado por 300 $\mu g/ml$ de congo red ou 2 $\mu g/ml$ de caspofungin foram agrupadas de acordo com a classe dos esfingolípídios. DHS: dihidroesfingosina; DHC: dihidroceramida; Cer: ceramida; GlcCer: glucosilceramida; OH-Cer: hidroxilceramida; PHS: fitoesfingosina; PCer: fitoceramida; OH-PCer: hidroxilfitoceramida; IPC: inositolfosforil ceramida. As barras representam diferenças significativas dentro da mesma linhagem. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ e **** $p \leq 0,0001$ (Two-way ANOVA com teste de Sidak em relação à linhagem selvagem na mesma condição).

A seguir, o conteúdo de ergosterol das mesmas amostras foi quantificado por TLC (Figura F1 do APÊNDICE F). Primeiramente, notou-se que o estresse de parede celular causado por CR e CASP aumentou a concentração de ergosterol na linhagem selvagem de *A. fumigatus* (Figura 67), ainda que de maneira não estatisticamente significativa. Além disso, os mutantes da via CWI e o mutante nulo $\Delta sakA$ também apresentaram níveis mais elevados de ergosterol em relação à linhagem selvagem, sugerindo que o comprometimento da parede celular desencadeia a síntese deste esterol. Porém, novamente tais comparações não foram estatisticamente significativas. Embora o CR também não tenha aumentado significativamente a quantidade de ergosterol nas linhagens mutantes, CASP aumentou significativamente nas linhagens $\Delta mpkA$ e $\Delta sakA$ (Figura 67), de forma semelhante aos resultados da análise de esfingolipídios (Figura 66).

Em concordância com esses resultados, foi observado anteriormente que células de levedura sem Mpk1 também exibem aumento do acúmulo de esteróis livres e ésteres de esterol, além de fosfolipídios (Nunez et al. 2008), sugerindo que a via CWI é necessária para manter a homeostase lipídica adequada da levedura. Além disso, a repressão do gene *ERG9*, que codifica uma enzima da via de biossíntese do ergosterol, leva ao aumento da fosforilação de Mpk1 e ativação da via CWI em *S. cerevisiae*, o que aponta mais uma vez para uma relação concisa entre as vias CWI e de biossíntese de ergosterol (Tanaka and Tani 2018). Assim, talvez a combinação terapêutica que afinge tanto a parede celular quanto à biossíntese de ergosterol possa ser uma boa opção para o tratamento da API.

A inibição da via HOG, por sua vez, aumenta a expressão de genes de biossíntese de ergosterol e conseqüentemente o conteúdo celular de ergosterol em *C. neoformans*, sugerindo que a biossíntese de ergosterol é reprimida pela via HOG em condições normais (Ko et al. 2009). Além disso, a MAPK Hog1, o homólogo de SakA, medeia a repressão da biossíntese de ergosterol em *S. cerevisiae*, embora sua deleção diminua o conteúdo de ergosterol (Montanes et al. 2011). Ademais, Hog1 também parece regular o metabolismo de ergosterol em *C. albicans* (Herrero-de-Dios et al. 2020). Os resultados da Figura 67 sugerem que as vias CWI e HOG também apresentam papéis regulatórios repressivos sobre a biossíntese de ergosterol em *A. fumigatus*.

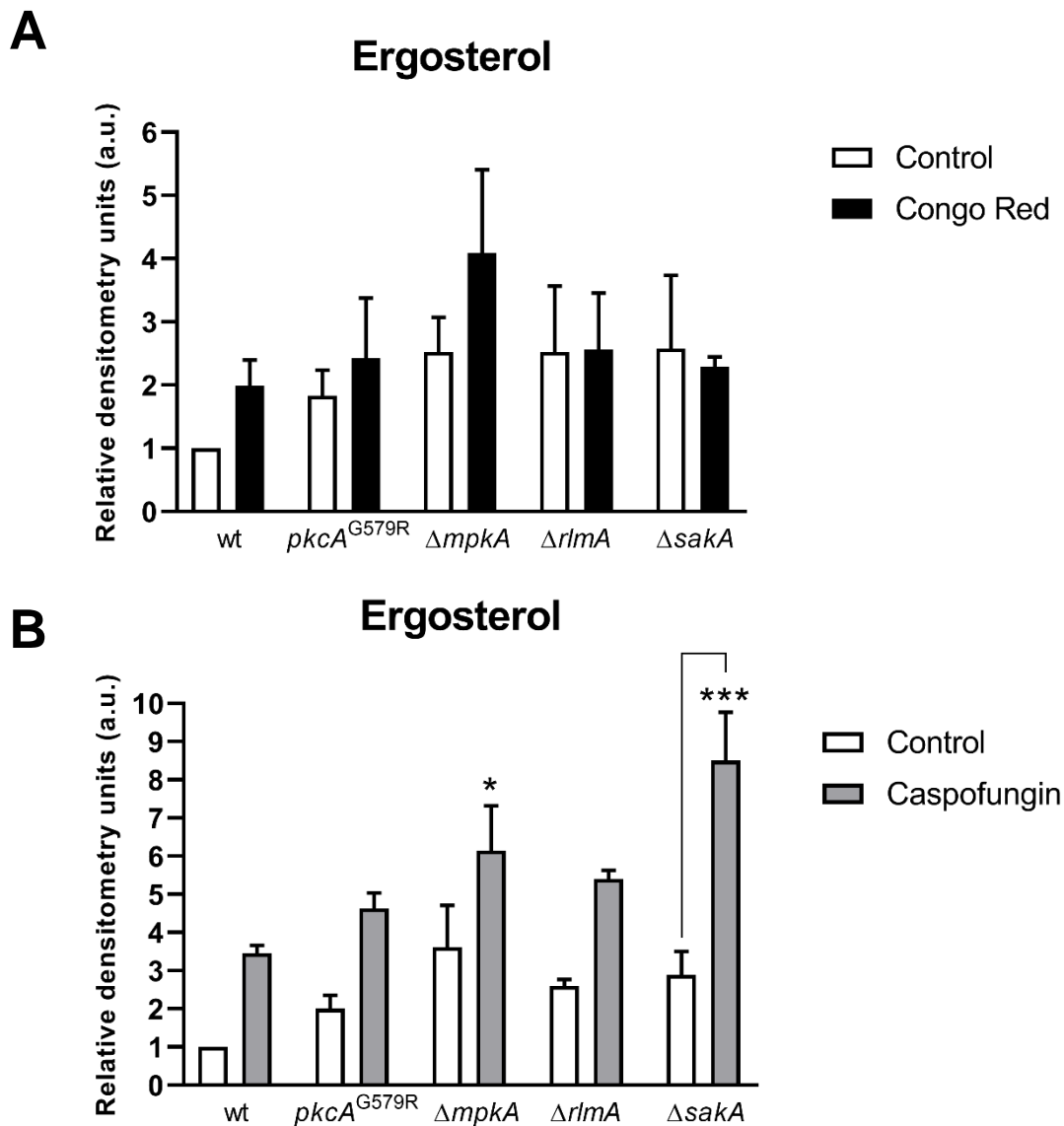


Figura 67. O comprometimento da parede celular provoca o acúmulo de ergosterol em *A. fumigatus*. A concentração de ergosterol nas linhagens selvagem, *pkcA*^{G579R}, $\Delta mpkA$, $\Delta rlmA$ e $\Delta sakA$ foi medida por densitometria após análise e separação por TLC. Os valores foram normalizados pela estimativa de Pi e plotados em relação ao controle da linhagem selvagem. (A) Comparação durante o tratamento com 300 μ g/ml de congo red. (B) Comparação durante o tratamento com 2 μ g/ml de caspofungin. As barras representam diferenças significativas dentro da mesma linhagem. * $p \leq 0,05$ e *** $p \leq 0,001$ (*Two-way* ANOVA com teste de Dunnet em relação à linhagem selvagem na mesma condição).

4.4.2 O mutante $\Delta mpkA$ é suscetível à inibição da síntese de ergosterol, enquanto o mutante $\Delta sakA$ é suscetível à inibição da síntese de esfingolípídeos e ergosterol

Em *S. cerevisiae* e *C. albicans*, Pkc1 regula a resposta e resistência aos inibidores da biossíntese de ergosterol (azóis, alilaminas e morfolinás) (LaFayette et al. 2010), uma vez que o comprometimento de Pkc1 aumenta a suscetibilidade a esses compostos, o que destaca Pkc1 e a biossíntese de

ergosterol como alvos proeminentes para uma terapia antifúngica combinatória. Além disso, mutantes de deleção dos genes da via CWI são hipersensíveis ao fluconazol em *S. cerevisiae* (Parsons et al. 2004) e *C. neoformans* (Lee et al. 2012). Tendo em vista essas informações e os resultados da análise lipidômica, a sensibilidade do mutante $\Delta mpkA$ a inibidores da síntese de ergosterol foi testada, assim como a sensibilidade ao inibidor da síntese de esfingolípídios miriocina, uma vez que esse mutante também acumulou mais esfingolípídios. Como mostrado na Figura 68, a deleção de *mpkA* levou a uma ligeira sensibilidade à lovastatina e a uma considerável suscetibilidade ao fluconazol. Já na presença de miriocina, o mutante $\Delta mpkA$ foi um pouco mais resistente que as linhagens selvagem e complementante.

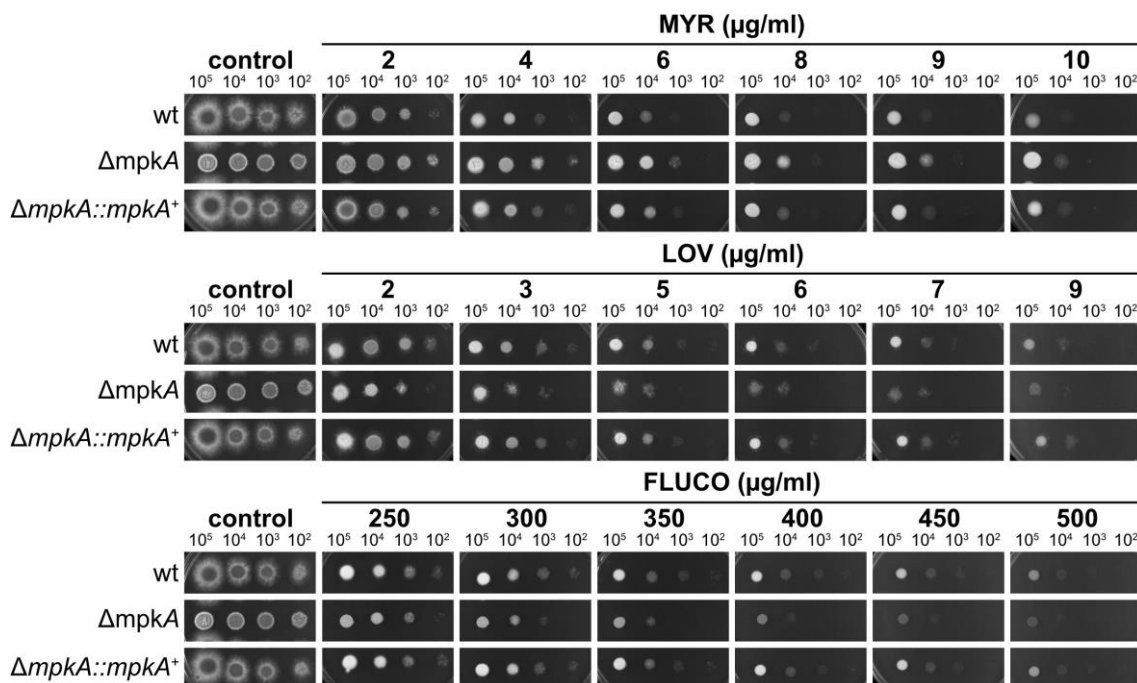


Figura 68. O mutante $\Delta mpkA$ é sensível à lovastatina e ao fluconazol. A quantidade indicada de conídios das linhagens selvagem, $\Delta mpkA$ e $\Delta mpkA::mpkA^+$ foram inoculados em MM sólido contendo as concentrações indicadas de miriocina (MYR), lovastatina (LOV) e fluconazol (FLUCO). As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas.

Apesar de acumularem mais ergosterol (Figura 67), as linhagens *pkcA*^{G579R} e $\Delta rlmA$ de *A. fumigatus* também são mais suscetíveis ao azol voriconazol do que a linhagem selvagem (Rocha et al. 2015; Rocha et al. 2016), sugerindo que os defeitos da via CWI podem aumentar a eficiência dos azóis. À princípio contraditório, o resultado do mutante $\Delta mpkA$ acumular mais ergosterol (Figura 67) e ainda assim ser mais suscetível à droga fluconazol (Figuras 68) pode ser explicado pelo fato de azóis como o fluconazol inibirem a enzima lanosterol-

demetilase, cuja perda de função leva ao acúmulo do metabólito dienol, que é fungistático para a célula fúngica (Bhattacharya et al. 2018). Dessa forma, linhagens que acumulam mais ergosterol por maior atividade de enzimas mais a jusante na via são mais sensíveis a azóis.

Uma vez que o mutante $\Delta sakA$ também acumulou mais esfingolipídios e ergosterol, a sensibilidade dessa linhagem a inibidores da síntese de esfingolipídios e ergosterol foi testada. Dessa vez, a deleção de *sakA* provocou grande suscetibilidade à miriocina e moderada sensibilidade ao fluconazol, mas não à lovastatina (Figura 69).

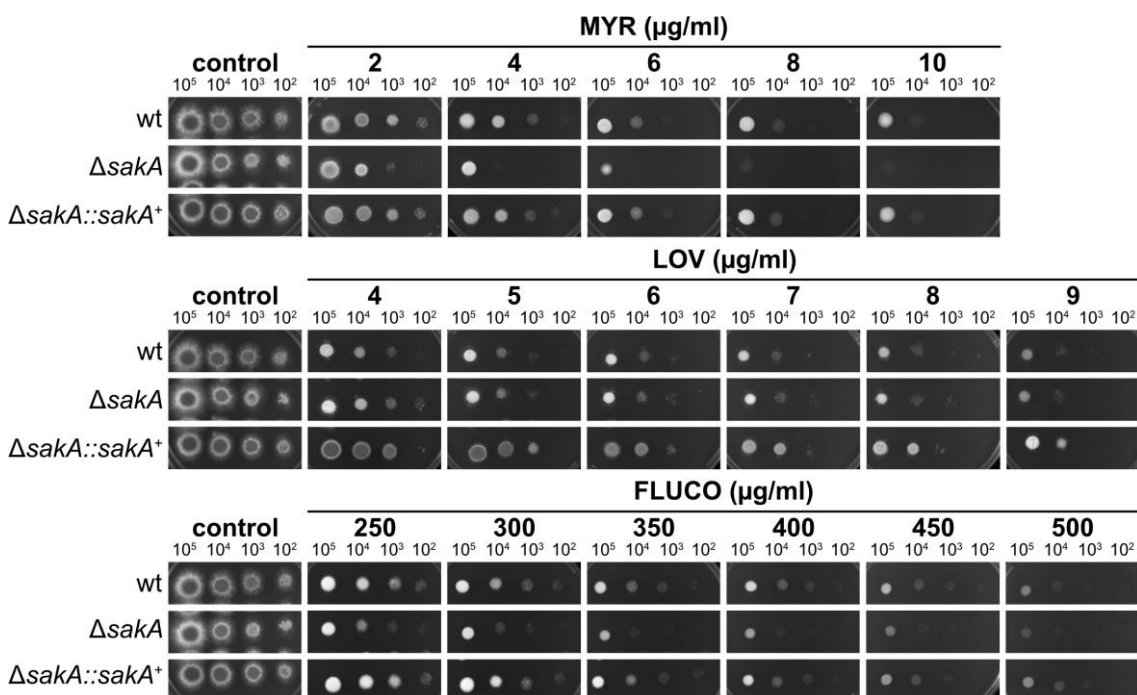


Figura 69. O mutante $\Delta sakA$ é sensível à miriocina e ao fluconazol. A quantidade indicada de conídios das linhagens selvagem, $\Delta sakA$ e $\Delta sakA::sakA^+$ foram inoculados em MM sólido contendo as concentrações indicadas de miriocina (MYR), lovastatina (LOV) e fluconazol (FLUCO). As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas.

Um mutante $\Delta sakA$ de *A. fumigatus* (originado de uma linhagem parental diferente daquela usada neste trabalho) também foi considerado mais sensível ao azol itraconazol (Kim et al. 2012). Por outro lado, a deleção do homólogo de *sakA*, *HOG1*, em *C. neoformans* aumenta a resistência aos azóis (Ko et al. 2009). Considerando os resultados acima, no futuro será interessante investigar bioquimicamente os papéis regulatórios das vias CWI e HOG sobre a biossíntese de esfingolipídios e ergosterol em *A. fumigatus*.

4.4.3 Discussão

Embora a parede celular e a membrana plasmática de organismos fúngicos sejam geralmente estudados separadamente por abordagens de genética molecular, elas frequentemente se conectam em diferentes processos celulares, como crescimento, alongamento de hifas e delimitação de áreas de deposição *de novo* de carboidratos na parede celular [revisado em Riquelme et al. (2018)]. Portanto, uma importante questão em aberto é como os polissacarídeos da parede celular e as proteínas de membrana se unem para guiar e permitir a morfogênese da parede celular [revisado em Gow et al. (2017)]. Em geral, abordagens de genética reversa têm mostrado há algum tempo que perturbações na CWI também causam maior suscetibilidade a agentes estressores da membrana. Um exemplo claro é o detergente aniônico SDS, que é amplamente utilizado em triagens genéticas e como ferramenta para avaliar características fenotípicas em mutantes da parede celular ou da membrana plasmática. O SDS não só desestabiliza as membranas celulares, como também desnatura as proteínas da parede celular, o que por sua vez pode interferir nas cascatas de sinalização associadas à CWI. Como consequência, os mutantes com parede celular defeituosa, inclusive em *A. fumigatus*, são mais suscetíveis a danos na membrana plasmática (Valiante et al. 2008; Valiante et al. 2009; Rocha et al. 2015; Rocha et al. 2016). Além disso, uma parede celular defeituosa pode facilitar a internalização de fármacos, resultando na potencialização de azóis ou na eficiência da anfotericina B, sendo esta a premissa para o emprego de uma estratégia de terapia combinada visando a parede celular e a membrana plasmática, concomitantemente. No entanto, as consequências do estresse à parede celular e como ele se reflete na membrana plasmática e vice-versa são pouco compreendidas, especialmente em fungos filamentosos, em grande parte devido às dificuldades técnicas para se isolar coletivamente as estruturas de parede celular ou membrana celular intactas e nativas.

MpkA é a MAPK da via CWI (Figura 4), a qual responde ao estresse de parede celular e atua na biossíntese e remodelamento desta estrutura. Neste trabalho, foi verificado que o mutante nulo $\Delta mpkA$ em *A. fumigatus* acumula esfingolipídios (Figuras 65 e 66), uma importante classe de lipídios com função estrutural e de sinalização, sugerindo um papel regulador da via CWI sobre a síntese de esfingolipídios. Esse acúmulo pode explicar a sutil resistência do

mutante $\Delta mpkA$ ao inibidor da síntese de esfingolipídios miriocina (Figura 68). Em *S. cerevisiae*, a via de sinalização que regula a biossíntese de esfingolipídios compreende uma cascata de sinalização ativada por duas proteínas quinases associadas à membrana plasmática: Pkh1 e Pkh2 (Casamayor et al. 1999). Essas proteínas fosforilam e ativam as quinases Ypk1 e Ypk2 (homólogas de YpkA em *A. fumigatus*), que por sua vez fosforilam e inibem as proteínas Orm1 e Orm2 na membrana do retículo endoplasmático, levando à ativação da biossíntese de esfingolipídios (Roelants et al. 2002; Roelants et al. 2011). Numerosos estudos mostraram que a cascata de sinalização dos esfingolipídios se conecta de fato a diferentes etapas da via CWI em leveduras, corroborando os resultados apresentados neste trabalho. Pkh1 e Pkh2, por exemplo, interagem e ativam Pkc1 (a proteína quinase apical da via CWI), especialmente durante o aumento da concentração *in vitro* de bases esfingóides, que são as unidades estruturais dos esfingolipídios (Inagaki et al. 1999; Friant et al. 2001; Roelants et al. 2004). Na verdade, maiores níveis das bases esfingóides, como dihidroesfingosina e fitoesfingosina, parecem ativar o módulo de sinalização Pkh1/Pkh2, Ypk1/Ypk2 e, conseqüentemente, Pkc1 (Friant et al. 2001; Liu et al. 2005). Além disso, Ypk1/Ypk2 também mantêm a GTPase Rho1 posicionada na membrana plasmática, permitindo assim a ativação de Pkc1 em resposta ao estresse da membrana (Hatakeyama et al. 2017). Em *A. fumigatus*, Rho1 é uma proteína com localização na ponta apical, ou seja, em áreas de novo crescimento da célula fúngica, enquanto Rho4 é uma proteína essencialmente localizada na membrana plasmática de toda a hifa (Dichtl et al. 2010; Dichtl et al. 2012). Assim, investigar o papel dos lipídios de membrana na ativação da CWI via participação de proteínas Rho pode ser uma estratégia bastante relevante para a busca de novas maneiras de interferir na estabilidade da parede celular em fungos. Semelhantemente, o metabolismo dos esfingolipídios também regula a CWI no patógeno *C. neoformans*. Neste fungo, a inositolfosforil ceramida sintase 1 (Ipc1), uma enzima do ramo ácido da via de biossíntese dos esfingolipídios necessária para a síntese de inositolfosforil ceramidas e inibida pelo antibiótico aureobasidina A, é capaz de ativar Pkc1 por meio da formação de diacilglicerol durante sua reação enzimática (Luberto et al. 2001; Heung et al. 2004)

Por sua vez, Zhang et al. (2004) mostraram que Pkc1 de *S. cerevisiae* controla a expressão de Ypk1, uma vez que células $\Delta PKC1$ exibem níveis mais

baixos de Ypk1 não fosforilada. Em concordância, a superexpressão de *RHO2*, *ROM2* e *PKC1* na levedura atenua os defeitos de crescimento causados pelo tratamento com miriocina (Kobayashi et al. 2005). Sendo Ypk1 fosforilada a forma proteica de Ypk1 que está associada a uma maior síntese de esfingolipídios, os resultados de Zhang et al. (2004) sugerem que o mutante $\Delta PKC1$ acumula menos esfingolipídios, diferentemente do mutante $\Delta mpkA$ em *A. fumigatus*. Isso pode significar que a regulação feita por MpkA (ou Mpk1 em *S. cerevisiae*) é independente da via CWI. De fato, como MpkA e YpkA interagem geneticamente em *A. fumigatus*, mas não fisicamente quando as células são expostas ao choque térmico (Fabri et al. 2018), o mecanismo regulatório de MpkA e YpkA parece ser indireto e ambas as proteínas quinases devem atuar em vias paralelas para garantir a sobrevivência do fungo. Independentemente, os esfingolipídios são essenciais para a formação das chamadas jangadas lipídicas e, conseqüentemente, para o posicionamento de proteínas à superfície celular. Assim, um possível significado biológico para estas interações entre a via de sinalização dos esfingolipídios e a via CWI é que o crescimento da membrana plasmática por fusão de vesículas enriquecidas com esfingolipídios é monitorado e acoplado à expansão da parede celular, e este processo pode exigir a regulação paralela de Pkh1/Pkh2, Ypk1/Ypk2 e Pkc1-Mpk1 (e seus homólogos em *A. fumigatus*) [revisado em Levin (2005)].

Outra via de sinalização de proteínas MAPKs em fungos é a via HOG, que atua principalmente na resposta ao estresse osmótico, mas também responde ao estresse de parede celular (Bermejo et al. 2008; Garcia et al. 2009; Altwasser et al. 2015; Bruder Nascimento et al. 2016). No organismo modelo *S. cerevisiae*, tais estresses iniciam uma resposta de sinalização que resulta na fosforilação da proteína Pbs2, que ativa a MAPK Hog1 (homólogo de SakA e MpkC em *A. fumigatus*), responsável por ativar diferentes fatores de transcrição que coordenam vários processos necessários para a adaptação celular [revisado em Hohmann (2009)]. Os resultados aqui apresentados mostraram, semelhantemente ao gene *mpkA*, que a perda de função de *sakA* provoca o acúmulo de esfingolipídios em *A. fumigatus* (Figuras 65 e 66), sugerindo que SakA, e possivelmente a via HOG, regulam a biossíntese desses lipídios. Essa relação havia sido encontrada apenas em *S. cerevisiae*, em que mutantes nulos de genes envolvidos na via HOG, como *PBS2* e *HOG1*, resultaram em

quantidades aumentadas de esfingolipídios, como inositolfosforil ceramidas e ceramidas, respectivamente, sugerindo a ocorrência de um *feedback* entre sinais de estresse osmótico e a homeostase de esfingolipídios (da Silveira Dos Santos et al. 2014). Além disso, já foi relatado que diferentes perturbações na homeostase dos esfingolipídios levam à ativação da via HOG em levedura, como (i) a inibição da biossíntese de esfingolipídios por meio do tratamento com miriocina ou aureobasidina A; (ii) a adição exógena de ceramida; (iii) e a perda de Isc1 (inositol fosfosfingolipídeo fosfolipase C), que produz ceramidas a partir de manosilinositol fosforilceramidas (Barbosa et al. 2012; Tanigawa et al. 2012). Em concordância com esses estudos, a ativação de SakA é induzida pela perda de função de *ypkA* em *A. fumigatus*, organismo no qual YpkA e SakA interagem genética e fisicamente (Fabri et al. 2018). Contudo, o paradoxo entre os fenótipos de acúmulo de esfingolipídios (Figuras 65 e 66) e de maior suscetibilidade à miriocina (Figura 68) apresentados pela linhagem $\Delta sakA$ ainda precisa ser melhor investigado para o completo entendimento da regulação feita pela via HOG na biossíntese de esfingolipídios.

Apesar da extensa literatura sobre a relação entre as vias CWI ou HOG e a síntese de esfingolipídios, pouco foi descoberto sobre a relação entre ambas cascatas de sinalização e a via biosintética de ergosterol, especialmente em *A. fumigatus*. Os poucos trabalhos que focaram nesse tema já foram citados durante a apresentação dos resultados deste módulo, com os quais foi observado um claro acúmulo de ergosterol em células $\Delta mpkA$ e $\Delta sakA$ (Figura 67), sugerindo que as vias CWI e HOG regulam a biossíntese desse lipídio. No entanto, o efeito da depleção de ergosterol na ativação de MpkA e o papel regulador de PkcA na biossíntese de ergosterol, previamente observado em homólogos de *S. cerevisiae* e *C. albicans* (LaFayette et al. 2010; Tanaka and Tani 2018)], ainda precisam ser investigados em *A. fumigatus*. Analogamente, o nível de fosforilação, e consequentemente ativação, de SakA durante a inibição da síntese de ergosterol precisa ser estudado. Recentemente, foi verificado em nosso laboratório por meio de MicroArray que o fator de transcrição RlmA regula a expressão de genes envolvidos na via de biossíntese de ergosterol (dados não publicados). Dados do nosso laboratório indicam também que grande parte dos alvos transcripcionais de RlmA dependem da ativação do eixo PkcA-MpkA e da fosforilação de RlmA (Rocha et al. 2016; Rocha et al. 2020a). Porém, se as

ações e a contribuição de RlmA sobre a biossíntese de ergosterol são diretas ou estritamente dependentes de PkcA ou MpkA ainda não foi investigado.

5. Conclusões

5. Conclusão

Uma caracterização detalhada do fator de transcrição de choque térmico HsfA foi realizada neste trabalho, demonstrando o papel desta proteína na resposta ao estresse de temperatura e na manutenção da integridade da parede celular do fungo *A. fumigatus*. Adicionalmente, a dessaturase de ácidos graxos SdeA e o pseudogene *sdeB* também foram estudados, sendo verificada a importância de ambos para a homeostase dos lipídios de membrana plasmática. Ademais, a relação entre HsfA e o metabolismo de lipídios foi investigada, demonstrando que HsfA é importante para a síntese de fosfolipídios e esfingolipídios e regula a expressão da dessaturase SdeA e do pseudogene *sdeB*. Por fim, foi observado que as MAPKs MpkA e SakA regulam a síntese de esfingolipídios e ergosterol. Estes resultados mostram que as estruturas e processos celulares dos microrganismos muitas vezes se relacionam e interconectam. Os progressos mais relevantes obtidos nesta tese levam à conclusão de que:

- O fator de transcrição HsfA é essencial para a termotolerância de *A. fumigatus*, importante para a tolerância ao estresse de parede celular e oxidativo, e necessário para a completa virulência deste patógeno;
- *hsfA* interage geneticamente com os genes *pkcA*, *mpkA* e *sakA*, que fazem parte das vias de sinalização CWI e HOG, respectivamente;
- O choque térmico e o estresse da parede celular espessam a parede celular fúngica e desencadeiam a expressão coordenada de *hsfA* e *hsp90*, a qual é regulada pelos componentes da via de sinalização CWI PkcA e MpkA;
- HsfA regula a expressão de genes relacionados à resposta ao choque térmico, biossíntese e remodelamento da parede celular e homeostase lipídica;
- A proteína HsfA também regula a síntese de fosfolipídios e esfingolipídios em *A. fumigatus*;
- O gene *sdeA* é essencial em *A. fumigatus* e codifica uma dessaturase de ácidos graxos importante para a produção de ácido oleico e palmitoleico e para a homeostase de fosfolipídios;
- *sdeB* é um pseudogene que exerce importante papel na virulência de *A. fumigatus*;

- *sdeA* e *sdeB* interagem geneticamente e modulam suas expressões mutuamente;
- A expressão de SdeA é regulada pelo fator de transcrição HsfA;
- MpkA e SakA, as MAPKs das vias CWI e HOG, modulam negativamente a síntese de esfingolipídios e ergosterol, o que conecta a via CWI com o metabolismo de lipídios da membrana plasmática.

6. Referências Bibliográficas

6. Referências Bibliográficas

- Abad A, Victoria Fernandez-Molina J, Bikandi J, Ramirez A, Margareto J, Sendino J, Luis Hernando F, Ponton J, Garaizar J, Rementeria A. 2010. What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Rev Iberoam Micol* **27**(4): 155-182.
- Akerfelt M, Morimoto RI, Sistonen L. 2010. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(8): 545-555.
- Al-Bader N, Vanier G, Liu H, Gravelat FN, Urb M, Hoareau CM, Campoli P, Chabot J, Filler SG, Sheppard DC. 2010. Role of trehalose biosynthesis in *Aspergillus fumigatus* development, stress response, and virulence. *Infect Immun* **78**(7): 3007-3018.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Roberts K, Walter P. 2007. *Molecular Biology of the Cell*, New York
- Albrecht D, Guthke R, Brakhage AA, Kniemeyer O. 2010. Integrative analysis of the heat shock response in *Aspergillus fumigatus*. *BMC genomics* **11**: 32.
- Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Garcia-Effron G, Lopez JF, Grimalt JO, Cuenca-Estrella JM, Rodriguez-Tudela JL. 2008. Ergosterol biosynthesis pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Steroids* **73**(3): 339-347.
- Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M. 1996. *Introductory mycology*. Wiley, New York.
- Altwasser R, Baldin C, Weber J, Guthke R, Kniemeyer O, Brakhage AA, Linde J, Valiante V. 2015. Network Modeling Reveals Cross Talk of MAP Kinases during Adaptation to Caspofungin Stress in *Aspergillus fumigatus*. *PloS one* **10**(9): e0136932.
- Alves de Castro P, Dos Reis TF, Dolan SK, Oliveira Manfiolli A, Brown NA, Jones GW, Doyle S, Riano-Pachon DM, Squina FM, Caldana C et al. 2016. The *Aspergillus fumigatus* SchA(SCH9) kinase modulates SakA(HOG1) MAP kinase activity and it is essential for virulence. *Molecular microbiology* **102**(4): 642-671.
- Amoros M, Estruch F. 2001. Hsf1p and Msn2/4p cooperate in the expression of *Saccharomyces cerevisiae* genes HSP26 and HSP104 in a gene- and stress type-dependent manner. *Mol Microbiol* **39**(6): 1523-1532.
- Araujo R, Rodrigues AG. 2004. Variability of germinative potential among pathogenic species of *Aspergillus*. *J Clin Microbiol* **42**(9): 4335-4337.
- Baker SEaB, J. W. 2008. An overview of the genus *Aspergillus*. In *The Aspergilli: genomics, medical aspects, biotechnology, and research methods*, (ed. GH GOLDMAN, OSMANI, S. A.), pp. 3-13. CRC Press, Boca Raton.
- Balogh G, Horvath I, Nagy E, Hoyk Z, Benko S, Bensaude O, Vigh L. 2005. The hyperfluidization of mammalian cell membranes acts as a signal to initiate the heat shock protein response. *The FEBS journal* **272**(23): 6077-6086.
- Barbosa AD, Graca J, Mendes V, Chaves SR, Amorim MA, Mendes MV, Moradas-Ferreira P, Corte-Real M, Costa V. 2012. Activation of the Hog1p kinase in Isc1p-deficient yeast cells is associated with mitochondrial dysfunction,

oxidative stress sensitivity and premature aging. *Mechanisms of ageing and development* **133**(5): 317-330.

Beauvais A, Schmidt C, Guadagnini S, Roux P, Perret E, Henry C, Paris S, Mallet A, Prevost MC, Latge JP. 2007. An extracellular matrix glues together the aerial-grown hyphae of *Aspergillus fumigatus*. *Cellular microbiology* **9**(6): 1588-1600.

Benedict K, Jackson BR, Chiller T, Beer KD. 2019. Estimation of Direct Healthcare Costs of Fungal Diseases in the United States. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **68**(11): 1791-1797.

Bergman A, Casadevall A. 2010. Mammalian endothermy optimally restricts fungi and metabolic costs. *MBio* **1**(5).

Bermejo C, Rodriguez E, Garcia R, Rodriguez-Pena JM, Rodriguez de la Concepcion ML, Rivas C, Arias P, Nombela C, Posas F, Arroyo J. 2008. The sequential activation of the yeast HOG and SLT2 pathways is required for cell survival to cell wall stress. *Molecular biology of the cell* **19**(3): 1113-1124.

Berthier E, Lim FY, Deng Q, Guo CJ, Kontoyiannis DP, Wang CC, Rindy J, Beebe DJ, Huttenlocher A, Keller NP. 2013. Low-volume toolbox for the discovery of immunosuppressive fungal secondary metabolites. *PLoS Pathog* **9**(4): e1003289.

Bhabhra R, Askew DS. 2005. Thermotolerance and virulence of *Aspergillus fumigatus*: role of the fungal nucleolus. *Medical mycology* **43 Suppl 1**: S87-93.

Bhabhra R, Miley MD, Mylonakis E, Boettner D, Fortwendel J, Panepinto JC, Postow M, Rhodes JC, Askew DS. 2004. Disruption of the *Aspergillus fumigatus* gene encoding nucleolar protein CgrA impairs thermotolerant growth and reduces virulence. *Infect Immun* **72**(8): 4731-4740.

Bhattacharya S, Esquivel BD, White TC. 2018. Overexpression or Deletion of Ergosterol Biosynthesis Genes Alters Doubling Time, Response to Stress Agents, and Drug Susceptibility in *Saccharomyces cerevisiae*. *mBio* **9**(4).

Bitencourt TA, Komoto TT, Massaroto BG, Miranda CE, Belebony RO, Marins M, Fachin AL. 2013. Trans-chalcone and quercetin down-regulate fatty acid synthase gene expression and reduce ergosterol content in the human pathogenic dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *BMC complementary and alternative medicine* **13**: 229.

Bligh EG, Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**(8): 911-917.

Bolger AM, Lohse M, Usadel B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**(15): 2114-2120.

Borges JC, Ramos CH. 2005. Protein folding assisted by chaperones. *Protein Pept Lett* **12**(3): 257-261.

Borkovich KA, Farrelly FW, Finkelstein DB, Taulien J, Lindquist S. 1989. hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. *Molecular and cellular biology* **9**(9): 3919-3930.

Boy-Marcotte E, Lagniel G, Perrot M, Bussereau F, Boudsocq A, Jacquet M, Labarre J. 1999. The heat shock response in yeast: differential regulations and

- contributions of the Msn2p/Msn4p and Hsf1p regulons. *Mol Microbiol* **33**(2): 274-283.
- Brakhage AA, Langfelder K. 2002. Menacing mold: the molecular biology of *Aspergillus fumigatus*. *Annu Rev Microbiol* **56**: 433-455.
- Brown AJ, Leach MD, Nicholls S. 2010. The relevance of heat shock regulation in fungal pathogens of humans. *Virulence* **1**(4): 330-332.
- Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG, White TC. 2012. Hidden killers: human fungal infections. *Science translational medicine* **4**(165): 165rv113.
- Bruder Nascimento AC, Dos Reis TF, de Castro PA, Hori JI, Bom VL, de Assis LJ, Ramalho LN, Rocha MC, Malavazi I, Brown NA et al. 2016. Mitogen activated protein kinases SakA(HOG1) and MpkC collaborate for *Aspergillus fumigatus* virulence. *Mol Microbiol* **100**(5): 841-859.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL et al. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry* **55**(4): 611-622.
- Camps SM, van der Linden JW, Li Y, Kuijper EJ, van Dissel JT, Verweij PE, Melchers WJ. 2012. Rapid induction of multiple resistance mechanisms in *Aspergillus fumigatus* during azole therapy: a case study and review of the literature. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **56**(1): 10-16.
- Carratu L, Franceschelli S, Pardini CL, Kobayashi GS, Horvath I, Vigh L, Maresca B. 1996. Membrane lipid perturbation modifies the set point of the temperature of heat shock response in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**(9): 3870-3875.
- Casadevall A. 2012. Fungi and the rise of mammals. *PLoS pathogens* **8**(8): e1002808.
- Casadevall A, Kontoyiannis DP, Robert V. 2019. On the Emergence of *Candida auris*: Climate Change, Azoles, Swamps, and Birds. *mBio* **10**(4).
- Casamayor A, Torrance PD, Kobayashi T, Thorner J, Alessi DR. 1999. Functional counterparts of mammalian protein kinases PDK1 and SGK in budding yeast. *Current biology* : **CB** **9**(4): 186-197.
- Cha HJ, He C, Zhao H, Dong Y, An IS, An S. 2016. Intercellular and intracellular functions of ceramides and their metabolites in skin (Review). *International journal of molecular medicine* **38**(1): 16-22.
- Chatterjee S, Tatu U. 2017. Heat shock protein 90 localizes to the surface and augments virulence factors of *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Negl Trop Dis* **11**(8): e0005836.
- Chaverroche MK, Ghigo JM, d'Enfert C. 2000. A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic acids research* **28**(22): E97.
- Chayakulkeeree M, Rude TH, Toffaletti DL, Perfect JR. 2007. Fatty acid synthesis is essential for survival of *Cryptococcus neoformans* and a potential fungicidal target. *Antimicrob Agents Chemother* **51**(10): 3537-3545.

- Cheetham SW, Faulkner GJ, Dinger ME. 2020. Overcoming challenges and dogmas to understand the functions of pseudogenes. *Nature reviews Genetics* **21**(3): 191-201.
- Clarke NG, Dawson RM. 1981. Alkaline O leads to N-transacylation. A new method for the quantitative deacylation of phospholipids. *Biochem J* **195**(1): 301-306.
- Cole JA, Meyers SA. 2011. Osmotic stress stimulates phosphorylation and cellular expression of heat shock proteins in rhesus macaque sperm. *J Androl* **32**(4): 402-410.
- Colot HV, Park G, Turner GE, Ringelberg C, Crew CM, Litvinkova L, Weiss RL, Borkovich KA, Dunlap JC. 2006. A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(27): 10352-10357.
- Costa JH, Wassano CI, Angolini CFF, Scherlach K, Hertweck C, Pacheco Fill T. 2019. Antifungal potential of secondary metabolites involved in the interaction between citrus pathogens. *Sci Rep* **9**(1): 18647.
- Cowart LA, Gandy JL, Tholanikunnel B, Hannun YA. 2010. Sphingolipids mediate formation of mRNA processing bodies during the heat-stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* **431**(1): 31-38.
- Cowart LA, Okamoto Y, Pinto FR, Gandy JL, Almeida JS, Hannun YA. 2003. Roles for sphingolipid biosynthesis in mediation of specific programs of the heat stress response determined through gene expression profiling. *J Biol Chem* **278**(32): 30328-30338.
- Cowen LE. 2009. Hsp90 orchestrates stress response signaling governing fungal drug resistance. *PLoS pathogens* **5**(8): e1000471.
- Cowen LE, Lindquist S. 2005. Hsp90 potentiates the rapid evolution of new traits: drug resistance in diverse fungi. *Science* **309**(5744): 2185-2189.
- Criddle DN, Gillies S, Baumgartner-Wilson HK, Jaffar M, Chinje EC, Passmore S, Chvanov M, Barrow S, Gerasimenko OV, Tepikin AV et al. 2006. Menadione-induced reactive oxygen species generation via redox cycling promotes apoptosis of murine pancreatic acinar cells. *J Biol Chem* **281**(52): 40485-40492.
- da Silva Ferreira ME, Kress MR, Savoldi M, Goldman MH, Hartl A, Heinekamp T, Brakhage AA, Goldman GH. 2006. The *akuB*(KU80) mutant deficient for nonhomologous end joining is a powerful tool for analyzing pathogenicity in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic cell* **5**(1): 207-211.
- da Silveira Dos Santos AX, Riezman I, Aguilera-Romero MA, David F, Piccolis M, Loewith R, Schaad O, Riezman H. 2014. Systematic lipidomic analysis of yeast protein kinase and phosphatase mutants reveals novel insights into regulation of lipid homeostasis. *Molecular biology of the cell* **25**(20): 3234-3246.
- Daum G, Lees ND, Bard M, R. D. 1998. *Biochemistry, Cell Biology and Molecular Biology of Lipids of Saccharomyces cerevisiae*.
- Denning DW. 1998. Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* **26**(4): 781-803; quiz 804-785.

Denning DW, Bromley MJ. 2015. Infectious Disease. How to bolster the antifungal pipeline. *Science* **347**(6229): 1414-1416.

Dichtl K, Ebel F, Dirr F, Routier FH, Heesemann J, Wagener J. 2010. Farnesol misplaces tip-localized Rho proteins and inhibits cell wall integrity signalling in *Aspergillus fumigatus*. *Mol Microbiol* **76**(5): 1191-1204.

Dichtl K, Helmschrott C, Dirr F, Wagener J. 2012. Deciphering cell wall integrity signalling in *Aspergillus fumigatus*: identification and functional characterization of cell wall stress sensors and relevant Rho GTPases. *Mol Microbiol* **83**(3): 506-519.

Dichtl K, Samantaray S, Wagener J. 2016. Cell wall integrity signalling in human pathogenic fungi. *Cellular microbiology* **18**(9): 1228-1238.

Dickson RC, Nagiec EE, Skrzypek M, Tillman P, Wells GB, Lester RL. 1997. Sphingolipids are potential heat stress signals in *Saccharomyces*. *J Biol Chem* **272**(48): 30196-30200.

Digel I. 2011. Primary thermosensory events in cells. *Advances in experimental medicine and biology* **704**: 451-468.

Dinamarco TM, Almeida RS, de Castro PA, Brown NA, dos Reis TF, Ramalho LN, Savoldi M, Goldman MH, Goldman GH. 2012. Molecular characterization of the putative transcription factor SebA involved in virulence in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell* **11**(4): 518-531.

Dirr F, Echtenacher B, Heesemann J, Hoffmann P, Ebel F, Wagener J. 2010. AfMkk2 is required for cell wall integrity signaling, adhesion, and full virulence of the human pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Int J Med Microbiol* **300**(7): 496-502.

Do JH, Yamaguchi R, Miyano S. 2009. Exploring temporal transcription regulation structure of *Aspergillus fumigatus* in heat shock by state space model. *BMC Genomics* **10**: 306.

Dong W, Nie X, Zhu H, Liu Q, Shi K, You L, Zhang Y, Fan H, Yan B, Niu C et al. 2021. Mycobacterial fatty acid catabolism is repressed by FdmR to sustain lipogenesis and virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **118**(16).

Eastmond DL, Nelson HC. 2006. Genome-wide analysis reveals new roles for the activation domains of the *Saccharomyces cerevisiae* heat shock transcription factor (Hsf1) during the transient heat shock response. *The Journal of biological chemistry* **281**(43): 32909-32921.

Ejsing CS, Sampaio JL, Surendranath V, Duchoslav E, Ekroos K, Klemm RW, Simons K, Shevchenko A. 2009. Global analysis of the yeast lipidome by quantitative shotgun mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(7): 2136-2141.

Ells R, Kock JL, Van Wyk PW, Botes PJ, Pohl CH. 2009. Arachidonic acid increases antifungal susceptibility of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **63**(1): 124-128.

Ericson ME, Subramanian C, Frank MW, Rock CO. 2017. Role of Fatty Acid Kinase in Cellular Lipid Homeostasis and SaeRS-Dependent Virulence Factor Expression in *Staphylococcus aureus*. *mBio* **8**(4).

- Erkine AM, Adams CC, Diken T, Gross DS. 1996. Heat shock factor gains access to the yeast HSC82 promoter independently of other sequence-specific factors and antagonizes nucleosomal repression of basal and induced transcription. *Molecular and cellular biology* **16**(12): 7004-7017.
- Erkine AM, Magrogan SF, Sekinger EA, Gross DS. 1999. Cooperative binding of heat shock factor to the yeast HSP82 promoter in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol* **19**(3): 1627-1639.
- Ernst R, Ballweg S, Levental I. 2020. Corrigendum to "Cellular mechanisms of physicochemical membrane homeostasis" [Curr Opin Cell Biol (2018) 44-51]. *Current opinion in cell biology* **63**: 212.
- Fabri J, de Sa NP, Malavazi I, Del Poeta M. 2020. The dynamics and role of sphingolipids in eukaryotic organisms upon thermal adaptation. *Progress in lipid research* **80**: 101063.
- Fabri J, Godoy NL, Rocha MC, Munshi M, Cocio TA, von Zeska Kress MR, Fill TP, da Cunha AF, Del Poeta M, Malavazi I. 2018. The AGC Kinase YpkA Regulates Sphingolipids Biosynthesis and Physically Interacts With SakA MAP Kinase in *Aspergillus fumigatus*. *Frontiers in microbiology* **9**: 3347.
- Fabri J, Rocha MC, Fernandes CM, Persinoti GF, Ries LNA, da Cunha AF, Goldman GH, Del Poeta M, Malavazi I. 2021. The Heat Shock Transcription Factor HsfA Is Essential for Thermotolerance and Regulates Cell Wall Integrity in *Aspergillus fumigatus*. *Frontiers in microbiology* **12**: 656548.
- Fabri J, Rocha MC, Malavazi I. 2019. Overview of the Interplay Between Cell Wall Integrity Signaling Pathways and Membrane Lipid biosynthesis in fungi: perspectives for *Aspergillus fumigatus*. *Curr Protein Pept Sci*.
- Fan Z, Yu H, Guo Q, He D, Xue B, Xie X, Yokoyama K, Wang L. 2016. Identification and characterization of an anti-oxidative stress-associated mutant of *Aspergillus fumigatus* transformed by *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular medicine reports* **13**(3): 2367-2376.
- Fanos V, Cataldi L. 2000. Amphotericin B-induced nephrotoxicity: a review. *Journal of chemotherapy* **12**(6): 463-470.
- Fernandes CM, de Castro PA, Singh A, Fonseca FL, Pereira MD, Vila TV, Atella GC, Rozental S, Savoldi M, Del Poeta M et al. 2016. Functional characterization of the *Aspergillus nidulans* glucosylceramide pathway reveals that LCB Delta8-desaturation and C9-methylation are relevant to filamentous growth, lipid raft localization and Psd1 defensin activity. *Mol Microbiol* **102**(3): 488-505.
- Fernandes CM, Goldman GH, Del Poeta M. 2018. Biological Roles Played by Sphingolipids in Dimorphic and Filamentous Fungi. *mBio* **9**(3).
- Fernandes PM, Domitrovic T, Kao CM, Kurtenbach E. 2004. Genomic expression pattern in *Saccharomyces cerevisiae* cells in response to high hydrostatic pressure. *FEBS Lett* **556**(1-3): 153-160.
- Friant S, Lombardi R, Schmelzle T, Hall MN, Riezman H. 2001. Sphingoid base signaling via Pkh kinases is required for endocytosis in yeast. *EMBO J* **20**(23): 6783-6792.
- Fu MS, De Sordi L, Muhlschlegel FA. 2012. Functional characterization of the small heat shock protein Hsp12p from *Candida albicans*. *PLoS One* **7**(8): e42894.

- Fuchs BB, O'Brien E, El Khoury JB, Mylonakis E. 2010. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence* **1**(6): 475-482.
- Garcia-Solache MA, Casadevall A. 2010. Global warming will bring new fungal diseases for mammals. *mBio* **1**(1).
- Garcia R, Rodriguez-Pena JM, Bermejo C, Nombela C, Arroyo J. 2009. The high osmotic response and cell wall integrity pathways cooperate to regulate transcriptional responses to zymolyase-induced cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **284**(16): 10901-10911.
- Gealt MA, Abdollahi A, Evans JL. 1989. Lipids and lipoidal mycotoxins of fungi. *Current topics in medical mycology* **3**: 218-247.
- Giardina C, Lis JT. 1995. Dynamic protein-DNA architecture of a yeast heat shock promoter. *Molecular and cellular biology* **15**(5): 2737-2744.
- Gigout T, Blondel W, Didelon J, Latger V, Dumas D, Schooneman F, Stoltz JF. 1999. Development and evaluation of an automatic method for the study of platelet osmotic response. *Technology and health care : official journal of the European Society for Engineering and Medicine* **7**(5): 371-380.
- Gomez-Pastor R, Burchfiel ET, Thiele DJ. 2018. Regulation of heat shock transcription factors and their roles in physiology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**(1): 4-19.
- Gong Y, Li T, Yu C, Sun S. 2017. *Candida albicans* Heat Shock Proteins and Hsps-Associated Signaling Pathways as Potential Antifungal Targets. *Frontiers in cellular and infection microbiology* **7**: 520.
- Gow NAR, Latge JP, Munro CA. 2017. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiology spectrum* **5**(3).
- Gryz E, Perlinska-Lenart U, Gawarecka K, Jozwiak A, Pilsyk S, Lipko A, Jemiola-Rzeminska M, Bernat P, Muszewska A, Steczkiewicz K et al. 2019. Poly-Saturated Dolichols from Filamentous Fungi Modulate Activity of Dolichol-Dependent Glycosyltransferase and Physical Properties of Membranes. *International journal of molecular sciences* **20**(12).
- Haas D, Lesch S, Buzina W, Galler H, Gutsch AM, Habib J, Pfeifer B, Luxner J, Reinthaler FF. 2016. Culturable fungi in potting soils and compost. *Med Mycol* **54**(8): 825-834.
- Haas H, Eisendle M, Turgeon BG. 2008. Siderophores in fungal physiology and virulence. *Annual review of phytopathology* **46**: 149-187.
- Hagiwara D, Sakai K, Suzuki S, Umemura M, Nogawa T, Kato N, Osada H, Watanabe A, Kawamoto S, Gono T et al. 2017. Temperature during conidiation affects stress tolerance, pigmentation, and tryptacidin accumulation in the conidia of the airborne pathogen *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One* **12**(5): e0177050.
- Hahn JS, Hu Z, Thiele DJ, Iyer VR. 2004. Genome-wide analysis of the biology of stress responses through heat shock transcription factor. *Molecular and cellular biology* **24**(12): 5249-5256.

- Hahn JS, Thiele DJ. 2004. Activation of the *Saccharomyces cerevisiae* heat shock transcription factor under glucose starvation conditions by Snf1 protein kinase. *J Biol Chem* **279**(7): 5169-5176.
- Hartl FU. 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**(6583): 571-579.
- Hartree EF. 1972. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical biochemistry* **48**(2): 422-427.
- Hashikawa N, Mizukami Y, Imazu H, Sakurai H. 2006. Mutated yeast heat shock transcription factor activates transcription independently of hyperphosphorylation. *J Biol Chem* **281**(7): 3936-3942.
- Hashikawa N, Sakurai H. 2004. Phosphorylation of the yeast heat shock transcription factor is implicated in gene-specific activation dependent on the architecture of the heat shock element. *Mol Cell Biol* **24**(9): 3648-3659.
- Hashikawa N, Yamamoto N, Sakurai H. 2007. Different mechanisms are involved in the transcriptional activation by yeast heat shock transcription factor through two different types of heat shock elements. *The Journal of biological chemistry* **282**(14): 10333-10340.
- Hatakeyama R, Kono K, Yoshida S. 2017. Ypk1 and Ypk2 kinases maintain Rho1 at the plasma membrane by flippase-dependent lipid remodeling after membrane stresses. *Journal of cell science* **130**(6): 1169-1178.
- He Y, Li Y, Zhang S, Perry B, Zhao T, Wang Y, Sun C. 2013. Radicol, a heat shock protein 90 inhibitor, inhibits differentiation and adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *Biochemical and biophysical research communications* **436**(2): 169-174.
- Healey KR, Challa KK, Edlind TD, Katiyar SK. 2015. Sphingolipids mediate differential echinocandin susceptibility in *Candida albicans* and *Aspergillus nidulans*. *Antimicrob Agents Chemother* **59**(6): 3377-3384.
- Healey KR, Katiyar SK, Raj S, Edlind TD. 2012. CRS-MIS in *Candida glabrata*: sphingolipids modulate echinocandin-Fks interaction. *Mol Microbiol* **86**(2): 303-313.
- Helmschrott C, Sasse A, Samantaray S, Krappmann S, Wagener J. 2013. Upgrading fungal gene expression on demand: improved systems for doxycycline-dependent silencing in *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol* **79**(5): 1751-1754.
- Henderson CM, Block DE. 2014. Examining the role of membrane lipid composition in determining the ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **80**(10): 2966-2972.
- Henry SA, Kohlwein SD, Carman GM. 2012. Metabolism and regulation of glycerolipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **190**(2): 317-349.
- Herbrecht R, Bories P, Moulin JC, Ledoux MP, Letscher-Bru V. 2012. Risk stratification for invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1272**: 23-30.
- Herndon JL, Peters RE, Hofer RN, Simmons TB, Symes SJ, Giles DK. 2020. Exogenous polyunsaturated fatty acids (PUFAs) promote changes in growth,

phospholipid composition, membrane permeability and virulence phenotypes in *Escherichia coli*. *BMC microbiology* **20**(1): 305.

Herrero-de-Dios C, Roman E, Pla J, Alonso-Monge R. 2020. Hog1 Controls Lipids Homeostasis Upon Osmotic Stress in *Candida albicans*. *Journal of fungi* **6**(4).

Heung LJ, Luberto C, Plowden A, Hannun YA, Del Poeta M. 2004. The sphingolipid pathway regulates Pkc1 through the formation of diacylglycerol in *Cryptococcus neoformans*. *J Biol Chem* **279**(20): 21144-21153.

Hohmann S. 2009. Control of high osmolarity signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **583**(24): 4025-4029.

Hoj A, Jakobsen BK. 1994. A short element required for turning off heat shock transcription factor: evidence that phosphorylation enhances deactivation. *EMBO J* **13**(11): 2617-2624.

Horvath I, Glatz A, Varvasovszki V, Torok Z, Pali T, Balogh G, Kovacs E, Nadasdi L, Benko S, Joo F et al. 1998. Membrane physical state controls the signaling mechanism of the heat shock response in *Synechocystis* PCC 6803: identification of hsp17 as a "fluidity gene". *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(7): 3513-3518.

Horvath I, Multhoff G, Sonnleitner A, Vigh L. 2008. Membrane-associated stress proteins: more than simply chaperones. *Biochim Biophys Acta* **1778**(7-8): 1653-1664.

Hu J, Furutani A, Yamamoto K, Oyama K, Mitomi M, Anzai H. 2014. Characterization of two acetyltransferase genes in the pyripyropene biosynthetic gene cluster from *Penicillium coprobium*. *Biotechnology, biotechnological equipment* **28**(5): 818-826.

Hu W, Sillaots S, Lemieux S, Davison J, Kauffman S, Breton A, Linteau A, Xin C, Bowman J, Becker J et al. 2007. Essential gene identification and drug target prioritization in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog* **3**(3): e24.

Huber W, Carey VJ, Gentleman R, Anders S, Carlson M, Carvalho BS, Bravo HC, Davis S, Gatto L, Girke T et al. 2015. Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nat Methods* **12**(2): 115-121.

Ianutevich EA, Danilova OA, Groza NV, Kotlova ER, Tereshina VM. 2016. Heat shock response of thermophilic fungi: membrane lipids and soluble carbohydrates under elevated temperatures. *Microbiology (Reading)* **162**(6): 989-999.

Ianutevich EA, Tereshina VM. 2019. Combinatorial impact of osmotic and heat shocks on the composition of membrane lipids and osmolytes in *Aspergillus niger*. *Microbiology (Reading)* **165**(5): 554-562.

Ibrahim-Granet O, Philippe B, Boleti H, Boisvieux-Ulrich E, Grenet D, Stern M, Latge JP. 2003. Phagocytosis and intracellular fate of *Aspergillus fumigatus* conidia in alveolar macrophages. *Infect Immun* **71**(2): 891-903.

Ikezaki S, Cho T, Nagao JI, Tasaki S, Yamaguchi M, Arita-Morioka KI, Yasumatsu K, Chibana H, Ikebe T, Tanaka Y. 2019. Mild Heat Stress Affects on the Cell Wall Structure in *Candida albicans* Biofilm. *Med Mycol J* **60**(2): 29-37.

- Imazu H, Sakurai H. 2005. *Saccharomyces cerevisiae* heat shock transcription factor regulates cell wall remodeling in response to heat shock. *Eukaryot Cell* **4**(6): 1050-1056.
- Inagaki M, Schmelzle T, Yamaguchi K, Irie K, Hall MN, Matsumoto K. 1999. PDK1 homologs activate the Pkc1-mitogen-activated protein kinase pathway in yeast. *Mol Cell Biol* **19**(12): 8344-8352.
- Inoue H, Nojima H, Okayama H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**(1): 23-28.
- Jacob TR, Peres NT, Martins MP, Lang EA, Sanches PR, Rossi A, Martinez-Rossi NM. 2015. Heat Shock Protein 90 (Hsp90) as a Molecular Target for the Development of Novel Drugs Against the Dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *Frontiers in microbiology* **6**: 1241.
- Jain R, Valiante V, Remme N, Docimo T, Heinekamp T, Hertweck C, Gershenzon J, Haas H, Brakhage AA. 2011. The MAP kinase MpkA controls cell wall integrity, oxidative stress response, gliotoxin production and iron adaptation in *Aspergillus fumigatus*. *Mol Microbiol* **82**(1): 39-53.
- Jakobsen BK, Pelham HR. 1988. Constitutive binding of yeast heat shock factor to DNA in vivo. *Molecular and cellular biology* **8**(11): 5040-5042.
- . 1991. A conserved heptapeptide restrains the activity of the yeast heat shock transcription factor. *EMBO J* **10**(2): 369-375.
- Jenkins GM, Richards A, Wahl T, Mao C, Obeid L, Hannun Y. 1997. Involvement of yeast sphingolipids in the heat stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **272**(51): 32566-32572.
- Kafer E. 1977. Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and its chromosomal aberrations. *Advances in genetics* **19**: 33-131.
- Kanetis L, Forster H, Jones CA, Borkovich KA, Adaskaveg JE. 2008. Characterization of genetic and biochemical mechanisms of fludioxonil and pyrimethanil resistance in field isolates of *Penicillium digitatum*. *Phytopathology* **98**(2): 205-214.
- Kim D, Perteza G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL. 2013. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol* **14**(4): R36.
- Kim JH, Chan KL, Faria NC, Martins Mde L, Campbell BC. 2012. Targeting the oxidative stress response system of fungi with redox-potent chemosensitizing agents. *Frontiers in microbiology* **3**: 88.
- Klose C, Surma MA, Gerl MJ, Meyenhofer F, Shevchenko A, Simons K. 2012. Flexibility of a eukaryotic lipidome--insights from yeast lipidomics. *PloS one* **7**(4): e35063.
- Knechtle P, Diefenbacher M, Greve KB, Brianza F, Folly C, Heider H, Lone MA, Long L, Meyer JP, Roussel P et al. 2014. The natural diene-furan fatty acid EV-086 is an inhibitor of fungal delta-9 fatty acid desaturation with efficacy in a model of skin dermatophytosis. *Antimicrob Agents Chemother* **58**(1): 455-466.
- Ko YJ, Yu YM, Kim GB, Lee GW, Maeng PJ, Kim S, Floyd A, Heitman J, Bahn YS. 2009. Remodeling of global transcription patterns of *Cryptococcus*

neoformans genes mediated by the stress-activated HOG signaling pathways. *Eukaryot Cell* **8**(8): 1197-1217.

Kobayashi T, Takematsu H, Yamaji T, Hiramoto S, Kozutsumi Y. 2005. Disturbance of sphingolipid biosynthesis abrogates the signaling of Mss4, phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, in yeast. *J Biol Chem* **280**(18): 18087-18094.

Kopecka M, Gabriel M. 1992. The influence of congo red on the cell wall and (1- \rightarrow 3)-beta-D-glucan microfibril biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* **158**(2): 115-126.

Kopylova E, Noe L, Touzet H. 2012. SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics* **28**(24): 3211-3217.

Kosower NS, Kosower EM, Wertheim B, Correa WS. 1969. Diamide, a new reagent for the intracellular oxidation of glutathione to the disulfide. *Biochem Biophys Res Commun* **37**(4): 593-596.

Kota V, Hama H. 2014. 2'-Hydroxy ceramide in membrane homeostasis and cell signaling. *Advances in biological regulation* **54**: 223-230.

Kowalski CH, Morelli KA, Schultz D, Nadell CD, Cramer RA. 2020. Fungal biofilm architecture produces hypoxic microenvironments that drive antifungal resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**(36): 22473-22483.

Kraus PR, Boily MJ, Giles SS, Stajich JE, Allen A, Cox GM, Dietrich FS, Perfect JR, Heitman J. 2004. Identification of *Cryptococcus neoformans* temperature-regulated genes with a genomic-DNA microarray. *Eukaryotic cell* **3**(5): 1249-1260.

Krishnamurthy S, Plaine A, Albert J, Prasad T, Prasad R, Ernst JF. 2004. Dosage-dependent functions of fatty acid desaturase Ole1p in growth and morphogenesis of *Candida albicans*. *Microbiology* **150**(Pt 6): 1991-2003.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259): 680-685.

LaFayette SL, Collins C, Zaas AK, Schell WA, Betancourt-Quiroz M, Gunatilaka AA, Perfect JR, Cowen LE. 2010. PKC signaling regulates drug resistance of the fungal pathogen *Candida albicans* via circuitry comprised of Mkc1, calcineurin, and Hsp90. *PLoS Pathog* **6**(8): e1001069.

Lam WC, Gerik KJ, Lodge JK. 2013. Role of *Cryptococcus neoformans* Rho1 GTPases in the PKC1 signaling pathway in response to thermal stress. *Eukaryot Cell* **12**(1): 118-131.

Lamoth F, Juvvadi PR, Fortwendel JR, Steinbach WJ. 2012. Heat shock protein 90 is required for conidiation and cell wall integrity in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell* **11**(11): 1324-1332.

Latge JP, Beauvais A, Chamilos G. 2017. The Cell Wall of the Human Fungal Pathogen *Aspergillus fumigatus*: Biosynthesis, Organization, Immune Response, and Virulence. *Annu Rev Microbiol* **71**: 99-116.

le Maire M, Champeil P, Moller JV. 2000. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochim Biophys Acta* **1508**(1-2): 86-111.

Leach MD, Budge S, Walker L, Munro C, Cowen LE, Brown AJ. 2012a. Hsp90 orchestrates transcriptional regulation by Hsf1 and cell wall remodelling by MAPK signalling during thermal adaptation in a pathogenic yeast. *PLoS Pathog* **8**(12): e1003069.

Leach MD, Cowen LE. 2013. Surviving the heat of the moment: a fungal pathogens perspective. *PLoS pathogens* **9**(3): e1003163.

-. 2014. Membrane fluidity and temperature sensing are coupled via circuitry comprised of Ole1, Rsp5, and Hsf1 in *Candida albicans*. *Eukaryotic cell* **13**(8): 1077-1084.

Leach MD, Farrer RA, Tan K, Miao Z, Walker LA, Cuomo CA, Wheeler RT, Brown AJ, Wong KH, Cowen LE. 2016. Hsf1 and Hsp90 orchestrate temperature-dependent global transcriptional remodelling and chromatin architecture in *Candida albicans*. *Nature communications* **7**: 11704.

Leach MD, Klipp E, Cowen LE, Brown AJP. 2012b. Fungal Hsp90: a biological transistor that tunes cellular outputs to thermal inputs. *Nat Rev Micro* **10**(10): 693-704.

Leach MD, Tyc KM, Brown AJ, Klipp E. 2012c. Modelling the regulation of thermal adaptation in *Candida albicans*, a major fungal pathogen of humans. *PLoS One* **7**(3): e32467.

Lee H, Khanal Lamichhane A, Garraffo HM, Kwon-Chung KJ, Chang YC. 2012. Involvement of PDK1, PKC and TOR signalling pathways in basal fluconazole tolerance in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* **84**(1): 130-146.

Lee MJ, Sheppard DC. 2016. Recent advances in the understanding of the *Aspergillus fumigatus* cell wall. *J Microbiol* **54**(3): 232-242.

Lee P, Cho BR, Joo HS, Hahn JS. 2008. Yeast Yak1 kinase, a bridge between PKA and stress-responsive transcription factors, Hsf1 and Msn2/Msn4. *Mol Microbiol* **70**(4): 882-895.

Lee P, Kim MS, Paik SM, Choi SH, Cho BR, Hahn JS. 2013. Rim15-dependent activation of Hsf1 and Msn2/4 transcription factors by direct phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **587**(22): 3648-3655.

Lesage G, Bussey H. 2006. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **70**(2): 317-343.

Levi-Strauss M, Beauvais C, Karray S. 2001. Identification of a polymorphic microsatellite marker in the mouse Fas ligand gene. *European journal of immunogenetics : official journal of the British Society for Histocompatibility and Immunogenetics* **28**(5): 553-555.

Levin DE. 2005. Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**(2): 262-291.

-. 2011. Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics* **189**(4): 1145-1175.

Li SM. 2011. Genome mining and biosynthesis of fumitremorgin-type alkaloids in ascomycetes. *J Antibiot (Tokyo)* **64**(1): 45-49.

Li XJ, Zhang Q, Zhang AL, Gao JM. 2012. Metabolites from *Aspergillus fumigatus*, an endophytic fungus associated with *Melia azedarach*, and their

- antifungal, antifeedant, and toxic activities. *Journal of agricultural and food chemistry* **60**(13): 3424-3431.
- Liao Y, Smyth GK, Shi W. 2013. The Subread aligner: fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote. *Nucleic Acids Res* **41**(10): e108.
- Lind AL, Smith TD, Saterlee T, Calvo AM, Rokas A. 2016. Regulation of Secondary Metabolism by the Velvet Complex Is Temperature-Responsive in *Aspergillus*. *G3* **6**(12): 4023-4033.
- Lingwood CA. 2011. Glycosphingolipid functions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **3**(7).
- Liu K, Zhang X, Lester RL, Dickson RC. 2005. The sphingoid long chain base phytosphingosine activates AGC-type protein kinases in *Saccharomyces cerevisiae* including Ypk1, Ypk2, and Sch9. *J Biol Chem* **280**(24): 22679-22687.
- Liu XD, Thiele DJ. 1996. Oxidative stress induced heat shock factor phosphorylation and HSF-dependent activation of yeast metallothionein gene transcription. *Genes Dev* **10**(5): 592-603.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**(4): 402-408.
- Luberto C, Toffaletti DL, Wills EA, Tucker SC, Casadevall A, Perfect JR, Hannun YA, Del Poeta M. 2001. Roles for inositol-phosphoryl ceramide synthase 1 (IPC1) in pathogenesis of *C. neoformans*. *Genes & development* **15**(2): 201-212.
- Macheleidt J, Mattern DJ, Fischer J, Netzker T, Weber J, Schroeckh V, Valiante V, Brakhage AA. 2016. Regulation and Role of Fungal Secondary Metabolites. *Annual review of genetics* **50**: 371-392.
- Maiya S, Grundmann A, Li SM, Turner G. 2006. The fumitremorgin gene cluster of *Aspergillus fumigatus*: identification of a gene encoding brevianamide F synthetase. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **7**(7): 1062-1069.
- Malavazi I, Goldman GH. 2012. Gene disruption in *Aspergillus fumigatus* using a PCR-based strategy and in vivo recombination in yeast. *Methods Mol Biol* **845**: 99-118.
- Malavazi I, Goldman GH, Brown NA. 2014. The importance of connections between the cell wall integrity pathway and the unfolded protein response in filamentous fungi. *Briefings in functional genomics* **13**(6): 456-470.
- Mandala SM, Thornton RA, Frommer BR, Curotto JE, Rozdilsky W, Kurtz MB, Giacobbe RA, Bills GF, Cabello MA, Martin I et al. 1995. The discovery of australifungin, a novel inhibitor of sphinganine N-acyltransferase from *Sporormiella australis*. Producing organism, fermentation, isolation, and biological activity. *J Antibiot (Tokyo)* **48**(5): 349-356.
- Maresca B, Kobayashi G. 1993. Changes in membrane fluidity modulate heat shock gene expression and produced attenuated strains in the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*. *Archives of medical research* **24**(3): 247-249.
- Martin CE, Oh CS, Jiang Y. 2007. Regulation of long chain unsaturated fatty acid synthesis in yeast. *Biochimica et biophysica acta* **1771**(3): 271-285.

- Martinez-Pastor MT, Marchler G, Schuller C, Marchler-Bauer A, Ruis H, Estruch F. 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J* **15**(9): 2227-2235.
- Millner PD, Marsh PB, Snowden RB, Parr JF. 1977. Occurrence of *Aspergillus fumigatus* during composting of sewage sludge. *Appl Environ Microbiol* **34**(6): 765-772.
- Millson SH, Truman AW, King V, Prodromou C, Pearl LH, Piper PW. 2005. A two-hybrid screen of the yeast proteome for Hsp90 interactors uncovers a novel Hsp90 chaperone requirement in the activity of a stress-activated mitogen-activated protein kinase, Slt2p (Mpk1p). *Eukaryot Cell* **4**(5): 849-860.
- Mishra NN, Ali S, Shukla PK. 2014. Arachidonic acid affects biofilm formation and PGE2 level in *Candida albicans* and non-*albicans* species in presence of subinhibitory concentration of fluconazole and terbinafine. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases* **18**(3): 287-293.
- Mondino S, Vazquez CL, Cabruja M, Sala C, Cazenave-Gassiot A, Blanco FC, Wenk MR, Bigi F, Cole ST, Gramajo H et al. 2020. FasR Regulates Fatty Acid Biosynthesis and Is Essential for Virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in microbiology* **11**: 586285.
- Montanes FM, Pascual-Ahuir A, Proft M. 2011. Repression of ergosterol biosynthesis is essential for stress resistance and is mediated by the Hog1 MAP kinase and the Mot3 and Rox1 transcription factors. *Mol Microbiol* **79**(4): 1008-1023.
- Morelli KA, Kerkaert JD, Cramer RA. 2021. *Aspergillus fumigatus* biofilms: Toward understanding how growth as a multicellular network increases antifungal resistance and disease progression. *PLoS Pathog* **17**(8): e1009794.
- Moss BJ, Kim Y, Nandakumar MP, Marten MR. 2008. Quantifying metabolic activity of filamentous fungi using a colorimetric XTT assay. *Biotechnology progress* **24**(3): 780-783.
- Munro S, Pelham HR. 1987. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* **48**(5): 899-907.
- Munshi MA, Gardin JM, Singh A, Luberto C, Rieger R, Bouklas T, Fries BC, Del Poeta M. 2018. The Role of Ceramide Synthases in the Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *Cell Rep* **22**(6): 1392-1400.
- Murayama SY, Negishi Y, Umeyama T, Kaneko A, Oura T, Niimi M, Ubukata K, Kajiwara S. 2006. Construction and functional analysis of fatty acid desaturase gene disruptants in *Candida albicans*. *Microbiology (Reading)* **152**(Pt 5): 1551-1558.
- Nagy E, Balogi Z, Gombos I, Akerfelt M, Bjorkbom A, Balogh G, Torok Z, Maslyanko A, Fiszer-Kierzkowska A, Lisowska K et al. 2007. Hyperfluidization-coupled membrane microdomain reorganization is linked to activation of the heat shock response in a murine melanoma cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**(19): 7945-7950.

- Nair R, Khandelwal NK, Shariq M, Redhu AK, Gaur NA, Shaikh S, Prasad R. 2018. Identification of genome-wide binding sites of heat shock factor 1, Hsf1, under basal conditions in the human pathogenic yeast, *Candida albicans*. *AMB Express* **8**(1): 116.
- Nair R, Shariq M, Dhamgaye S, Mukhopadhyay CK, Shaikh S, Prasad R. 2017. Non-heat shock responsive roles of HSF1 in *Candida albicans* are essential under iron deprivation and drug defense. *Biochimica et biophysica acta Molecular cell research* **1864**(2): 345-354.
- Nakagawa Y, Sakumoto N, Kaneko Y, Harashima S. 2002. Mga2p is a putative sensor for low temperature and oxygen to induce OLE1 transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and biophysical research communications* **291**(3): 707-713.
- Nasution O, Lee YM, Kim E, Lee Y, Kim W, Choi W. 2017. Overexpression of OLE1 enhances stress tolerance and constitutively activates the MAPK HOG pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and bioengineering* **114**(3): 620-631.
- Neumann D, Lichtenberger O, Gunther D, Tschiersch K, Nover L. 1994. Heat-Shock Proteins Induce Heavy-Metal Tolerance in Higher-Plants. *Planta* **194**(3): 360-367.
- Nguyen LN, Gacser A, Nosanchuk JD. 2011. The stearyl-coenzyme A desaturase 1 is essential for virulence and membrane stress in *Candida parapsilosis* through unsaturated fatty acid production. *Infect Immun* **79**(1): 136-145.
- Nguyen LN, Trofa D, Nosanchuk JD. 2009. Fatty acid synthase impacts the pathobiology of *Candida parapsilosis* in vitro and during mammalian infection. *PLoS One* **4**(12): e8421.
- Nicholls S, Leach MD, Priest CL, Brown AJ. 2009. Role of the heat shock transcription factor, Hsf1, in a major fungal pathogen that is obligately associated with warm-blooded animals. *Molecular microbiology* **74**(4): 844-861.
- Nicholls S, MacCallum DM, Kaffarnik FA, Selway L, Peck SC, Brown AJ. 2011. Activation of the heat shock transcription factor Hsf1 is essential for the full virulence of the fungal pathogen *Candida albicans*. *Fungal genetics and biology : FG & B* **48**(3): 297-305.
- Nierman WC, Pain A, Anderson MJ, Wortman JR, Kim HS, Arroyo J, Berriman M, Abe K, Archer DB, Bermejo C et al. 2005. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* **438**(7071): 1151-1156.
- Nieto-Sotelo J, Wiederrecht G, Okuda A, Parker CS. 1990. The yeast heat shock transcription factor contains a transcriptional activation domain whose activity is repressed under nonshock conditions. *Cell* **62**(4): 807-817.
- Noble SM, French S, Kohn LA, Chen V, Johnson AD. 2010. Systematic screens of a *Candida albicans* homozygous deletion library decouple morphogenetic switching and pathogenicity. *Nature genetics* **42**(7): 590-598.

- Nunez LR, Jesch SA, Gaspar ML, Almaguer C, Villa-Garcia M, Ruiz-Noriega M, Patton-Vogt J, Henry SA. 2008. Cell wall integrity MAPK pathway is essential for lipid homeostasis. *J Biol Chem* **283**(49): 34204-34217.
- O'Meara TR, O'Meara MJ, Polvi EJ, Pourhaghighi MR, Liston SD, Lin ZY, Veri AO, Emili A, Gingras AC, Cowen LE. 2019. Global proteomic analyses define an environmentally contingent Hsp90 interactome and reveal chaperone-dependent regulation of stress granule proteins and the R2TP complex in a fungal pathogen. *PLoS biology* **17**(7): e3000358.
- O'Meara TR, Veri AO, Polvi EJ, Li X, Valaei SF, Diezmann S, Cowen LE. 2016. Mapping the Hsp90 Genetic Network Reveals Ergosterol Biosynthesis and Phosphatidylinositol-4-Kinase Signaling as Core Circuitry Governing Cellular Stress. *PLoS Genet* **12**(6): e1006142.
- Okuyama H, Saito M, Joshi VC, Gunsberg S, Wakil SJ. 1979. Regulation by temperature of the chain length of fatty acids in yeast. *The Journal of biological chemistry* **254**(24): 12281-12284.
- Olson DK, Frohlich F, Christiano R, Hannibal-Bach HK, Ejsing CS, Walther TC. 2015. Rom2-dependent phosphorylation of Elo2 controls the abundance of very long-chain fatty acids. *J Biol Chem* **290**(7): 4238-4247.
- Omura S. 1976. The antibiotic cerulenin, a novel tool for biochemistry as an inhibitor of fatty acid synthesis. *Bacteriological reviews* **40**(3): 681-697.
- Osmani SA, May GS, Morris NR. 1987. Regulation of the mRNA levels of nimA, a gene required for the G2-M transition in *Aspergillus nidulans*. *The Journal of cell biology* **104**(6): 1495-1504.
- Pakula TM, Laxell M, Huuskonen A, Uusitalo J, Saloheimo M, Penttila M. 2003. The effects of drugs inhibiting protein secretion in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. Evidence for down-regulation of genes that encode secreted proteins in the stressed cells. *The Journal of biological chemistry* **278**(45): 45011-45020.
- Palousova D, Lengerova M, Volfova P, Bejdak P, Kocmanova I, Mayer J, Racil Z. 2012. [Invasive fungal infections in immunocompromised patients with focus on aspergillosis and its causative agents]. *Klin Mikrobiol Infekc Lek* **18**(4): 96-101.
- Park SJ, Mehrad B. 2009. Innate immunity to *Aspergillus* species. *Clin Microbiol Rev* **22**(4): 535-551.
- Parsell DA, Lindquist S. 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annual review of genetics* **27**: 437-496.
- Parsons AB, Brost RL, Ding H, Li Z, Zhang C, Sheikh B, Brown GW, Kane PM, Hughes TR, Boone C. 2004. Integration of chemical-genetic and genetic interaction data links bioactive compounds to cellular target pathways. *Nature biotechnology* **22**(1): 62-69.
- Patton JL, Srinivasan B, Dickson RC, Lester RL. 1992. Phenotypes of sphingolipid-dependent strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **174**(22): 7180-7184.
- Pelham HR, Hardwick KG, Lewis MJ. 1988. Sorting of soluble ER proteins in yeast. *EMBO J* **7**(6): 1757-1762.

- Peng Y, Zhang H, Xu M, Tan MW. 2018. A Tet-Off gene expression system for validation of antifungal drug targets in a murine invasive pulmonary aspergillosis model. *Sci Rep* **8**(1): 443.
- Pereira Silva L, Alves de Castro P, Dos Reis TF, Paziani MH, Von Zeska Kress MR, Riano-Pachon DM, Hagiwara D, Ries LN, Brown NA, Goldman GH. 2017. Genome-wide transcriptome analysis of *Aspergillus fumigatus* exposed to osmotic stress reveals regulators of osmotic and cell wall stresses that are SakA(HOG1) and MpkC dependent. *Cellular microbiology* **19**(4).
- Pereira SL, Leonard AE, Mukerji P. 2003. Recent advances in the study of fatty acid desaturases from animals and lower eukaryotes. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* **68**(2): 97-106.
- Perez-Nadales E, Nogueira MF, Baldin C, Castanheira S, El Ghalid M, Grund E, Lengeler K, Marchegiani E, Mehrotra PV, Moretti M et al. 2014. Fungal model systems and the elucidation of pathogenicity determinants. *Fungal genetics and biology : FG & B* **70**: 42-67.
- Perlin DS. 2011. Current perspectives on echinocandin class drugs. *Future Microbiol* **6**(4): 441-457.
- Peter M, Glatz A, Gudmann P, Gombos I, Torok Z, Horvath I, Vigh L, Balogh G. 2017. Metabolic crosstalk between membrane and storage lipids facilitates heat stress management in *Schizosaccharomyces pombe*. *PloS one* **12**(3): e0173739.
- Plesofsky N. 2004. Heat shock proteins and the stress response. In *The Mycota III, Biochemistry and Molecular Biology*, (ed. RBaGA Marzluf). Springer-Verlag.
- Plesofsky N. 2010. Heat shock response. In *Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi*, (ed. KA Borkovich, DJ Ebbole), pp. 488-497. ASM Press, Washington.
- Porta A, Eletto A, Torok Z, Franceschelli S, Glatz A, Vigh L, Maresca B. 2010. Changes in membrane fluid state and heat shock response cause attenuation of virulence. *Journal of bacteriology* **192**(7): 1999-2005.
- Prasath KG, Tharani H, Kumar MS, Pandian SK. 2020. Palmitic Acid Inhibits the Virulence Factors of *Candida tropicalis*: Biofilms, Cell Surface Hydrophobicity, Ergosterol Biosynthesis, and Enzymatic Activity. *Frontiers in microbiology* **11**: 864.
- Prodromou C. 2016. Mechanisms of Hsp90 regulation. *Biochem J* **473**(16): 2439-2452.
- Qiu M, Wang Y, Sun L, Deng Q, Zhao J. 2021. Fatty Acids and Oxylipins as Antifungal and Anti-Mycotoxin Agents in Food: A Review. *Toxins* **13**(12): 852.
- Rajavel M, Philip B, Buehrer BM, Errede B, Levin DE. 1999. Mid2 is a putative sensor for cell integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **19**(6): 3969-3976.
- Rella A, Farnoud AM, Del Poeta M. 2016. Plasma membrane lipids and their role in fungal virulence. *Progress in lipid research* **61**: 63-72.
- Renne MF, de Kroon A. 2018. The role of phospholipid molecular species in determining the physical properties of yeast membranes. *FEBS Lett* **592**(8): 1330-1345.

- Rhodes JC. 2006. *Aspergillus fumigatus*: growth and virulence. *Medical mycology* **44** Suppl 1: S77-81.
- Rhodes JC, Oliver BG, Askew DS, Amlung TW. 2001. Identification of genes of *Aspergillus fumigatus* up-regulated during growth on endothelial cells. *Medical mycology* **39**(3): 253-260.
- Richter K, Haslbeck M, Buchner J. 2010. The heat shock response: life on the verge of death. *Mol Cell* **40**(2): 253-266.
- Ries LN, Beattie SR, Espeso EA, Cramer RA, Goldman GH. 2016. Diverse Regulation of the CreA Carbon Catabolite Repressor in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **203**(1): 335-352.
- Riquelme M, Aguirre J, Bartnicki-Garcia S, Braus GH, Feldbrugge M, Fleig U, Hansberg W, Herrera-Estrella A, Kamper J, Kuck U et al. 2018. Fungal Morphogenesis, from the Polarized Growth of Hyphae to Complex Reproduction and Infection Structures. *Microbiol Mol Biol Rev* **82**(2).
- Rizzo J, Colombo AC, Zamith-Miranda D, Silva VKA, Allegood JC, Casadevall A, Del Poeta M, Nosanchuk JD, Kronstad JW, Rodrigues ML. 2018. The putative flippase Apt1 is required for intracellular membrane architecture and biosynthesis of polysaccharide and lipids in *Cryptococcus neoformans*. *Biochimica et biophysica acta Molecular cell research* **1865**(3): 532-541.
- Robert VA, Casadevall A. 2009. Vertebrate endothermy restricts most fungi as potential pathogens. *J Infect Dis* **200**(10): 1623-1626.
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**(1): 139-140.
- Rocha MC, Fabri J, Silva LP, Angolini CFF, Bertolini MC, da Cunha AF, Valiante V, Goldman GH, Fill TP, Malavazi I. 2021. Transcriptional Control of the Production of *Aspergillus fumigatus* Conidia-Borne Secondary Metabolite Fumiquinazoline C Important for Phagocytosis Protection. *Genetics* **218**(1).
- Rocha MC, Fabri J, Simoes IT, Silva-Rocha R, Hagiwara D, da Cunha AF, Goldman GH, Canovas D, Malavazi I. 2020a. The cell wall integrity pathway contributes to the early stages of *Aspergillus fumigatus* asexual development. *Appl Environ Microbiol*.
- Rocha MC, Fabri JH, Franco de Godoy K, Alves de Castro P, Hori JI, Ferreira da Cunha A, Arentshorst M, Ram AF, van den Hondel CA, Goldman GH et al. 2016. *Aspergillus fumigatus* MADS-Box Transcription Factor rlmA Is Required for Regulation of the Cell Wall Integrity and Virulence. *G3* **6**(9): 2983-3002.
- Rocha MC, Godoy KF, de Castro PA, Hori JI, Bom VL, Brown NA, Cunha AF, Goldman GH, Malavazi I. 2015. The *Aspergillus fumigatus* pkcAG579R Mutant Is Defective in the Activation of the Cell Wall Integrity Pathway but Is Dispensable for Virulence in a Neutropenic Mouse Infection Model. *PLoS One* **10**(8): e0135195.
- Rocha MC, Minari K, Fabri J, Kerkaert JD, Gava LM, da Cunha AF, Cramer RA, Borges JC, Malavazi I. 2020b. *Aspergillus fumigatus* Hsp90 interacts with the main components of the cell wall integrity pathway and cooperates in heat shock and cell wall stress adaptation. *Cell Microbiol*: e13273.

Rodrigues MM. 2012. Fatty acid synthase 1 in *Candida albicans* virulence and the in vitro effects of fluconazole, tetracycline in combinatorial therapy. In *Graduate School at TRACE*, Vol Master of Science. University of Tennessee, Knoxville, Tennessee.

Rodriguez-Pena JM, Garcia R, Nombela C, Arroyo J. 2010. The high-osmolarity glycerol (HOG) and cell wall integrity (CWI) signalling pathways interplay: a yeast dialogue between MAPK routes. *Yeast* **27**(8): 495-502.

Roelants FM, Breslow DK, Muir A, Weissman JS, Thorner J. 2011. Protein kinase Ypk1 phosphorylates regulatory proteins Orm1 and Orm2 to control sphingolipid homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(48): 19222-19227.

Roelants FM, Torrance PD, Bezman N, Thorner J. 2002. Pkh1 and Pkh2 differentially phosphorylate and activate Ypk1 and Ykr2 and define protein kinase modules required for maintenance of cell wall integrity. *Molecular biology of the cell* **13**(9): 3005-3028.

Roelants FM, Torrance PD, Thorner J. 2004. Differential roles of PDK1- and PDK2-phosphorylation sites in the yeast AGC kinases Ypk1, Pkc1 and Sch9. *Microbiology (Reading)* **150**(Pt 10): 3289-3304.

Romero B, Turner G, Olivas I, Laborda F, De Lucas JR. 2003. The *Aspergillus nidulans* alcA promoter drives tightly regulated conditional gene expression in *Aspergillus fumigatus* permitting validation of essential genes in this human pathogen. *Fungal genetics and biology : FG & B* **40**(2): 103-114.

Roncero C, Duran A. 1985. Effect of Calcofluor white and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: in vivo activation of chitin polymerization. *J Bacteriol* **163**(3): 1180-1185.

Roundtree MT, Juvvadi PR, Shwab EK, Cole DC, Steinbach WJ. 2020. *Aspergillus fumigatus* Cyp51A and Cyp51B Proteins Are Compensatory in Function and Localize Differentially in Response to Antifungals and Cell Wall Inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **64**(10).

Sahara T, Goda T, Ohgiya S. 2002. Comprehensive expression analysis of time-dependent genetic responses in yeast cells to low temperature. *The Journal of biological chemistry* **277**(51): 50015-50021.

Sakurai H, Fukasawa T. 2001. A novel domain of the yeast heat shock factor that regulates its activation function. *Biochem Biophys Res Commun* **285**(3): 696-701.

Samantaray S, Neubauer M, Helmschrott C, Wagener J. 2013. Role of the guanine nucleotide exchange factor Rom2 in cell wall integrity maintenance of *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell* **12**(2): 288-298.

Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* CSHL Press, London.

Sarge KD, Murphy SP, Morimoto RI. 1993. Activation of heat shock gene transcription by heat shock factor 1 involves oligomerization, acquisition of DNA-binding activity, and nuclear localization and can occur in the absence of stress. *Mol Cell Biol* **13**(3): 1392-1407.

Schade B, Jansen G, Whiteway M, Entian KD, Thomas DY. 2004. Cold adaptation in budding yeast. *Molecular biology of the cell* **15**(12): 5492-5502.

Schmitt AP, McEntee K. 1996. Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(12): 5777-5782.

Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods* **9**(7): 671-675.

Schrettl M, Bignell E, Kragl C, Sabiha Y, Loss O, Eisendle M, Wallner A, Arst HN, Jr., Haynes K, Haas H. 2007. Distinct roles for intra- and extracellular siderophores during *Aspergillus fumigatus* infection. *PLoS Pathog* **3**(9): 1195-1207.

Schweizer HP, Choi KH. 2011. *Pseudomonas aeruginosa* aerobic fatty acid desaturase DesB is important for virulence factor production. *Arch Microbiol* **193**(3): 227-234.

Seidler MJ, Salvenmoser S, Muller FM. 2008. *Aspergillus fumigatus* forms biofilms with reduced antifungal drug susceptibility on bronchial epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother* **52**(11): 4130-4136.

Sekonyela R, Palmer JM, Bok JW, Jain S, Berthier E, Forseth R, Schroeder F, Keller NP. 2013. RsmA regulates *Aspergillus fumigatus* gliotoxin cluster metabolites including cyclo(L-Phe-L-Ser), a potential new diagnostic marker for invasive aspergillosis. *PLoS one* **8**(5): e62591.

Shapiro RS, Cowen LE. 2012. Thermal control of microbial development and virulence: molecular mechanisms of microbial temperature sensing. *mBio* **3**(5).

Sharma M, Chadha BS, Kaur M, Ghatora SK, Saini HS. 2008. Molecular characterization of multiple xylanase producing thermophilic/thermotolerant fungi isolated from composting materials. *Letters in applied microbiology* **46**(5): 526-535.

Sharma M, Soni R, Nazir A, Oberoi HS, Chadha BS. 2011. Evaluation of glycosyl hydrolases in the secretome of *Aspergillus fumigatus* and saccharification of alkali-treated rice straw. *Applied biochemistry and biotechnology* **163**(5): 577-591.

Shigapova N, Torok Z, Balogh G, Goloubinoff P, Vigh L, Horvath I. 2005. Membrane fluidization triggers membrane remodeling which affects the thermotolerance in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **328**(4): 1216-1223.

Smith LL. 1987. Mechanism of paraquat toxicity in lung and its relevance to treatment. *Hum Toxicol* **6**(1): 31-36.

Solis EJ, Pandey JP, Zheng X, Jin DX, Gupta PB, Airoidi EM, Pincus D, Denic V. 2016. Defining the Essential Function of Yeast Hsf1 Reveals a Compact Transcriptional Program for Maintaining Eukaryotic Proteostasis. *Molecular cell* **63**(1): 60-71.

Song J, Zhai P, Zhang Y, Zhang C, Sang H, Han G, Keller NP, Lu L. 2016. The *Aspergillus fumigatus* Damage Resistance Protein Family Coordinately Regulates Ergosterol Biosynthesis and Azole Susceptibility. *mBio* **7**(1): e01919-01915.

Sorger PK. 1990. Yeast heat shock factor contains separable transient and sustained response transcriptional activators. *Cell* **62**(4): 793-805.

- Sorger PK, Nelson HC. 1989. Trimerization of a yeast transcriptional activator via a coiled-coil motif. *Cell* **59**(5): 807-813.
- Sorger PK, Pelham HR. 1987. Purification and characterization of a heat-shock element binding protein from yeast. *EMBO J* **6**(10): 3035-3041.
- Steinbach W. 2008. Clinical Aspects of the Genus *Aspergillus*. In *The Aspergilli Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods*, (ed. SO GH Goldam). CRC Press, Boca Raton.
- Steinbach WJ, Marr KA, Anaissie EJ, Azie N, Quan S-P, Meier-Kriesche H-U, Apewokin S, Horn DL. 2012. Clinical epidemiology of 960 patients with invasive aspergillosis from the PATH Alliance registry. *Journal of Infection* **65**(5): 453-464.
- Stukey JE, McDonough VM, Martin CE. 1989. Isolation and characterization of OLE1, a gene affecting fatty acid desaturation from *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* **264**(28): 16537-16544.
- . 1990. The OLE1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the delta 9 fatty acid desaturase and can be functionally replaced by the rat stearyl-CoA desaturase gene. *The Journal of biological chemistry* **265**(33): 20144-20149.
- Sueiro-Olivares M, Fernandez-Molina JV, Abad-Diaz-de-Cerio A, Gorospe E, Pascual E, Guruceaga X, Ramirez-Garcia A, Garaizar J, Hernando FL, Margareto J et al. 2015. *Aspergillus fumigatus* transcriptome response to a higher temperature during the earliest steps of germination monitored using a new customized expression microarray. *Microbiology* **161**(Pt 3): 490-502.
- Sugiyama K, Kawamura A, Izawa S, Inoue Y. 2000. Role of glutathione in heat-shock-induced cell death of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Biochemical journal* **352 Pt 1**: 71-78.
- Sun Y, Wilkinson BJ, Standiford TJ, Akinbi HT, O'Riordan MX. 2012. Fatty acids regulate stress resistance and virulence factor production for *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* **194**(19): 5274-5284.
- Swan TM, Watson K. 1998. Stress tolerance in a yeast sterol auxotroph: role of ergosterol, heat shock proteins and trehalose. *FEMS Microbiol Lett* **169**(1): 191-197.
- Szigeti ZM, Szaniszló S, Fazekas E, Gyemant G, Szabon J, Antal K, Emri T, Balla J, Balla G, Csernoch L et al. 2014. Optimization of triacetylfusarinine C and ferricrocin productions in *Aspergillus fumigatus*. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica* **61**(2): 107-119.
- Taipale M, Jarosz DF, Lindquist S. 2010. HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(7): 515-528.
- Takahashi H, Kusuya Y, Hagiwara D, Takahashi-Nakaguchi A, Sakai K, Gono T. 2017. Global gene expression reveals stress-responsive genes in *Aspergillus fumigatus* mycelia. *BMC Genomics* **18**(1): 942.
- Takemori Y, Sakaguchi A, Matsuda S, Mizukami Y, Sakurai H. 2006. Stress-induced transcription of the endoplasmic reticulum oxidoreductin gene ERO1 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics* **275**(1): 89-96.

- Tanaka S, Tani M. 2018. Mannosylinositol phosphorylceramides and ergosterol coordinately maintain cell wall integrity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The FEBS journal* **285**(13): 2405-2427.
- Tang W, Ouyang C, Liu L, Li H, Zeng C, Wang J, Fu L, Wu Q, Zeng B, He B. 2018. Genome-wide identification of the fatty acid desaturases gene family in four *Aspergillus* species and their expression profile in *Aspergillus oryzae*. *AMB Express* **8**(1): 169.
- Tanigawa M, Kihara A, Terashima M, Takahara T, Maeda T. 2012. Sphingolipids regulate the yeast high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol Cell Biol* **32**(14): 2861-2870.
- Tashiro M, Izumikawa K, Hirano K, Ide S, Mihara T, Hosogaya N, Takazono T, Morinaga Y, Nakamura S, Kurihara S et al. 2012. Correlation between triazole treatment history and susceptibility in clinically isolated *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **56**(9): 4870-4875.
- Tereshina VM. 2005. [Thermal resistance in fungi: the role of heat shock proteins and trehalose]. *Mikrobiologija* **74**(3): 293-304.
- Tereshina VM, Memorskaia AS, Kotlova ER. 2013. [Lipid metabolism in *Aspergillus niger* under conditions of heat shock]. *Mikrobiologija* **82**(5): 528-533.
- Thompson S, Croft NJ, Sotiriou A, Piggins HD, Crosthwaite SK. 2008. *Neurospora crassa* heat shock factor 1 is an essential gene; a second heat shock factor-like gene, *hsf2*, is required for asexual spore formation. *Eukaryotic cell* **7**(9): 1573-1581.
- Tiwari S, Thakur R, Shankar J. 2015. Role of Heat-Shock Proteins in Cellular Function and in the Biology of Fungi. *Biotechnol Res Int* **2015**: 132635.
- Torok Z, Crul T, Maresca B, Schutz GJ, Viana F, Dindia L, Piotto S, Brameshuber M, Balogh G, Peter M et al. 2014. Plasma membranes as heat stress sensors: from lipid-controlled molecular switches to therapeutic applications. *Biochim Biophys Acta* **1838**(6): 1594-1618.
- Toth ME, Vigh L, Santha M. 2014. Alcohol stress, membranes, and chaperones. *Cell Stress Chaperones* **19**(3): 299-309.
- Treger JM, Schmitt AP, Simon JR, McEntee K. 1998. Transcriptional factor mutations reveal regulatory complexities of heat shock and newly identified stress genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **273**(41): 26875-26879.
- Truman AW, Millson SH, Nuttall JM, Mollapour M, Prodromou C, Piper PW. 2007. In the yeast heat shock response, Hsf1-directed induction of Hsp90 facilitates the activation of the Slf2 (Mpk1) mitogen-activated protein kinase required for cell integrity. *Eukaryot Cell* **6**(4): 744-752.
- Uenishi R, Gong P, Suzuki K, Koizumi S. 2006. Cross talk of heat shock and heavy metal regulatory pathways. *Biochem Biophys Res Commun* **341**(4): 1072-1077.
- Urano F, Bertolotti A, Ron D. 2000. IRE1 and efferent signaling from the endoplasmic reticulum. *Journal of cell science* **113 Pt 21**: 3697-3702.
- Valiante V, Baldin C, Hortschansky P, Jain R, Thywissen A, Strassburger M, Shelest E, Heinekamp T, Brakhage AA. 2016. The *Aspergillus fumigatus* conidial

melanin production is regulated by the bifunctional bHLH DevR and MADS-box RlmA transcription factors. *Mol Microbiol* **102**(2): 321-335.

Valiante V, Heinekamp T, Jain R, Hartl A, Brakhage AA. 2008. The mitogen-activated protein kinase MpkA of *Aspergillus fumigatus* regulates cell wall signaling and oxidative stress response. *Fungal Genet Biol* **45**(5): 618-627.

Valiante V, Jain R, Heinekamp T, Brakhage AA. 2009. The MpkA MAP kinase module regulates cell wall integrity signaling and pyomelanin formation in *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol* **46**(12): 909-918.

Verghese J, Abrams J, Wang Y, Morano KA. 2012. Biology of the heat shock response and protein chaperones: budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a model system. *Microbiol Mol Biol Rev* **76**(2): 115-158.

Veri AO, Miao Z, Shapiro RS, Tebbji F, O'Meara TR, Kim SH, Colazo J, Tan K, Vyas VK, Whiteway M et al. 2018a. Tuning Hsf1 levels drives distinct fungal morphogenetic programs with depletion impairing Hsp90 function and overexpression expanding the target space. *PLoS genetics* **14**(3): e1007270.

Veri AO, Robbins N, Cowen LE. 2018b. Regulation of the heat shock transcription factor Hsf1 in fungi: implications for temperature-dependent virulence traits. *FEMS Yeast Res* **18**(5).

Verna J, Lodder A, Lee K, Vagts A, Ballester R. 1997. A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(25): 13804-13809.

Wang H, Klein MG, Zou H, Lane W, Snell G, Levin I, Li K, Sang BC. 2015. Crystal structure of human stearyl-coenzyme A desaturase in complex with substrate. *Nature structural & molecular biology* **22**(7): 581-585.

Wang L, Wang S, Li W. 2012. RSeQC: quality control of RNA-seq experiments. *Bioinformatics* **28**(16): 2184-2185.

Wang Y, Wang S, Zeng L, Han Z, Cao J, Wang Y, Zhong G. 2021. Long-chain unsaturated fatty acids are involved in the viability and itraconazole susceptibility of *Aspergillus fumigatus*. *Biochem Biophys Res Commun* **585**: 82-88.

Waring RB, May GS, Morris NR. 1989. Characterization of an inducible expression system in *Aspergillus nidulans* using *alcA* and tubulin-coding genes. *Gene* **79**(1): 119-130.

Waterhouse AM, Procter JB, Martin DM, Clamp M, Barton GJ. 2009. Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* **25**(9): 1189-1191.

Wiederrecht G, Seto D, Parker CS. 1988. Isolation of the gene encoding the *S. cerevisiae* heat shock transcription factor. *Cell* **54**(6): 841-853.

Wilson RA, Chang PK, Dobrzyn A, Ntambi JM, Zarnowski R, Keller NP. 2004. Two Delta9-stearic acid desaturases are required for *Aspergillus nidulans* growth and development. *Fungal genetics and biology : FG & B* **41**(5): 501-509.

Wu C. 1995. Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**: 441-469.

- Xie C, Mao X, Huang J, Ding Y, Wu J, Dong S, Kong L, Gao G, Li CY, Wei L. 2011. KOBAS 2.0: a web server for annotation and identification of enriched pathways and diseases. *Nucleic Acids Res* **39**(Web Server issue): W316-322.
- Xu D, Sillaots S, Davison J, Hu W, Jiang B, Kauffman S, Martel N, Ocampo P, Oh C, Trosok S et al. 2009. Chemical genetic profiling and characterization of small-molecule compounds that affect the biosynthesis of unsaturated fatty acids in *Candida albicans*. *J Biol Chem* **284**(29): 19754-19764.
- Yamamoto A, Mizukami Y, Sakurai H. 2005. Identification of a novel class of target genes and a novel type of binding sequence of heat shock transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* **280**(12): 11911-11919.
- Yamamoto N, Maeda Y, Ikeda A, Sakurai H. 2008. Regulation of thermotolerance by stress-induced transcription factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic cell* **7**(5): 783-790.
- Yang DH, Jung KW, Bang S, Lee JW, Song MH, Floyd-Averette A, Festa RA, Ianiri G, Idnurm A, Thiele DJ et al. 2017. Rewiring of Signaling Networks Modulating Thermotolerance in the Human Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Genetics* **205**(1): 201-219.
- Yang Y, Lee M, Fairn GD. 2018. Phospholipid subcellular localization and dynamics. *J Biol Chem* **293**(17): 6230-6240.
- Zadra I, Abt B, Parson W, Haas H. 2000. xylP promoter-based expression system and its use for antisense downregulation of the *Penicillium chrysogenum* nitrogen regulator NRE. *Applied and environmental microbiology* **66**(11): 4810-4816.
- Zeng R, Li M, Chen Q, Wang L, Zhan P, Wang C, Lv G, Shen Y, Liu W. 2014. In vitro analyses of mild heat stress in combination with antifungal agents against *Aspergillus fumigatus* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* **58**(3): 1443-1450.
- Zhang S, Skalsky Y, Garfinkel DJ. 1999. MGA2 or SPT23 is required for transcription of the delta9 fatty acid desaturase gene, OLE1, and nuclear membrane integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **151**(2): 473-483.
- Zhang X, Jia X, Tian S, Zhang C, Lu Z, Chen Y, Chen F, Li Z, Su X, Han X et al. 2018. Role of the small GTPase Rho1 in cell wall integrity, stress response, and pathogenesis of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol* **120**: 30-41.
- Zhang X, Lester RL, Dickson RC. 2004. Pil1p and Lsp1p negatively regulate the 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-like kinase Pkh1p and downstream signaling pathways Pkc1p and Ypk1p. *J Biol Chem* **279**(21): 22030-22038.
- Zhao XJ, McElhaney-Feser GE, Bowen WH, Cole MF, Broedel SE, Jr., Cihlar RL. 1996. Requirement for the *Candida albicans* FAS2 gene for infection in a rat model of oropharyngeal candidiasis. *Microbiology (Reading)* **142** (Pt 9): 2509-2514.
- Zhao XJ, McElhaney-Feser GE, Sheridan MJ, Broedel SE, Jr., Cihlar RL. 1997. Avirulence of *Candida albicans* FAS2 mutants in a mouse model of systemic candidiasis. *Infect Immun* **65**(2): 829-832.
- Zheng X, Krakowiak J, Patel N, Beyzavi A, Ezike J, Khalil AS, Pincus D. 2016. Dynamic control of Hsf1 during heat shock by a chaperone switch and phosphorylation. *Elife* **5**.

Zu T, Verna J, Ballester R. 2001. Mutations in WSC genes for putative stress receptors result in sensitivity to multiple stress conditions and impairment of Rim1-dependent gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics* **266**(1): 142-155.

APÊNDICE A - Validação do RNA-Seq por RT-qPCR

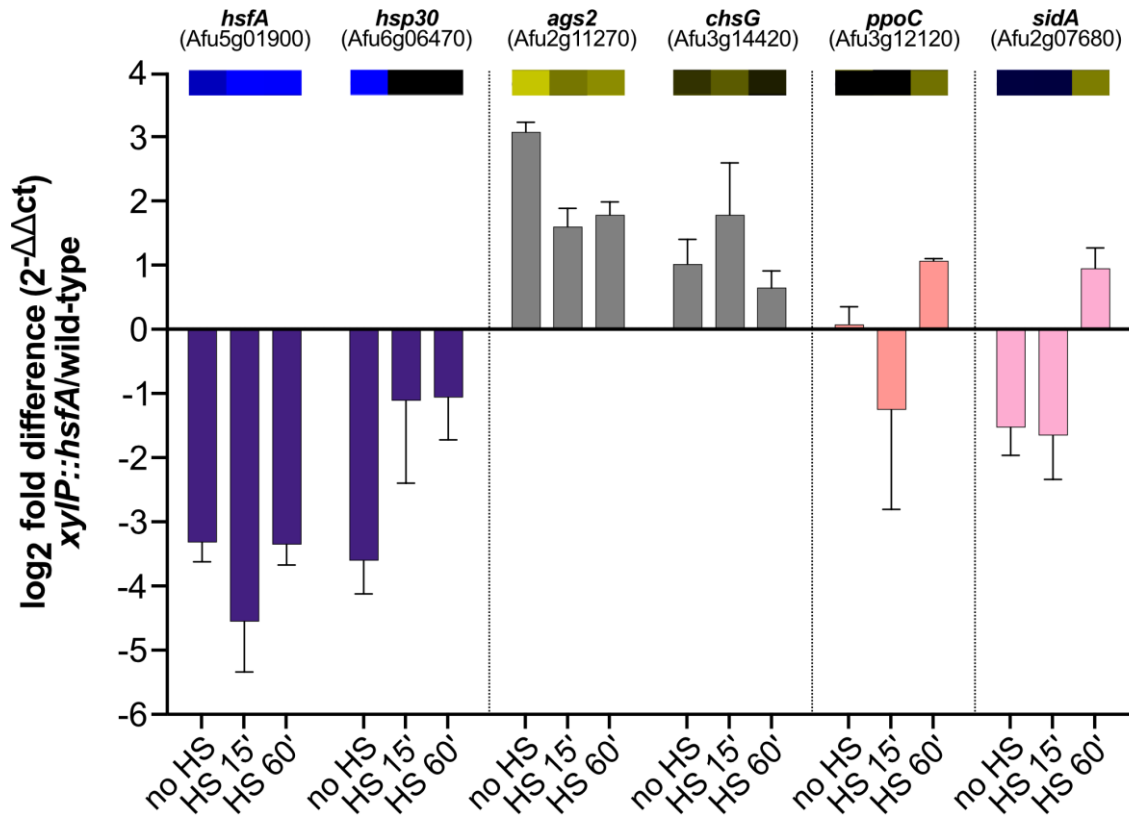


Figura A1. RT-qPCR de genes diferencialmente expressos selecionados na análise de RNA-Seq. As barras com cores diferentes e separadas por linhas tracejadas indicam diferentes categorias de GO, sendo estas: resposta ao choque térmico, atividade de chaperona e dobramento de proteína (azul); biossíntese e organização da parede celular (cinza); metabolismo lipídico (salmão); e metabolismo do ferro (rosa). As linhagens foram cultivadas em MM líquido suplementado com xilose 1% por 24 horas a 30°C. Posteriormente, os micélios foram lavados duas vezes com MM e incubados por 4 horas a 30°C em MM para a repressão de *hsfA*. O choque de temperatura foi induzido pela transferência do micélio para MM pré-aquecido por 15 e 60 minutos a 48°C. A abundância de cada gene foi dividida pela abundância do normalizador *tubA*. Os resultados são expressos como \log_2 da razão *xy/IP::hsfA/wt* para cada ponto de tempo. Médias \pm SD (n = 3) são mostrados. Para comparação, os *heat maps* no topo mostram os resultados do RNA-Seq para cada gene.

APÊNDICE B - Fórmulas e massas moleculares dos metabólitos secundários quantificados

Metabolite	Molecular formula	MW (g/mol)
Trypostatin B	C ₂₁ H ₂₅ N ₃ O ₂	351.45
Trypostatin A	C ₂₂ H ₂₇ N ₃ O ₃	381.476
Ferricrocin	C ₂₈ H ₄₇ N ₉ O ₁₃	717.734
Triacetylfusarinine C	C ₃₉ H ₆₃ FeN ₆ O ₁₅ ³⁺	911.805
Brevianamide F	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₂	283.331
Fumitremorgin B	C ₂₇ H ₃₃ N ₃ O ₅	479.577
Fumitremorgin C	C ₂₂ H ₂₅ N ₃ O ₃	379.46
Demethoxyfumitremorgin C	C ₂₁ H ₂₃ N ₃ O ₂	349.434
Pyripyropene A	C ₃₁ H ₃₇ NO ₁₀	583.634
Pyripyropene E	C ₂₇ H ₃₃ NO ₅	451.235
Pyripyropene F	C ₂₈ H ₃₅ NO ₅	465.251
Pyripyropene G	C ₂₇ H ₃₃ NO ₆	467.562
Pyripyropene N	C ₃₁ H ₃₉ NO ₈	553.652
Pyripyropene O	C ₂₉ H ₃₅ NO ₇	509.599
Fumiquinazoline A/B	C ₂₄ H ₂₃ N ₅ O ₄	445.479
Fumiquinazoline C/D	C ₂₄ H ₂₁ N ₅ O ₄	443.463

APÊNDICE C - Quantificação de fosfolipídios nas linhagens selvagem, *xylP::hsfA* e *xylP::sdeA*

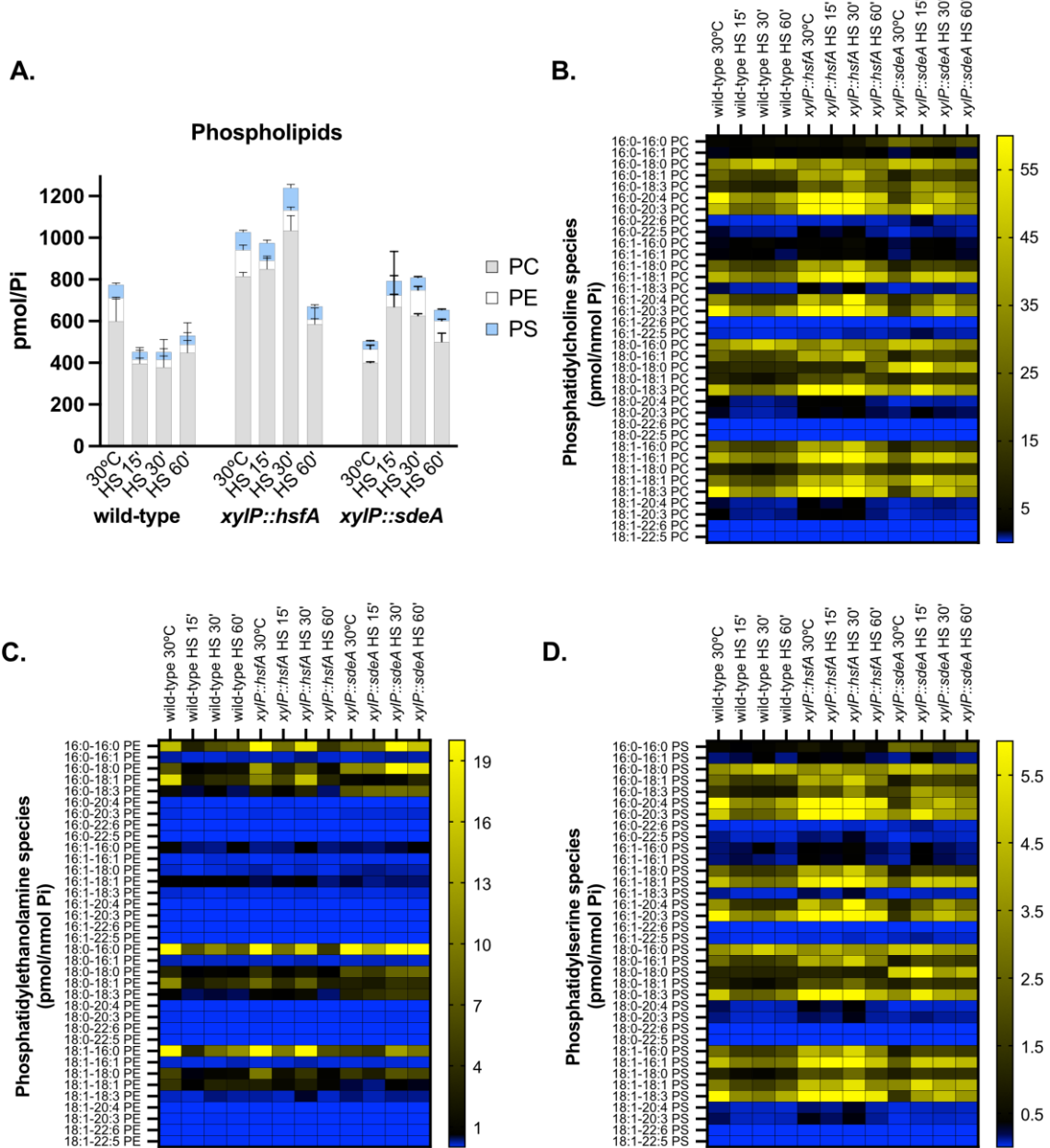


Figura C1. Quantificação de fosfolipídios nas linhagens selvagem, *xylP::hsfA* e *xylP::sdeA*. (A) Proporção geral de fosfolipídios medidos nas linhagens selvagem, *xylP::hsfA* e *xylP::sdeA* de *A. fumigatus*. A abundância de cada espécie de fosfatidilcolina (B), fosfatidiletanolamina (C) e fosfatidilserina (D) nas três linhagens na condição basal de 30°C e durante o choque térmico, sob repressão (glicose), foi quantificada e plotada na forma de gráfico *heat map*. Todas as nomenclaturas de abreviações de fosfolipídios são expressas como “ácido graxo-ácido graxo” no formato X:Y (X, número de carbonos; Y, número de ligações duplas C-C). Os *heat maps* foram criados utilizando o software GraphPad Prism. PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; PS: fosfatidilserina.

APÊNDICE D - Quantificação de esfingolipídios nas linhagens selvagem e *xyfP::hsfA*

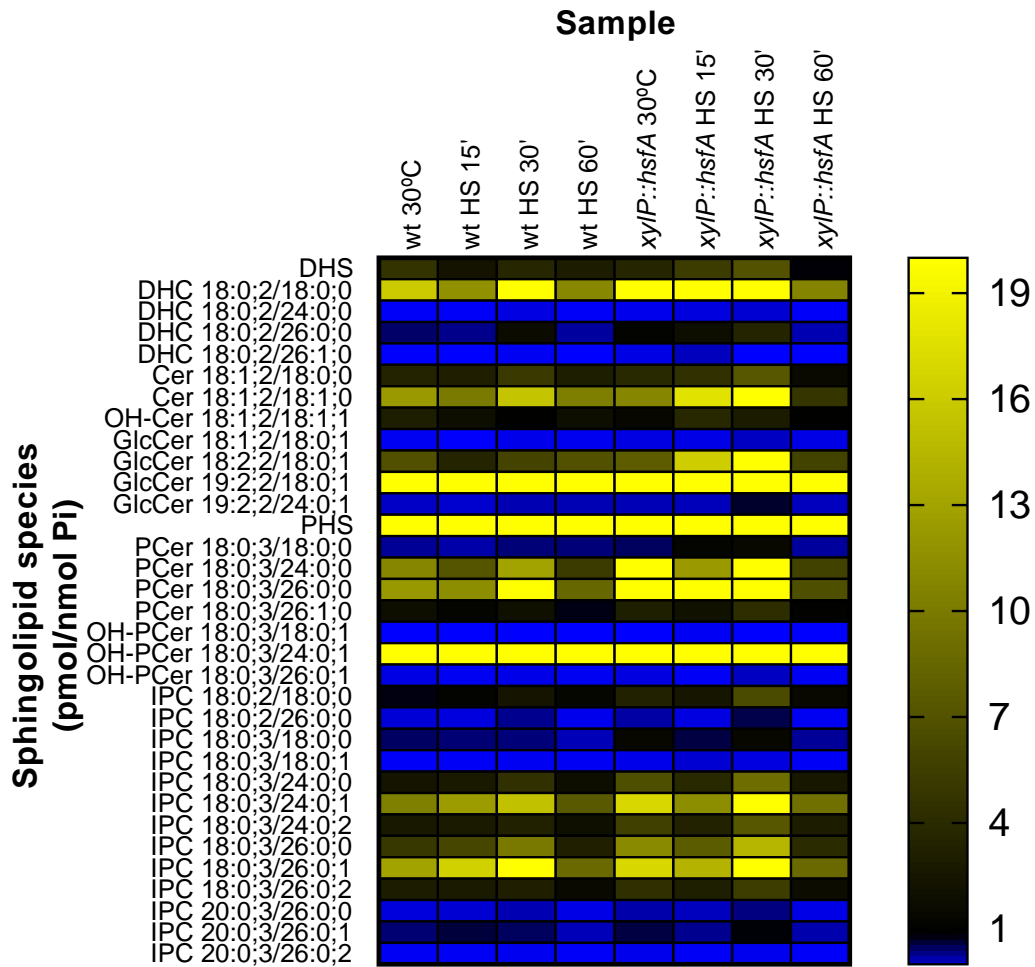


Figura D1. A repressão de *hsfA* provoca o acúmulo de esfingolipídios no choque de temperatura. As espécies de esfingolipídios das linhagens selvagem e *xyfP::hsfA* na condição basal de 30°C e durante o choque térmico, sob repressão (glicose), foram medidas por espectrometria de massas. Gráfico *heat map* mostrando a concentração de cada espécie medida. DHS: dihidroesfingosina; DHC: dihidroceramida; Cer: ceramida; GlcCer: glucosilceramida; OH-Cer: hidroxilceramida; PHS: fitoesfingosina; PCer: fitoceramida; OH-PCer: hidroxilfitoceramida; IPC: inositolfosforil ceramida. Todas as nomenclaturas de abreviações de esfingolipídios são expressas como “cadeia de base esfingoide/ácido graxo” no formato X:Y;Z (X, número de carbonos; Y, número de ligações duplas C-C; Z, número de grupos hidroxila). O *heat map* foi criado utilizando o software GraphPad Prism.

APÊNDICE E - Quantificação de esfingolipídios nas linhagens selvagem, *pkcA*^{G579R}, $\Delta mpkA$, $\Delta rlmA$ e $\Delta saka$

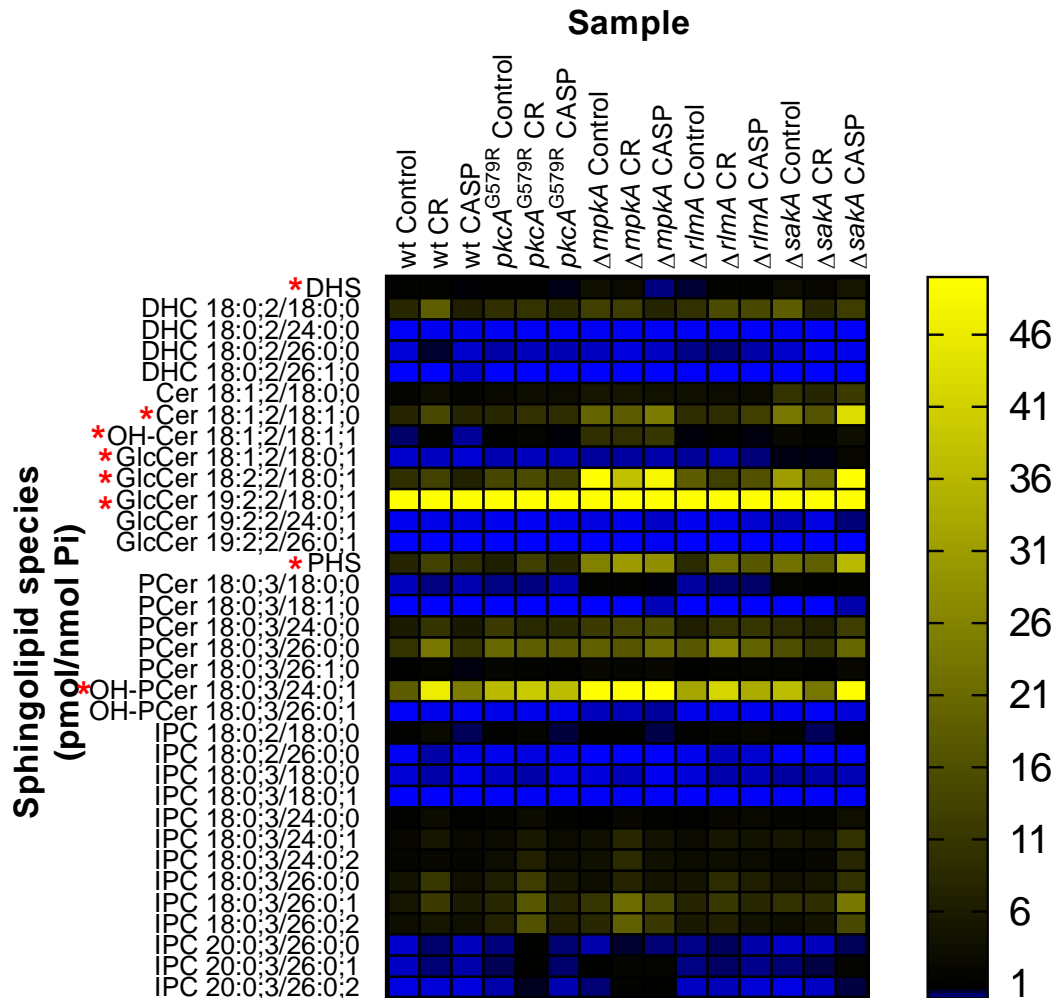


Figura E1. Os mutantes $\Delta mpkA$ e $\Delta saka$ acumulam mais ceramidas, hidroxi-ceramidas, hidroxi-fitoceramidas e glucosilceramidas. As espécies de esfingolipídios das linhagens selvagem, *pkcA*^{G579R}, $\Delta mpkA$, $\Delta rlmA$ e $\Delta saka$ na presença e ausência de estresse na parede celular causado por 300 $\mu\text{g/ml}$ de congo red (CR) ou 2 $\mu\text{g/ml}$ de caspofungin (CASP) foram medidas por espectrometria de massas. Gráfico *heat map* mostrando a concentração de cada espécie medida. Os asteriscos vermelhos destacam as espécies cuja concentração foi bem maior na linhagem $\Delta mpkA$ ou $\Delta saka$. DHS: dihidroesfingosina; DHC: dihidroceramida; Cer: ceramida; GlcCer: glucosilceramida; OH-Cer: hidroxi-ceramida; PHS: fitoesfingosina; PCer: fitoceramida; OH-PCer: hidroxi-fitoceramida; IPC: inositolfosforil ceramida. Todas as nomenclaturas de abreviações de esfingolipídios são expressas como “cadeia de base esfingoide/ácido graxo” no formato X:Y;Z (X, número de carbonos; Y, número de ligações duplas C-C; Z, número de grupos hidroxila). O *heat map* foi criado utilizando o software GraphPad Prism.

APÊNDICE F - Placas de TLC para quantificação de ergosterol

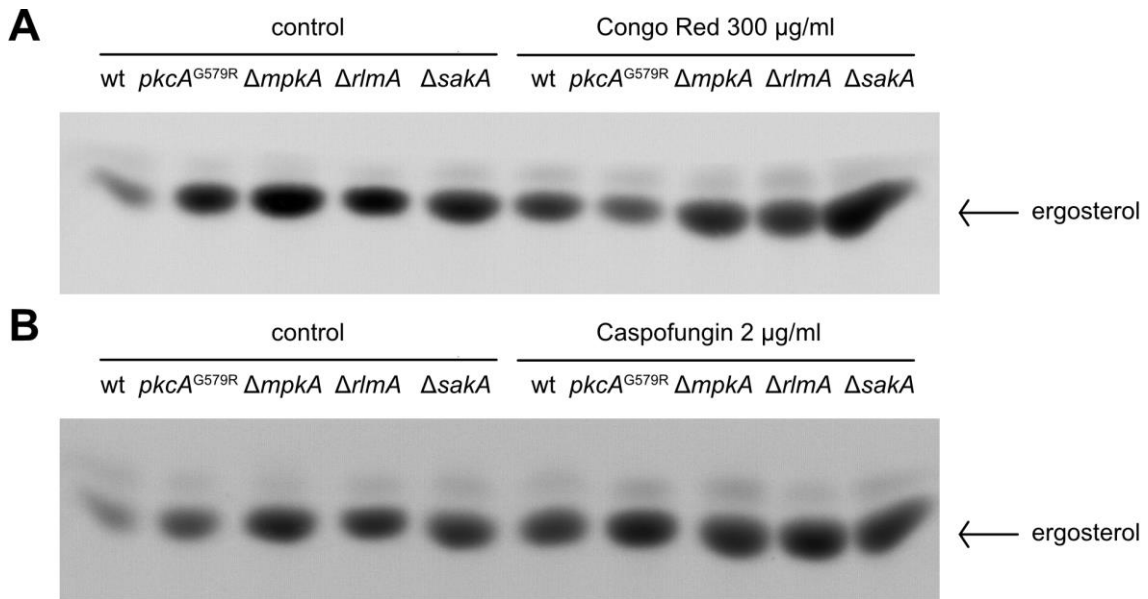


Figura F1. Placas de TLC das linhagens selvagem, *pkcA*^{G579R}, Δ *mpkA*, Δ *rlmA* e Δ *sakA*. Imagem para exemplificar o resultado obtido após a cromatografia em camada delgada (TLC) e utilizado para quantificação do ergosterol na presença de congo red (A) e caspofungin (B). As amostras foram extraídas e corridas em uma placa de sílica gel conforme descrito na seção Materiais e Métodos. A luz ultravioleta foi utilizada para visualizar as bandas correspondentes ao ergosterol, as quais foram submetidas à análise densitométrica no software ImageJ e normalizadas pela estimativa de Pi. O mesmo procedimento foi seguido para as outras réplicas (dados não mostrados).

APÊNDICE G - Artigos publicados durante o Doutorado do estudante

1. ROCHA, MARINA CAMPOS; **FABRI, JOÃO HENRIQUE TADINI MARILHANO**; DA SILVA, LILIAN PEREIRA; ANGOLINI, CÉLIO FERNANDO FIGUEIREDO; BERTOLINI, MARIA CÉLIA; DA CUNHA, ANDERSON FERREIRA; VALIANTE, VITO; GOLDMAN, GUSTAVO HENRIQUE; FILL, TAICIA PACHECO; MALAVAZI, IRAN. Transcriptional control of the production of *Aspergillus fumigatus* conidia-borne secondary metabolite fumiquinazoline C important for phagocytosis protection. *Genetics*, v. 036, p. 1, 2021. Doi: 10.1093/genetics/iyab036.

2. **FABRI, JOÃO HENRIQUE TADINI MARILHANO**; ROCHA, MARINA CAMPOS; FERNANDES, CAROLINE MOTA; PERSINOTI, GABRIELA FELIX; RIES, LAURE NICOLAS ANNICK; CUNHA, ANDERSON FERREIRA DA; GOLDMAN, GUSTAVO HENRIQUE; DEL POETA, MAURIZIO; MALAVAZI, IRAN. The Heat Shock Transcription Factor HsfA Is Essential for Thermotolerance and Regulates Cell Wall Integrity in *Aspergillus fumigatus*. *Frontiers in Microbiology*, v. 12, p. 656548, 2021. Doi: 10.3389/fmicb.2021.656548.

3. ROCHA, MARINA CAMPOS; **FABRI, JOÃO HENRIQUE TADINI MARILHANO**; SIMÕES, ISABELLE TAIRA; SILVA-ROCHA, RAFAEL; HAGIWARA, DAISUKE; DA CUNHA, ANDERSON FERREIRA; GOLDMAN, GUSTAVO HENRIQUE; CÁNOVAS, DAVID; MALAVAZI, IRAN. The cell wall integrity pathway contributes to the early stages of *Aspergillus fumigatus* asexual development. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 86, p. 1/e02347-19, 2020. Doi: 10.1128/AEM.02347-19.

4. **FABRI, JOÃO HENRIQUE TADINI MARILHANO**; DE SÁ, NIVEA PEREIRA; MALAVAZI, IRAN; DEL POETA, MAURIZIO. The dynamics and role of sphingolipids in eukaryotic organisms upon thermal adaptation. *Progress in Lipid Research*, v. 80, p. 101063, 2020. Doi: 10.1016/j.plipres.2020.101063.

5. ROCHA, MARINA CAMPOS; MINARI, KARINE; **FABRI, JOÃO HENRIQUE TADINI MARILHANO**; KERKAERT, JOSHUA D.; GAVA, LISANDRA MARQUES; CUNHA, ANDERSON FERREIRA; CRAMER, ROBERT A.; BORGES, JÚLIO CÉSAR; MALAVAZI, IRAN. *Aspergillus fumigatus* Hsp90 interacts with the main components of the cell wall integrity pathway and

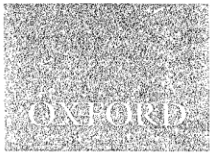
cooperates in heat shock and cell wall stress adaptation. *Cellular Microbiology*, v. 13273, p. 1, 2020. Doi: 10.1111/cmi.13273.

6. **FABRI, JOÃO HENRIQUE TADINI MARILHANO**; GODOY, NAIANE LIMA; ROCHA, MARINA CAMPOS; MUNSHI, MANSA; COCIO, TIAGO ALEXANDRE; VON ZESKA KRESS, MARCIA REGINA; FILL, TAICIA PACHECO; DA CUNHA, ANDERSON FERREIRA; DEL POETA, MAURIZIO; MALAVAZI, IRAN. The AGC Kinase YpkA Regulates Sphingolipids Biosynthesis and Physically Interacts With SakA MAP Kinase in *Aspergillus fumigatus*. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, p. 1/3347, 2019. Doi: 10.3389/fmicb.2018.03347.

7. **FABRI, JOÃO HENRIQUE TADINI MARILHANO**; ROCHA, MARINA CAMPOS; MALAVAZI, IRAN. Overview of the Interplay Between Cell Wall Integrity Signaling Pathways and Membrane Lipid biosynthesis in fungi: perspectives for *Aspergillus fumigatus*. *Current Protein & Peptide Science*, v. 20, p. 1, 2019. Doi: 10.2174/1389203720666190705164203.

8. ROCHA, MARINA CAMPOS; DE GODOY, KRISSIA FRANCO; BANNITZ-FERNANDES, RENATA; **FABRI, JOÃO HENRIQUE TADINI MARILHANO**; BARBOSA, MAYRA M. FERRARI; DE CASTRO, PATRÍCIA ALVES; ALMEIDA, FAUSTO; GOLDMAN, GUSTAVO HENRIQUE; DA CUNHA, ANDERSON FERREIRA; NETTO, LUIS E. S.; DE OLIVEIRA, MARCOS ANTONIO; MALAVAZI, IRAN. Analyses of the three 1-Cys Peroxiredoxins from *Aspergillus fumigatus* reveal that cytosolic Prx1 is central to H₂O₂ metabolism and virulence. *Scientific Reports*, v. 8, p. 12314 (2018), 2018. Doi: 10.1038/s41598-018-30108-2.

9. DE ASSIS, LEANDRO JOSÉ; MANFIOLLI, ADRIANA; MATTOS, ELICIANE; **FABRI, JOÃO HENRIQUE TADINI MARILHANO**; MALAVAZI, IRAN; JACOBSEN, ILSE D.; BROCK, MATTHIAS; CRAMER, ROBERT A.; THAMMAHONG, ARSA; HAGIWARA, DAISUKE; RIES, LAURE NICOLAS ANNICK; GOLDMAN, GUSTAVO HENRIQUE. Protein Kinase A and High-Osmolarity Glycerol Response Pathways Cooperatively Control Cell Wall Carbohydrate Mobilization in *Aspergillus fumigatus*. *mBio*, v. 9, p. e01952-18, 2018. Doi: 10.1128/mBio.01952-18.



Transcriptional Control of the Production of *Aspergillus fumigatus* Conidia-Borne Secondary Metabolite Fumiquinazoline C Important for Phagocytosis Protection

Marina Campos Rocha ¹, João Henrique Tadini Marilhan Fabri ¹, Lilian Pereira Silva ², Célio Fernando Figueiredo Angolini ³, Maria Célia Bertolini ⁴, Anderson Ferreira da Cunha ¹, Vito Valiante ⁵, Gustavo Henrique Goldman ², Taícia Pacheco Fill ⁶ and Iran Malavazi *

¹Departamento de Genética e Evolução, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, Brazil

²Departamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

³Universidade Federal do ABC, Centro de Ciências Naturais e Humanas, Santo André, São Paulo, Brazil

⁴Departamento de Bioquímica e Tecnologia, Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, Brazil

⁵Leibniz Research Group Biobricks of Microbial Natural Product Syntheses, Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology-Hans Knöll Institute (HKI), Jena, Germany

⁶Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

*Corresponding author: Departamento de Genética e Evolução, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Via Washington Luís, Km. 235, Caixa Postal 676, Bairro Monjolinho, CEP 13565-905, São Carlos, São Paulo, Brazil. E-mail: imalavazi@ufscar.br

Abstract

Aspergillus fumigatus produces diverse secondary metabolites whose biological functions and regulation remain to be understood. Despite the importance of the conidia for this fungus, the role of the conidia-born metabolite fumiquinazoline C (FqC) is unclear. Here, we describe a dual function of the cell-wall integrity pathway in regulating FqC biosynthesis dictated by the MAPK kinase MpkA, which phosphorylates one of the nonribosomal peptide synthetases enzymes of the cluster (FmqC), and the transcription factor RlmA, which directly regulates the expression of *fmq* genes. Another level of crosstalk between the FqC regulation and the cell physiology is described since the deletion of the stress-responsive transcription factor *sebA* provokes derepression of the *fmq* cluster and overproduction of FqC. Thus, we describe a mechanism by which *A. fumigatus* controls FqC biosynthesis orchestrated by MpkA-RlmA and SebA and hence enabling survival and adaptation to the environmental niche, given that FqC is a deterrent of amoeba predation.

Keywords: cell wall integrity pathway; fumiquinazoline C; *pkcA*; *mpkA*; *rlmA*; *sebA*; amoeba predation

Introduction

Conidia (asexual spores) are the dispersive propagules for most of the known filamentous fungi. The ability of the human pathogen *Aspergillus fumigatus* to produce massive amounts of such structures is a hallmark in comparison to other pathogenic molds and is recognized as a critical element that facilitates its environmental dispersion and access to the human airways (Kwon-Chung and Sugui 2013). Subsequently, conidial germination and mycelium formation in the human lungs of severely immunocompromised patients can cause the life-threatening disease invasive pulmonary aspergillosis, which is associated with high mortality rates (Brown et al. 2012; Bongomin et al. 2017; Latge and Chamilos 2019).

As an environmentally acquired pathogen, *A. fumigatus* spends most of its life cycle in the soil (Casadevall et al. 2019; Ferling et al. 2020). The structural and chemical elements that decorate the conidia surface, such as the secondary metabolites (SM), are considered important self-defense weapons because they can help *A. fumigatus* to survive in natural niches where it

faces multikingdom microbial competition and predation by soil inhabitants (Hillmann et al. 2015; Ferling et al. 2020). These observations support the idea that soil amoeba serves as a selection mechanism, leading to the emergence of virulence traits in different microbes via the development of strategies to counteract phagocytic uptake or intracellular passage (Erken et al. 2013; Novohradská et al. 2017; Casadevall et al. 2019).

It has been shown that the presence of SMs accumulated in the *A. fumigatus* aerial structures interferes in conidial uptake by mammalian phagocytes and also from soil predators such as frugivorous (*Protostelium aurantium*) and nonfrugivorous (*Dictyostelium discoideum*) amoebas (Hillmann et al. 2015; Raffa and Keller 2019; Ferling et al. 2020). Among the main SMs enriched in *A. fumigatus* conidia, 1,8-dihydroxynaphthalene-melanin and tryptacidin have received most of the attention over the past years with a focus on how these prototypical conidia-born SM representatives confer a dual-usage capability to defend against phagocytes in the environment and animal hosts (Jahn et al. 2002; Gauthier et al. 2012; Hillmann et al. 2015; Mattern et al. 2015; Hagiwara et al. 2017).

Received: January 27, 2021. Accepted: February 28, 2021

© The Author(s) 2021. Published by Oxford University Press on behalf of Genetics Society of America. All rights reserved.

For permissions, please email: journals.permissions@oup.com



The Heat Shock Transcription Factor HsfA Is Essential for Thermotolerance and Regulates Cell Wall Integrity in *Aspergillus fumigatus*

João Henrique Tadini Marilhana Fabri¹, Marina Campos Rocha¹, Caroline Mota Fernandes², Gabriela Felix Persinoti³, Laure Nicolas Annick Ries⁴, Anderson Ferreira da Cunha¹, Gustavo Henrique Goldman⁵, Maurizio Del Poeta^{2,6,7,8} and Iran Malavazi^{1*}

¹ Departamento de Genética e Evolução, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brazil, ² Department of Microbiology and Immunology, Stony Brook University, Stony Brook, NY, United States, ³ Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBPF), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Campinas, São Paulo, Brazil, ⁴ MRC Centre for Medical Mycology, University of Exeter, Exeter, United Kingdom, ⁵ Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, ⁶ Division of Infectious Diseases, School of Medicine, Stony Brook University, Stony Brook, NY, United States, ⁷ Institute of Chemical Biology and Drug Discovery, Stony Brook University, Stony Brook, NY, United States, ⁸ Veterans Administration Medical Center, Northport, NY, United States

OPEN ACCESS

Edited by:

Allan J. Guimaraes,
Fluminense Federal University, Brazil

Reviewed by:

Louise Walker,
University of Aberdeen,
United Kingdom
Nir Osherov,
Tel Aviv University, Israel

*Correspondence:

Iran Malavazi
imalavazi@ufscar.br

Specialty section:

This article was submitted to
Microbial Physiology and Metabolism,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 21 January 2021

Accepted: 11 March 2021

Published: 09 April 2021

Citation:

Fabri JHTM, Rocha MC, Fernandes CM, Persinoti GF, Ries LNA, Cunha AF, Goldman GH, Del Poeta M and Malavazi I (2021) The Heat Shock Transcription Factor HsfA Is Essential for Thermotolerance and Regulates Cell Wall Integrity in *Aspergillus fumigatus*. *Front. Microbiol.* 12:656548. doi: 10.3389/fmicb.2021.656548

The deleterious effects of human-induced climate change have long been predicted. However, the imminent emergence and spread of new diseases, including fungal infections through the rise of thermotolerant strains, is still neglected, despite being a potential consequence of global warming. Thermotolerance is a remarkable virulence attribute of the mold *Aspergillus fumigatus*. Under high-temperature stress, opportunistic fungal pathogens deploy an adaptive mechanism known as heat shock (HS) response controlled by heat shock transcription factors (HSFs). In eukaryotes, HSFs regulate the expression of several heat shock proteins (HSPs), such as the chaperone Hsp90, which is part of the cellular program for heat adaptation and a direct target of HSFs. We recently observed that the perturbation in cell wall integrity (CWI) causes concomitant susceptibility to elevated temperatures in *A. fumigatus*, although the mechanisms underpinning the HS response and CWI cross talking are not elucidated. Here, we aim at further deciphering the interplay between HS and CWI. Our results show that cell wall ultrastructure is severely modified when *A. fumigatus* is exposed to HS. We identify the transcription factor HsfA as essential for *A. fumigatus* viability, thermotolerance, and CWI. Indeed, HS and cell wall stress trigger the coordinated expression of both *hsfA* and *hsp90*. Furthermore, the CWI signaling pathway components PkcA and MpkA were shown to be important for HsfA and Hsp90 expression in the *A. fumigatus* biofilms. Lastly, RNA-sequencing confirmed that *hsfA* regulates the expression of genes related to the HS response,



The Cell Wall Integrity Pathway Contributes to the Early Stages of *Aspergillus fumigatus* Asexual Development

Marina Campos Rocha,^a João Henrique Tadini Marilhano Fabri,^a Isabelle Taira Simões,^a Rafael Silva-Rocha,^b Daisuke Hagiwara,^c Anderson Ferreira da Cunha,^a Gustavo Henrique Goldman,^d David Cánovas,^e Iran Malavazi^a

^aDepartamento de Genética e Evolução, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, Brazil

^bDepartamento de Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

^cFaculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, Ibaraki, Japan

^dDepartamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

^eDepartment of Genetics, University of Seville, Seville, Spain

ABSTRACT *Aspergillus fumigatus* is a major cause of human disease. The survival of this fungus is dependent on the cell wall organization and function of its components. The cell wall integrity pathway (CWIP) is the primary signaling cascade that controls *de novo* synthesis of the cell wall in fungi. Abundant conidiation is a hallmark in *A. fumigatus*, and uptake of conidia by a susceptible host is usually the initial event in infection. The formation of conidia is mediated by the development of fungus-specific specialized structures, conidiophores, which are accompanied by cell wall remodeling. The molecular regulation of these changes in cell wall composition required for the rise of conidiophore from the solid surface and to disperse the conidia into the air is currently unknown. Here, we investigated the role of CWIP in conidiation. We show that CWIP *pkcA*^{GS79R}, *ΔmpkA*, and *ΔrlmA* mutants displayed reduced conidiation during synchronized asexual differentiation. The transcription factor RlmA directly regulated the expression of regulators of conidiation, including *flbB*, *flbC*, *brlA*, *abaA*, and *rasB*, as well as genes involved in cell wall synthesis and remodeling, and this affected the chitin content in aerial hyphae. Phosphorylation of RlmA and MpkA was increased during asexual differentiation. We also observed that MpkA physically associated with the proteins FlbB, FlbC, BrlA, and RasB during this process, suggesting another level of cross talk between the CWIP and asexual development pathways. In summary, our results support the conclusion that one function of the CWIP is the regulation of asexual development in filamentous fungi.

IMPORTANCE A remarkable feature of the human pathogen *Aspergillus fumigatus* is its ability to produce impressive amounts of infectious propagules known as conidia. These particles reach immunocompromised patients and may initiate a life-threatening mycosis. The conidiation process in *Aspergillus* is governed by a sequence of proteins that coordinate the development of conidiophores. This process requires the remodeling of the cell wall so that the conidiophores can rise and withstand the chains of conidia. The events regulating cell wall remodeling during conidiation are currently unknown. Here, we show that the cell wall integrity pathway (CWIP) components RlmA and MpkA directly contribute to the activation of the conidiation cascade by enabling transcription or phosphorylation of critical proteins involved in asexual development. This study points to an essential role for the CWIP during conidiation and provides further insights into the complex regulation of asexual development in filamentous fungi.

KEYWORDS asexual development, *Aspergillus fumigatus*, cell wall integrity, MpkA, PkcA, RlmA

Citation Rocha MC, Fabri JHTM, Simões IT, Silva-Rocha R, Hagiwara D, da Cunha AF, Goldman GH, Cánovas D, Malavazi I. 2020. The cell wall integrity pathway contributes to the early stages of *Aspergillus fumigatus* asexual development. *Appl Environ Microbiol* 86:e02347-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.02347-19>.

Editor Irina S. Druzhinina, Nanjing Agricultural University

Copyright © 2020 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Iran Malavazi, imalavazi@ufscar.br.

Received 14 October 2019

Accepted 10 January 2020

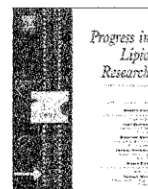
Accepted manuscript posted online 31 January 2020

Published 18 March 2020



Contents lists available at ScienceDirect

Progress in Lipid Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/plipres

Review

The dynamics and role of sphingolipids in eukaryotic organisms upon thermal adaptation

João Henrique Tadini Marilhano Fabri^{a,b}, Nivea Pereira de Sá^a, Iran Malavazi^b, Maurizio Del Poeta^{a,c,d,*}^a Department of Microbiology and Immunology, Stony Brook University, Stony Brook, New York, USA^b Departamento de Genética e Evolução, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brazil^c Division of Infectious Diseases, School of Medicine, Stony Brook University, Stony Brook, New York, USA^d Veterans Administration Medical Center, Northport, New York, USA

ARTICLE INFO

Keywords:

Sphingolipid
Ceramide
Heat shock
Cold stress
Heat shock protein
Lysophospholipid
Fungal virulence

ABSTRACT

All living beings have an optimal temperature for growth and survival. With the advancement of global warming, the search for understanding adaptive processes to climate changes has gained prominence. In this context, all living beings monitor the external temperature and develop adaptive responses to thermal variations. These responses ultimately change the functioning of the cell and affect the most diverse structures and processes. One of the first structures to detect thermal variations is the plasma membrane, whose constitution allows triggering of intracellular signals that assist in the response to temperature stress. Although studies on this topic have been conducted, the underlying mechanisms of recognizing thermal changes and modifying cellular functioning to adapt to this condition are not fully understood. Recently, many reports have indicated the participation of sphingolipids (SLs), major components of the plasma membrane, in the regulation of the thermal stress response. SLs can structurally reinforce the membrane or/and send signals intracellularly to control numerous cellular processes, such as apoptosis, cytoskeleton polarization, cell cycle arresting and fungal virulence. In this review, we discuss how SLs synthesis changes during both heat and cold stresses, focusing on fungi, plants, animals and human cells. The role of lysophospholipids is also discussed.

1. Introduction

Biological membranes are indispensable for cell survival in view of the numerous structural and signaling functions they perform. Amongst the lipid molecules that make up the eukaryotic plasma membrane, the sphingolipids (SLs) are some of the most unique, functioning as both structural components and signaling molecules. In addition to being involved in processes such as stress response, cell cycle arrest, apoptosis, pathogenesis, cell growth and differentiation [1], SLs also associate with sterols in eukaryotic membranes to form the lipid rafts microdomains, which are fundamental for signal transduction and

membrane trafficking [2]. Structurally, SLs are characterized by a long-chain sphingoid base linked to a fatty acid chain and to a polar head group. The *de novo* biosynthetic pathway of these bioactive compounds begins in the endoplasmic reticulum (ER) with the condensation of serine and palmitoyl-CoA by the activity of the serine palmitoyl-transferase (SPT), and sequential reactions lead to the generation of dihydrosphingosine (DHS), dihydroceramide (DHC) and ceramide (Cer), as shown in Fig. 1 [3]. Next, more complex and specific SLs are usually formed in the Golgi, such as glucosylceramide (GlcCer) in fungi, plants and mammals, phytoceramide (PHC) and glycosylinositol phosphoryl ceramide (GIPC) in fungi and plants, inositol

Abbreviations: Cer, ceramides; COR, cold-regulated; DHC, dihydroceramide; DHS, dihydrosphingosine; DHS-1P, dihydrosphingosine-1-phosphate; ER, endoplasmic reticulum; GalCer, galactosylceramide; GIPC, glycosylinositol phosphoryl ceramide; GlcCer, glucosylceramide; GPCRs, G-protein-coupled receptors; HS, heat shock; HSFs, heat shock transcription factors; HSPs, heat shock proteins; IPC, inositol phosphorylceramide; LCBs, long chain bases; LCB-PS, long chain base phosphates; LPLs, lysophospholipids; LPA, lysophosphatidic acid; LPC, lysophosphatidylcholine; LPE, lysophosphatidylethanolamine; LPI, lysophosphatidylinositol; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MIPC, mannosylinositol phosphorylceramide; M(IP)2C, mannosyl diinositol phosphoryl ceramide; NO, nitric oxide; PIP2, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate; PHC, phytoceramide; PHS, phytosphingosine; PHS-1P, phytosphingosine-1-phosphate; ROS, reactive oxygen species; SLs, sphingolipids; SM, sphingomyelin; SPC, sphingosylphosphorylcholine; Sph, sphingosine; Sph-1P, sphingosine 1-phosphate; SPT, serine palmitoyltransferase; STRE, stress response element.

* Corresponding author at: Department of Microbiology and Immunology, Stony Brook University, Stony Brook, New York, USA.

E-mail address: maurizio.delpoeta@stonybrook.edu (M. Del Poeta).<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2020.101063>

Received 2 June 2020; Received in revised form 18 August 2020; Accepted 27 August 2020

Available online 02 September 2020

0163-7827/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

RESEARCH ARTICLE

Aspergillus fumigatus Hsp90 interacts with the main components of the cell wall integrity pathway and cooperates in heat shock and cell wall stress adaptation

Marina Campos Rocha¹ | Karine Minari^{1,2} |
 João Henrique Tadini Marilhano Fabri¹ | Joshua D. Kerkaert³ |
 Lisandra Marques Gava¹ | Anderson Ferreira da Cunha¹ | Robert A. Cramer³ |
 Júlio César Borges² | Iran Malavazi¹

¹Departamento de Genética e Evolução, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brazil

²Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, Brazil

³Department of Microbiology and Immunology, Geisel School of Medicine at Dartmouth, Hanover, New Hampshire

Correspondence

Iran Malavazi, Departamento de Genética e Evolução, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brazil.
 Email: imalavazi@ufscar.br

Funding information

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Grant/Award Numbers: 462383/2014-8, 471415/2013-8; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Grant/Award Numbers: 2016/07870-9, 2014/07206-6, 2015/17541-0, 2017/07335-9, 2017/19694-3, 2017/26131-5; National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Grant/Award Numbers: R01AI130128, R01AI146121

Abstract

The initiation of *Aspergillus fumigatus* infection occurs via dormant conidia deposition into the airways. Therefore, conidial germination and subsequent hyphal extension and growth occur in a sustained heat shock (HS) environment promoted by the host. The cell wall integrity pathway (CWIP) and the essential eukaryotic chaperone Hsp90 are critical for fungi to survive HS. Although *A. fumigatus* is a thermophilic fungus, the mechanisms underpinning the HS response are not thoroughly described and important to define its role in pathogenesis, virulence and antifungal drug responses. Here, we investigate the contribution of the CWIP in *A. fumigatus* thermotolerance. We observed that the CWIP components PkcA, MpkA and RlmA are Hsp90 clients and that a PkcA^{G579R} mutation abolishes this interaction. PkcA^{G579R} also abolishes MpkA activation in the short-term response to HS. Biochemical and biophysical analyses indicated that Hsp90 is a dimeric functional ATPase, which has a higher affinity for ADP than ATP and prevents MpkA aggregation in vitro. Our data suggest that the CWIP is constitutively required for *A. fumigatus* to cope with the temperature increase found in the mammalian lung environment, emphasising the importance of this pathway in supporting thermotolerance and cell wall integrity.

KEYWORDS

Aspergillus fumigatus, cell wall integrity, heat shock, Hsp90, MpkA, PkcA

1 | INTRODUCTION

Aspergillus fumigatus is the most common *Aspergillus* species to cause systemic infections in humans (Latge & Chamilos, 2019). The clinical spectrum of aspergillosis varies, but preexisting immunosuppression is most often associated with the establishment of invasive pulmonary aspergillosis, the most severe form of infection that accounts for high mortality rates (Brown et al., 2012, 2014; Kousha, Tadi, & Soubani, 2011; Sugui, Kwon-Chung, Juvvadi, Latge, & Steinbach, 2014; van de Veerdonk,

Gresnigt, Romani, Netea, & Latge, 2017). *A. fumigatus* is a thermophilic saprophytic fungus that can grow at temperatures up to 55°C and survive as viable conidia at temperatures up to 70°C (Albrecht, Guthke, Brakhage, & Kniemeyer, 2010; Araujo & Rodrigues, 2004; Brakhage & Langfelder, 2002; Rhodes & Askew, 2010). Therefore, this attribute of *A. fumigatus* biology allows adaptation to temperatures found before and after infection in mammalian hosts. In contrast, other species such as *A. flavus*, *A. terreus* and *A. niger* are less tolerant to germination and growth at higher temperatures (Araujo & Rodrigues, 2004; Perfect



The AGC Kinase YpkA Regulates Sphingolipids Biosynthesis and Physically Interacts With Saka MAP Kinase in *Aspergillus fumigatus*

OPEN ACCESS

Edited by:

Neil Andrew Brown,
University of Bath, United Kingdom

Reviewed by:

Anita Hilda Straus,
Federal University of São Paulo, Brazil
Steven Harris,
University of Manitoba, Canada

*Correspondence:

Iran Malavazi
imalavazi@ufscar.br

†These authors have contributed
equally to this work

†Present address:

Tiago Alexandre Cocio,
Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto, Hospital das Clínicas
de Ribeirão Preto, Universidade
de São Paulo, São Paulo, Brazil

Specialty section:

This article was submitted to
Fungi and Their Interactions,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 17 October 2018

Accepted: 28 December 2018

Published: 14 January 2019

Citation:

Fabri JHTM, Godoy NL,
Rocha MC, Munshi M, Cocio TA,
von Zeska Kress MR, Fill TP,
da Cunha AF, Del Poeta M and
Malavazi I (2019) The AGC Kinase
YpkA Regulates Sphingolipids
Biosynthesis and Physically Interacts
With Saka MAP Kinase in *Aspergillus
fumigatus*. *Front. Microbiol.* 9:3347.
doi: 10.3389/fmicb.2018.03347

João Henrique Tadini Marilhano Fabri^{1†}, Naiane Lima Godoy^{1†}, Marina Campos Rocha¹, Mansa Munshi², Tiago Alexandre Cocio^{1‡}, Marcia Regina von Zeska Kress³, Taicia Pacheco Fill⁴, Anderson Ferreira da Cunha¹, Maurizio Del Poeta^{2,5,6,7} and Iran Malavazi^{1*}

¹ Departamento de Genética e Evolução, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brazil, ² Department of Molecular Genetics and Microbiology, Stony Brook University, Stony Brook, NY, United States, ³ Departamento de Análises Clínicas Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil, ⁴ Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brazil, ⁵ Division of Infectious Diseases, School of Medicine, Stony Brook University, Stony Brook, NY, United States, ⁶ Institute of Chemical Biology and Drug Discovery, Stony Brook University, Stony Brook, NY, United States, ⁷ Veterans Administration Medical Center, Northport, NY, United States

Sphingolipids (SL) are complex lipids and components of the plasma membrane which are involved in numerous cellular processes, as well as important for virulence of different fungal pathogens. In yeast, SL biosynthesis is regulated by the “AGC kinases” Ypk1 and Ypk2, which also seem to connect the SL biosynthesis with the cell wall integrity (CWI) and the High Osmolarity Glycerol (HOG) pathways. Here, we investigate the role of *ypkA*^{YPK1} in SL biosynthesis and its relationship with the CWI and the HOG pathways in the opportunistic human pathogen *Aspergillus fumigatus*. We found that *ypkA* is important for fungal viability, since the Δ *ypkA* strain presented a drastically sick phenotype and complete absence of conidiation. We observed that under repressive condition, the conditional mutant *niiA::ypkA* exhibited vegetative growth defects, impaired germination and thermosensitivity. In addition, the *ypkA* loss of function caused a decrease in glycosphingolipid (GSL) levels, especially the metabolic intermediates belonging to the neutral GSL branch including dihydroceramide (DHC), ceramide (Cer), and glucosylceramide (GlcCer), but interestingly a small increase in ergosterol content. Genetic analyzes showed that *ypkA* genetically interacts with the MAP kinases of CWI and HOG pathways, *mpkA* and *saka*, respectively, while only *Saka* physically interacts with YpkA. Our results suggest that YpkA is important for fungal survival through the regulation of GSL biosynthesis and cross talks with *A. fumigatus* MAP kinase pathways.

Keywords: *Aspergillus fumigatus*, sphingolipids, MpkA, Saka, YpkA

REVIEW ARTICLE



**BENTHAM
SCIENCE**

Overview of the Interplay Between Cell Wall Integrity Signaling Pathways and Membrane Lipid Biosynthesis in Fungi: Perspectives for *Aspergillus fumigatus*



João Henrique T.M. Fabri¹, Marina C. Rocha¹ and Iran Malavazi^{1,*}

¹Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brazil

Abstract: The cell wall (CW) and plasma membrane are fundamental structures that define cell shape and support different cellular functions. In pathogenic fungi, such as *Aspergillus fumigatus*, they not only play structural roles but are also important for virulence and immune recognition. Both the CW and the plasma membrane remain as attractive drug targets to treat fungal infections, such as the Invasive Pulmonary Aspergillosis (IPA), a disease associated with high morbimortality in immunocompromised individuals. The low efficiency of echinocandins that target the fungal CW biosynthesis, the occurrence of environmental isolates resistant to azoles such as voriconazole and the known drawbacks associated with amphotericin toxicity foster the urgent need for fungal-specific drugable targets and/or more efficient combinatorial therapeutic strategies. Reverse genetic approaches in fungi unveil that perturbations of the CW also render cells with increased susceptibility to membrane disrupting agents and vice-versa. However, how the fungal cells simultaneously cope with perturbation in CW polysaccharides and cell membrane proteins to allow morphogenesis is scarcely known. Here, we focus on current information on how the main signaling pathways that maintain fungal cell wall integrity, such as the Cell Wall Integrity and the High Osmolarity Glycerol pathways, in different species often cross-talk to regulate the synthesis of molecules that comprise the plasma membrane, especially sphingolipids, ergosterol and phospholipids to promote functioning of both structures concomitantly and thus, cell viability. We propose that the conclusions drawn from other organisms are the foundations to point out experimental lines that can be endeavored in *A. fumigatus*.

ARTICLE HISTORY

Received: May 03, 2019
Revised: June 10, 2019
Accepted: June 13, 2019

DOI:
10.2174/1389203720666190705164203



Keywords: *Aspergillus fumigatus*, cell wall integrity pathway, sphingolipids, ergosterol, membrane lipids, biosynthesis.

1. INTRODUCTION

Among the spectrum of clinical diseases caused by *Aspergillus* species, invasive pulmonary aspergillosis (IPA) is one of the most serious clinical conditions derived from a fungal infection, since it results in high mortality rates within the susceptible population, which includes the immunocompromised patients [1, 2]. A previous study found that IPA was the most common type of fungal infection among stem cell transplant recipients [3], and the second-most common type of fungal infection among solid organ transplant recipients [4]. In addition, aspergillosis was within the top four most common diagnoses that likely lead to death, according to a broad US healthcare network of intensive care unit autopsy studies [5]. About 90% of all systemic *Aspergillus* infections are caused by *Aspergillus fumigatus*, an environmentally abundant filamentous saprophytic fungus widespread across the globe [6].

The increase of IPA incidence reported in the last decades, along with the limitations of the existing pharmacological treatments and the occurrence of resistant isolates to some of the chemotherapeutic compounds (*i.e.* azoles) are the main challenges for fighting the spectrum of diseases caused by *A. fumigatus* in the upcoming years [7, 8]. In view of these obstacles, understanding how the fungus adapts to stressful environmental conditions and how its main virulence determinants collectively dictate the outcomes of *A. fumigatus* infection may benefit clinical management and help to save about 450 thousand lives that succumb from *Aspergillus*-related infections per year worldwide [9, 10].

The fungal cell wall (CW) has been long considered an attractive therapeutic target due to the numerous processes it undertakes. In addition to promoting structural integrity and playing a key role in growth and morphogenesis, CW is also the first barrier between the invading pathogen and the cell host environment [11]. *A. fumigatus* CW is primarily composed of the polymers β -1,3-glucan, α -1,3-glucan, galactomannan and chitin (reviewed in [12]). It undergoes continuous remodeling and/or reinforcement in response to environmental changes to adjust growth and morphogenesis [9].

*Address correspondence to this author at the Departamento de Genética e Evolução, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, Via Washington Luís, Km. 235, P.O. 676: 13.565-905, São Carlos, SP, Brazil; Tel/Fax: +55-16-33519769, +55-16-33518377; E-mail: imalavazi@ufscar.br

OPEN

Analyses of the three 1-Cys Peroxiredoxins from *Aspergillus fumigatus* reveal that cytosolic Prx1 is central to H₂O₂ metabolism and virulence

Marina Campos Rocha¹, Krissia Franco de Godoy¹, Renata Bannitz-Fernandes², João H. T. Marilhano Fabri¹, Mayra M. Ferrari Barbosa^{1,6}, Patrícia Alves de Castro³, Fausto Almeida⁴, Gustavo Henrique Goldman³, Anderson Ferreira da Cunha¹, Luis E. S. Netto², Marcos Antonio de Oliveira⁵ & Iran Malavazi¹

Standing among the front defense strategies against pathogens, host phagocytic cells release various oxidants. Therefore, pathogens have to cope with stressful conditions at the site of infection. Peroxiredoxins (Prx) are highly reactive and abundant peroxidases that can support virulence and persistence of pathogens in distinct hosts. Here, we revealed that the opportunistic human pathogen *A. fumigatus* presents three 1-Cys Prx (Prx6 subfamily), which is unprecedented. We showed that PrxB and PrxC were in mitochondria, while Prx1 was in cytosol. As observed for other Prxs, recombinant Prx1 and PrxC decomposed H₂O₂ at elevated velocities (rate constants in the 10⁷ M⁻¹s⁻¹ range). Deletion mutants for each Prx displayed higher sensitivity to oxidative challenge in comparison with the wild-type strain. Additionally, cytosolic Prx1 was important for *A. fumigatus* survival upon electron transport dysfunction. Expression of Prxs was dependent on the Saka^{HOG1} MAP kinase and the Yap1^{YAP1} transcription factor, a global regulator of the oxidative stress response in fungi. Finally, cytosolic Prx1 played a major role in pathogenicity, since it is required for full virulence, using a neutropenic mouse infection model. Our data indicate that the three 1-Cys Prxs act together to maintain the redox balance of *A. fumigatus*.

Aspergillus fumigatus is a mold with a notorious ability to infect immunocompromised individuals and therefore cause severe systemic infections in this cohort of patients. *A. fumigatus* solely accounts for approximately 90% incidence of the invasive pulmonary aspergillosis (IPA) cases worldwide. Mortality rates associated with IPA can be as high as 50% even if properly diagnosed and treated. However, if the diagnosis is not reached or is delayed, death can occur in nearly 100% of infected individuals^{1,2}.

Among the front defense strategies against pathogens, host effector immune cells release oxidants, such as reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). This process ultimately generates oxidative/nitrosative stresses to the pathogen at the infection site³. At high levels, ROS and RNS cause damage to the macromolecules of invading microorganisms⁴. Furthermore, pathogens must also metabolize ROS produced by its

¹Departamento de Genética e Evolução, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 13.565-905, Brazil. ²Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 05508-090, Brazil. ³Departamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 14.040-903, Brazil. ⁴Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 14.040-900, Brazil. ⁵Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Campus do Litoral Paulista, São Vicente, SP, 11.380-972, Brazil. ⁶Present address: Instituto Butantan, São Paulo, SP, 05503-900, Brazil. Marina Campos Rocha and Krissia Franco de Godoy contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to I.M. (email: imalavazi@ufscar.br)



Protein Kinase A and High-Osmolarity Glycerol Response Pathways Cooperatively Control Cell Wall Carbohydrate Mobilization in *Aspergillus fumigatus*

Leandro José de Assis,^a Adriana Manfioli,^a Eliciane Mattos,^a João H. T. Marilhano Fabri,^b Iran Malavazi,^b Ilse D. Jacobsen,^c Matthias Brock,^d Robert A. Cramer,^e Arsa Thammahong,^f Daisuke Hagiwara,^g Laure Nicolas Annick Ries,^h Gustavo Henrique Goldman^a

^aFaculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

^bDepartamento de Genética e Evolução, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, Brazil

^cResearch Group Microbial Immunology, Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology, Hans Knoell Institute, Jena, Germany

^dFungal Genetics and Biology Group, School of Life Sciences, University of Nottingham, Nottingham, United Kingdom

^eGeisel School of Medicine at Dartmouth, Department of Microbiology and Immunology, Hanover, New Hampshire, USA

^fDepartment of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

^gFaculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, Ibaraki, Japan

^hFaculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

ABSTRACT *Aspergillus fumigatus* mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are involved in maintaining the normal morphology of the cell wall and providing resistance against cell wall-damaging agents. Upon cell wall stress, cell wall-related sugars need to be synthesized from carbohydrate storage compounds. Here we show that this process is dependent on cAMP-dependent protein kinase A (PKA) activity and regulated by the high-osmolarity glycerol response (HOG) MAPKs SakA and MpkC. These protein kinases are necessary for normal accumulation/degradation of trehalose and glycogen, and the lack of these genes reduces glucose uptake and glycogen synthesis. Alterations in glycogen synthesis were observed for the *sakA* and *mpkC* deletion mutants, which also displayed alterations in carbohydrate exposure on the cell wall. Carbohydrate mobilization is controlled by SakA interaction with PkaC1 and PkaR, suggesting a putative mechanism where the PkaR regulatory subunit leaves the complex and releases the SakA-PkaC1 complex for activation of enzymes involved in carbohydrate mobilization. This work reveals the communication between the HOG and PKA pathways for carbohydrate mobilization for cell wall construction.

IMPORTANCE *Aspergillus fumigatus* is an opportunistic human pathogen causing allergic reactions or systemic infections such as invasive pulmonary aspergillosis, especially in immunocompromised patients. The fungal cell wall is the main component responsible for recognition by the immune system, due to the specific composition of polysaccharide carbohydrates exposed on the surface of the fungal cell wall called pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Key enzymes in the fungal cell wall biosynthesis are a good target for fungal drug development. This report elucidates the cooperation between the HOG and PKA pathways in the mobilization of carbohydrates for fungal cell wall biosynthesis. We suggest that the reduced mobilization of simple sugars causes defects in the structure of the fungal cell wall. In summary, we propose that SakA is important for PKA activity, therefore regulating

Received 5 November 2018 Accepted 6 November 2018 Published 11 December 2018

Citation de Assis LJ, Manfioli A, Mattos E, Fabri JHTM, Malavazi I, Jacobsen ID, Brock M, Cramer RA, Thammahong A, Hagiwara D, Ries LNA, Goldman GH. 2018. Protein kinase A and high-osmolarity glycerol response pathways cooperatively control cell wall carbohydrate mobilization in *Aspergillus fumigatus*. *mBio* 9:e01952-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.01952-18>.

Editor Reinhard Fischer, Karlsruhe Institute of Technology (KIT)

Copyright © 2018 de Assis et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

Address correspondence to Gustavo Henrique Goldman, ggoldman@usp.br.

This article is a direct contribution from a Fellow of the American Academy of Microbiology. Solicited external reviewers: Jae-Hyuk Yu, University of Wisconsin-Madison; Yong-Sun Bahn, Yonsei University.