

Universidade Federal de São Carlos

Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada

Caracterização funcional e bioquímica do fator de transcrição *rlmA* e da interação de PkcA e Hsp90 no fungo *Aspergillus fumigatus*

Discente: Marina Campos Rocha

Orientador: Prof. Dr. Iran Malavazi

São Carlos

2017

Universidade Federal de São Carlos

Programa de Pós Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada

Caracterização funcional e bioquímica do fator de transcrição *rImA* e da interação de PkcA e Hsp90 no fungo *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 Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Discente: Marina Campos Rocha

Orientador: Prof. Dr. Iran Malavazi

São Carlos

2017



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

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Marina Campos Rocha, realizada em 18/12/2017:

Prof. Dr. Iran Malavazi
UFSCar

Prof. Dr. Felipe Roberti Teixeira
UFSCar

Prof. Dr. Julio Cesar Borges
USP

Profa. Dra. Maria Célia Bertolini
UNESP

Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman
USP

Dedico:

*Aos meus queridos pais Luciene e Elcio, pela confiança, amor,
apoio e dedicação.*

*Ao Roger, meu esposo por me fazer acreditar, por me apoiar,
me fazer seguir sempre em frente e ser um exemplo nesta
trajetória.*

Ao meu irmão Igor eterna gratidão e carinho.

Agradecimentos especiais

Ao meu orientador, Prof. Dr. Iran Malavazi. Obrigado pela confiança, grande oportunidade de trabalho, apoio e pelos ensinamentos compartilhados ao longo deste trabalho.

À FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro ao longo desse trabalho e pela bolsa de doutorado concedida (Processo FAPESP 2013/22375-6).

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha, do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, pelo apoio e auxílio nas análises de dados de diversas partes deste trabalho, e também pela agradável convivência.

Ao Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, pelo auxílio nas análises de dados e por disponibilizar o seu laboratório para a realização de diversos experimentos deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Júlio César Borges, do Instituto de Química de São Carlos, do Departamento de Química e Física Molecular pelo auxílio nas análises biofísicas da expressão de proteínas recombinantes e por ceder o seu laboratório para a realização destes experimentos.

À Prof.^a. Dra. Lisandra Marques Gava Borges, do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, pelo auxílio nas análises da expressão de proteínas recombinantes.

À Prof.^a. Dra. Taícia Pacheco Fill Instituto de Química, da Universidade Estadual de Campinas, pelas análises de metabólitos secundários em *Aspergillus fumigatus*.

Ao Prof. Rafael Silva-Rocha do Departamento de Farmacologia, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pelo auxílio na identificação de *motifs* para as análises de ChiP-qPCR.

À Prof.^a. Dra. Maria Célia Bertolini da Universidade Estadual Paulista, do Instituto de Química, Araraquara, pelo auxílio na identificação dos *motifs* de ligação do fator de transcrição SebA.

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

À aluna de doutorado Karine Minari pelo auxílio nas análises biofísicas das proteínas recombinantes.

À Dra. Patrícia Alves Castro pelos experimentos de virulência em modelo murino.

À Dra. Juliana Isa Hori pelos ensaios de toxicidade da fumiquinazolina em culturas de células.

À aluna de doutorado Ms. Lilian Pereira Silva pelos ensaios de toxicidade da fumiquinazolina em *Dictyostelium discoideum*.

À Dra. Laure Reis pelo auxílio nas análises de ChiP-qPCR.

Ao Dr. Celio Fernando F. Angolini pelo auxílio nos experimentos de DESI.

Ao Dr. Cess Van den Hondel e ao Dr. Mark Arentshorst pelo ensaio de atividade Lux em *A. fumigatus*.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da FMRP e a técnica Maria Dolores S. Ferreira (Tuca) pelo auxílio no preparo das amostras de TEM.

Ao LCE-UFSCar pelo auxílio nas análises de SEM e TEM.

Ao amigo de laboratório, João Henrique Tadini Marilhano Fabri pelo auxílio em inúmeras etapas deste trabalho e pelo convívio proporcionado durante estes anos.

A todos do LBGA1 e LBGA2.

Agradeço também aos meus avós Dadinha e Carlito por entenderem todos os momentos nos quais não pude estar presente, e que eles também não puderam estar presentes. E a minha afilhada Maria Eduarda por mesmo tão pequena entender a necessidade da “dindinha” estar longe, e mesmo que distante por me proporcionar momentos de alegria.

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

RESUMO

Aspergillus fumigatus é um patógeno humano oportunista que causa infecções sistêmicas, incluindo a aspergilose pulmonar invasiva, em indivíduos imunocomprometidos. A sobrevivência deste fungo é altamente dependente da organização e função dos componentes da parede celular. A via de integridade da parede celular (CWIP) é a cascata de sinalização primária que controla a síntese *de novo* da parede celular. Em *Sacharomyces cerevisiae*, este evento depende do fator de transcrição RLM1 que contém o domínio MADS-box. Neste trabalho, investigamos a função de RlmA^{RLM1} na CWIP de *A. fumigatus*. Mostramos que a linhagem $\Delta rlmA$ apresenta uma composição de parede celular alterada, além de defeitos relacionados ao crescimento vegetativo e à integridade da parede celular na presença de agentes estressores da parede celular. Uma análise genética indicou que *rlmA* está posicionado a jusante dos genes *pkcA* e *mpkA* na CWIP, e como consequência, a perda de função de *rlmA* leva à expressão alterada de genes que codificam proteínas relacionadas à parede celular. O fator de transcrição RlmA regula positivamente a fosforilação de MpkA e este é induzido tanto em nível proteico quanto em nível transcricional durante o estresse da parede celular. *rlmA* também esteve envolvido na tolerância ao dano oxidativo, ao passo que os principais genes que regulam tolerância a espécies reativas de oxigênio tiveram sua expressão reduzida no mutante $\Delta rlmA$. Além disso, a cepa $\Delta rlmA$ teve virulência atenuada em um modelo murino de aspergilose pulmonar invasiva, e induziu a secreção aumentada de TNF- α . Ainda, houve maior taxa de fagocitose dos conídios do mutante $\Delta rlmA$ em relação à linhagem selvagem. O mutante $\Delta rlmA$ exibe esporulação assexuada reduzida, e regula a transcrição dos principais fatores de transcrição envolvidos na conidiogênese em *Aspergillus ssp.* isto é, *brlA* e *abaA*. RlmA também é importante para a produção de metabolitos secundários, incluindo gliotoxina e fumiquinazolina C (FqC), e regula positivamente a transcrição dos genes do cluster responsável pela biossíntese da fumiquinazolina (Fq). Uma caracterização da atividade biológica da FqC mostrou que esta leva ao aumento da produção das citocinas inflamatórias TNF- α , IL-6, e da formação de poros na membrana plasmática, sugerindo ser este um composto de defesa contra outros microrganismos ou predadores do solo. Adicionalmente, relatou-se o papel de um segundo fator de transcrição (SebA) na produção de FqC em *A. fumigatus*. Mostramos que a manutenção da integridade da parede celular está associada à termotolerância em *A. fumigatus*, e que uma das principais chaperonas envolvidas na resposta ao choque térmico, a Hsp90, interage fisicamente com PkcA, MpkA e RlmA. Além disso, a perda parcial ou total da função destes genes leva a expressão alterada dos principais genes relacionados a resposta ao choque térmico em *A. fumigatus*. Adicionalmente as proteínas MpkA e Hsp90 tiveram sua estrutura parcialmente caracterizada. Nossos resultados sugerem que RlmA funciona como um fator de transcrição associado à CWIP de *A. fumigatus* que atua a jusante da sinalização PkcA-MpkA, regulando a resposta a diversos estresses causados a célula fúngica o que enfatiza a importância desta via na virulência e patogenicidade deste fungo.

ABSTRACT

Aspergillus fumigatus is an opportunistic human pathogen that causes systemic infections, including invasive pulmonary aspergillosis in immunocompromised individuals. Survival of this fungus is highly dependent on the cell wall organization and function of its structural components. Cell wall integrity pathway (CWIP) is the primary signaling cascade that controls *de novo* synthesis of the cell wall. In *Sacharomyces cerevisiae*, this event depends on the RLM1 transcription factor that contains the MADS-box domain. In this work, we investigated the function of RlmA^{RLM1} in the CWIP of *A. fumigatus*. We show that the $\Delta rlmA$ strain presents an altered cell wall composition, besides defects related to vegetative growth and cell wall integrity in the presence of cell wall stressors agents. Genetic assays indicated that *rlmA* is positioned downstream of *pkcA* and *mpkA* genes in CWIP, and, as a consequence, the loss of *rlmA* function results in alteration of genes expression of the encoding cell wall related proteins. The transcription factor RlmA positively regulates the phosphorylation of MpkA, which is induced in both protein and transcriptional levels during cell wall stress. *rlmA* is also involved in tolerance to oxidative stress, whereas the main genes that regulate tolerance to reactive oxygen species had their expression reduced in the $\Delta rlmA$ mutant. In addition, $\Delta rlmA$ strain presents attenuated virulence in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis and induced increased secretion of TNF- α . There was a higher rate of conidia phagocytosis of the mutant $\Delta rlmA$ in comparison to the wild type. The $\Delta rlmA$ mutant exhibits reduced asexual sporulation, and regulates transcription of the major transcription factors involved in conidiogenesis in *Aspergillus ssp.*, i.e. *bria* and *abaA*. RlmA is also important in the production of secondary metabolites, including gliotoxin and fumiquinazoline (Fq) C, and positively regulates the transcription of the genes cluster responsible for Fq biosynthesis. A biological characterization showed that activity of FqC increase the production of the inflammatory cytokines TNF- α , IL-6, and pore formation in the plasma membrane, suggesting that this is a defense mechanism against other microorganisms or soil predators. Additionally, the role of the second transcription factor (SebA) in the production of FqC in *A. fumigatus* was reported. We have shown that maintenance of cell wall integrity is associated with thermotolerance in *A. fumigatus*, and the Hsp90, one of the main chaperone involved in the heat shock response, physically interacts with PkcA, MpkA, and RlmA. Furthermore, partial or total loss of function of these genes results in altered expression of the principal genes related to heat shock response in *A. fumigatus*. Additionally, the proteins MpkA and Hsp90 had their structure partially characterized. Overall results suggest that RlmA works as a transcription factor associated with the *A. fumigatus* CWIP acting downstream of the PkcA-MpkA signaling and regulating the response to several stresses caused to the fungal cell which emphasizes the importance of this pathway in the virulence and pathogenicity of this fungus.

SUMÁRIO

Agradecimentos especiais	i
Agradecimentos	ii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
1.0 Introdução.....	1
1.1 O patógeno <i>Aspergillus fumigatus</i>	2
1.2 Via da integridade da parede celular em <i>A. fumigatus</i>	6
1.3 Desenvolvimento e a produção de metabólitos secundários em <i>Aspergillus fumigatus</i>	12
1.4 Termotolerância em <i>A. fumigatus</i>	17
1.4.1 Hsp90.....	20
2.0 Objetivos	24
2.1 Objetivo geral	25
2.2 Objetivos específicos.....	25
3.0 Materiais e métodos	27
3.1 Linhagens de <i>A. fumigatus</i> utilizadas neste trabalho	28
3.2 Linhagens utilizadas para a expressão de proteínas recombinantes	28
3.3 Meios de cultura	29
3.3.1 Meios de cultura para <i>A. fumigatus</i>	29
3.3.1.1 Meio mínimo (MM, MM+UU)	29
3.3.1.2 Meio completo (YG, YUU, YG e YG+UU, YG+KCI)	29
3.3.1.3 Meio mínimo de Cove.....	30
3.3.1.4 Meio RPMI.....	30
3.3.2 Meios de cultura para <i>E. coli</i>	31
3.3.2.1 Meio LB (Luria bertani)	31
3.3.3 Meios de cultura para <i>S. cerevisiae</i>	31
3.3.3.1 Meio YPD	31
3.3.3.2 Meio Sc URA-.....	32
3.4 Oligonucleotídeos utilizados para construção e checagem das linhagens obtidas neste trabalho.....	33
3.5 Oligonucleotídeos utilizados para clonagem dos cDNAs para a obtenção das proteínas recombinantes.....	34
3.6 Oligonucleotídeos utilizados para RT-qPCR em tempo real	34
3.7 Oligonucleotídeos utilizados para ChIP-qPCR	36
3.8 Soluções e tampões.....	37
3.8.1 Soluções de elementos traços.....	37
3.8.2 Solução de sais 20 x concentrada para Meio Mínimo	38
3.8.3 Solução de sais 50 x concentrada para Meio Mínimo de Cove	38
3.8.4 Soluções para preparo de <i>E. coli</i> quimiocompetente	38
3.8.5 Soluções para extração de DNA plasmidial de <i>E. coli</i>	39
3.8.5.1 Solução 1	39
3.8.5.2 Solução 2	39
3.8.5.3 Solução 3	39
3.8.6 Soluções para transformação em <i>S. cerevisiae</i>	40
3.8.6.1 Solução de TE (Tris EDTA) 10 x concentrado.....	40
3.8.6.2 Solução de acetato de lítio (LiAC) 10 x concentrada.....	40
3.8.6.3 Solução de PEG (polietilenoglicol) 50 %.....	40
3.8.7 Soluções para transformação em <i>A. fumigatus</i>	41
3.8.7.1 Solução 1 de protoplastização.....	41
3.8.7.2 Solução 2 de protoplastização.....	41
3.8.7.3 Solução 3 de protoplastização.....	41
3.8.7.4 Solução 4 de protoplastização.....	42
3.8.7.5 Solução 5 de protoplastização.....	42
3.8.8 Tampão de extração de proteína total de <i>A. fumigatus</i> para <i>Western blot</i>	43

3.8.9 Tampão para lise de <i>E. coli</i> para cromatografia de proteínas por afinidade em coluna de níquel.....	44
3.8.9.1 Tampão para lise de <i>E. coli</i> e purificação da proteína recombinante Hsp90	44
3.8.9.1.1 Tampão A para lise de <i>E. coli</i> e purificação da proteína recombinante Hsp90 em coluna de níquel.....	44
3.8.9.1.2 Tampão B para purificação da proteína recombinante Hsp90 em coluna de níquel.....	44
3.8.9.1.3 Tampão para purificação da proteína recombinante Hsp90 através da cromatografia de exclusão molecular	45
3.8.9.2 Tampão para lise de <i>E. coli</i> e purificação da proteína recombinante MpkA	45
3.8.9.2.1 Tampão A para lise de <i>E. coli</i> e purificação da proteína recombinante MpkA em coluna de níquel, e purificação da proteína recombinante MpkA através da cromatografia de exclusão molecular.....	45
3.8.9.2.2 Tampão B para purificação da proteína recombinante MpkA em coluna de níquel	46
3.8.10 Inibidores de protease	46
3.8.10.1 PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride)	46
3.8.10.2 <i>cOmplete™ ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free, EASYpack Protease Inhibitor Cocktail</i> (11836153001).....	46
3.8.10.3 <i>Protease Inhibitor Cocktail</i> (Sigma Aldrich, P8215)	47
3.8.11 Soluções para <i>Western blot</i>	47
3.8.11.1 Tampão para eletroforese de proteína 5 x concentrada.....	47
3.8.11.2 Tampão de transferência para gel SDS-PAGE	47
3.8.11.3 Tampão Salina Tris (TBS)	48
3.8.11.4 Tampão Salina Tris + Tween 20 (TBST)	48
3.8.11.5 Tampão de amostra para eletroforese de proteínas 5 x concentrado.....	48
3.8.12 Corante <i>coomassie blue</i>	49
3.8.13 Descorante de <i>coomassie blue</i>	49
3.8.14 Solução de SDS 10 %.....	49
3.8.15 Tampão para extração de DNA de micélio de <i>A. fumigatus</i> e de <i>S. cerevisiae</i> ..	50
3.8.16 Tampão para extração de DNA de conídios de <i>A. fumigatus</i>	50
3.8.17 Tampão Tris Acetato EDTA (TAE) 50 x concentrado para eletroforese de DNA	51
3.8.18 Tampão de amostra para eletroforese de DNA 5 x concentrado	51
3.8.19 Tampão de amostra para eletroforese de RNA.....	51
3.8.20 Tampão MOPS 10 x concentrado para eletroforese de RNA.....	52
3.8.21 Tampão fosfato salina (PBS) 10 x concentrado	52
3.8.22 Solução de Bis-acrilamida 30:08.....	53
3.8.23 Solução de Tris HCl 1 M pH 6,8.....	53
3.8.24 Solução de Tris HCl 1,5 M pH 8,0.....	53
3.8.25 Soluções para quantificação de proteína total pelo método de Lowry modificado [139].....	53
3.8.25.1 Solução de carbonato de sódio e hidróxido de sódio 2 %	53
3.8.25.2 Solução de sulfato de cobre 1 %.....	54
3.8.25.3 Solução de tartarato de sódio e potássio 1 %.....	54
3.8.25.4 Solução de tartarato de sódio e potássio + carbonato de sódio + sulfato de cobre	54
3.8.26 Soluções para <i>Southern blot</i>	55
3.8.26.1 Solução de ácido clorídrico 0,25 M.....	55
3.8.26.2 Solução de desnaturação	55
3.8.26.3 Solução de neutralização.....	55
3.8.26.4 Solução salina citrato 20 x concentrada.....	56
3.8.26.4.1 Solução salina citrato 2 x concentrada	56
3.8.27 Soluções para far <i>Western blot</i> (far WB).....	56
3.8.27.1 Solução de desnaturação e renaturação da membrana de PVDF	56
3.8.27.1.1 Solução de cloreto de sódio 5 M.....	56
3.8.27.1.2 Solução de tris HCl pH 7,5.....	57
3.8.27.1.3 Solução de EDTA 0,5 M pH 8,0	57
3.8.27.1.4 Solução de Guanidina HCl 8 M	57

3.8.27.1.5 Solução de DTT 1 M	57
3.8.27.2 Solução de ligação para far WB	58
3.8.28 Soluções para ChIP	58
3.8.28.1 Tampão para <i>cross-linking</i>	58
3.8.28.2 Solução de glicina 1 M.....	59
3.8.28.3 ChIP <i>lysis buffer</i> (CLB).....	59
3.8.28.4 Tampão de bloqueio	59
3.8.28.5 Tampão para eluição das amostras de ChIP	60
3.8.29 Soluções para imunoprecipitação utilizando <i>Dynabeads Protein A</i> [®] (Thermo Fisher Scientific A, 10001D) e <i>Anti FLAG M2 Affinity Gel</i> (Sigma Aldrich, A2220).....	60
3.8.29.1 Tampão fosfato salina (PBS) 1 x concentrado com Tween 20 0,01 %.....	60
3.8.29.2 Tampão B250 para extração de proteínas para imunoprecipitação	61
3.8.30 Soluções para microscopia eletrônica de transmissão (TEM).....	61
3.8.30.1 Solução de fixação	61
3.8.30.2 Solução ágar-ágar	62
3.8.30.3 Solução de tetróxido de ósmio	62
3.8.30.4 Solução de acetato de uranila.....	62
3.8.31 Solução de bloqueio para microscopia.....	62
3.8.32 Soluções para coloração do gel de SDS-PAGE com nitrato de prata	63
3.8.32.1 Solução de fixação	63
3.8.32.2 Solução de sensibilização	63
3.8.32.3 Solução de coloração	63
3.8.32.4 Solução de revelação.....	64
3.8.32.5 Solução de interrupção de coloração	64
3.9 Gel de agarose para eletroforese de DNA.....	64
3.10 Gel de agarose desnaturante para eletroforese de RNA	65
3.11 Gel SDS PAGE	65
3.11.1 Gel de poliacrilamida – empilhamento 1,2 %.....	65
3.11.2 Gel de poliacrilamida – corrida	66
3.12 Soluções estoque das drogas e agentes utilizados neste trabalho	66
3.13 Protocolos adotados.....	67
3.13.1 Construção dos cassetes de deleção e substituição gênica utilizando a técnica de recombinação <i>in vivo</i> em <i>S. cerevisiae</i>	67
3.13.2 Extração do DNA de <i>S. cerevisiae</i>	69
3.13.3 Transformação em <i>A. fumigatus</i>	70
3.13.4 Extração do DNA do micélio de <i>A. fumigatus</i>	71
3.13.5 Extração do DNA do conídio de <i>A. fumigatus</i>	72
3.13.6 Preparo de células eletrocompetentes de <i>E. coli</i>	73
3.13.7 Eletrotransformação de <i>E. coli</i>	74
3.13.8 Preparo de células quimiocompetentes de <i>E. coli</i>	74
3.13.9 Quimiotransformação de <i>E. coli</i>	75
3.13.10 Análise de <i>Southern blot</i>	75
3.13.11 Análise do crescimento radial.....	77
3.13.12 Contagem de esporos.....	77
3.13.13 Microscopia de polarização.....	78
3.13.14 Determinação do número de protoplastos após a digestão parcial com Lallzyme MMX [™]	78
3.13.15 Extração de hidrofobinas dos conídios de <i>A. fumigatus</i>	78
3.13.16 Avaliação de distribuição de $\beta(1,3)$ glucana e quitina em hifas de <i>A. fumigatus</i> ..	79
3.13.17 Formação de biofilme	80
3.13.18 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)	81
3.13.19 Microscopia eletrônica de varredura (SEM) de conídios de <i>A. fumigatus</i>	82
3.13.20 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de microdiluição	82
3.13.21 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pela técnica de <i>Etest</i>	82
3.13.22 Teste de sensibilidade pela técnica de <i>drop-out</i>	83
3.13.23 Teste de sensibilidade ao peróxido de hidrogênio	83
3.13.24 Curva de sobrevivência após exposição a diferentes temperaturas	83
3.13.25 Ensaio de atividade Lux em <i>A. fumigatus</i>	84

3.13.26 Extração e quantificação do ergosterol das linhagens de <i>A. fumigatus</i> por HPLC-UV.....	85
3.13.27 Extração e quantificação de gliotoxina por UPLC-MS/MS.....	86
3.13.28 Identificação, quantificação e isolamento das Fqs.....	87
3.13.29 Análise de absorção de nutrientes a partir do pulmão murino.....	88
3.13.30 Preparação de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs), índice de fagocitose, determinação da concentração de TNF- α	88
3.13.31 Análise da fagocitose de conídios de <i>A. fumigatus</i> pela ameba de vida livre <i>Dictyostelium discoideum</i>	89
3.13.31.1 Co-incubação.....	90
3.13.31.2 Avaliação da sobrevivência dos conídios pós fagocitose por <i>D. discoideum</i>	90
3.13.32 Análise da virulência do mutante $\Delta rlmA$ em modelo murino neutropênico de aspergilose pulmonar invasiva.....	90
3.13.33 Análises de ChIP-qPCR.....	92
3.13.33.1 ChIP-qPCR utilizando a resina GFP-Trap [®]	92
3.13.33.2 ChIP-qPCR utilizando <i>Dynabeads protein A</i> [®] (Thermo Scientific, 10001D).....	94
3.13.34 Experimentos de imunoprecipitação.....	96
3.13.34.1 Imunoprecipitação utilizando <i>Dynabeads protein A</i> [®] (Thermo Scientific, 10001D).....	96
3.13.34.2 Imunoprecipitação utilizando a resina <i>Anti FLAG M2 Affinity Gel</i> [®]	98
3.13.35 Extração de RNA total de <i>A. fumigatus</i>	99
3.13.36 Análises de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR).....	100
3.13.37 Extração de proteínas totais de <i>A. fumigatus</i>	101
3.13.38 Quantificação de proteína total pelo método de Lowry modificado.....	101
3.13.39 Análises de <i>Western blot</i>	102
3.13.40 Análises de expressão gênica global da linhagem $\Delta rlmA$ pela técnica de <i>microarray</i>	103
3.13.41 Expressão de proteínas recombinantes.....	105
3.13.42 Lise das células de <i>E. coli</i> utilizadas para a expressão de proteínas recombinantes.....	106
3.13.43 Cromatografia de afinidade em resina de níquel.....	106
3.13.44 Cromatografia de exclusão molecular em colunas Superdex.....	107
3.13.45 Espectropolarimetria de Dicroísmo Circular.....	107
3.13.46 Espectroscopia de emissão de fluorescência.....	108
3.13.47 Cromatografia de exclusão molecular analítica.....	109
3.13.48 Avaliação da atividade chaperona da Hsp90 de <i>A. fumigatus</i>	109
3.13.48.2 Atividade chaperona da Hsp90 com a proteína MpkA.....	110
3.13.49 Calorimetria de titulação isotérmica para determinação da afinidade de ligação de Hsp90 pelo ATP e ADP.....	110
3.13.50 Análise da interação proteína-proteína pela técnica de far <i>Western blot</i>	111
3.13.51 Coloração do gel de SDS-PAGE utilizando nitrato de prata.....	112
3.15.52 <i>Ambient mass spectrometry imaging on agar culture</i>	113
3.15.53 Síntese do anticorpo anti Hsp90.....	113
4.0 Resultados e discussão.....	114
Módulo 4.1 Isolamento e caracterização fenotípica do mutante $\Delta rlmA$ em <i>A. fumigatus</i>	115
4.1.1. Identificação do homólogo de RlmA em <i>A. fumigatus</i> e construção da linhagem $\Delta rlmA$, $\Delta rlmA::rlmA^+$ em <i>A. fumigatus</i>	116
4.1.2 Caracterização funcional do mutante $\Delta rlmA$ em <i>A. fumigatus</i>	118
4.1.2.1 A deleção de <i>rlmA</i> leva a alterações no crescimento radial e taxas de germinação em <i>A. fumigatus</i>	118
4.1.2.2 O mutante nulo $\Delta rlmA$ apresenta defeitos relacionados ao crescimento vegetativo e à integridade da parede celular.....	120
4.1.3 Os genes <i>pkcA</i> , <i>mpkA</i> e <i>rlmA</i> da CWIP interagem geneticamente em <i>A. fumigatus</i>	129
4.1.4 RlmA regula positivamente a fosforilação de MpkA e é induzido a nível proteico e transcricional durante o estresse de parede celular.....	132
4.1.5 A perda de <i>rlmA</i> aumenta a susceptibilidade a drogas antifúngicas e altera a produção de ergosterol.....	149

4.1.6 RlmA desempenha um papel na resistência ao estresse oxidativo em <i>A. fumigatus</i>	151
4.1.7 RlmA está relacionado ao estresse de retículo em <i>A. fumigatus</i>	156
4.1.8 O mutante $\Delta rlmA$ é avirulento em um modelo murino de infecção neutropênica e leva ao aumento dos níveis de TNF- α e reconhecimento de macrófagos	158
4.1.9 Discussão	161
Módulo 4.2 A CWIP está relacionada ao desenvolvimento e à produção de metabólitos secundários em <i>A. fumigatus</i>	166
4.2.1 O mutante $\Delta rlmA$ apresenta reduzida conidiação e alterada expressão gênica dos principais reguladores do desenvolvimento assexuado em <i>A. fumigatus</i>	167
4.2.2 Os mutantes da CWIP $\Delta rlmA$, $pkcA^{G579R}$ e $\Delta mpkA$ apresentam produção reduzida dos metabólitos secundários FqC e gliotoxina de <i>A. fumigatus</i>	178
4.2.3 O fator de transcrição de <i>A. fumigatus</i> SebA regula a síntese de FqC em <i>A. fumigatus</i>	187
4.2.4 A FqC é um metabólito secundário envolvido na virulência de <i>A. fumigatus</i> em diferentes hospedeiros	194
4.2.5 Discussão	200
Módulo 4.3 A CWIP é uma das vias responsáveis pela termotolerância em <i>A. fumigatus</i> , uma importante característica para a virulência deste patógeno	206
4.3.1 Os mutantes da CWIP $\Delta rlmA$, $pkcA^{G579R}$ e $\Delta mpkA$ possuem redução da termotolerância, uma importante característica para a virulência de <i>A. fumigatus</i>	207
4.3.2 Análises da interação da CWIP de <i>A. fumigatus</i> com a chaperona molecular Hsp90	217
4.3.3 Clonagem e expressão das proteínas recombinantes de <i>A. fumigatus</i> Hsp90, PkcA ⁴⁰⁹⁻¹¹⁰⁶ , PkcA ^{G579R409-1106} e MpkA	233
4.3.4 Estudos bioquímicos e funcionais das proteínas Hsp90, PkcA ⁴⁰⁹⁻¹¹⁰⁶ e MpkA	239
4.3.4.1 Análise <i>in vitro</i> da interação da proteína recombinante Hsp90 com as proteínas recombinantes da CWIP	239
4.3.4.2 Estudos estruturais e bioquímicos da proteína Hsp90 de <i>A. fumigatus</i>	242
4.3.5 Estudos estruturais da proteína MpkA de <i>A. fumigatus</i>	248
4.4 Discussão	255
5.0 Conclusões	261
6.0 Referências bibliográficas	265
7.0 APÊNDICES	277
APÊNDICE A - Fenótipos de crescimento da linhagem mutante $\Delta rlmA$ na presença de CR e CFW.	278
APÊNDICE B - Análise da interação genética dos mutantes da CWIP.	279
APÊNDICE C - Análise das respostas transcricionais da linhagem selvagem e dos mutantes $\Delta rlmA$ e $\Delta mpkA$ frente ao estresse da parede celular induzido por CR.	280
APÊNDICE D - As linhagens mutantes da CWIP $pkcA^{G579R}$, $\Delta mpkA$ e $\Delta rlmA$ reduziram a acumulação de mRNA de <i>brlA</i> , <i>abaA</i> e <i>wetA</i> durante o desenvolvimento assexuado sincronizado em <i>A. fumigatus</i> a 30 e a 37 °C.	283
APÊNDICE E - Dados de RMN das fumiquinazolininas.	285
APÊNDICE F - Análise da resposta transcricional de genes relacionados à síntese de Fq na linhagem selvagem e mutantes $\Delta mpkA$ e $\Delta rlmA$ durante o desenvolvimento assexuado a 30 °C e a 37 °C.	286
APÊNDICE G - Análise da resposta transcricional de genes relacionados à síntese de Fq na linhagem selvagem e mutante $\Delta sebA$ durante o desenvolvimento assexuado a 30 °C e a 37 °C.	288
APÊNDICE H - Sequência de aminoácidos da proteína Hsp90 de <i>A. fumigatus</i>	289
APÊNDICE I - Sequência de aminoácidos da proteína PkcA ⁴⁰⁹⁻¹¹¹⁶ de <i>A. fumigatus</i>	290
APÊNDICE J - Sequência de aminoácidos da proteína PkcA ^{409-1116G579R} de <i>A. fumigatus</i>	291
APÊNDICE K - Sequência de aminoácidos da proteína MpkA de <i>A. fumigatus</i>	292
APÊNDICE L - Atividade chaperona da proteína recombinante Hsp90 na proteína recombinante MpkA	293
APÊNDICE M - Lista de publicações	294

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: O ciclo de vida assexuado e patogênese de <i>A. fumigatus</i>	2
Figura 2: Esquema dos componentes de resposta do hospedeiro aos conídios de <i>A. fumigatus</i> inalados.	4
Figura 3: Esquema da via de sinalização da CWIP de <i>A. fumigatus</i> baseado no modelo desta via em <i>S. cerevisiae</i>	12
Figura 4: Regulação da conidiação em <i>A. fumigatus</i>	14
Figura 5: Rota biossintética da síntese de Fqs.....	16
Figura 6: Organização de domínio da Hsp90 fúngica com base na organização da proteína Hsp90 de <i>A. fumigatus</i> e funções descritas obtidas a partir de estudos sistemáticos.....	23
Figura 7: Construção da cassete <i>PagsA::mLuc</i>	84
Figura 8: Desenho experimental das hibridizações de <i>microarray</i>	104
Figura 9: Construção do mutante $\Delta rlmA$ e da linhagem complementante $\Delta rlmA::rlmA^+$	118
Figura 10: Crescimento radial e taxas de germinação da linhagem $\Delta rlmA$	120
Figura 11: Teste de sensibilidade do mutante $\Delta rlmA$ a diferentes drogas que causam estresse de parede celular.....	123
Figura 12: A sensibilidade às drogas que causam estresse de parede é parcialmente revertida na presença do estabilizador osmótico D-sorbitol.....	124
Figura 13: A perda da função de RlmA causa aumento da hidrólise enzimática da parede celular, maior detecção de $\beta(1,3)$ glucana e quitina, e diminuição da formação de biofilme.....	127
Figura 14: Germinantes da linhagem $\Delta rlmA$ apresentam parede celular mais espessa..	128
Figura 15: Análise da superfície dos conídios de <i>A. fumigatus</i> e quantificação da hidrofobina na linhagem selvagem e mutante $\Delta rlmA$	129
Figura 16: PCR de validação dos duplos mutantes de CWIP.....	130
Figura 17: Crescimento radial e morfologia das colônias dos mutantes simples parentais e duplos da CWIP.....	131
Figura 18: <i>rlmA</i> , <i>pkcA</i> e <i>mpkA</i> interagem geneticamente durante o estresse da parede celular.....	132
Figura 19: A deleção de <i>rlmA</i> reduz a fosforilação da MAP quinase MpkA na presença do estresse de parede celular provocado por CR.....	134
Figura 20: Construção da linhagem <i>rlmA::gfp</i> de <i>A. fumigatus</i>	135
Figura 21: O cassete <i>rlmA::gfp</i> complementa funcionalmente o mutante nulo $\Delta rlmA$	136
Figura 22: Análise da expressão proteica de RlmA na presença de CR.....	137
Figura 23: Análise de agrupamento hierárquico evidenciando o perfil de expressão dos genes selecionados para a linhagem selvagem e mutantes $\Delta rlmA$ e $\Delta mpkA$ em resposta ao estresse da parede celular induzido por CR.....	139
Figura 24: Esquema demonstrando a proposta de regulação gênica para a ativação/inibição ou a não correlação entre <i>rlmA</i> , <i>mpkA</i> e os genes da biossíntese da parede celular durante o estresse induzido por CR.....	140
Figura 25: Ensaio de atividade Lux em <i>A. fumigatus</i> MAF 6.6 (wt; <i>PagsA::mLuc</i>) e MAF 8.1 ($\Delta rlmA$; <i>PagsA::mLuc</i>) incubadas com diferentes concentrações de CFW.....	142
Figura 26: ChIP-qPCR dos genes relacionados a biossíntese da parede celular nas linhagens selvagem e <i>rlmA::3xFLAG</i> durante o estresse de parede celular provocado por CR 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, por 15, 30 e 60 minutos.....	148
Figura 27: RlmA está relacionado à resistência a azóis e a equinocandinas.....	151
Figura 28: Análise da sensibilidade do mutante a drogas que promovem o estresse oxidativo.....	153
Figura 29: Análise da expressão gênica de RlmA na presença de estresse oxidativo provocado por H_2O_2	156
Figura 30: O estresse da parede celular causado pela perda de <i>rlmA</i> está ligado à sinalização da UPR em <i>A. fumigatus</i>	157
Figura 31: RlmA de <i>A. fumigatus</i> é necessário para virulência completa em um modelo murino de aspergilose pulmonar invasiva, para a ativação da imunidade inata contra <i>A. fumigatus</i> e para a absorção de nutrientes a partir do tecido pulmonar murino.....	160

Figura 32: O mutante $\Delta rlmA$ apresenta fenótipo <i>fluffy</i> e formação de conídios inferior à linhagem selvagem a 30 °C.....	167
Figura 33: Indução sincronizada de desenvolvimento assexuado para <i>A. fumigatus</i> na linhagem selvagem e mutante $\Delta rlmA$ a 30 °C (A) e 37 °C (B).....	168
Figura 34: Os genes da CWIP <i>pkcA</i> e <i>rlmA</i> são induzidos durante o desenvolvimento assexuado sincronizado em <i>A. fumigatus</i> a 30 e a 37 °C.....	171
Figura 35: A fosforilação da MAP quinase MpkA é induzida durante o desenvolvimento assexuado sincronizado em <i>A. fumigatus</i> a 30 °C e a 37 °C.....	173
Figura 36: As linhagens mutantes da CWIP <i>pkcA</i> ^{G579R} , $\Delta mpkA$ e $\Delta rlmA$ reduziram a expressão de mRNA de <i>brlA</i> , <i>abaA</i> e <i>wetA</i> durante o desenvolvimento assexuado sincronizado em <i>A. fumigatus</i> a 30 °C e a 37 °C.....	175
Figura 37: O fator de transcrição RlmA se liga <i>in vivo</i> na região promotora dos genes <i>flbB</i> , <i>flbC</i> , <i>abaA</i> e <i>brlA</i> durante o desenvolvimento assexuado em <i>A. fumigatus</i>	177
Figura 38: A linhagem mutante $\Delta rlmA$ não produz gliotoxina.....	179
Figura 39: Mutantes de CWIP possuem redução na produção de FqC.....	180
Figura 40: Quantificação de FqC e FqD nas linhagens mutantes da CWIP.....	181
Figura 41: Análise da resposta transcricional de genes relacionados à síntese de Fq na linhagem selvagem e mutantes $\Delta mpkA$ e $\Delta rlmA$ durante o desenvolvimento assexuado a 37 °C (A) e a 30 °C (B).....	183
Figura 42: ChIP-qPCR dos genes <i>fmqA</i> , <i>fmqB</i> , <i>fmqC</i> e <i>fmqD</i> nas linhagens selvagem e <i>rlmA::gfp</i> durante o desenvolvimento assexuado a 37 °C em <i>A. fumigatus</i>	186
Figura 43: Quantificação de FqC nas linhagens mutantes representativas do <i>screening</i> para identificar reguladores da síntese desse metabólito secundário.....	188
Figura 44: Análise da resposta transcricional de genes do <i>cluster</i> de síntese de Fqs na linhagem selvagem e mutante $\Delta sebA$ durante o desenvolvimento assexuado a 30 °C (A) e a 37 °C (B).....	190
Figura 45: ChIP-qPCR dos genes <i>fmqA</i> , <i>fmqB</i> , <i>fmqC</i> e <i>fmqD</i> nas linhagens selvagem e <i>sebA::gfp</i> durante o desenvolvimento assexuado a 37 °C em <i>A. fumigatus</i>	193
Figura 46: Mutantes da CWIP de <i>A. fumigatus</i> são mais sensíveis à FqC (A), enquanto a deleção de <i>SebA</i> é mais tolerante (B).....	195
Figura 47: Secreção de TNF- α (A) e IL-6 (B) a partir de BMDMs após incubação com FqC e FqD.....	196
Figura 48: FqC e FqD apresentam efeitos citotóxicos limitados, mas influenciam a formação de poros em BMDMs de camundongos.....	197
Figura 49: Análise dos índices de fagocitose de conídios por <i>D. discoideum</i> e BMDMs.....	199
Figura 50: Esquema proposto como modelo de regulação transcricional do desenvolvimento assexuado, biossíntese das Fqs e gliotoxina em <i>A. fumigatus</i> , assim como o papel da FqC na virulência de <i>A. fumigatus</i> em diferentes hospedeiros.....	204
Figura 51: Genes da CWIP de <i>A. fumigatus</i> estão relacionados à resistência ao choque térmico.....	209
Figura 52: A perda da função de <i>pkcA</i> aumenta a fosforilação da MAP quinase MpkA na presença do estresse térmico a 37 °C.....	211
Figura 53: A deleção de <i>rlmA</i> e a perda da função de <i>pkcA</i> reduzem a fosforilação da MAP quinase MpkA na presença do estresse térmico a 48 °C.....	213
Figura 54: Análise transcricional dos genes envolvidos no choque térmico de <i>A. fumigatus</i> a 37 °C.....	215
Figura 55: Análise transcricional dos genes envolvidos no choque térmico de <i>A. fumigatus</i> a 48 °C.....	216
Figura 56: Mutantes da CWIP de <i>A. fumigatus</i> são mais sensíveis à drogas inibidoras de Hsp90.....	219
Figura 57: Análise da expressão da proteína Hsp90 durante o estresse térmico a 37 °C na linhagem selvagem e nas linhagens mutantes da CWIP de <i>A. fumigatus</i>	221
Figura 58: Análise da expressão da proteína Hsp90 durante o estresse térmico a 48 °C na linhagem selvagem e nas linhagens mutantes da CWIP de <i>A. fumigatus</i>	223
Figura 59: Geração do mutante <i>pkcA</i> 3xHA.....	225
Figura 60: A proteína apical da CWIP PkcA interage com Hsp90 durante o choque térmico em <i>A. fumigatus</i>	226
Figura 61: A proteína apical da CWIP PkcA interage com Hsp90 durante o estresse de parede celular provocado por CR em <i>A. fumigatus</i>	227

Figura 62: A MAP quinase MpkA da CWIP interage com Hsp90 durante o estresse de parede celular provocado por CR em <i>A. fumigatus</i>	228
Figura 63: Geração do mutante <i>rlmA</i> 3×FLAG.....	230
Figura 64: O fator de transcrição da CWIP RImA interage com a Hsp90 e com a MAP quinase MpkA fosforilada durante o choque térmico em <i>A. fumigatus</i>	231
Figura 65: O fator de transcrição da CWIP RImA interage com a MAP quinase MpkA fosforilada e Hsp90 durante o estresse de parede celular provocado por CR em <i>A. fumigatus</i>	232
Figura 66: Validação da clonagem dos cDNAs dos genes <i>hsp90</i> , <i>mpkA</i> , <i>pkcA</i> ⁴⁰⁹⁻¹¹¹⁶ e <i>pkcA</i> ^{409-1116G579R} de <i>A. fumigatus</i> no plasmídeo pET-15b.....	236
Figura 67: Análise da expressão em pequena escala das proteínas recombinantes obtidas. (A) Hsp90 (B) PkcA ⁴⁰⁹⁻¹¹¹⁶ (C) PkcA ^{409-1116G579R} (D) MpkA.....	238
Figura 68: Detecção da interação proteína-proteína entre (A) PkcA ⁴⁰⁹⁻¹¹¹⁶ (B) PkcA ^{4091116G579R} e (C) MpkA com a proteína Hsp90 de <i>A. fumigatus</i>	241
Figura 69: Gel de purificação da proteína recombinante Hsp90 de <i>A. fumigatus</i> por cromatografia de afinidade em resina de níquel e cromatografia de exclusão molecular.....	242
Figura 70: Cromatografia de exclusão molecular analítica da proteína recombinante Hsp90.....	244
Figura 71: Espectros de CD da proteína recombinante Hsp90.....	245
Figura 72: Espectros de fluorescência da proteína Hsp90 nos comprimentos de onda de excitação de 280 e 295 nm.....	246
Figura 73: Análise da atividade chaperona da Hsp90 de <i>A. fumigatus</i>	247
Figura 74: Interação da Hsp90 de <i>A. fumigatus</i> com ATP e ADP por calorimetria de titulação isotérmica.....	248
Figura 75: Gel de purificação da proteína recombinante MpkA de <i>A. fumigatus</i> por cromatografia de afinidade em resina de níquel e cromatografia de exclusão molecular.....	249
Figura 76: Cromatografia de exclusão molecular analítica da proteína recombinante MpkA.....	250
Figura 77: Espectros de CD da proteína recombinante MpkA.....	251
Figura 78: Espectros de fluorescência da proteína Hsp90 nos comprimentos de onda de excitação de 280 e 295 nm.....	252
Figura 79: Espectros de fluorescência da proteína Hsp90 nos comprimentos de onda de excitação de 280 nm (A) e 295 nm (B) na presença de diferentes concentrações de guanidina.....	252
Figura 80: Ensaios de estabilidade térmica da MpkA de <i>A. fumigatus</i>	253
Figura 81: Atividade chaperona Hsp90 de <i>A. fumigatus</i> com a proteína MpkA de <i>A. fumigatus</i>	254
Figura 82: As proteínas PkcA, MpkA e RImA da CWIP interagem com Hsp90 durante o estresse de temperatura e parede celular em <i>A. fumigatus</i>	258
Figura A1: Fenótipos de crescimento da linhagem mutante $\Delta rImA$ na presença de CR e CFW.....	278
Figura B1: Análise da interação genética dos mutantes da CWIP.....	279
Figura C1: Análise das respostas transcricionais da linhagem selvagem e dos mutantes $\Delta rImA$ e $\Delta mpkA$ frente ao estresse da parede celular induzido por CR.....	281
Figura C2: <i>Heatmap</i> mostrando o padrão de expressão de genes selecionados de <i>A. fumigatus</i> identificados durante a comparação da linhagem selvagem <i>versus</i> $\Delta rImA$ por <i>microarray</i>	282
Figura D1: As linhagens mutantes da CWIP <i>pkcA</i> ^{G579R} , $\Delta mpkA$ e $\Delta rImA$ reduziram a acumulação de mRNA de <i>bria</i> , <i>abaA</i> e <i>wetA</i> durante o desenvolvimento assexuado sincronizado em <i>A. fumigatus</i> a 30 °C (A) e a 37 °C (B).....	284
Figura F1: Análise da resposta transcricional de genes relacionados à síntese de Fq na linhagem selvagem e mutantes $\Delta mpkA$ e $\Delta rImA$ durante o desenvolvimento assexuado a 37 °C (A) e a 30 °C (B).....	287
Figura G1: Análise da resposta transcricional de genes relacionados à síntese de Fq na linhagem selvagem e mutante $\Delta sebA$ durante o desenvolvimento assexuado a 30 °C (A) e a 37 °C (B).....	288
Figura L1: Atividade chaperona de Hsp90 de <i>A. fumigatus</i> com a proteína MpkA de <i>A. fumigatus</i> . (A-B-C-D-E-F).....	293

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Genótipos das linhagens de <i>A. fumigatus</i> utilizadas neste trabalho.....	28
Tabela 2: Linhagens utilizadas para a expressão de proteínas recombinantes.....	28
Tabela 3: Tabela contendo os oligonucleotídeos utilizados para construção e checagem de construções das linhagens utilizadas neste trabalho.....	33
Tabela 4: Tabela contendo os oligonucleotídeos utilizados para construção de linhagens para a expressão de proteínas recombinantes utilizadas neste trabalho.....	34
Tabela 5: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-qPCR em tempo real.....	34
Tabela 6: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de ChIP-qPCR durante o estresse de parede celular na presença do CR na linhagem <i>rlmA::3xFLAG</i> ...	36
Tabela 7: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de ChIP-qPCR durante o desenvolvimento assexuado em <i>A. fumigatus</i> na linhagem <i>rlmA::gfp</i>	36
Tabela 8: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de ChIP-qPCR durante o desenvolvimento assexuado em <i>A. fumigatus</i> na linhagem <i>sebA::gfp</i>	37
Tabela 9: Soluções para desnaturação e renaturação da membrana de far WB.....	56
Tabela 10: Agentes e drogas utilizados nos ensaios de caracterização fenotípica das linhagens utilizadas neste trabalho.....	66
Tabela 11: Genes relacionados a biossíntese e manutenção da integridade da parede celular de <i>A. fumigatus</i> selecionados para a análise por ChIP-qPCR do fator de transcrição RImA.....	146
Tabela 12: Genes relacionados ao desenvolvimento de <i>A. fumigatus</i> selecionados para a análise por ChIP-qPCR do fator de transcrição RImA.....	176
Tabela 13: Genes relacionados à biossíntese de Fq em <i>A. fumigatus</i> selecionados para a análise por ChIP-qPCR do fator de transcrição RImA.....	185
Tabela 14: Genes relacionados à biossíntese de Fq em <i>A. fumigatus</i> selecionados para a análise por ChIP-qPCR do fator de transcrição SebA.....	191
Tabela 15: Propriedades físico-químicas e condições de expressão das proteínas estudadas neste trabalho.....	237
Tabela 16: Propriedades estruturais da Hsp90 de <i>A. fumigatus</i>	245
Tabela 17: Propriedades estruturais da MpkA de <i>A. fumigatus</i>	251

LISTA DE ABREVIATURAS

AF - anidulanfungina
AI - Aspergilose pulmonar invasiva
aSEC - Cromatografia por exclusão de tamanho analítica
BFA - brefeldina A
BMDMs - Macrófagos derivados de medula óssea
pb - Pares de bases
BSA - Albumina bovina sérica
CASP - caspofungina
CAFF - cafeína
CD - Dicroísmo circular
CFU - Unidades formadoras de colônias
CFW - *Calcofluor white*
ChIP-qPCR - Imunoprecipitação de cromatina (ChIP) acoplada à PCR quantitativa
CIM - Concentração inibitória mínima
CLB - ChIP *lysis buffer*
CR - *congo red*
cRNA - Ácido ribonucleico complementar
CWI - Integridade da parede celular
CWIP - Via da integridade da parede celular
DTT - Ditioneitol
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético
ER - Retículo endoplasmático
EROS - Espécies reativas de oxigênio
FBS - soro fetal bovino
Fq - Fumiquinazolina
GFP - Proteína verde fluorescente
HOG - *High osmolarity glycerol*
HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC-UV - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a luz ultravioleta
HRMS - Espectrometria de massa de alta resolução
HSE - Elementos de choque térmico
HSF - *Heat shock transcription factors*/ fatores de transcrição de choque térmico
HSP - Proteína de choque térmico
IL-6 - Interleucina 6
ITC - Calorimetria de titulação isotérmica
LUC - Luciferase
MEV - *Multiple experiment viewer*
MM - Meio mínimo
MOIs - Diferentes multiplicidades de infecção
NO - Óxido nítrico
OD_{600nm} - Densidade ótica a 600 nm
ORF - *open reading frame*/ fase de leitura aberta
PBS - Tampão fosfato-salina
PCR - Reação em cadeia da polimerase
PMSF - *Phenylmethanesulfonyl fluoride*

qPCR - Reação em cadeia da polimerase quantitativa
q.s.p - Quantidade suficiente para
RPMI - meio *Roswell Park Memorial Institute*
RT - Transcriptase reversa
SDS - Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE - Dodecil sulfato de sódio - eletroforese em gel de poliacrilamida
SEC - Cromatografia por exclusão de tamanho
SEM - Microscopia eletrônica de varredura
STRE - *Stress response element*
TAE - Tampão tris acetato EDTA
TBS - Tampão tris salina
TBST - Tampão tris salina tween 20
T-butyl - Terc butyl
TEM - Microscopia electrónica de transmissão
TM - tunicamicina
TNF- α - Fator de necrose tumoral α
UFC - Unidades formadoras de colônias
WT - *wild type*
YG - meio *Yeast glucose*
YPD - meio *Yeast extract - Peptone - Dextrose*
5-FOA - Ácido 5-Fluoroorotico

1.0 Introdução

1.0 Introdução

1.1 O patógeno *Aspergillus fumigatus*

O patógeno *Aspergillus fumigatus* é um fungo filamentoso saprofítico que desempenha um importante papel ambiental nos ciclos de carbono e nitrogênio através da decomposição da matéria orgânica. Este fungo, apesar de não ser a espécie mais predominante de *Aspergillus ssp.*, é um dos mais ubíquos, sendo encontrado no solo de diferentes ambientes [1, 2]. O patógeno *A. fumigatus* é disseminado principalmente através da liberação de conídios haploides produzidos assexuadamente e disseminados através das correntes de ar, podendo ser facilmente inalados devido ao seu pequeno tamanho (cerca de 2-3 μm) [1, 2]. Ao encontrar um substrato adequado, estes podem germinar originando o micélio que é formado por um conjunto de hifas septadas [2-4]. O ciclo de vida e mecanismo de patogênese do *A. fumigatus* pode ser observado na figura 1.

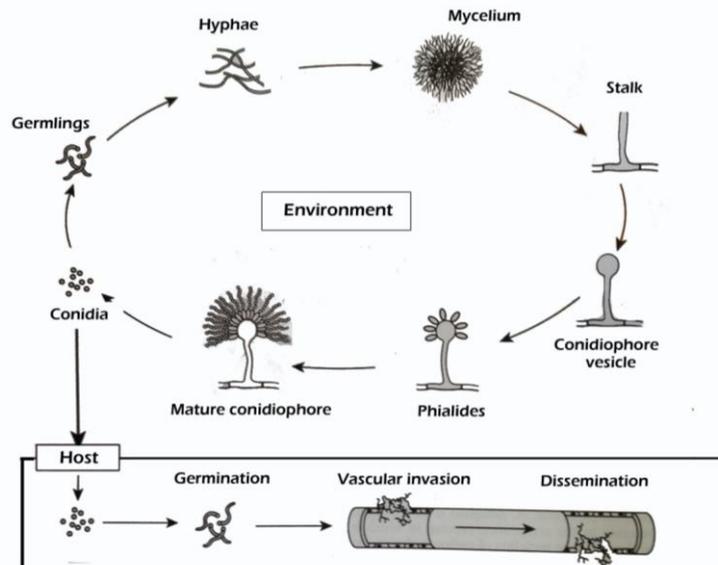


Figura 1: O ciclo de vida assexuado e patogênese de *A. fumigatus*. *A. fumigatus* desenvolve-se através do ciclo assexuado. O conídio, na presença de substratos nutricionais, forma germinantes que se tornam hifas maduras, as quais eventualmente se desenvolvem em micélio. As hifas ativam o desenvolvimento através do ciclo assexuado resultando em uma série de mudanças morfológicas como formação de hifas aéreas, desenvolvimento inicial do conidióforo e formação das fiáldes até a formação do conidióforo maduro. No hospedeiro imunocomprometido os conídios inalados podem invadir os vasos sanguíneos e serem disseminados. Na aspergilose pulmonar invasiva o órgão colonizado é majoritariamente o pulmão. Figura adaptada de Rhodes, Oliver [5].

A infecção por *A. fumigatus* se dá principalmente através da inalação dos seus conídios. A inalação dos conídios por indivíduos saudáveis raramente leva ao desenvolvimento de alguma forma de aspergilose, já que nestes as células do sistema imune inato eliminam o fungo do organismo [6].

As principais células imunes envolvidas na depuração dos conídios de *A. fumigatus* são macrófagos alveolares e neutrófilos. Os macrófagos alveolares constituem a primeira linha de células fagocíticas do hospedeiro contra o conídio inalado. Os monócitos e neutrófilos periféricos do sangue são subsequentemente recrutados para os locais de infecção após a germinação fúngica, constituindo a defesa do hospedeiro contra hifas [7]. O reconhecimento de conídios por macrófagos alveolares leva à fagocitose e induz a expressão de quimiocinas e citocinas inflamatórias [8-10]. Receptores de reconhecimento das células do hospedeiro como receptores de dectina-1 e *Toll like receptors* (TLR), assim como *pentraxin-3* e ligantes de manose e lectina reconhecem *motifs* fúngicos específicos [9, 11, 12]. Enquanto os receptores TLR-2 e dectina-1 reconhecem β glucanas da parede celular fúngica e se ligam a estas, o DNA de *A. fumigatus* contém ilhas CpG não metiladas que também são reconhecidas pelo TLR-9. Já a *pentraxin-3* se liga à galactomanana da parede celular fúngica e facilita o reconhecimento do conídio por células efetoras do sistema imune [13]. Na figura 2 pode-se observar um esquema dos componentes de resposta do hospedeiro aos conídios de *A. fumigatus* inalados.

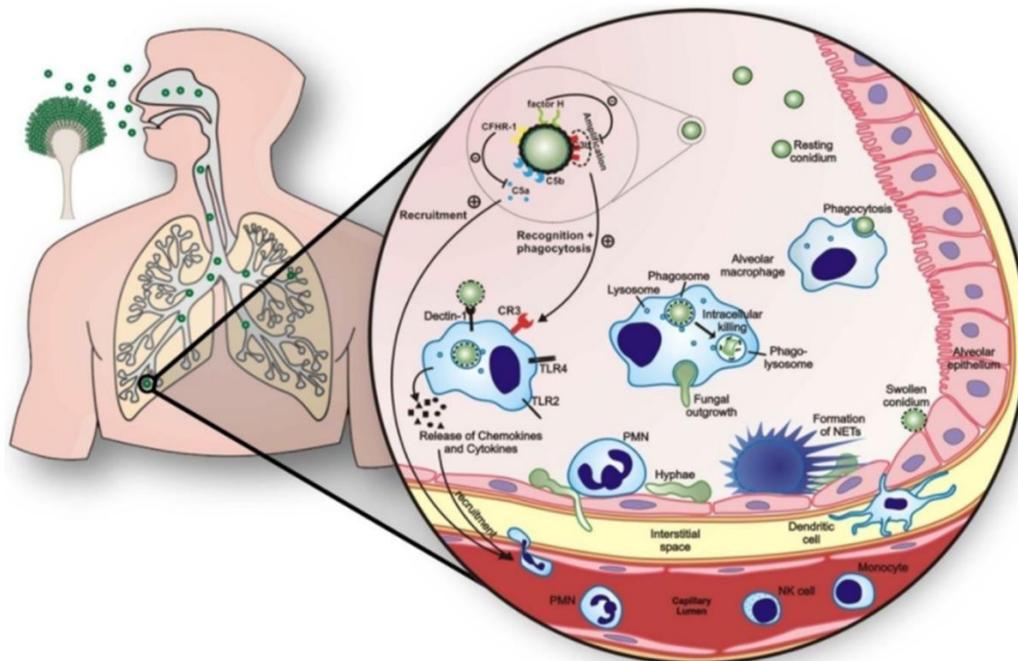


Figura 2: Esquema dos componentes de resposta do hospedeiro aos conídios de *A. fumigatus* inalados. A primeira linha de defesa contra os conídios inalados ocorre já nas cornetas nasais e na árvore brônquica devido ao fluxo de ar altamente turbulento que deposita a maioria das partículas inaladas contra o fluido da superfície da via aérea, permitindo sua remoção pela ação ciliar do epitélio respiratório. Isso constitui um mecanismo importante de defesa antimicrobiana nos pulmões. Por outro lado, o pequeno tamanho dos conídios de *A. fumigatus* em repouso (2 a 3 µm de diâmetro) permite que alguns dos esporos inalados evitem este mecanismo de defesa e cheguem à zona respiratória do pulmão. O reconhecimento do *A. fumigatus* pelo hospedeiro ocorre por meio de moléculas de reconhecimento de padrões solúveis, bem como receptores ligados às células. O próximo passo em defesa contra o *A. fumigatus* é a ativação dos mecanismos efetores da imunidade inata. Estes incluem mecanismos antimicrobianos como macrófagos alveolares e células dendríticas, assim como recrutamento e ativação de leucócitos após a chegada do conídio ao local de infecção. Simultaneamente, os conídios em repouso ficam “inchados” dentro de 4 a 5 horas da chegada aos pulmões e, se não eliminados, germinam e formam hifas dentro de 12 a 15 horas após a chegada ao pulmão. As hifas invadem o tecido pulmonar adjacente, causam pneumonia e, muitas vezes, disseminam-se para outros órgãos. Adaptado de Heinekamp, Schmidt [6].

Outras espécies de *Aspergillus ssp.* são capazes de causar a aspergilose invasiva, incluindo *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nidulans* e *Aspergillus terreus*, entretanto *A. fumigatus* é o principal agente etiológico da aspergilose em humanos, sendo a espécie responsável por cerca de 90 % dos casos da doença [14, 15], o que sugere que este patógeno possui determinantes de virulência específicos que permitem a colonização dos hospedeiros imunocomprometidos mais facilmente.

Há uma variedade de processos envolvidos na patogênese e nas diferentes manifestações clínicas causadas por *A. fumigatus* [14, 15]. Diversos genes que estão relacionados à patogenicidade em *A. fumigatus* não se

encaixam em uma definição clássica de fator de virulência, no entanto, eles são responsáveis pela evasão do sistema imune e capacidade de causar danos ao hospedeiro [5]. Os genes e moléculas envolvidos na capacidade infectiva de *A. fumigatus*, e, portanto, tidos como determinantes de virulência, auxiliam na adesão, colonização, disseminação e imunomodulação e, conseqüentemente, na habilidade do fungo em escapar dos mecanismos de resposta imune do hospedeiro [16]. Estes podem ser classificados de acordo com a função em que estão envolvidos na proteção do patógeno frente ao hospedeiro como, por exemplo, termotolerância, composição da parede celular, resistência à resposta imune, produção de toxinas e metabólitos secundários, absorção de nutrientes e versatilidade nutricional, regulação do metabolismo, dentre outros. Para uma revisão ver Abad, Fernandez-Molina [17].

A maioria das infecções causadas pelo *A. fumigatus* em humanos pode ser separada em três principais categorias: aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA), aspergilose pulmonar crônica (CPA) e aspergilose pulmonar invasiva (AI), sendo esta última a forma mais grave da doença [18]. Nesta, as hifas fúngicas podem invadir tecidos e, em alguns casos, até mesmo o sistema sanguíneo, podendo se dispersar por diversos órgãos [2]. O principal local de infecção é o pulmão, porém a infecção pode ocorrer também através da pele e da córnea, apesar da colonização fúngica desses locais ser muito menos frequente. A AI é rara em indivíduos saudáveis e afeta quase exclusivamente pacientes com comprometimento no sistema imunológico, sendo os maiores fatores de risco a neutropenia, transplante hematopoiético alogênico de *stem cells*, ou transplantes de órgãos sólidos (em particular pulmão), neoplasia hematológica, quimioterapia citotóxica para tratamento de câncer, pacientes com HIV/AIDS (Vírus da imunodeficiência humana/Síndrome da imunodeficiência adquirida) e doença granulomatosa crônica (DGC) [19].

O tratamento de infecções fúngicas é desafiador, pois estes organismos compartilham muitas vias metabólicas com o hospedeiro mamífero. As atuais opções de tratamento para a aspergilose são limitadas a três classes terapêuticas de moléculas antifúngicas: polienos (anfotericina B) que se ligam aos esteróis da parede celular fúngica; azóis que promovem inibição da esterol- α -1,4-desmetilase, um sistema enzimático microsomal dependente do

citocromo P450 que age inibindo a síntese do ergosterol na parede celular (fluconazol, voriconazol, itraconazol) [20]; e equinocandinas semissintéticas (casposfungina, anidulafungina e micafungim) que inibem a enzima $\beta(1,3)$ glucano sintase, impedindo a manutenção da integridade da parede celular [21]. Apesar das opções terapêuticas atuais, a mortalidade associada à aspergilose invasiva ainda permanece elevada [22].

Devido à falta de terapias antifúngicas eficazes, a parede celular fúngica tem sido alvo de pesquisas visando o desenho de drogas, pois ela é a estrutura que determina o formato da célula, fornece suporte osmótico, proteção física, além de estar relacionada a eventos de sinalização celular, adesão e reprodução [23-31].

1.2 Via da integridade da parede celular em *A. fumigatus*

Um dos principais determinantes da resistência ao estresse fúngico é a sua parede celular. A parede celular tem um papel proeminente e duplo durante o crescimento de patógenos fúngicos: permite ao patógeno detectar, adaptar e sobreviver em um ambiente destrutivo em termos de nutrientes, como a microbiota ou células humanas, mas também controla o crescimento polarizado, o que ajuda o fungo a invadir novos territórios e especialmente os tecidos do hospedeiro. Devido a estudos genéticos, bioquímicos e imunológicos ao longo das duas últimas décadas, *A. fumigatus* tornou-se um modelo para entender o papel da parede celular no crescimento de um fungo filamentosos em seu ambiente natural ou durante a sua vida patogênica.

A arquitetura geral da parede celular é conservada em todas as espécies de fungos e essencialmente consiste de uma estrutura de polímeros, incluindo quitina, glucana e manana/galactomanana. No entanto, existem algumas diversidades fundamentais na estrutura da parede celular fúngica entre diferentes espécies e por vezes até mesmo entre diferentes morfologias das mesmas espécies. Apesar da diversidade estrutural, a parede celular permanece única ao patógeno fúngico e vital para o seu crescimento e sobrevivência, sobressaindo-se assim como um alvo promissor para a investigação de drogas antifúngicas [32].

Mais de 90 % da parede celular do micélio de *A. fumigatus* compreende polissacarídeos, alguns dos quais estão estruturalmente e covalentemente ligados em um complexo composto por $\beta(1,3)$ glucana ligada a quitina, galactomanana e $\beta(1,3)$ e $\beta(1,4)$ glucanas. Outros polissacarídeos tais como $\alpha(1,3)$ glucana e galactosaminogalactano atuam como “cimento”, preenchendo os poros entre os polissacarídeos fibrilares. Revisado por Bernard and Latge [33], Latge, Beauvais [34].

A sobrevivência da célula fúngica é altamente dependente da função, organização, e composição da parede celular. Esta estrutura é essencial para proporcionar uma forma celular adequada e a integridade para morfotipos fúngicos, prevenindo a lise das células. Além disso, esta estrutura tem um papel na adesão célula-a-célula e na prevenção de reconhecimento pelo sistema imunitário do hospedeiro [23, 26, 35]. Como uma barreira de proteção rígida, porém dinâmica, esta estrutura está sob biossíntese e remodelação constante devido a processos inerentes envolvidos no crescimento e na reprodução fúngica ou aos vários desafios ambientais que são sentidos pelo agente patogênico invasor durante a infecção [36, 37].

A formação e manutenção da parede celular são controladas através da via da integridade da parede celular (CWIP). A CWIP é uma cascata de transdução de sinal que mantém a integridade da parede celular, sendo conservada e já estudada em diversos fungos patogênicos humanos, incluindo *A. fumigatus* [23, 29, 32, 35, 38-40]. Estes estudos têm demonstrado que deficiências na integridade da parede celular levam à atenuação da virulência e ao aumento da sensibilidade a agentes antifúngicos neste patógeno [24, 25, 27, 28, 30, 31, 40-42]. Essencialmente, em todas as espécies de fungos, uma atividade basal dessa via é necessária mesmo sob condições normais de crescimento para manter a biogênese da parede celular e a integridade da célula fúngica [32].

A ativação da CWIP é iniciada na superfície da célula em resposta a algum estresse, o qual é detectado por sensores transmembrana [43]. Em *Sacharomyces cerevisiae*, os estímulos que ativam a CWIP são captados por sensores presentes na membrana plasmática, como Wsc1-3, Mid2 e Mtl1[44]. Esses sensores por sua vez transmitem os sinais para Rom2, que é

responsável pela ligação de GTP à proteína Rho1. Uma vez ativada, Rho1 promove a ativação de Pkc1 [45]. Em seguida, Pkc1 fosforila Bck1 que então ativa as quinases *downstream* Mkk2 e Mpk1 [46]. Mpk1 por sua vez controla a atividade de dois fatores de transcrição, Rlm1 e SBF (Swi4/Swi6), responsáveis pela regulação da expressão de genes relacionados à biossíntese da parede celular e ao controle do ciclo celular, respectivamente [47]. O módulo de quinase central da MAPK é conservado a partir de *S. cerevisiae* para espécies de *Aspergillus ssp.*, conforme descrito anteriormente [35, 40, 48].

Os cinco sensores da CWIP que respondem a diversos estresses em *S. cerevisiae*, as proteínas de membranas Wsc1-3, Mid2 e Mtl1, são caracterizadas por um domínio extracelular rico em serina/treonina [44]. *A. fumigatus* possui três supostos homólogos de Wsc e um de Mid2/Mtl1, Wsc1-3 e MidA respectivamente. Mutantes nulos destes sensores ($\Delta wsc1$, $\Delta wsc2$, $\Delta wsc3$ e $\Delta midA$) possuem alteração no crescimento de colônias e na produção de conídios [23]. O triplo mutante nulo destes sensores, $\Delta wsc1 \Delta wsc3 \Delta midA$, possui um grande aumento deste fenótipo, o que sugere funções parcialmente sobrepostas na regulação do crescimento polarizado e da conidiação em *A. fumigatus* [23]. Os papéis distintos na detecção do estresse da parede celular podem ser atribuídos a MidA (agentes de ligação à quitina, temperaturas elevadas) e Wsc1 (equinocandinas), Wsc2, porém, não pode ser ligado à CWIP [23]. Uma resposta diferencial semelhante em nível transcricional também foi observada para sensores de CWIP em *S. cerevisiae* [49].

A ativação das proteínas Rho requer a troca do GDP vinculado para GTP. Dois fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GEFs) foram identificados como ativadores de Rho1 em *S. cerevisiae*, Rom1 e Rom2. Estes são homólogos parcialmente redundantes que se originam da duplicação do genoma completo de *S. cerevisiae* [36]. De acordo com o modelo atual, após o estímulo da parede celular, os GEFs da CWIP interagem diretamente com os sensores e, posteriormente, estimulam a troca GDP/GTP na Rho GTPase *downstream* em *S. cerevisiae* e *Neurospora crassa* [36, 50]. *A. fumigatus* codifica apenas um homólogo Rom1/Rom2, denominado Rom2. Um mutante condicional com a expressão de *rom2* reduzida é viável, e integra essencialmente todos os fenótipos dos mutantes dos sensores da CWIP [51].

De acordo com seu papel na sinalização de CWIP, a fosforilação da MAP quinase MpkA de *A. fumigatus* não é induzida no mutante condicional *rom2_{tetOn}* em condições de repressão [51], mas a fosforilação basal contínua de MpkA no mutante condicional *rom2_{tetOn}* em condições de repressão indica a presença de rotas alternativas de ativação da CWIP em *A. fumigatus* [51].

No mutante nulo de Rho1 em *A. fumigatus* ($\Delta\rho1$), foi relatado um fenótipo de lise das hifas, e este está localizado na proximidade do complexo de $\beta(1,3)$ glucana sintase e principalmente durante o crescimento polarizado das hifas [23, 24, 38]. Isso sugere que o papel fisiológico de Rho1 em *A. fumigatus* é semelhante ao de Rho1 em *S. cerevisiae*. O envolvimento do homólogo Rho2 de *S. cerevisiae* na manutenção da parede celular de *A. fumigatus* é claro a partir dos fenótipos do respectivo mutante nulo ($\Delta\rho2$). A deleção de *rho2* em *A. fumigatus* resulta em um mutante suscetível a *calcofluor white* (CFW), *congo red* (CR) e temperatura [23]. Resultados muito semelhantes foram obtidos para um mutante $\Delta\rhoB$ de *A. niger* [52]. Em *A. fumigatus*, foi identificada uma terceira Rho GTPase conservada com importância para a integridade das hifas expostas ao estresse da parede celular, Rho4, homóloga de Rho4 de *S. cerevisiae*. Em testes de crescimento em meios sólidos, o mutante nulo $\Delta\rho4$ demonstrou susceptibilidade a agentes e condições perturbadoras da parede celular (CFW, CR, temperatura), semelhante ao mutante $\Delta\rho2$ [23]. Embora o papel funcional de Rho4 em *S. cerevisiae* não esteja totalmente esclarecido, em *A. fumigatus* este é essencial para a formação de septos nas hifas [23].

A proteína quinase C, que é ativada pelas Rho GTPases é a quinase apical da CWIP. Esta é conservada em fungos, incluindo *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans* e *A. fumigatus* [53]. O homólogo de Pkc1 em *A. fumigatus*, PkcA, foi recentemente caracterizado através da construção de um mutante *pkcA^{G579R}* que carrega uma mutação pontual no domínio regulatório C1B da PkcA de *A. fumigatus* [29]. O mutante *pkcA^{G579R}* é hipersensível aos agentes de ligação à quitina (CFW e CR), ao aumento de temperatura, ao estresse oxidativo e a antifúngicos como azóis e equinocandinas [29]. Embora a super expressão de PkcA de *A. nidulans* tenha aumentado a fosforilação de MpkA, em *A. fumigatus* a fosforilação de MpkA foi

reduzida no mutante *pkcA*^{G579R} durante o estresse de parede celular provocado por CR [29, 54]. Surpreendentemente, apesar do aumento da susceptibilidade às condições perturbadoras da parede celular e do aumento da internalização por macrófagos sob condições *in vitro*, a virulência do mutante *pkcA*^{G579R} não é atenuada [29].

Em *S. cerevisiae*, Pkc1 fosforila Bck1 que então ativa as quinases *downstream* Mkk2 e Mpk1 [46], e este módulo é conservado em espécies de *Aspergillus ssp.* [35, 40, 48]. Em *A. fumigatus*, o estresse da parede celular não consegue induzir a fosforilação de MpkA em cepas que não possuem Mkk2 (MAPKK) ou Bck1 (MAPKKK) [30, 38, 40]. A deleção de componentes do módulo MAPK leva a hifas irregulares e inchadas que possuem defeitos de adesão e hipersensibilidade a pH alcalino, agentes estressantes da parede celular e antifúngicos (equinocandinas e azóis) [35, 38, 40].

Em *S. cerevisiae*, Mpk1, quando ativada, localiza-se no núcleo e ativa o fator de transcrição Rlm1 (*resistant to the lethality of constitutive Mkk1*) e o fator de transcrição dimérico Swi4/Swi6 (complexo SBF). Jung and Levin [55] demonstram que a sinalização através da CWIP que culmina na ativação do fator de transcrição Rlm1, regula a expressão de pelo menos 25 genes, a maioria dos quais têm sido implicados na biogênese da parede celular [36, 55, 56].

Conforme mencionado, em *S. cerevisiae* o fator de transcrição *downstream* a Pkc1, responsável pela transcrição de genes associados à manutenção da integridade da parede celular, é o Rlm1 [36, 55, 56]. O fator de transcrição Rlm1 é membro da família dos fatores de transcrição do tipo “MADS-box” (Mcm1p – *Agamous Deficiens Serum Response Factor*) [57], cujo ortólogo em mamíferos é o fator de transcrição “MEF2” (*Myocyte Enhancer Factor* dois) [58]. Tanto em *S. cerevisiae* quanto em mamíferos, a sequência de ligação ao DNA desse fator de transcrição é bastante conservada [58]. Rlm1 é responsável pela ativação transcricional da maior parte dos genes relacionados à CWIP em *S. cerevisiae*, e foi identificado a partir de um *screening* genético que isolou mutantes que conferiam resistência à letalidade causada pelo efeito da super expressão da MAPKK MKK1 na forma do mutante ativado MKK1, ou seja, eram capazes de sobreviver à inibição do crescimento causado por uma forma constitutivamente ativa da MAPKK Mkk1 [59]. O Rlm1 foi identificado

entre os genes induzidos, sugerindo a existência de um circuito autorregulador para amplificação da resposta ao estresse [60]. Em *S. cerevisiae*, Rlm1 reside no núcleo, independentemente do seu estado de fosforilação e ativação [58].

Fujioka, Mizutani [48] descreveram RlmA de *A. nidulans* como o fator de transcrição responsável por regular a síntese de $\alpha(1,3)$ glucana sintase, pois RlmA regulou os genes *agsA* e *agsB*, e quando deletado causou o aumento da sensibilidade a drogas que causam estresse da parede celular, CFW e CR [48]. Posteriormente Kovacs, Szarka [61] demonstraram que o RlmA também está relacionado ao desenvolvimento assexuado de *A. nidulans* [61]. Entretanto, embora em *S. cerevisiae* o papel de *RLM1* (ortólogo de *rlmA* em *A. fumigatus*) na CWIP seja bem conhecido, em *A. fumigatus* o papel deste ainda não foi elucidado, de forma que ainda não se sabe quais são efetivamente os genes ativados transcricionalmente por RlmA. Na figura 3, encontra-se o modelo proposto para a CWIP de *A. fumigatus*, baseado na CWIP de *S. cerevisiae*.

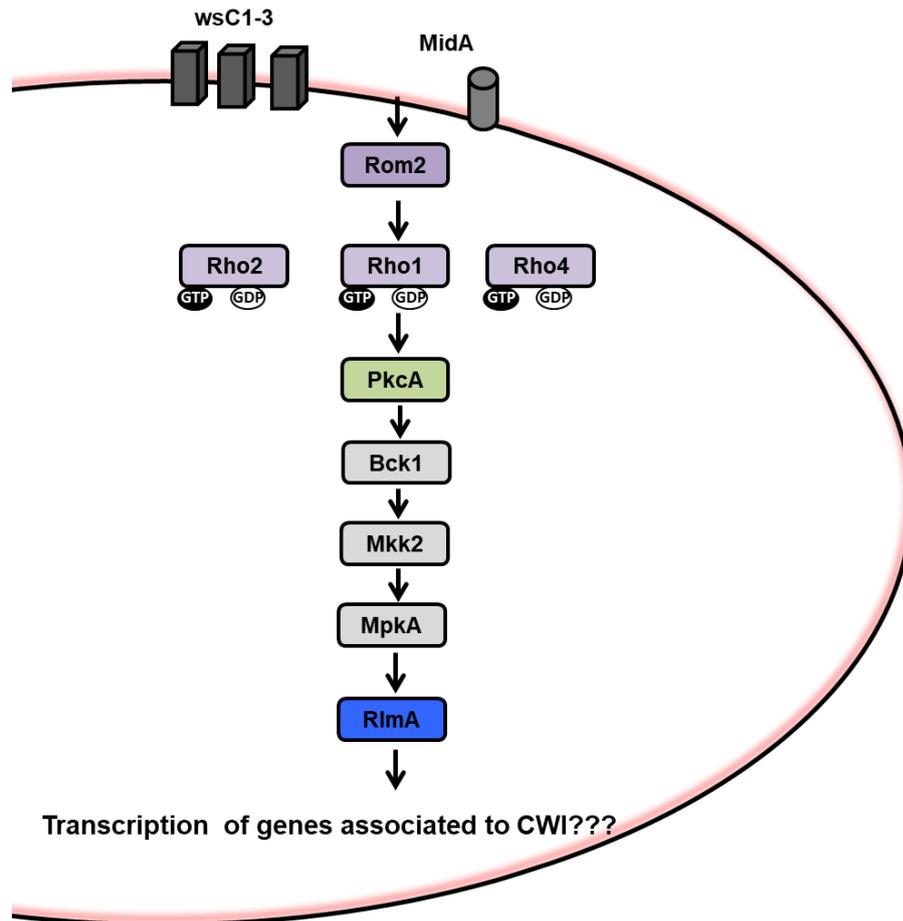


Figura 3: Esquema da via de sinalização da CWIP de *A. fumigatus* baseado no modelo desta via em *S. cerevisiae*. A proteína quinase C participa de uma cascata de MAP quinase, também denominada via de integridade da parede celular, a qual é ativada em condições de estresse (maiores informações no texto). Diagrama baseado nos dados descritos por [42], [23], [38], [40], [30] e [51]. RlmA ainda não está caracterizado.

1.3 Desenvolvimento e a produção de metabólitos secundários em *Aspergillus fumigatus*

A conidiação em *Aspergillus ssp.* envolve muitos temas como comunicações intra e intercelulares, controle temporal e espacial da expressão de genes do desenvolvimento e a diferenciação especializada de células [62]. Todo o processo da formação de conidióforos, estruturas específicas assexuadas que produzem os conídios, é geneticamente regulado e exercido por múltiplos ativadores e repressores [63]. Esses reguladores governam a expressão coordenada de um conjunto de genes distintos, que são necessários para a progressão de cada etapa [64-66].

A formação do conidióforo é um processo que pode ser dividido em vários estágios diferenciais [62]. Sob condições adequadas, as células vegetativas cessam o crescimento das hifas e começam a formar *foot cells*, que são células de hifas com paredes grossas que se prolongam no ar para produzir uma hifa aérea denominada *stalk*. Após a extensão dos *stalks*, a ponta da haste começa a inchar e ocorre a formação de uma vesícula multinucleada. Os numerosos botões, produzidos de forma síncrona no topo da vesícula, formam uma camada de células uninucleadas estéreis denominadas fiálides, que por sua vez produzem células diferenciadas a partir da divisão mitótica e formam longas cadeias de conídios que sofrem um processo de maturação, incluindo a modificação da parede celular e a aquisição de um metabolismo específico de remodelação. Essas estruturas multicelulares resultantes contêm até 50.000 conídios e são denominadas conidióforos (figura 4A) [67].

A via reguladora central que controla a conidiação é altamente conservada em *A. fumigatus*. [67, 68]. Esta via contém os três genes que são elementos chave, BrlA, AbaA e WetA (figura 4B), responsáveis por coordenar a conidiação e a expressão específica de genes, e por determinar a ordem da ativação de genes durante a formação e a maturação de conidióforos e esporos [67].

BrlA é um ativador chave para a iniciação do desenvolvimento em *A. fumigatus* [68, 69]. O gene *brlA* é especificamente expresso durante a fase inicial da conidiação. Os mutantes nulos de *brlA* produzem hifas aéreas alongadas que não conseguem formar uma estrutura assexuada além do estágio da iniciação da conidiogênese (formação do *stalk*), sugerindo que BrlA é essencial para a iniciação da formação de conidióforos [68, 69]. Este ativador é necessário para a expressão adequada de genes relacionados à conidiação, como *abaA*, *wetA*, *vosA* e *rodA* [70]. A deleção de *brlA* também altera a expressão de genes que estão relacionados à pigmentação conidiana e à biossíntese de gliotoxina [71].

AbaA é um regulador chave para a diferenciação e formação de fiálides em *A. fumigatus* [70, 72]. A deleção de *abaA* em *A. fumigatus* ($\Delta abaA$) levou a formação de conidióforos atípicos que exibiam longas cadeias de células semelhantes a cilindros sem conídios [70]. A expressão de *abaA* é altamente

induzida durante a metade do desenvolvimento assexuado, anteriormente à formação dos *stalks*. A expressão de *abaA* é dependente de *brlA*, mas não de *wetA* [70]. *AbaA* contém um domínio de ligação ao DNA ATTS/TEA e, é necessário para a expressão de genes esporo-específicos, incluindo *wetA*, *vosA* e *velB*, os quais contêm elementos putativos de resposta a *AbaA* nas suas regiões promotoras [70, 73]. Esses dados demonstram que *AbaA* é um fator de transcrição regulador da expressão de genes associados com o atraso da fase de conidiação. Além desta função, *AbaA* também regula a autólise e morte celular. A deleção de *abaA* retarda a viabilidade celular em comparação com a linhagem selvagem de *A. fumigatus*, enquanto que a super expressão de *abaA* induz a fragmentação de hifas, redução da massa micelial e morte celular precoce [70].

WetA é essencial para a conclusão da conidiação [70, 72]. O gene *wetA* está ativado na fase tardia da conidiação. A deleção de *wetA* ($\Delta wetA$) resulta na formação de conídios brancos com parede celular defeituosa. Estes apresentam tolerância reduzida para vários estresses, redução da viabilidade de esporos, e não contêm trealose (um protetor celular necessário), sugerindo que *WetA* desempenha um papel crítico na biogênese de trealose em conídios, o que pode afetar a viabilidade dos conídios e a tolerância ao estresse [74]. Além disso, *WetA* é importante para germinação de esporos e para o início da fase de crescimento de fungos, visto que a deleção de *wetA* no mutante $\Delta wetA$ de *A. nidulans* resultou na formação retardada do tubo germinativo e diminuiu a ramificação de hifas [70].

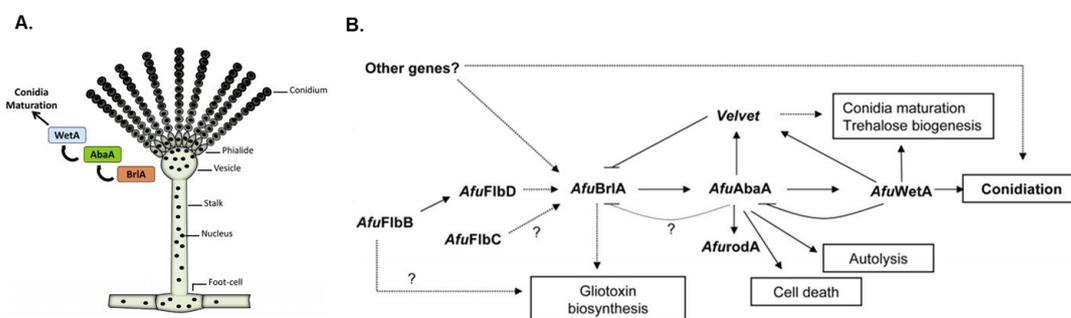


Figura 4: Regulação da conidiação em *A. fumigatus*. (A) Ilustração do conidióforo de *A. fumigatus*. O Ativador de cada fase da conidiação é colocado ao lado dele. *BrlA* é necessário para a formação de vesículas, *AbaA* é necessário para a diferenciação em conídios, e *WetA* é necessário para a maturidade dos conídios e integridade da parede destes. As setas indicam a ativação subsequente [68]. (B) Esquema da via reguladora central que controla a conidiação em *A. fumigatus* proposto por Yu [67].

Os fungos filamentosos produzem diversos metabólitos secundários essenciais à sua ecologia e adaptação. Embora cada metabólito secundário seja tipicamente produzido por apenas um grupo de espécies, a produção global de metabólitos secundários é governada por reguladores de transcrição amplamente conservados em conjunto com outros processos celulares, como o desenvolvimento. O tempo de produção de metabólitos secundários com as mudanças de desenvolvimento está bem estabelecido em fungos filamentosos, e a presença/ausência de metabólitos secundários tem sido associada a mudanças de desenvolvimento [75]. Desta forma alguns estudos já sugeriram que os reguladores que coordenam a síntese de metabólitos secundários e o desenvolvimento permitem que os fungos filamentosos desenvolvam estilos de vida mais "complexos" através da produção de uma diversidade muito maior de metabólitos secundários [75-77]. Muitos estudos também associaram a expressão e acumulação de metabólitos secundários com vias de sinalização, revelando uma conexão direta entre um determinado sinal e a produção de moléculas ativas específicas. Em *A. fumigatus*, a deleção da MAPK MpkA não só aumenta sensibilidade aos compostos de ação da parede celular, mas também diminui a produção de DHN-melanina e gliotoxina [40, 78].

A gliotoxina é a principal e mais potente toxina produzida por *A. fumigatus* [79]. Essa toxina possui vários papéis imunossupressivos: inibição da fagocitose por macrófagos, inibição da proliferação das células T ativadas por mitógenos e da resposta citotóxica dessas células, além da apoptose de macrófagos [80]. Há relatos de que essa toxina é produzida tanto em aspergilose experimental animal quanto em AI, e nesse caso com concentrações séricas de 166-785 ng/mL em 80 % dos pacientes. Acredita-se que devido a sua atividade biológica ela atua como um fator de virulência [2, 81, 82]. Análises dos mutantes nulos de *brlA* e *abaA* revelaram que *AbaA* e *BrlA* são reguladores positivos do *cluster* biossintético de gliotoxina pois os níveis de mRNA de genes biossintéticos de gliotoxina, incluindo *gliM*, *gliP*, *gliT* e *gliZ*, bem como os níveis da própria gliotoxina foram significativamente reduzidos em ambas as cepas mutantes [83]. Como *GliT* é necessário para a proteção do fungo à gliotoxina, o crescimento do mutante $\Delta brlA$ com níveis reduzidos de *GliT* foi gravemente prejudicado pela gliotoxina exógena [83]. As

análises proteômicas comparativas e a identificação de proteínas-chave alteradas revelaram que BrlA e AbaA são necessários para a produção adequada das proteínas GliM e GliT, as quais são associados à biossíntese da gliotoxina e à autoproteção em *A. fumigatus* [84-86].

Um outro metabólito secundário de *A. fumigatus* bem caracterizado são as fumiquinazolinas (Fqs). Estas compreendem uma família de alcaloides citotóxicos relacionados bioquimicamente a opopúndios e produzidos por *A. fumigatus* [87]. Um estudo recente relatou o isolamento da fumiquinazolina C (FqC) a partir dos extratos de conídios de *A. fumigatus* [88]. A rede de sínteses das Fqs é construída por uma maquinaria enzimática de peptídeo sintase não ribossomal (NRPS) com antranilato como um bloco de construção de aminoácidos não proteínogênicos chave [89]. As análises bioinformáticas seguidas de expressão heteróloga e purificação em *E. coli* de proteínas de *A. fumigatus* que se prevêem estar envolvidas na biossíntese de Fq levaram à identificação de um processo de reação enzimática que constrói a rota biossintética para a produção de Fqs cada vez mais complexo (figura 5), começando com o NRPS FmqA trifásico (AFUA_6G12080) e terminando com a oxirredutase dependente de FmqD (AFUA_6G12070) [89-91].

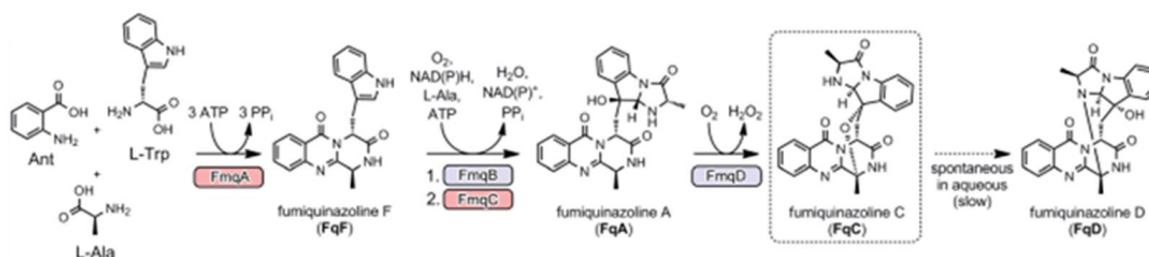


Figura 5: Rota biossintética da síntese de Fqs [87].

BrlA, conforme demonstrado acima, é um fator de transcrição específico de conidiação envolvido no estágio inicial do desenvolvimento assexuado e necessário para a formação de conidióforos em *A. fumigatus* [69]. Este é também um importante gene necessário para a síntese de FqC e FqA, uma vez que o mutante nulo de BrlA, $\Delta brlA$, produz apenas FqF [87]. BrlA é duplamente importante na produção de Fq, uma vez que não é apenas necessário para a expressão dos genes do cluster Fq, mas também fornece a estrutura (conidióforo e conídios associados) necessária para a secreção de FqD e

deposição de FqC e, os transcritos *fmqA*, *fmqB*, *fmqC*, *fmqD* e *fmqE* são indetectáveis no mutante $\Delta brlA$ [87].

AbaA e WetA são regulados por BrlA e estão envolvidos nos estádios médio e tardio do desenvolvimento e maturação de conidióforos, e a produção de Fq no mutante $\Delta abaA$ assemelha-se à da linhagem selvagem, mas é aumentada no mutante $\Delta wetA$ [87]. Em todos os casos, a maior acumulação de FqC ainda é mantida nos mutantes $\Delta abaA$ e $\Delta wetA$. Estes resultados demonstram que a expressão de *brlA* é necessária e suficiente para a biossíntese de Fq, que permanece em grande medida normal em mutantes com anormalidades da estrutura do desenvolvimento nas linhagens nulas $\Delta abaA$ e $\Delta wetA$ [87].

1.4 Termotolerância em *A. fumigatus*

A temperatura é um dos parâmetros que são constantemente monitorados pelos seres vivos, de forma que organismos fúngicos também controlam a sua temperatura constantemente [92-94]. Em organismos fúngicos, o aumento da temperatura ao sair do solo (25 °C) e entrar em contato com a temperatura do hospedeiro (37 °C) já é suficiente para iniciar cascatas de sinalização de resposta ao estresse, afetando o ciclo de vida e diversos processos celulares tanto no nível transcricional quanto pós-transcricional, que visam manter a viabilidade celular e a persistência dentro do hospedeiro durante o processo de infecção [95].

Em algumas espécies de fungos que compreendem os chamados fungos dimórficos, a elevação da temperatura também é essencial para a indução de transição termodimórfica e conseqüentemente habilita propriedades patogênicas nesta classe de fungos, desencadeando a conversão da forma saprófita, filamentosa e infecciosa para a forma invasiva de levedura em resposta ao aumento da temperatura no hospedeiro [96, 97]. Além disso, patógenos fúngicos como *C. albicans* podem realizar a transição entre morfotipos distintos (hifas, pseudo-hifas e leveduras) [98]. Este interruptor morfológico é rigorosamente regulado por sinais ambientais juntamente com o aumento da temperatura (37 °C) e afeta diretamente os traços de virulência

neste organismo [98]. Em *A. fumigatus*, a termotolerância é um importante traço genético responsável pela sobrevivência durante a infecção do hospedeiro, pois este é um fungo termofílico capaz de crescer em temperaturas de até 55 °C e sobreviver na forma de conídios viáveis em temperaturas de até 70 °C [41], adaptando-se a alterações dramáticas de temperatura, diferentemente do que ocorre em outras espécies de *Aspergillus ssp.*, como *A. niger* e *A. flavus* [99].

Em *S. cerevisiae*, a resposta ao choque térmico é controlada principalmente pelos fatores de transcrição Hsf1, Msn2/Msn4 e Hac1 [100]. O fator de transcrição Hsf1 é o principal e este se liga a sequências consenso específicas (nGAAn ou nTTCn) presentes nos elementos de choque térmico (HSE) dentro das regiões promotoras de alvos de transcrição de *heat shock transcription factors* (HSF). Após o choque térmico, Hsf1 induz a expressão de chaperonas e outros genes relacionados ao choque térmico além de enzimas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo, transdução de sinal, metabolismo de carboidratos e nitrogênio, entre outros [101, 102]. O resultado final da ativação de Hsf1 após o choque térmico é a expressão das chamadas proteínas de choque térmico (HSPs). Esta família de proteínas compreende os efetores finais para a adaptação térmica, estabelecendo uma ligação entre a morfogênese e a termotolerância em fungos [103, 104].

As HSPs são divididas em cinco grandes famílias com base em seu tamanho e função, que incluem Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 (GroEL) e as pequenas HSPs (sHSPs) [105, 106]. Esta família de proteínas atua em vários processos celulares para evitar o *misfolding*, maturação anormal e agregação de proteínas clientes. Algumas dessas proteínas clientes são frequentemente posicionadas em diferentes cascatas de sinalização e, portanto, o papel regulador de tais proteínas clientes que conduzem o comportamento das células durante o choque térmico é estritamente dependente da função das HSPs [107, 108]. As HSPs são encontradas de forma ubíqua na célula e residem em vários locais, como o citosol, as mitocôndrias, o retículo endoplasmático, o núcleo, a membrana celular e a parede celular, podendo se mover para diferentes compartimentos celulares de acordo com as condições de estresse [105].

De fato, o estresse da parede celular é uma das ocorrências mais prejudiciais na célula fúngica, pois acarreta na interrupção ou comprometimento da estrutura da parede celular. A chaperona molecular Hsp90 de *S. cerevisiae*, cujo ortólogo em *A. fumigatus* é a Hsp90 (Afu5g04170), é uma chaperona molecular altamente conservada e essencial para o crescimento viável em altas temperaturas [109]. Em *A. fumigatus*, assim como em *C. albicans* e *Candida glabrata*, a função da Hsp90 é diretamente ligada à manutenção da parede celular, cooperando em mecanismos de compensação de estresse, ditados por diferentes cascatas de sinalização ativadas quando a célula é desafiada com diferentes tipos de estresse da parede celular, como os causados pela terapia antifúngica [110, 111]. Já se sabe, por exemplo, que em *A. fumigatus* Hsp90 migra do citosol e se acumula na parede celular ou nas pontas das hifas recentemente formadas na presença do estresse de parede celular causado pela caspofungina [110]. Nesses locais, Hsp90 modula a atividade da via de sinalização MAP quinase que medeia a integridade da parede celular e/ou a adaptação ao choque térmico [110, 112]. Portanto, o papel fundamental da Hsp90 na CWIP é notável, tornando esta proteína um alvo atraente para a inibição do crescimento de fungos através do uso de terapia combinada baseada na inibição de Hsp90 e no uso de outras drogas antifúngicas. Esta estratégia foi proposta com base em descobertas sólidas que indicam que esta terapia combinada pode atenuar a virulência fúngica e diminuir o surgimento de resistência contra muitos dos antifúngicos atualmente disponíveis [92, 93, 112].

As mudanças fisiológicas e a adaptação ao hospedeiro em fungos patogênicos ocorrem em resposta aos sinais ambientais do hospedeiro e alguns deles podem ser conduzidos pelo circuito Hsf1-Hsp90 para suportar a persistência do fungo dentro do hospedeiro. Há um sistema regulatório durante o estresse térmico que é ajustado e concomitantemente governa a função de Hsp90 e a atividade do fator de transcrição Hsf1 para se adaptar ao aumento de temperatura e outros processos relacionados. Em *C. albicans* e *S. cerevisiae* após o choque térmico, a proteína Hsp90 na célula torna-se menos disponível para se ligar ao Hsf1, uma vez que este fator de transcrição é uma proteína cliente da Hsp90 [102, 113]. Como resultado, Hsf1 induz a

transcrição *de novo* de Hsp90 para auxiliar a célula a sobreviver a temperaturas mais elevadas, levando a uma maior produção de Hsp90. O circuito regulatório automático através do qual Hsf1 ativa a expressão de Hsp90 é um evento chave de adaptação ao choque térmico em fungos, e o excesso de Hsp90, por sua vez, interage e regula a função de Hsf1 [112, 113].

Embora as proteínas que participam da CWIP não sejam essenciais para a ativação do fator de transcrição Hsf1, mutações em qualquer um dos genes que codificam proteínas relacionadas à CWIP afetam expressivamente a integridade da parede celular e a tolerância ao estresse de temperatura ou a inibidores farmacológicos de Hsp90 [29, 112, 114]. Em *A. fumigatus*, a perturbação da função de Hsp90 por depleção genética afeta a integridade da parede celular e causa maior sensibilidade a uma gama de agentes danificadores da parede celular [115].

As proteínas Mkc1 (homólogo de Mpk1 em *S. cerevisiae* e MpkA em *A. fumigatus*) e também Pkc1 interagem geneticamente com Hsp90 em *C. albicans* durante o estresse de temperatura a 41 °C [116]. Análises bioquímicas confirmaram que a Hsp90 estabiliza a MAP quinase terminal Mkc1 na CWIP [114]. Além disso, Hsp90 também interage geneticamente com dois componentes da CWIP (Mkc1 e Mkk2) durante o estresse causado por tunicamicina [116], um agente que causa estresse de retículo endoplasmático (ER) e ativa *unfolded protein response* (UPR). Em *A. fumigatus*, PkcA está envolvido na tolerância a drogas que causam estresse ao ER e UPR [29], mantendo a funcionalidade do ER durante o estresse da parede celular, influenciando na homeostase desta [28]. Assim, a relação entre o estresse de ER e a homeostase da parede celular é um componente importante que dirige células fúngicas para a manutenção da parede celular [28, 59]. No entanto, a participação da Hsp90 neste processo não está elucidada em *A. fumigatus*.

1.4.1 Hsp90

Hsp90 é uma chaperona molecular eucariótica citosólica conservada e essencial em eucariotos [92, 113, 117]. Ela é uma das proteínas mais abundantes na célula com concentração estimada em, aproximadamente, 1 % do teor de proteína solúvel total no citoplasma das células humanas [118], e

está envolvida no *folding* de muitas proteínas clientes, incluindo quinases e fatores de transcrição envolvidos na sinalização e respostas a estresses celulares [119].

A Hsp90 é uma proteína de massa molecular entre 82-96 kDa constituídas por três domínios: N-terminal, Central e C-terminal (figura 6). O domínio N-terminal contém o sítio de ligação ao ATP que é essencial para a função chaperona. Este domínio é altamente conservado em todas as espécies. Após a ligação ao ATP, Hsp90 é dimerizada e exibe um estado fechado em que as regiões N-terminais estão intimamente associadas à hidrólise de ATP, direcionando o *folding* ou estabilização das proteínas clientes [120]. Este evento é seguido por um estado aberto alcançado após a liberação do ADP [121]. O sítio de ligação de ATP no domínio N-terminal é crucial para a atividade chaperona da Hsp90, pois à medida que os inibidores farmacológicos clássicos de Hsp90, como a geldanamicina e o radicicol, se ligam competitivamente a este sítio, eles inibem a atividade ATPásica da Hsp90 e, portanto, impedem o *folding* das proteínas clientes [122]. Após o domínio N-terminal, há uma região curta que funciona como um *linker*, seguido de um domínio intermediário. Este domínio complementa o sítio de ATPase necessário para a hidrólise de ATP e pode se ligar a co-chaperonas como Sba1 (homólogo da p23 de humano) ou Aha1 de *S. cerevisiae* [122]. O domínio C-terminal da Hsp90 também interage com co-chaperonas e proteínas clientes [123], este domínio inclui o sítio de dimerização e uma região MEEVD conservada capaz de interagir com as co-chaperonas p60 ou Sti1, em humanos e *S. cerevisiae*, respectivamente. A interação de Hsp90 com co-chaperonas já foi relatada em diversos organismos fúngicos [116, 124-127].

A ativação de Hsp90 e as interações com as proteínas clientes e co-chaperonas são mediadas em geral por modificações pós-traducionais, como fosforilação, acetilação, oxidação, S-nitrosilação e ubiquitinação [128]. Nos fungos, esses mecanismos reguladores da função de Hsp90 também refletem na fisiologia fúngica e possuem impactos sobre a relevância clínica e a eficácia de alguns medicamentos antifúngicos.

As lisinas desacetilases (KDACs) catalisam a remoção de grupos acetil do grupo ϵ -amino de lisinas e estão envolvidas principalmente na modificação

pós-traducional em histonas. No entanto, estas enzimas também desacetilam várias proteínas não histonas, como a chaperona Hsp90. Observou-se que a inibição das KDACs bloqueia o surgimento e a manutenção da resistência dependente de Hsp90 aos azóis tanto em *C. albicans* quanto em *S. cerevisiae*, sugerindo que a hiperacetilação compromete a função de Hsp90 em organismos fúngicos [129-131]. Portanto, a segmentação de KDACs pode fornecer uma estratégia alternativa poderosa para inibir a função de Hsp90, uma vez que a divergência de KDACs entre fungos e humanos é muito maior do que a de Hsp90 [131]. A hipersensibilidade ao inibidor de Hsp90 geldanamicina foi observada em mutantes de Hsp90 de *A. fumigatus* que abrigavam as mutações K27 e K270 tanto para um resíduo de acetilação-mimético (glutamina) como para um resíduo de desacetilação-mimético (arginina). Além disso, tanto a deleção da lisina K27 (Δ K27) quanto a mutação para um resíduo mimético de acetilação (K27A) resultou no aumento da susceptibilidade ao voriconazol e à caspofungina em *A. fumigatus* [132].

A fosforilação também foi estabelecida como um mecanismo de regulação da função da Hsp90 fúngica, o que foi relacionado à resistência a drogas. Hsp90 é fosforilada pela proteína quinase CK2 em humanos, Ckb1 em *S. cerevisiae* e *C. albicans* [131, 133]. Em *C. albicans*, a deleção de componentes do complexo Ckb1 prejudica a fosforilação de Hsp90 e consequentemente a estabilidade e a função das proteínas clientes de Hsp90 [131]. Em *A. fumigatus*, apenas três resíduos no polipeptídeo (S49, S288 e T681) foram detectados como fosforilados (figura 6) [132]. Estes sítios diferiram dos detectados em *S. cerevisiae* e, curiosamente, não são essenciais para a função de Hsp90 de *A. fumigatus* [132] (figura 6). Esses resultados sugerem que a regulação da atividade de Hsp90 por fosforilação em *A. fumigatus* se difere de *S. cerevisiae* [132].

O estresse de óxido nítrico (NO) é outro fator que atua sobre a modulação de Hsp90 e pode afetar várias vias de sinalização intracelular por S-nitrosilação de proteínas, a qual foi detectada no resíduo de cisteína C597 da Hsp90 humana, resultando na alteração de suas atividades chaperona e ATPásica [134, 135]. Nos fungos, a mutação do sítio correspondente de *A. fumigatus* (C573) (figura 6) para a alanina não é viável [132].

O conjunto de modificações pós-traducionais que a proteína Hsp90 sofre indica que esse perfil regulatório multinível reflete sua capacidade de se adaptar a diferentes condições de estresse.

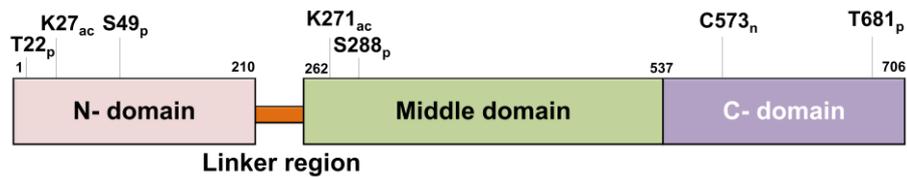


Figura 6: Organização de domínio da Hsp90 fúngica com base na organização da proteína Hsp90 de *A. fumigatus* e funções descritas obtidas a partir de estudos sistemáticos. Os resíduos fosforilados S49, S288 e T681 mostraram-se não essenciais para a função de Hsp90 de *A. fumigatus*. Os locais de acetilação identificados foram K27 e K271 e a mutação desses sítios resultou em maior susceptibilidade a geldanamicina, caspofungina e voriconazol. A mutação do sítio C573 de S-nitrosilação resultou em atividade de chaperona e ATPásica alteradas.

2.0 Objetivos

2.0 Objetivos

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo identificar e caracterizar funcionalmente o fator de transcrição *rlmA* de *A. fumigatus* de forma a estabelecer sua função na manutenção da integridade e reforço da parede celular, no desenvolvimento assexuado e na síntese de metabólitos secundários em *A. fumigatus*. Adicionalmente, caracterizar a interação entre Hsp90 e as principais proteínas que compõem a CWIP (PkcA, MpkA e RlmA), a fim de se compreender o papel destas proteínas na termotolerância em *A. fumigatus*.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterização funcional da linhagem $\Delta rlmA$, avaliando a função deste gene durante o estresse de parede celular e de temperatura, além de outros estresses que a célula fúngica pode ser submetida durante o processo de infecção;
- Análise das interações genéticas entre $pkcA^{PKC1}$, $rlmA^{RLM1}$ e $mpkA^{MPK1}$ de *A. fumigatus*, durante o estresse da parede celular e térmico;
- Análise da expressão gênica global por meio da técnica de *microarray* da linhagem mutante $\Delta rlmA$ em *A. fumigatus* para estabelecer a relação de RlmA com o estresse de parede celular em *A. fumigatus* e análise da identificação de alvos transcricionais de RlmA relacionados a composição e manutenção da parede celular de *A. fumigatus* utilizando a técnica de ChIP-qPCR;
- Análise do papel da CWIP no desenvolvimento assexuado em *A. fumigatus*, e análise da identificação de alvos transcricionais de RlmA

relacionados ao desenvolvimento assexuado utilizando a técnica de ChIP-qPCR;

- Análise da relação da CWIP com a termotolerância em *A. fumigatus*, por meio de técnicas de análise genética e bioquímica;
- Determinação da interação *in vivo* e *in vitro* de PkcA, MpkA e RlmA com a chaperona Hsp90 de *A. fumigatus*;
- Caracterização biofísica e bioquímica inicial da proteína Hsp90 de *A. fumigatus*;
- Caracterização biofísica e bioquímica inicial da proteína MpkA de *A. fumigatus*.

3.0 Materiais e métodos

3.0 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
$\Delta akuB^{Ku80}$	$\Delta akuB; pyrG-$	[136]
$\Delta rlmA$	$\Delta rlmA::pyrG; \Delta akuB$	Este trabalho
$\Delta rlmA::rlmA^+$	$\Delta rlmA::rlmA^+; \Delta akuB$	Este trabalho
$\Delta rlmA pyrG-$	$\Delta rlmA; \Delta akuB$	Este trabalho
$rlmA::gfp$	$rlmA::gfp; \Delta akuB$	Este trabalho
$rlmA::3xFLAG$	$rlmA::3xflag; \Delta akuB$	Este trabalho
$pkcA^{G579R}$	$pkcA^{G579R}::pyrG; \Delta akuB$	[42]
$pkcA^{G579R}::pkcA^+$	$pkcA^{G579R}::pkcA^+; \Delta akuB$	[42]
$\Delta mpkA$	$\Delta mpkA; \Delta akuB$	[40]
$\Delta rlmA; pkcA^{G579R}$	$\Delta rlmA; pkcA^{G579R}; \Delta akuB$	Este trabalho
$\Delta rlmA; \Delta mpkA$	$\Delta rlmA; \Delta mpkA; \Delta akuB$	Este trabalho
$pkcA^{G579R} \Delta mpkA$	$pkcA^{G579R}; \Delta mpkA; \Delta akuB$	Este trabalho
MAF 6.6	$PagsA::mluc; \Delta akuB$	Este trabalho
MAF 8.1	$\Delta rlmA; PagsA::mluc; \Delta akuB$	Este trabalho
$\Delta sebA$	$\Delta sebA::pyrG; \Delta akuB$	[137]
$\Delta sebA::sebA^+$	$\Delta sebA::sebA^+; \Delta akuB$	[137]
$sebA::gfp$	$sebA::gfp; \Delta akuB$	[137]
$\Delta saka$	$\Delta saka::pyrG; \Delta akuB$	[138]
$\Delta saka \Delta mpkC$	$\Delta saka; \Delta mpkC; \Delta akuB$	[138]
$\Delta mpkC$	$\Delta mpkC::pyrG; \Delta akuB$	[138]
$mpkA::3xHA mpkB::gfp$	$mpkA::3xHA mpkB::gfp; \Delta akuB$	Manfioli et al. (dados não publicados)
$pkcA::3xHA$	$pkcA::3xH; \Delta akuB$	Este trabalho

3.2 Linhagens utilizadas para a expressão de proteínas recombinantes

Tabela 2: Linhagens utilizadas para a expressão de proteínas recombinantes.

Proteína	Vetor	Linhagem utilizada	Referência
Hsp90	pET-15b	Rosetta™ (DE3)	Este trabalho
PkcA ⁴⁰⁹⁻¹¹¹⁶	pET-15b	Rosetta™ (DE3)	Este trabalho
PkcA ^{G579R409-1116}	pET-15b	Rosetta™ (DE3)	Este trabalho
MpkA	pET-15b	Rosetta™ (DE3)	Este trabalho
RlmA	pET-15b	Rosetta™ (DE3)	Este trabalho

3.3 Meios de cultura

3.3.1 Meios de cultura para *A. fumigatus*

3.3.1.1 Meio mínimo (MM, MM+UU)

Solução de sais	1 x
Dextrose	1,0 % (p/v)
Solução de elementos traços	0,1 % (p/v)
Ágar (se sólido)	2 % (p/v)
Água destilada	q.s.p.

As substâncias que compõe o meio foram dissolvidas em água destilada, o pH foi ajustado para 6,5. O meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf/cm² por 15 minutos. Para MM+glicerol, a glicose foi substituída por 2 % de glicerol (v/v). MM+UU indica MM suplementado com uridina 4 mM e uracila 10 mM.

3.3.1.2 Meio completo (YG, YUU, YG e YG+UU, YG+KCl)

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

As substâncias foram dissolvidas em água destilada e o meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf/cm² por 15 minutos. YUU indica o meio de cultura completo YG suplementado com uridina 4 mM e uracila 10 mM. O meio de regeneração dos protoplastos utilizado na transformação de *A. fumigatus* consiste de meio completo adicionado de KCl 0,6 mM (44 g/L). O meio top ágar consiste no meio contendo 1,0 % (p/v) de ágar.

3.3.1.3 Meio mínimo de Cove

Solução de sais para MM Cove	1 x
Dextrose	1,0 % (p/v)
Solução de elementos traços	0,1 % (p/v)
Ágar (se sólido)	2 % (p/v)
Água destilada	q.s.p.

As substâncias que compõe o meio foram dissolvidas em água destilada, o pH foi ajustado para 6,5. O meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf/cm² por 15 minutos.

3.3.1.4 Meio RPMI

Preparo do Meio (1 litro):

RPMI 1640 (contendo L-glutamina, Sigma Aldrich)	8,4 g
MOPS (Sigma Aldrich)	34,5 g
Ágar	15,0 g
Dextrose	20,0 g
Água destilada	900 mL

O RPMI e MOPS foram dissolvidos em 500 mL de água destilada estéril e em seguida filtrados com uma membrana 0,2 µm esterilizante. A glicose e o ágar foram dissolvidos em 500 mL de água destilada estéril, e em seguida esterilizados em autoclave por 15 minutos e resfriados a 45-50 °C. A solução de RPMI + MOPS esterilizada por filtração foi misturada à solução de ágar e glicose e resfriada. Ajustou-se o pH para 7,0 com a solução de hidróxido de sódio 1 M, e em seguida o meio foi distribuído em placas de Petri estéreis.

3.3.2 Meios de cultura para *E. coli*

3.3.2.1 Meio LB (Luria bertani)

Triptona	1 % (p/v)
Extrato de Levedura	0,5 % (p/v)
Cloreto de Sódio	0,17 M
Ágar (se sólido)	2 % (p/v)
Água destilada	q.s.p.

As substâncias que compõem o meio foram dissolvidas em água destilada e o volume final foi ajustado. O meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf/cm² por 15 minutos.

3.3.3 Meios de cultura para *S. cerevisiae*

3.3.3.1 Meio YPD

Peptona	2 % (p/v)
Extrato de levedura	1 % (p/v)
Dextrose	4 % (p/v)
Ágar (se sólido)	2 % (p/v)
Água destilada	q.s.p.

As substâncias que compõem o meio foram dissolvidas em água destilada e o pH foi ajustado para 6,5. O meio de cultura foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf/cm² por 15 minutos.

3.3.3.2 Meio Sc URA-

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

O meio SC é definido como um meio mínimo para cultura de leveduras. As substâncias que compõe o meio foram dissolvidas em água destilada e o meio de cultura foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf/cm² por 15 minutos.

3.4 Oligonucleotídeos utilizados para construção e checagem das linhagens obtidas neste trabalho

Tabela 3: Tabela contendo os oligonucleotídeos utilizados para construção e checagem de construções das linhagens utilizadas neste trabalho.

Nome do oligonucleotídeo	Sequência (5' → 3')	Gene
Afu3g08520 5F	gtaacgccagggtttcccagtcacgacgCTTGCTTGCTTGCTT'GCTT'	Afu3g08520
Afu3g08520 5R	<u>GCATCAGTGCCTCCTCTCAGACAGAATTCCGCAGTAAACAAGGAACACCAG'</u>	
pyrG FW	GGAATTCTGTCTGAGAGGAGGC	Afu2g08360
pyrG REV	GATATCGAATTTCGCCTCAAAC	
Afu3g08520 3F	<u>AAGAGCATTGTTTGAGGCCAATTCGATATCACTTTTCTTGAATATTGCGATGG</u>	Afu3g08520
Afu3g08520 3R	gcggataacaatttcacacaggaacagcTCAGCGTCCGGTAAGTTG	
rlmA 1000 FW	CGTGTGGTTGCCAGCCTTGACCAGG	Afu3g08520
rlmA 1000 REV	TCGTCTACCAGAACGACCTCGCGCG	
rlmA ST SC 5F	gtaacgccagggtttcccagtcacgacgATGGGTCTGAAGAAAGATCGA	Afu3g08520
rlmA ORF REV	<u>AGTTCCTCTCCTTTACTCATTCCCGTGTTCCCGTCTTGGATTTCTTCGCC</u>	
rlmA 600 ups	GAATGAGAAGAAAGGAGGAATGA	
Spacer GFP FW	GGAACACGGGGAATGAGTAAAGGAGAAGAAGAACTTTTCA	
GFP REV pyrG	<u>GCATCAGTGCCTCCTCTCAGACAGAATTCCTTATTTGTATAGTTCATCCATGCCATG</u>	
MpkA_5'_FW	CTCATTCTTGTCTGATGCG	Afu4g13720
MpkA_3'_REV	GACTGTGCGAGAAATCCGCTT	
mpkA 600 ups	GAGCCCTGACTTCACTGCA	
GA5 3xFLAG pyrG FW	GGAGCTGGTGCAGGCGCTGGAGCCGGTGCCGATTACAAGGATGACGA CGATAAGGATTACAAGGATGACGACGATAAGGATTACAAGGATGACGA CGATAAGTAAGGAATTCTGTCTGAGAGGAGGC	
pkcA 5F ORF	gtaacgccagggtttcccagtcacgacgGAACGCCATCCATTCCTTC	Afu5g11970
pkcA 5R 3xHA	<u>ACCACCGCTACCACCTCCGGCGAAGTCCGCGG</u>	
linker3xHA-pyrG FW	GGAGGTGGTAGCGGTGGT	
pOB430		
linker3xHA-pyrG REV	CTGTCTGAGAGGAGGCACTGA	
pOB430		
pkcA 3F 3xHA pyrG	<u>TCAGTGCCTCCTCTCAGACAGGTTACTCGGTGTTGATTGAGAATT</u>	
pkcA 3R	gcggataacaatttcacacaggaacagcGGGAAGAGTACTCGACGG	
cpkcA FW	TACAACATACCTGGCTGGATG	

Letras pequenas indicam homologia com a sequência flanqueadora pRS426.

Letras sublinhadas indicam homologia com um fragmento do cassete.

3.5 Oligonucleotídeos utilizados para clonagem dos cDNAs para a obtenção das proteínas recombinantes

Tabela 4: Tabela contendo os oligonucleotídeos utilizados para construção de linhagens para a expressão de proteínas recombinantes utilizadas neste trabalho.

Oligonucleotídeos	Sequência (5' → 3')	Gene
<i>rlmA</i> pET-15b FW	cagccatatgctcgagATGGGTCTGAAGAAAGATC	Afu3g08520
<i>rlmA</i> pET-15b REV	gctttgttagcagccgTCACGTCTTGGATTCTTC	
<i>rlmA</i> pET-28a FW	ttcagggcgagccgATGGGTCTGAAGAAAGATC	Afu3g08520
<i>rlmA</i> pET-28a REV	tgctcgacggagctcgTCACGTCTTGGATTCTTC	
<i>hsp90</i> pET-15b FW	cagccatatgctcgagATGTCTTCCGAAACCTTTG	Afu5g04170
<i>hsp90</i> pET-15b REV	gctttgttagcagccgCTAGTCAACCTCCTCCATG	
<i>pkcA</i> pET-15b FW	cagccatatgctcgagATGCTGATCGACAGTTGGTTC	Afu5g11970
<i>pkcA</i> pET-15b REV	gctttgttagcagccgCTAGGCGAAGTCCGCGGT	
<i>pkcA</i> pET-28a FW	ctgtatttcagggcgATGCTGATCGACAGTTGGTTC	Afu5g11970
<i>pkcA</i> pET-28a REV	tcgacggagctcgcgCTAGGCGAAGTCCGCGGT	
<i>mpkA</i> pET-15b FW	cagccatatgctcgagATGTCTGATCTACAGGGTTCG	Afu4g13720
<i>mpkA</i> pET-15b REV	gctttgttagcagccgCTATTGGACATCCATCCC	

Letras minúsculas indicam homologia com a sequência flanqueadora pET15b

3.6 Oligonucleotídeos utilizados para RT-qPCR em tempo real

Tabela 5: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-qPCR em tempo real.

Oligonucleotídeos	Sequência (5' → 3')	Gene	Concentração utilizada (pmol/μl)	Eficiência (%) / Threshold
<i>(pkcA)</i> FW	CCGAAGTTCTGTTGGCTCTC	Afu5g11970	300	98.32/0.1
<i>(pkcA)</i> REV	CAGAGACCGTAATCGGCAAT		150	
<i>(tubA)</i> FW	TTCCCAACAACATCCAGACC	Afu1g10910	300	100.01/0.1
<i>(tubA)</i> REV	CGACGGAACATAGCAGTGAA		150	
<i>(agsA)</i> FW	CCAACACCTGGAAGATGACC	Afu3g00910	300	103.44/0.1
<i>(agsA)</i> REV	AACACCGACCGATAGAAGGA		300	
<i>(agsB)</i> FW	TCAGGGATTGGGCTGTATGT	Afu2g11270	100	105.23/0.1
<i>(agsB)</i> REV	TAGCAC TTGAGAAGCCAGCA		150	
<i>(agsC)</i> FW	TGCAGACCCTGACAAGAGTG	Afu1g15440	300	97.34/0.1
<i>(agsC)</i> REV	GAACAAGGCAATCCAGAACC		150	
<i>(chsA)</i> FW	CTGGAGTGTGGCTGGTCTCT	Afu2g01870	100	98.67/0.1
<i>(chsA)</i> REV	GCGTGTGAAAAGCAGTATGGA		100	
<i>(chsB)</i> FW	GCTCTCCACTGTCGGTCTCT	Afu4g04180	100	98.32/0.1
<i>(chsB)</i> REV	GGTCGTTGTTGATGGTGTG		150	
<i>(chsC)</i> FW	TTGCTGCGAGTTTGATTCC	Afu5g00760	100	99.45/0.1
<i>(chsC)</i> REV	GCCAGTAGGATGCCAAAGAG		150	
<i>(chsD)</i> FW	CAGAACACGATCCGAACAAC	Afu1g12600	300	103.21/0.1
<i>(chsD)</i> REV	GCTTCGCACCCAAGTAGAAC		150	
<i>(chsE)</i> FW	TGGTGTTCGTTGACTTGCTC	Afu2g13440	300	96.54/0.1
<i>(chsE)</i> REV	TCATCCATCCAACCATTTCC		150	
<i>(chsF)</i> FW	AACCTGCTTCTTCTGGGTGA	Afu8g05630	300	97.24/0.1
<i>(chsF)</i> REV	GAGCACGAGTTCCATGAGGT		150	
<i>(chsG)</i> FW	AGGATGAGGGCAAAGAGGTT	Afu3g14420	150	98.35/0.1
<i>(chsG)</i> REV	AAGGCGTTGCTAAAGATCCA		100	
<i>(csmB)</i> FW	ACAATACGCGGCGAATCC	Afu2g13430	150	96.32/0.1
<i>(csmB)</i> REV	GTTATCCCGACTGCCAAAA		300	
<i>(fksA)</i> FW	AAGCAATCGAAGCTCAGGAA	Afu6g12400	100	100.79/0.1
<i>(fksA)</i> REV	ACCAATCCCATAGAGCGAAC		100	
<i>(gelA)</i> FW	CACTGGCTACGGTCTTCCTC	Afu2g01170	150	100.65/0.1
<i>(gelA)</i> REV	CATTGTTGCCGCTAATCTCC		300	
<i>(gelB)</i> FW	CAGGAGGAGAACGACTACGG	Afu6g11390	150	97.83/0.1
<i>(gelB)</i> REV	AGGTCTGGGTTGTGTTGGAG		300	
<i>(gelC)</i> FW	GAATGGTGGGTGACAAGAC	Afu2g12850	300	104.58/0.1
<i>(gelC)</i> REV	TGTTGCAGCCGTATTCAGAG		300	

<i>(rlmA)</i> FW	GACGCCGATCTCTGCTCTAC	Afu3g08520	150	94.32/0.1
<i>(rlmA)</i> REV	GGAGTGGGGAAGGTTAGAGG		300	
<i>(mpkA)</i> FW	GGCCATCAAGAAGGTTACCA	Afu4g13720	300	95.67/0.1
<i>(mpkA)</i> REV	TGAAATTGTCTGGTCGTGGA'		300	
<i>(hsf1)</i> FW	CGTGGTCATCCGGATCTACTG	Afu5g01900	150	99.88/0.1
<i>(hsf1)</i> REV	TGCCCCGCGGTGTTTC		150	
<i>(hsp30)</i> FW	CGCATCGCCGGCTAA	Afu6g06470	300	97.56/0.1
<i>(hsp30)</i> REV	TGTCTGGGTCGGTGAATTTGT		300	
<i>(hsp70)</i> FW	GCGAGGGCAAGCTCAACAT	Afu1g07440	150	96.98/0.1
<i>(hsp70)</i> REV	CGACCTTGCTGGAGACCTTCT		100	
<i>(hsp90)</i> FW	CGCCAACATGGAGCGTATC	Afu5g04170	150	104.69/0.1
<i>(hsp90)</i> REV	TGTAAGAGCTCATGGAGGTGTC		100	
<i>(ssc1)</i> FW	TCATCACCGCCGATGCTA	Afu2g09960	100	102.54/0.1
<i>(ssc1)</i> REV	GAGCGAGTCATCTTGAGGTTGA		300	
<i>(ssp1)</i> FW	GGACGCAGGTGCCATTG	Afu8g03930	300	103.29/0.1
<i>(ssp1)</i> REV	GGCAGTGGGCTCATTGATG		300	
<i>(yap1)</i> FW	GGAAGCCCATCCACAATT	Afu6g09930	150	95.79/0.1
<i>(yap1)</i> REV	TCTTTGGCGCTGCTGGTT		150	
<i>(sod1)</i> FW	CAAGATCACCGGCACTGTCA	Afu5g09240	300	98.74/0.1
<i>(sod1)</i> REV	AGACGGTGGTGGGAGAGTTCT		100	
<i>(sod2)</i> FW	GCTTCGGCTGCTCCAAGA	Afu4g11580	300	105.02/0.1
<i>(sod2)</i> REV	CCTTGCCGCGAGCAA		100	
<i>(cat1)</i> FW	TCGGCCCCTGCAGATTC	Afu3g02270	150	96.54/0.1
<i>(cat1)</i> REV	AGCGCCCCAACAGTCTTG		300	
<i>(cat2)</i> FW	ACATTGCCGCGCTCAAG	Afu8g01670	300	98.39/0.1
<i>(cat2)</i> REV	GCGGTGGAGATGAAGCTTCT		300	
<i>(abaA)</i> FW	GCACGACCTGTTGCATCAA	Afu1g04830	150	95.48/0.1
<i>(abaA)</i> REV	GCGGTGGCGGGTACAA		300	
<i>(briA)</i> FW	TGCAAAGAACCCTGGCTGCAA	Afu1g16590	300	108.29/0.1
<i>(briA)</i> REV	AACCCAGCAGACATGAGGCTT		300	
<i>(wetA)</i> FW	CGAGATTCCCATGAGCGTAAA	Afu4g13230	300	106.52/0.1
<i>(wetA)</i> REV	GGAAGGGCGCATCAAGCT		100	
<i>(fmqA)</i> FW	GCCAGACGTTAACAACGAACA	Afu6g12080	300	96.34/0.1
<i>(fmqA)</i> REV	GACAAACTGGGACCTCCAGAA		150	
<i>(fmqB)</i> FW	AGGGAGGCAGTCAGGCAAT	Afu6g12060	300	97.82/0.1
<i>(fmqB)</i> REV	GCCAATTCGAGCGCTGTAG		300	
<i>(fmqC)</i> FW	CCCGATCTCATCCAGACCAATGGA	Afu6g12050	100	98.29/0.1
<i>(fmqC)</i> REV	GCCAAAACCATCTTTACA		150	
<i>(fmqD)</i> FW	TTTTCGAAGCGACGAGCAA	Afu6g12070	300	100.22/0.1
<i>(fmqD)</i> REV	CGAAGATGGCGGCGATAT		100	
<i>(fmqE)</i> FW	GGCACACGGAAAGCATGATA	Afu6g12040	300	100.54/0.1
<i>(fmqE)</i> REV	TCGGAACCTGCCGTGTAAGC		300	
<i>(prx1)</i> FW	CTCTACTGCCCTGACTTCG	Afu4g08580	150	96.52/0.1
<i>(prx1)</i> REV	GGGTGGGAGAAGAGGATAGC		300	

3.7 Oligonucleotídeos utilizados para ChIP-qPCR

Tabela 6: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de ChIP-qPCR durante o estresse de parede celular na presença do CR na linhagem *rlmA::3xFLAG*.

Oligonucleotídeos	Sequência (5' → 3')	Gene
<i>chsA</i> FW	TTGCGGCGCAGGGTTAT	Afu2g01870
<i>chsA</i> REV	GCCACACCCCAACATGT	
<i>gel4</i> FW	ATGATTGACAGTCGAGTACTCCGTAT	Afu2g05340
<i>gel4</i> REV	CCGTAAGCAGCCCCTGTAATAA	
<i>pdiA</i> FW	TGTGTGTTACTGCTCCGTACGTT	Afu2g06150
<i>pdiA</i> REV	CCTATAGTCAATGTTTCAGAGCATAAACAG	
<i>pyrG</i> FW	CGCAATTTTACACGCGGA	Afu2g08360
<i>pyrG</i> REV	CCGCCGGGGACTAAATTT	
<i>chsE</i> FW	TTGTCATCTCTACTGCCTCAGATT	Afu2g13440
<i>chsE</i> REV	GGCACAATACTCTCAATTATGGAATG	
<i>chsC</i> FW	AGGCTGGCCTGTTCTCACTAAT	Afu5g00760
<i>chsC</i> REV	CTCTGTCACCGTCCAATCTTGA	
<i>rho4</i> FW	CAACGACAATATGGACCAGATCA	Afu5g14060
<i>rho4</i> REV	CACGCTCTCGATTCTCGTCTTA	
<i>gel4</i> FW	TGAGGAGGGCTGCCATTAAT	Afu2g05340
<i>gel4</i> REV	TCCATCAACACACCCATCGT	
<i>gel4</i> – 2 FW	ACAAAGCTTGAAGTACTAGATGGCGTAT	Afu2g05340
<i>gel4</i> – 2 REV	CTCTCTGCAAGCTAAAGTCTCCTTA	
<i>wsc1</i> FW	CGGAGTATTGACATCTACAGAGTATTATTG	Afu4g13670
<i>wsc1</i> REV	GTATTTAGTACTTTGTAGACCAGGATCTTTGT	
<i>gfa1</i> FW	CATTTTAGCTAACTAACACTATCCATCTGTG	Afu6g06340
<i>gfa1</i> REV	GCTAGTGCTGATGCTGACCATC	
<i>gel5-1</i> FW	AATCGGCTGCAAATCCAC	Afu8g02130
<i>gel5-1</i> REV	CGCACCACGACACACTCTCT	
<i>gel5-2</i> FW	GCCGACTTGACAAAGGTGA	Afu8g02130
<i>gel5-2</i> REV	TTCCATCAACACACCCATC	

Tabela 7: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de ChIP-qPCR durante o desenvolvimento assexuado em *A. fumigatus* na linhagem *rlmA::gfp*.

Oligonucleotídeos	Sequência (5' → 3')	Gene
<i>flbB</i> FW	CTCTTATTCTTTGTGGCCCTCTCT	Afu2g14680
<i>flbB</i> REV	GAGCTCAAGGAACGAGATTATTTTTAA	
<i>flbC</i> FW	CAAGATGAAAGAAGAAAAAGCAGTT	Afu2g13770
<i>flbC</i> REV	CCTTTCGATTACTGTGTGCAAGTT	
<i>abaA</i> FW	GCTGGAAGTCTGTATACATGAATGTG	Afu1g04830
<i>abaA</i> REV	GACACCAAGTCGCTCGGCCACCGAAG	
<i>brlA</i> FW	AAATGCTCCGAAGACAAGAAAC	Afu1g16590
<i>brlA</i> REV	CTCTTTCTTTTTGATTTAATTCCTT	
<i>fmqA</i> FW	GGAGCCATCCGCATGGT	Afu6g12080
<i>fmqA</i> REV	TTTATACTCTACCCAGCTAAA	
<i>fmqB</i> FW	TTACCCCTTGCTGTTTAAATAGGAC	Afu6g12060
<i>fmqB</i> REV	AGAGAGCTCTGGCACGTCTT	
<i>fmqC</i> FW	GTGAGGAGGTAAGAGGTGCG	Afu6g12050
<i>fmqC</i> REV	ATCGAGAATGTTTCAATGTGCC	
<i>fmqD</i> FW	GTAAGAGAGCTCTGGCACGTC	Afu6g12070
<i>fmqD</i> REV	CCCTTGCTGTTTAAATAGGAC	

Tabela 8: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de ChIP-qPCR durante o desenvolvimento assexuado em *A. fumigatus* na linhagem *sebA::gfp*.

Oligonucleotídeos	Sequência (5' → 3')	Gene
<i>fmqA1</i> FW	CATGTGCGGGCCCAAT	Afu6g12080
<i>fmqA1</i> REV	TTGCACCCCTTCAGCTATAA	
<i>fmqA2</i> FW	GAAAGGTCTCATTATCGGCATT	Afu6g12080
<i>fmqA2</i> REV	GACTGCGGAATTGGCGAAGATTGA	
<i>fmqB1</i> FW	CCTGGAATCGATCCATAAATGG	Afu6g12060
<i>fmqB1</i> REV	ACTGCAGAACTTTCTCGTGG	
<i>fmqB2</i> FW	TACCAAGCGAGCGGACACA	Afu6g12060
<i>fmqB2</i> REV	AACACCATCGGCCCTACGCTTG	
<i>fmqB3</i> FW	AGGACGGGTCTGTTGAATGTC	Afu6g12060
<i>fmqB3</i> REV	TCGGTCCGGTCTTGACACCAGA	
<i>fmqB4</i> FW	CGCTTCGAAAAGGGACTTTG	Afu6g12060
<i>fmqB4</i> REV	TGAGATCAGCCATGCAGTACAT	
<i>fmqC1</i> FW	TGTCACTCGCCATCCTTTCTATC	Afu6g12050
<i>fmqC1</i> REV	CGTCTTGCCGACTAATAACATG	
<i>fmqC2</i> FW	AAACTCCGTGGTGCTCTCCTGCA	Afu6g12050
<i>fmqC2</i> REV	ATGAAGGCGCGCACGATTCC	
<i>fmqD1</i> FW	GGATTCTCAAGGGCGATTTG	Afu6g12070
<i>fmqD1</i> REV	GTGAGTAACCGCGGTTAGTAC	
<i>fmqD2</i> FW	AACATGTCTCTAGATCCTATC	Afu6g12070
<i>fmqD2</i> REV	GGGTCTGCTCACGAATCGCAC	
<i>fmqE1</i> FW	TGTATTATTAGGATTCTATTTT	Afu6g12040
<i>fmqE1</i> REV	GCCAAGTGACATAGCAAATGTC	
<i>fmqE2</i> FW	TGCGGCACAACCTTCACCTT	Afu6g12040
<i>fmqE2</i> REV	CCCGTAAGAGCATTGCAGCC	
<i>rlmA</i> FW	GATGATGAGGATCTGCCTTAGCTAT	Afu3g08520
<i>rlmA</i> REV	TGGGCGTAAGTAATGGAATTCA	

3.8 Soluções e tampões

3.8.1 Soluções 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
Molibdato de amônio tetra hidratado	1 mM
EDTA	140 mM
Água destilada	q.s.p.

Os componentes foram adicionados na ordem listada em água destilada. Cada componente foi dissolvido completamente antes da adição do próximo. A solução foi aquecida até 100 °C e então resfriada para 60 °C. Ajustou-se o pH entre 6,5 e 6,8 com solução de hidróxido de sódio (1 M). Deixou-se resfriar até atingir a temperatura ambiente para acertar o volume final.

3.8.2 Solução de sais 20 × concentrada para Meio Mínimo

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 em água destilada e utilizados na composição do Meio Mínimo diluído para 1 ×.

3.8.3 Solução de sais 50 × concentrada para Meio Mínimo de Cove

Cloreto de potássio	0,5 M
Dihidrogenofosfato de potássio	0,56 M
Sulfato de magnésio heptahidratado	0,11 M
Água destilada	q.s.p.

Os componentes foram dissolvidos em água destilada e utilizados na composição do Meio Mínimo de Cove diluído para 1 ×.

3.8.4 Soluções para preparo de *E. coli* quimiocompetente

Cloreto de magnésio tetrahidratado	55 mM
Cloreto de cálcio dihidratado	15 mM
Cloreto de potássio	250 mM
PIPES (0,5 M pH 6,7)	10 mM
Água Milli-Q®	q.s.p.

Os componentes foram dissolvidos em água Milli-Q®. A solução foi esterilizada utilizando filtro 0,45 µm, e posteriormente dividida em alíquotas e armazenada a -20 °C.

3.8.5 Soluções para extração de DNA plasmidial de *E. coli*

3.8.5.1 Solução 1

Dextrose	50 mM
Tris HCl pH 8,0	25 mM
EDTA pH 8,0	10 mM
Água Milli-Q®	q.s.p.

Os componentes foram dissolvidos em água Milli-Q® e acrescentou-se o volume necessário de solução tris HCl, pH 8 (1 M), e EDTA pH 8 (0,5 M) previamente preparadas. O volume foi ajustado e esterilizado por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf/cm² por 15 minutos.

3.8.5.2 Solução 2

Hidróxido de sódio	0,2 M
SDS	1 % (v/v)
Água Milli-Q®	q.s.p.

Acrescentou-se o volume necessário de solução de hidróxido de sódio (2 M) à água Milli-Q® e, posteriormente adicionou-se o SDS (10 % p/v), o volume final foi ajustado e a solução foi utilizada em seguida.

3.8.5.3 Solução 3

Acetato de potássio	5 M
Ácido acético glacial	11,50 % (v/v)
Água Milli-Q®	q.s.p.

Dissolveu-se o acetato de potássio em água Milli-Q®, acrescentou-se o volume de ácido acético glacial, o volume final foi ajustado e a solução foi armazenada a 4 °C.

3.8.6 Soluções para transformação em *S. cerevisiae*

3.8.6.1 Solução de TE (Tris EDTA) 10 x concentrado

Tris base	100 mM
EDTA pH 7,5	10 mM
Água Milli-Q®	q.s.p.

O tris base foi dissolvido em água Milli-Q® e acrescentou-se o volume necessário de solução de EDTA pH 7,5 (0,5 M) previamente preparada. O volume final foi ajustado e a solução foi esterilizada por calor úmido em autoclave a 120 °C, 1 kgf/cm² por 15 minutos.

3.8.6.2 Solução de acetato de lítio (LiAC) 10 x concentrada

Acetato de lítio pH 7,5	1 M
Água Milli-Q®	q.s.p.

Dissolveu-se o acetato de lítio em água Milli-Q®, ajustou-se o pH com ácido acético 1 M, o volume final foi ajustado e a solução foi esterilizada por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf/cm² por 15 minutos.

3.8.6.3 Solução de PEG (polietilenoglicol) 50 %

PEG (polietilenoglicol) 3350	50 % (p/v)
Água Milli-Q®	q.s.p.

Dissolveu-se o PEG 3350 em água Milli-Q®. Para a completa dissolução, a solução foi aquecida a 100 °C. O volume final foi ajustado e a solução esterilizada por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf/cm² por 15 minutos.

3.8.7 Soluções para transformação em *A. fumigatus*

3.8.7.1 Solução 1 de protoplastização

Sulfato de amônio	0,8 M
Ácido cítrico pH 6	100 mM
Água Milli-Q®	q.s.p.

O sulfato de amônio foi dissolvido em água Milli-Q® e em seguida adicionou-se o volume adequado da solução de ácido cítrico 1 M, pH 6 previamente preparada. O pH final foi ajustado para 6, e posteriormente o volume foi ajustado. A solução foi esterilizada por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf/cm² por 15 minutos.

3.8.7.2 Solução 2 de protoplastização

Extrato de levedura	1 % (p/v)
Sacarose	2 % (p/v)
Água Milli-Q®	q.s.p.

Os componentes foram dissolvidos em água Milli-Q® e o volume foi ajustado. A solução foi esterilizada por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf/cm² por 15 minutos.

3.8.7.3 Solução 3 de protoplastização

Sulfato de amônio	0,4 M
Sacarose	1 % (p/v)
Ácido cítrico pH 6	50 mM
Água Milli-Q®	q.s.p.

O sulfato de amônio e a sacarose foram dissolvidos em água Milli-Q®. Adicionou-se o volume necessário de uma solução de ácido cítrico 1 M, pH 6

previamente preparada, e o pH final da solução foi ajustado para 6. O volume foi ajustado, e a solução foi esterilizada por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf/cm² por 15 minutos.

3.8.7.4 Solução 4 de protoplastização

Poli(etileno)glicol 6000	25 % (p/v)
Cloreto de cálcio	100 mM
Cloreto de potássio	0,6 M
Tris HCl pH 7,5	10 mM
Água Milli-Q®	q.s.p.

Os componentes foram dissolvidos em água Milli-Q® e acrescentou-se o volume necessário de solução tris HCl, pH 7,5 (1 M) previamente preparada. O pH foi ajustado para 7,5, o volume final foi ajustado e a solução esterilizada por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf/cm² por 15 minutos.

3.8.7.5 Solução 5 de protoplastização

Cloreto de cálcio	50 mM
Cloreto de potássio	0,6 M
MES pH 6,0	10 mM
Água Milli-Q®	q.s.p.

Os componentes foram dissolvidos em água Milli-Q®. O pH foi ajustado para 6, e o volume final foi ajustado. A solução foi esterilizada por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf/cm² por 15 minutos.

3.8.8 Tampão de extração de proteína total de *A. fumigatus* para *Western blot*

SDS	0,1 % (p/v)
Triton-X100	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
Na ₃ VO ₄	5 mM
β-glycerophosphate	50 mM
Água Milli-Q®	q.s.p.
<i>cOmplete™ ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free</i>	1 ×
PMSF	1 mM

Os componentes foram dissolvidos em água Milli-Q® e o volume foi ajustado. A solução foi esterilizada por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf/cm² por 15 minutos, e no momento do uso adicionou-se o *cOmplete™ ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free* e o PMSF.

3.8.9 Tampão para lise de *E. coli* para cromatografia de proteínas por afinidade em coluna de níquel

3.8.9.1 Tampão para lise de *E. coli* e purificação da proteína recombinante Hsp90

3.8.9.1.1 Tampão A para lise de *E. coli* e purificação da proteína recombinante Hsp90 em coluna de níquel

Fosfato de sódio pH 7,4	50 mM
NaCl	300 mM
Água Milli-Q®	q.s.p.

Os componentes foram dissolvidos em água Milli-Q®. Após a solução foi filtrada em membrana de 5 µm e deaerada por 20 minutos utilizando bomba a vácuo.

3.8.9.1.2 Tampão B para purificação da proteína recombinante Hsp90 em coluna de níquel

Fosfato de sódio pH 7,4	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	500 mM
Água Milli-Q®	q.s.p.

Os componentes foram dissolvidos em água Milli-Q®. Após, o volume final foi ajustado. A solução foi filtrada em membrana de 5 µm e deaerada por 20 minutos utilizando bomba a vácuo.

3.8.9.1.3 Tampão para purificação da proteína recombinante Hsp90 através da cromatografia de exclusão molecular

Hepes pH 7,5	40 mM
KCl	100 mM
Água Milli-Q®	q.s.p.

Os componentes foram dissolvidos em água Milli-Q®. Após o volume final foi ajustado. A solução foi filtrada em membrana de 5 µm e deaerada por 20 minutos utilizando bomba a vácuo.

3.8.9.2 Tampão para lise de *E. coli* e purificação da proteína recombinante MpkA

3.8.9.2.1 Tampão A para lise de *E. coli* e purificação da proteína recombinante MpkA em coluna de níquel, e purificação da proteína recombinante MpkA através da cromatografia de exclusão molecular

Tris base	10 mM
Fosfato de sódio monobásico	5 mM
Cloreto de sódio	100 mM
EDTA	1 mM
Água Milli-Q®	q.s.p.

Os componentes foram dissolvidos em água Milli-Q®. Após, o pH foi ajustado para 8 e o volume final foi ajustado. A solução foi filtrada em membrana de 5 µm e deaerada por 20 minutos utilizando bomba a vácuo.

3.8.9.2.2 Tampão B para purificação da proteína recombinante MpKA em coluna de níquel

Tris base	10 mM
Fosfato de sódio monobásico	5 mM
Cloreto de sódio	100 mM
EDTA	1 mM
Imidazol	500 mM
Água Milli-Q®	q.s.p.

Os componentes foram dissolvidos em água Milli-Q®. Após o pH foi ajustado para 8 e o volume final foi ajustado. A solução foi filtrada em membrana de 5 µm e deaerada por 20 minutos utilizando bomba a vácuo.

3.8.10 Inibidores de protease

3.8.10.1 PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride)

PMSF	200 mM
Isopropanol	q.s.p.

O PMSF foi dissolvido no volume adequado de isopropanol para a obtenção da concentração final de 200 mM. A suspensão foi armazenada a -20 °C, e o volume necessário foi adicionado ao tampão de extração de proteína no momento do uso para a concentração final de 1 mM.

3.8.10.2 *cOmplete™ ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free, EASYpack Protease Inhibitor Cocktail* (11836153001)

1 tablete do coquetel de inibidores de protease foi dissolvido em 1,5 mL de água Milli-Q® para a concentração final de 7 × concentrado. A solução foi armazenada a -20 °C, e o volume necessário foi adicionado ao tampão de extração de proteína no momento do uso para a concentração final de 1 ×.

3.8.10.3 *Protease Inhibitor Cocktail* (Sigma Aldrich, P8215)

A solução 100 x concentrada foi armazenada a -20 °C, e o volume necessário foi adicionado ao ChIP *lysis buffer* no momento do uso para a concentração final de 1 x.

3.8.11 Soluções para *Western blot*

3.8.11.1 Tampão para eletroforese de proteína 5 x concentrada

Tris base	125 mM
Glicina	95 mM
SDS	0,1 % (p/v)
Água Milli-Q®	q.s.p.

O tris base e a glicina foram dissolvidos em água Milli-Q®. Acrescentou-se o volume necessário da solução de SDS 1 % previamente preparada e o volume final foi ajustado. A solução foi armazenada em geladeira. No momento do uso a solução foi diluída para a concentração de 1 x para ser utilizada na eletroforese.

3.8.11.2 Tampão de transferência para gel SDS-PAGE

Tris base	25 mM
Glicina	192 mM
Metanol	20 % (v/v)
SDS	0,1 % (p/v)
Água Milli-Q®	q.s.p.

O tris base e a glicina foram dissolvidos em água Milli-Q®, acrescentou-se o volume necessário da solução de SDS 10 % previamente preparada, acrescentou-se o metanol e o volume final foi ajustado. A solução foi preparada no momento do uso.

3.8.11.3 Tampão Salina Tris (TBS)

Cloreto de sódio	1,5 M
Tris base	2 M
Água Milli-Q®	q.s.p.

O cloreto de sódio e o tris base foram dissolvidos em água Milli-Q®. Após, o pH foi ajustado para 7,6 e o volume final foi ajustado. A solução foi armazenada em geladeira.

3.8.11.4 Tampão Salina Tris + Tween 20 (TBST)

TBS	10 ×
Twenn 20	0,1 %
Água Milli-Q®	q.s.p.

Adicionou-se o volume necessário de TBS 10 × e Tween 20. Ajustou-se o volume final com água Milli-Q®. A solução foi preparada no momento do uso.

3.8.11.5 Tampão de amostra para eletroforese de proteínas 5 × concentrado

Tris HCl	0,625 M
SDS	10 % (p/v)
Glicerol	10 % (v/v)
Azul de bromofenol	0,1 % (p/v)
DTT	1 mM
Água Milli-Q®	q.s.p.

Os componentes foram dissolvidos em água Milli-Q® e para uso o tampão foi diluído de forma que ficasse 1 × concentrado na amostra. No momento do uso foi adicionado 2 mM de DDT a partir de uma solução estoque 1 M previamente preparada e mantida à -20 °C.

3.8.12 Corante *coomassie blue*

<i>Coomassie brilliant blue</i>	0,25 % (p/v)
Ácido acético glacial	30 % (v/v)
Metanol	50 % (v/v)
Água Milli-Q [®]	q.s.p.

O *coomassie brilliant blue* foi dissolvido no metanol, após adicionou-se o ácido acético glacial e o volume final ajustado com água Milli-Q[®]. A solução foi armazenada à temperatura ambiente.

3.8.13 Descorante de *coomassie blue*

Ácido acético glacial	10 % (v/v)
Etanol	30 % (v/v)
Água Milli-Q [®]	q.s.p.

O ácido acético glacial foi diluído em água Milli-Q[®], após adicionou-se o etanol. O volume final necessário foi ajustado com água Milli-Q[®]. A solução foi armazenada à temperatura ambiente.

3.8.14 Solução de SDS 10 %

SDS	10 % (p/v)
Água Milli-Q [®]	q.s.p.

O SDS foi dissolvido em água Milli-Q[®], e em seguida o volume final foi ajustado. A solução foi armazenada à temperatura ambiente.

3.8.15 Tampão para extração de DNA de micélio de *A. fumigatus* e de *S. cerevisiae*

Tris HCl pH 8,5	200 mM
Cloreto de sódio	250 mM
EDTA	25 mM
SDS	0,5 % (p/v)
Água Milli-Q®	q.s.p.

O cloreto de sódio, SDS e o EDTA foram dissolvidos em água Milli-Q®, acrescentou-se o volume necessário da solução de tris HCl pH 8,5 previamente preparada, ajustou-se o volume final. A solução foi armazenada à temperatura ambiente.

3.8.16 Tampão para extração de DNA de conídios de *A. fumigatus*

Triton X-100	2 % (v/v)
SDS	1 % (p/v)
Cloreto de sódio	250 mM
EDTA	1 mM
Tris HCl pH 8	10 mM
Água Milli-Q®	q.s.p.

O cloreto de sódio, SDS e o EDTA foram dissolvidos em água Milli-Q®, adicionou-se o triton X-100, acrescentou-se o volume necessário da solução de tris HCl pH 8 previamente preparada, ajustou-se o volume final. A solução foi armazenada à temperatura ambiente.

3.8.17 Tampão Tris Acetato EDTA (TAE) 50 × concentrado para eletroforese de DNA

Tris base	2 M
Ácido acético glacial	5,71 % (v/v)
EDTA pH 8	0,05 M
Água Milli-Q®	q.s.p.

O tris base foi dissolvido em água Milli-Q®, em seguida acrescentou-se a solução de EDTA 0,5 M pH 8, previamente preparada. Acrescentou-se o ácido acético glacial, ajustou-se o pH para 8. Armazenou-se a solução à temperatura ambiente. Para uso na eletroforese de DNA, o tampão foi diluído para a concentração final de 1 ×.

3.8.18 Tampão de amostra para eletroforese de DNA 5 × concentrado

Azul de bromofenol	0,1 mg/mL
Xilenocianol	0,1 mg/mL
Glicerol	50 % (v/v)
Água Milli-Q®	q.s.p.

Dissolveram-se os componentes no volume necessário de água Milli-Q®. A solução foi armazenada à temperatura ambiente.

3.8.19 Tampão de amostra para eletroforese de RNA

RNA	x µL
Formaldeído	16,5 % (v/v)
Formamida	50 % (v/v)
Tampão MOPS	1 ×
Azul de bromofenol	0,5 % (p/v)
Brometo de etídio	0,024 mg
Água Milli-Q® (DEPC)	q.s.p.

Acrescentaram-se todos os componentes em água Milli-Q® tratada com dietil pirocarbonato (DEPC) 0,1 %. Em seguida acrescentou-se a amostra de RNA suficiente para a quantidade de RNA desejada no gel (10 µg). As amostras foram aquecidas a 65 °C por 15 minutos em banho seco para desnaturar a amostra de RNA, em seguida aplicou-se no gel de agarose desnaturante 1,2 %.

3.8.20 Tampão MOPS 10 × concentrado para eletroforese de RNA

MOPS	0,2 M
Acetato de sódio	0,5 M
EDTA	0,01 M
Água Milli-Q® (DEPC)	q.s.p.

Dissolveram-se os componentes em água Milli-Q® tratada com DEPC 0,1 %, o pH foi ajustado para 7 e ajustou-se o volume final.

3.8.21 Tampão fosfato salina (PBS) 10 × concentrado

Cloreto de sódio	350 mM
Cloreto de potássio	180 mM
Hidrogenofosfato de sódio	25 mM
Dihidrogenofosfato de potássio	18 mM
Água Milli-Q®	q.s.p

Dissolveram-se os componentes em água Milli-Q®, o pH foi ajustado para 7,4. O volume final foi ajustado e a solução esterilizada por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf/cm² por 15 minutos. A solução foi armazenada em geladeira.

3.8.22 Solução de Bis-acrilamida 30:08

Acrilamida	30 % (p/v)
N,N-Metileno-bis-acrilamida	0,8 % (p/v)
Água Milli-Q [®]	q.s.p

Dissolveram-se os componentes em água Milli-Q[®], o volume final foi ajustado. A solução foi armazenada em geladeira em frasco âmbar.

3.8.23 Solução de Tris HCl 1 M pH 6,8

Tris base	1 M
Água Milli-Q [®]	q.s.p

Dissolveu-se o tris base em água Milli-Q[®], o pH foi ajustado para 6,8 com ácido clorídrico. O volume final foi ajustado e a solução foi armazenada em geladeira.

3.8.24 Solução de Tris HCl 1,5 M pH 8,0

Tris base	1,5 M
Água Milli-Q [®]	q.s.p

Dissolveu-se o tris base em água Milli-Q[®], o pH foi ajustado para 8 com ácido clorídrico. O volume final foi ajustado e a solução foi armazenada em geladeira.

3.8.25 Soluções para quantificação de proteína total pelo método de Lowry modificado [139]

3.8.25.1 Solução de carbonato de sódio e hidróxido de sódio 2 %

Carbonato de sódio	2 % (p/v)
Hidróxido de sódio	0,1 M
Água Milli-Q [®]	q.s.p

Dissolveram-se os componentes em água Milli-Q®, o volume final foi ajustado. A solução foi armazenada em geladeira.

3.8.25.2 Solução de sulfato de cobre 1 %

Sulfato de cobre	1 % (p/v)
Água Milli-Q®	q.s.p

Dissolveu-se o sulfato de cobre em água Milli-Q®, o volume final foi ajustado. A solução foi armazenada em geladeira.

3.8.25.3 Solução de tartarato de sódio e potássio 1 %

Tartarato de sódio e potássio	1 % (p/v)
Água Milli-Q®	q.s.p

Dissolveu-se o tartarato de sódio e potássio em água Milli-Q®, o volume final foi ajustado. A solução foi armazenada em geladeira.

3.8.25.4 Solução de tartarato de sódio e potássio + carbonato de sódio + sulfato de cobre

Solução de tartarato de sódio e potássio 1 %	100 µL
Solução de sulfato de cobre 1 %	100 µL
Solução de carbonato de sódio e hidróxido de sódio 2 %	9,8 mL
Volume final	10 mL

A solução de tartarato de sódio e potássio 1 % e a solução de sulfato de cobre 1 % foram adicionadas à solução de carbonato de sódio e hidróxido de sódio 2 %, em seguida os componentes foram homogeneizados. A solução foi preparada no momento do uso.

3.8.26 Soluções para *Southern blot*

3.8.26.1 Solução de ácido clorídrico 0,25 M

Ácido clorídrico	0,25 M
Água Milli-Q®	q.s.p

Dissolveu-se o ácido clorídrico em água Milli-Q®, o volume final foi ajustado. A solução foi preparada no momento do uso.

3.8.26.2 Solução de desnaturação

Cloreto de sódio	1,5 M
Hidróxido de sódio	0,5 M
Água Milli-Q®	q.s.p

Dissolveu-se o cloreto de sódio e o hidróxido de sódio em água Milli-Q®, o volume final foi ajustado. A solução foi preparada no momento do uso.

3.8.26.3 Solução de neutralização

Tris base	0,5 M
Cloreto de sódio	1,5 M
Água Milli-Q®	q.s.p

Dissolveu-se o tris base em água Milli-Q®, ajustou-se o pH para 7 com ácido clorídrico. Adicionou-se o cloreto de sódio. Após a dissolução do cloreto de sódio na solução de tris HCl o volume final foi ajustado. A solução foi preparada no momento do uso.

3.8.26.4 Solução salina citrato 20 x concentrada

Cloreto de sódio	3 M
Citrato de sódio	0,3 M
Água Milli-Q®	q.s.p

Dissolveram-se os componentes em água Milli-Q®, ajustou-se o pH para 7 com ácido clorídrico. O volume final foi ajustado. A solução foi preparada no momento do uso.

3.8.26.4.1 Solução salina citrato 2 x concentrada

Solução salina citrato 20 x concentrada	2 x
Água Milli-Q®	q.s.p

Dissolveu-se a solução salina citrato 20 x previamente preparada em água Milli-Q® para a concentração final de 2 x concentrada. A solução foi preparada no momento do uso.

3.8.27 Soluções para far *Western blot* (far WB)

3.8.27.1 Solução de desnaturação e renaturação da membrana de PVDF

Tabela 9: Soluções para desnaturação e renaturação da membrana de far WB.

Concentração de Guanidina HCl (M)	6	3	0,1	0
Glicerol 99,5 % (mL)	2,5	2,5	2,5	2,5
Cloreto de sódio 5 M (mL)	0,5	0,5	0,5	0,5
Tris HCl 1 M pH 7,5 (mL)	0,5	0,5	0,5	0,5
EDTA 0,5 M pH 8 (mL)	0,05	0,05	0,05	0,05
Tween 20 (mL)	0,25	0,25	0,25	0,25
Guanidina HCl 8 M (mL)	18,75	9,30	0,31	0
Leite em pó (Nestlé Mólico®) (g)	0,5	0,5	0,5	0,5
DTT 1 M (μL)	25	25	25	25
Água Milli-Q® (mL)	2,45	12,85	20,89	21,2

3.8.27.1.1 Solução de cloreto de sódio 5 M

Cloreto de sódio	5 M
Água Milli-Q®	q.s.p

Dissolveu-se o cloreto de sódio em água Milli-Q® e o volume final foi ajustado. A solução foi preparada no momento do uso.

3.8.27.1.2 Solução de tris HCl pH 7,5

Tris base	1 M
Água Milli-Q®	q.s.p

Dissolveu-se o tris base em água Milli-Q®, ajustou-se o pH para 7,5 com ácido clorídrico. Ajustou-se o volume final.

3.8.27.1.3 Solução de EDTA 0,5 M pH 8,0

EDTA	0,5 M
Água Milli-Q®	q.s.p

Dissolveu-se o EDTA em água Milli-Q®, ajustou-se o pH para 8,0 para a completa dissolução. Ajustou-se o volume final.

3.8.27.1.4 Solução de Guanidina HCl 8 M

Guanidina HCl	8 M
Água Milli-Q®	q.s.p

Dissolveu-se a guanidina HCl em água Milli-Q® previamente aquecida. Ajustou-se o volume final. A solução foi preparada no momento do uso.

3.8.27.1.5 Solução de DTT 1 M

DTT	1 M
Água Milli-Q®	q.s.p

Dissolveu-se O DTT em água Milli-Q®. Ajustou-se o volume final. A solução foi preparada e o estoque foi mantido a -20 °C.

3.8.27.2 Solução de ligação para far WB

Cloreto de sódio	100 mM
Tris HCl pH 7,6	20 mM
EDTA	0,5 mM
Leite em pó	1 %
DTT	1 mM
Água Milli-Q®	q.s.p

Dissolveu-se a os componentes em água Milli-Q®, adicionou-se a proteína purificada. Ajustou-se o volume final. A solução foi preparada no momento do uso.

3.8.28 Soluções para ChIP

3.8.28.1 Tampão para *cross-linking*

Sacarose	0,4 M
Tris base	10 mM
EDTA pH 8	1 mM
PMSF	1 mM
Formaldeído	1 % (v/v)
Água Milli-Q®	q.s.p

Dissolveu-se o tris base em água Milli-Q®, após a dissolução o pH foi ajustado para 8. Adicionou-se a sacarose, e após o EDTA. Após foram adicionados o formaldeído e o PMSF. Ajustou-se o volume final necessário com água Milli-Q®. A solução foi preparada no momento do uso.

3.8.28.2 Solução de glicina 1 M

Glicina	1 M
Água Milli-Q®	q.s.p

Dissolveu-se a glicina em água Milli-Q®, ajustou-se o volume final. A solução foi preparada no momento do uso.

3.8.28.3 ChIP *lysis buffer* (CLB)

HEPES	50 mM
Cloreto de sódio	150 mM
EDTA	1 mM
Triton X-100	1 % (v/v)
Deoxicolato de sódio	0,1 % (p/v)
SDS	1 % (p/v)
PMSF	1 mM
<i>Protease Inhibitor Cocktail</i> (Sigma Aldrich)	1 x
Água Milli-Q®	q.s.p

Dissolveu-se o HEPES em água Milli-Q®, ajustou-se o pH para 7,5. Após adicionou-se o cloreto de sódio, EDTA, Triton X-100 e SDS. Ajustou-se o volume final. O PMSF e o *Protease Inhibitor Cocktail* foram adicionados posteriormente no momento do uso.

3.8.28.4 Tampão de bloqueio

BSA	1 % (p/v)
Yeast tRNA	200 µg/mL
CLB	q.s.p

Dissolveram-se os componentes em CLB ajustou-se o volume final. A solução foi preparada no momento do uso.

3.8.28.5 Tampão para eluição das amostras de CHIP

SDS	1 % (p/v)
Carbonato de sódio	0,1 M
Proteinase K	0,2 mg/mL
DTT	1 mM
Água Milli-Q®	q.s.p

Dissolveram-se os componentes em água Milli-Q®, ajustou-se o volume final. A solução foi preparada no momento do uso.

3.8.29 Soluções para imunoprecipitação utilizando *Dynabeads Proteín A*® (Thermo Fisher Scientific A, 10001D) e *Anti FLAG M2 Affinity Gel* (Sigma Aldrich, A2220)

3.8.29.1 Tampão fosfato salina (PBS) 1 x concentrado com Tween 20 0,01 %

PBS pH 7,4	1 x
Tween 20	0,01 % (v/v)
Água Milli-Q®	q.s.p

Diluiu-se o tampão PBS 10 x concentrado (Thermo fisher scientific, 10010023) em água Milli-Q® para a concentração final desejada. Após adicionou-se o tween 20. A solução foi preparada no momento do uso.

3.8.29.2 Tampão B250 para extração de proteínas para imunoprecipitação

Tris base	100 mM
Cloreto de sódio	250 mM
Igepal	0,1 % (v/v)
Glicerol	1 % (v/v)
EDTA	1 mM
Benzamidina	0,6 mM
Ortovanadato de sódio	1 mM
PMSF	1 mM
<i>cOmplete™ ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free</i>	1 x
Água Milli-Q®	q.s.p

Dissolveu-se o tris base em água Milli-Q®, ajustou-se o pH para 7,5 com HCl. Após adicionou-se o cloreto de sódio, o EDTA, igepal, glicerol, benzamidina e ortovanadato de sódio. Ajustou-se o volume final. O PMSF e o *cOmplete™ ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free* foram adicionados posteriormente no momento do uso.

3.8.30 Soluções para microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

3.8.30.1 Solução de fixação

Tampão fosfato pH 7,4	0,1 M
Glutaraldeído	2,5 % (v/v)
Paraformaldeído	2 % (p/v)
Água Milli-Q®	q.s.p

Aqueceu-se o tampão fosfato pH 7,4 a cerca de 100 °C e após adicionou-se o paraformaldeído. Após a dissolução do paraformaldeído e resfriamento até a temperatura ambiente, adicionou-se o glutaraldeído e o volume final foi ajustado com água Milli-Q®. A solução foi preparada no momento do uso.

3.8.30.2 Solução ágar-ágar

Tampão fosfato pH 7,4	0,1 M
Ágar-ágar	2,0 % (v/v)

Adicionou-se ágar-ágar ao tampão fosfato pH 7,4 a 0,1 M, aqueceu-se até completa dissolução. A solução foi preparada no momento do uso.

3.8.30.3 Solução de tetróxido de ósmio

Tetróxido de ósmio	1 % (p/v)
Tampão fosfato pH 7,4	0,2 M

Adicionou-se o tetróxido de ósmio ao tampão fosfato pH 7,4 a 0,2 M. A solução foi armazenada em frasco âmbar.

3.8.30.4 Solução de acetato de uranila

Acetato de uranila	1 % (p/v)
Água Milli-Q [®]	q.s.p

Adicionou-se o acetato de uranila à água Milli-Q[®], ajustou-se o volume final. A solução foi filtrada em membrana de 0,2 µm.

3.8.31 Solução de bloqueio para microscopia

PBS	0,01 M
Soro de cabra	2 % (v/v)
BSA	1 % (p/v)
Triton X-100	0,1 % (v/v)
Tween 20	0,05 % (v/v)
Azida de sódio	0,05 % (p/v)
Água Milli-Q [®]	q.s.p

Dissolveram-se os componentes em água Milli-Q®, ajustou-se o pH para 7,2. Ajustou-se o volume final. A solução foi preparada no momento do uso.

3.8.32 Soluções para coloração do gel de SDS-PAGE com nitrato de prata

3.8.32.1 Solução de fixação

Etanol	50 % (v/v)
Ácido acético	10 % (v/v)
Água Milli-Q®	q.s.p

Dissolveu-se o etanol e o ácido acético em água Milli-Q®, ajustou-se o volume final. A solução foi preparada no momento do uso.

3.8.32.2 Solução de sensibilização

Tiosulfato de sódio	0,2 mg/mL
Água Milli-Q®	q.s.p

Dissolveu-se o tiosulfato de sódio em água Milli-Q®, ajustou-se o volume final. A solução foi preparada no momento do uso.

3.8.32.3 Solução de coloração

Nitrato de prata	2 mg/mL
Água Milli-Q®	q.s.p

Dissolveu-se o nitrato de prata em água Milli-Q®, ajustou-se o volume final. A solução foi preparada no momento do uso.

3.8.32.4 Solução de revelação

Carbonato de sódio	60 mg/mL
Solução de sensibilização	2 mL
Formaldeído	0,015 % (v/v)
Água Milli-Q®	q.s.p

Dissolveu-se o carbonato de sódio em água Milli-Q®, adicionou-se 2 mL da solução de sensibilização, e após adicionou-se o formaldeído. Ajustou-se o volume final. A solução foi preparada no momento do uso.

3.8.32.5 Solução de interrupção de coloração

Ácido acético	6 % (v/v)
Água Milli-Q®	q.s.p

Dissolveu-se o ácido acético em água Milli-Q®, ajustou-se o volume final. A solução foi preparada no momento do uso.

3.9 Gel de agarose para eletroforese de DNA

Agarose	1 %
TAE 1 x	q.s.p.

A agarose foi dissolvida em TAE 1 x no forno micro-ondas, após a fusão da agarose com o TAE esperou-se esfriar a temperatura de 50 °C, adicionou-se o brometo de etídio na concentração final de 40 µg/mL a partir de uma solução estoque previamente preparada na concentração de 10 mg/mL. A solução foi distribuída no suporte da cuba de eletroforese e aguardou-se 30 minutos para a polimerização antes da aplicação das amostras.

3.10 Gel de agarose desnaturante para eletroforese de RNA

Agarose	1,2 %
Tampão MOPS	1 x
Formaldeído	15 %
Água Milli-Q®	q.s.p.

A agarose foi dissolvida em água Milli-Q® em forno micro-ondas. Após a fusão da agarose com a água esperou-se esfriar a temperatura de 50 °C, adicionou-se o tampão MOPS, em seguida adicionou-se o formaldeído. A solução foi distribuída no suporte da cuba de eletroforese e aguardou-se 30 minutos para a polimerização antes da aplicação das amostras.

3.11 Gel SDS PAGE

3.11.1 Gel de poliacrilamida – empilhamento 1,2 %

Tris HCl pH 6,8	125 mM
SDS	0,1 % (p/v)
Acrilamida:bisacrilamida (30:0,8)	5 % (v/v)
TEMED	0,15 % (v/v)
Persulfato de amônia	0,1 % (v/v)
Água Milli-Q®	q.s.p.

Os componentes foram dissolvidos em água Milli-Q®. Após a dissolução dos componentes para a polimerização, adicionou-se 0,15 % de TEMED e 0,1 % de persulfato de amônia, e em seguida aplicou-se a solução no suporte. Aguardou-se a polimerização do gel por no mínimo 30 minutos.

3.11.2 Gel de poliacrilamida – corrida

Tris HCl pH 8,0	375 mM
Acrilamida:bisacrilamida (30:0,8)	X % (v/v)
TEMED	0,1 % (v/v)
Persulfato de amônio	0,1 % (v/v)
SDS	0,1 % (p/v)
Água Milli-Q®	q.s.p.

Os componentes foram dissolvidos em água Milli-Q®. A quantidade de Acrilamida:bisacrilamida (30:0,8) adicionada foi referente à concentração desejada do gel de SDS-PAGE (6 %, 8 %, 10 %, 12 %, 15 % ou 20 %). Após a dissolução dos componentes para a polimerização, adicionou-se 0,15 % de TEMED e 0,1 % de persulfato de amônia, e em seguida aplicou-se a solução no suporte. Aguardou-se a polimerização do gel por no mínimo 30 minutos.

3.12 Soluções estoque das drogas e agentes utilizados neste trabalho

Tabela 10: Agentes e drogas utilizados nos ensaios de caracterização fenotípica das linhagens utilizadas neste trabalho.

Droga	Mecanismo de ação	Estoque
CFW	Liga-se à quitina da parede celular impedindo a ligação de $\beta(1,3)$ glucana e $\beta(1,6)$ glucana, enfraquecendo a parede celular	10 mg/mL em água
CR	Liga-se à quitina da parede celular impedindo a ligação de $\beta(1,3)$ glucana e $\beta(1,6)$ glucana, enfraquecendo a parede celular	5 mg/mL em água
SDS	Ação detergente na membrana plasmática	10 % em água
Cafeína	Inibição da fosfodiesterase	735 mM em água, na hora do uso a suspensão deve ser aquecida em banho-maria fervente para solubilização
Radicol	Inibição da Hsp90	2 μ g/mL em etanol absoluto
Geldanamicina	Inibição da Hsp90	1 mg/mL em DMSO
Caspofungina	Inibição da síntese de $\beta(1,3)$ glucana	10 mg/mL em água
Anidulafungina	Inibição da síntese de $\beta(1,3)$ glucana	10 mg/mL em água

Fluconazol	Inibição das enzimas dependentes do citocromo fúngico P450	100 µg/mL em água
Tunicamicina	Promove o desenovelamento da proteína, interferindo no transporte do RE para o complexo de golgi	10 mg/mL em água
Brefeldina	Promove o desenovelamento da proteína, interferindo no transporte do RE para o complexo de golgi	5 mg/mL em água
DTT	Promove o desenovelamento da proteína, 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
Terc-butil	Produz radicais hidroxila (OH ⁻), que promove o estresse oxidativo	1 M em água
Menadiona	Libera ânion O singlete (O ⁻¹), que promove o estresse oxidativo	50 mM em água
Peróxido de Hidrogênio	O radical peróxido (H ₂ O ₂) promove o estresse oxidativo	30 %
Nikomicina Z	Inibição da síntese de quitina	0,1 M em água
Ampicilina	Antibiótico utilizado para seleção de <i>E. coli</i> transformada com o plasmídeo pET-15b	100 mg/mL em etanol 30 %
Cloranfenicol	Antibiótico utilizado para a seleção da linhagem Rosetta™ (DE3)	34 mg/mL em etanol absoluto
Piritiamina	Utilizado para a seleção de linhagens transformantes de <i>A. fumigatus</i> com o marcador <i>prtA</i>	1 mg/mL em água
IPTG	Liga-se ao repressor lac e libera o repressor tetramérico do operador lac de maneira alostérica, permitindo assim a transcrição de genes no <i>operon lac</i>	1 M em água

3.13 Protocolos adotados

3.13.1 Construção dos cassetes de deleção e substituição gênica utilizando a técnica de recombinação *in vivo* em *S. cerevisiae*

Os cassetes de substituição e deleção gênica para transformação em *A. fumigatus* foram construídos conforme descrito anteriormente por Malavazi e Goldman [140]. Para a recombinação do cassete de deleção e/ou substituição gênica foi utilizada a linhagem de *S. cerevisiae* FGSC 9721. Esta linhagem não possui o gene *URA3* funcional, portanto este marcador

auxotrófico pode ser utilizado como marca de seleção para a transformação. O vetor utilizado para a recombinação dos fragmentos independentes e transformação em *S. cerevisiae* foi o pRS426. Este é um vetor de dupla seleção, apresentando uma marca de seleção para ampicilina e outra para o gene *URA3*. Este vetor foi linearizado com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI. Os oligonucleotídeos distais (região 5' e 3' das construções realizadas) utilizados para construção do cassete de deleção e ou substituição gênica foram desenhados com 29 pares de bases complementares ao vetor pRS426 linearizado com *Bam*HI e *Eco*RI, para possibilitar a recombinação neste vetor. Os oligonucleotídeos internos das construções também apresentavam regiões de homologia entre cada fragmento para possibilitar a recombinação dos fragmentos independentes (tabela 3). As reações de PCR para a amplificação dos fragmentos independentes para cada construção foram realizadas utilizando sempre uma enzima DNA polimerase de alta fidelidade. O vetor pCDA21 foi utilizado para amplificar o fragmento contendo o marcador genético de auxotrofia, o gene *pyrG* de *A. fumigatus* [141].

Para a transformação, uma colônia isolada de *S. cerevisiae* da linhagem FGSC 9721 foi inoculada em 10 mL de meio líquido YPD (seção 3.3.3.1) e incubada a 30 °C a 180 rpm por 18 horas. Após este período, 500 µL desta cultura foram adicionados a 50 mL de YPD (seção 3.3.3.1) e posteriormente incubados a 30 °C a 180 rpm até a densidade óptica da cultura a 600 nm (OD_{600nm}) atingir uma absorbância entre 0,4 e 0,6. As células foram então centrifugadas a 1000 g por 2 minutos e lavadas com tampão TE 1 × (seção 3.8.6.1). Em seguida, as células foram novamente centrifugadas a 1000 g por 2 minutos e ressuspendidas em 800 µL de solução TE/LiAc 1 × e incubadas a 30 °C por 1 hora, sob leve agitação (90 rpm). Para cada reação de transformação foram misturados 200 µl de suspensão de células, 200-500 ng de DNA plasmidial linearizado e 1-5 µg dos fragmentos de DNA purificados, provenientes das PCRs para a construção dos cassetes de deleção, e 200 µg de DNA de esperma de salmão (previamente desnaturado a 99 °C por 5 minutos, e incubado imediatamente em gelo após a desnaturação). Como controle positivo foi realizada uma reação com o plasmídeo pRS426 circular, para avaliar a viabilidade das células, e como controle negativo foi realizada

uma reação com a célula e o DNA de espermatozoides de salmão sem fragmentos de DNA e plasmídeo para avaliar a presença de possíveis contaminações. As reações foram incubadas a 30 °C por 30 minutos, sob leve agitação (90 rpm). Após foi adicionado 1,5 mL de solução contendo LiAc 1 ×/PEG-3350 40 % (seção 3.8.6.2 e 3.8.6.3), as células foram gentilmente homogeneizadas e então incubadas por 30 minutos a 42 °C em banho úmido. Após a incubação, as células foram então centrifugadas a 2500 g por 1 minuto, foram ressuspensas em 1 mL de TE 1 × (seção 3.8.6.1), precipitadas novamente, ressuspensas em 100 µL de TE 1 × (seção 3.8.6.1), e então semeadas em meio SC-URA⁻ (seção 3.3.3.2). As placas foram incubadas por 5 dias em estufa a 30 °C e os transformantes foram inoculados em meio líquido SC-URA⁻ (seção 3.3.3.2), incubados sob agitação (180 rpm) a 30 °C por 5 dias, e posteriormente tiveram seu DNA plasmidial extraído para validação do construto.

3.13.2 Extração do DNA de *S. cerevisiae*

Após a incubação das colônias candidatas em meio SC-URA⁻ (seção 3.3.3.2) líquido sob agitação (180 rpm) a 30 °C por 5 dias as células foram centrifugadas a 2.500 g por 5 minutos e em seguida ressuspensas em 500 µL de tampão de extração de DNA de leveduras (seção 3.8.15), a esta solução foi adicionado o mesmo volume de pérolas de vidro estéreis (previamente tratadas com ácido clorídrico 6 M). Os tubos contendo as células com as pérolas de vidro foram acoplados a um agitador tipo vórtex e agitados vigorosamente durante 10 minutos para a lise de *S. cerevisiae*. Após esse período o sobrenadante foi transferido para novos tubos contendo o mesmo volume de uma mistura fenol:clorofórmio (1:1) e novamente agitados vigorosamente por mais 10 minutos. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 16000 g durante 15 minutos a 4 °C, e a fase superior (aquosa) contendo o DNA foi recuperada. O DNA foi novamente lavado com o mesmo volume de clorofórmio, para remover possíveis contaminações com fenol. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 16000 g durante 15 minutos a 4 °C, e a fase superior (aquosa) contendo o DNA genômico foi recuperado. O DNA foi precipitado com a adição de 800 µL de isopropanol, com posterior incubação a -80 °C por 30 minutos, seguido da

centrifugação a 16000 g por 10 minutos a 4 °C. O sedimento foi lavado com etanol 70 % e centrifugado novamente a 16000 g por 1 minuto a 4 °C. O sobrenadante foi novamente descartado e o resíduo de etanol evaporado a temperatura ambiente por 30 minutos. O sedimento foi ressuspensionado em água Milli-Q® estéril e estocado a 4 °C. A integridade das amostras foi verificada através do gel de agarose 1 %, e o DNA foi quantificado por espectrofotometria quando necessário (260/280 nm) utilizando-se equipamento NanoVue Plus® (GE HealthCare).

3.13.3 Transformação em *A. fumigatus*

Cerca de 10^7 conídios da linhagem recipiente de *A. fumigatus* para cada transformação [136] foram inoculados em 50 mL de meio mínimo líquido (seção 3.3.1.1) e incubados com agitação constante de 180 rpm por 16 horas a 37 °C. Os germinantes foram coletados por centrifugação (900 g por 5 minutos a 4 °C). Os germinantes sedimentados foram ressuspensionados em 20 mL de solução 1 (seção 3.8.7.1), somada de 20 mL de solução 2 (seção 3.8.7.2), 6,5 mL de sulfato de magnésio 1 M, 400 mg de BSA e 400 mg de Lallzyme MMX® (Lallemand). Esta mistura foi incubada a 30 °C sob agitação a 90 rpm por 5 horas, até a completa protoplastização. Após a protoplastização, a cultura foi filtrada com lã de vidro e posteriormente centrifugada a 1500 g por 10 minutos a 4 °C. O sedimento obtido foi lavado com solução 3 (seção 3.8.7.3) gelada por duas vezes e centrifugado por 5 minutos a 1500 g e analisado em microscópio para averiguação visual do sucesso da protoplastização. Na sequência, o sedimento foi ressuspensionado no volume adequado de solução 5 (seção 3.8.7.5) (para cada reação de transformação são usados 100 µL dessa solução). A mistura foi incubada em banho de gelo por 10 minutos. Para cada reação foi adicionado 10-20 µg (contidos em um volume máximo de 20 µL) de DNA com 50 µL de solução 4 (seção 3.8.7.4). Esta mistura foi incubada por 20 minutos em banho de gelo. Após esse tempo, adicionou-se em cada reação 1 mL da solução 4 (seção 3.8.7.4) e incubou-se por mais 20 minutos na temperatura ambiente. Após esse tempo, os protoplastos transformados foram inoculados em meio YG+KCl top ágar (seção 3.3.1.2), (o qual tem apenas 1 % de ágar). Isso foi

realizado para permitir a inoculação dos protoplastos transformados pelo método de *pour plate* sobre meio sólido YG+KCl (seção 3.3.1.2) previamente depositado sobre uma placa de Petri. Para tanto, nas placas foram inicialmente colocados 20 mL do meio sólido YG+KCl (seção 3.3.1.2) e em seguida, a mistura da reação de transformação foi misturada com 15 mL de meio top ágar (YG+KCl, seção 3.3.1.2), homogeneizada delicadamente por inversão e então colocada sobre o meio sólido na placa de Petri. As placas de transformação foram então incubadas a 37 °C por aproximadamente três dias, até a visualização dos transformantes. Os transformantes obtidos foram isolados e repicados três vezes consecutivas em YG sólido (seção 3.3.1.2) a partir de colônias monospóricas para eliminação dos heterocários de transformação. Depois de expandidos, o DNA genômico dos transformantes foi extraído e usado para validação desses através de PCR convencional diagnóstica e *Southern blot*.

Para as transformações dos cassetes contendo como marcador dominante o gene de resistência a piritiamina (*ptrA*) [142] utilizou-se MM+D-sorbitol (1,2 M) (seção 3.3.1.1) como estabilizador osmótico ao invés de KCl. Utilizou-se 4 µg/mL de piritiamina nas placas de MM + D-sorbitol (seção 3.3.1.1) tanto no *bottom* quanto no *top* ágar. Incubou-se as placas de transformação por cerca de cinco dias até o aparecimento dos transformantes, os quais foram imediatamente repicados em meio MM (seção 3.3.1.1) acrescido de piritiamina na mesma concentração acima.

3.13.4 Extração do DNA do micélio de *A. fumigatus*

Conídios das linhagens foram inoculados em meio de cultura completo YG líquido e incubados por aproximadamente 16 horas a 37 °C a 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 cada cerca de 40 mg de micélio acrescentaram-se 500 µL de tampão de extração de DNA (seção 3.8.15). Adicionou-se em cada amostra um volume igual de fenol:clorofórmio (1:1) e a mistura foi agitada mecanicamente em agitador do tipo vórtex por 10 minutos. Para sedimentar as proteínas

precipitadas e debris celulares, as amostras foram centrifugadas a 16000 g por 20 minutos a 4 °C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de micro centrífuga onde foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio para a retirada de resíduos de fenol. As amostras foram centrifugadas a 16000 g por 10 minutos a 4 °C e a fase aquosa superior foi novamente transferida para outro tubo de micro centrífuga, onde foram adicionados 900 µL de isopropanol para precipitar o DNA. A amostra foi incubada a -80 °C por 30 minutos e posteriormente centrifugada a 16000 g por 15 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi lavado com etanol 70 % e centrifugado novamente a 16000 g por 1 minuto a 4 °C. O sobrenadante foi novamente descartado e o resíduo de etanol evaporado a temperatura ambiente por 30 minutos. O sedimento foi ressuspensionado em água Milli-Q® estéril e estocado a 4 °C. A integridade das amostras foi verificada através do gel de agarose 1 %, e o DNA foi quantificado por espectrofotometria quando necessário (260/280 nm) utilizando-se equipamento NanoVue Plus (GE HealthCare).

3.13.5 Extração do DNA do conídio de *A. fumigatus*

Os conídios foram incubados em placa de Petri contendo meio sólido YG por 48 horas a 37 °C. Após, estes foram coletados da placa de Petri com o auxílio de uma pipeta de Pasteur utilizando 500 µL do tampão de extração de DNA de conídios (seção 3.8.16) de *A. fumigatus*, e a esta solução foi adicionado o mesmo volume de pérolas de vidro estéreis (previamente tratadas com ácido clorídrico 6 M para retirar as impurezas). Os tubos de micro centrífuga contendo as células com as pérolas de vidro foram acoplados a um agitador do tipo vórtex e agitados vigorosamente durante 10 minutos para a lise da parede celular fúngica. Após esse período o sobrenadante foi transferido para novos tubos de micro centrífuga contendo o mesmo volume de uma mistura fenol:clorofórmio (1:1) e novamente agitados vigorosamente por 10 minutos. Em seguida a mistura foi centrifugada a 16000 g durante 15 minutos a 4 °C, e a fase superior (aquosa) contendo o DNA genômico foi recuperada. O DNA foi novamente lavado com o mesmo volume de clorofórmio, para remover possíveis contaminações com fenol. Em seguida, a mistura foi centrifugada a

16000 g durante 15 minutos a 4 °C, e a fase superior (aquosa) contendo o DNA genômico foi recuperada. O DNA foi precipitado com a adição de 800 µL de isopropanol, com posterior incubação a -80 °C por 30 minutos, seguido da centrifugação a 16000 g por 10 minutos a 4 °C. O sedimento foi lavado com etanol 70 % e centrifugado novamente a 16000 g por 1 minuto a 4 °C. O sobrenadante foi novamente descartado e o resíduo de etanol evaporado à temperatura ambiente por 30 minutos. O sedimento foi ressuspensionado em água Milli-Q® estéril e estocado a 4 °C. A integridade das amostras foi verificada através do gel de agarose 1 %, e o DNA foi quantificado por espectrofotometria quando necessário (260/280 nm) utilizando-se equipamento NanoVue Plus (GE HealthCare).

3.13.6 Preparo de células eletrocompetentes de *E. coli*

Uma colônia isolada da linhagem de *E. coli* DH10B foi inoculada em 10 mL de meio de cultura LB líquido (seção 3.3.2.1) a 37 °C a 180 rpm por 16 horas. Este pré-inóculo foi adicionado a 1 L de LB líquido (seção 3.3.2.1) e cultivado a 37 °C sob agitação de 180 rpm, até que a OD_{600nm} da cultura atingisse a absorvância entre 0,4 a 0,5. O frasco da cultura foi resfriado em banho de gelo por 30 minutos e as células foram recuperadas por centrifugação a 4000 g a 4 °C por 15 minutos. As células precipitadas foram cuidadosamente ressuspensionadas em 500 mL de água destilada estéril resfriada a 4 °C. As células foram precipitadas por centrifugação e novamente lavadas como descrito anteriormente. Tais lavagens com água promovem a diminuição da força iônica da suspensão de células, facilitando a entrada do DNA a ser transformado na bactéria. Em seguida, as células foram equilibradas em 50 mL de solução de glicerol 10 %, resfriadas a 4 °C e centrifugadas nas mesmas condições descritas anteriormente. O precipitado foi ressuspensionado em glicerol 10 % com o volume necessário para atingir uma concentração de 1 a 3×10¹⁰ células/mL (aproximadamente 40 µL de suspensão de células). A suspensão de células eletrocompetentes foi alíquotada em tubos de micro centrífuga e foram estocadas a -80 °C até o momento do uso.

3.13.7 Eletrotransformação de *E. coli*

O DNA plasmidial dialisado por 4 horas em membrana com poros de 45 μm (PVDF, Millipore) foi acrescentado a 1 a 3×10^{10} células eletrocompetentes da linhagem DH10B, misturando-se gentilmente. A mistura foi incubada por 5 minutos em gelo, e após foi transferida para cubetas de eletroporação de 2 mm (Bio-rad) previamente esterilizadas por UV e resfriadas a 0 °C, e estas foram submetidas a 25 μF , 200 ω e 2,5 kV no aparelho Gene Pulser (Bio-rad). A seguir, 1 mL de meio LB foi adicionado à mistura, e esta transferida para tubos de centrifuga de fundo triangular de 15 mL estéreis e incubada a 37 °C (180 rpm). Após uma hora, a cultura foi semeada em LB sólido acrescido da concentração adequada de antibiótico apropriado e incubada a 37 °C por aproximadamente 16 horas.

3.13.8 Preparo de células quimiocompetentes de *E. coli*

Uma colônia isolada da linhagem de *E. coli* Rosetta™ (DE3) foi inoculada em 10 mL de meio de cultura LB líquido (seção 3.3.2.1) a 37 °C a 180 rpm por 16 horas. Este pré-inóculo foi adicionado a 250 mL de LB líquido (seção 3.3.2.1) e cultivado a 37 °C sob agitação de 180 rpm, por 6 horas. 10 mL deste inóculo foi adicionado a 1 L de LB líquido e cultivado a 18 °C sob agitação de 180 rpm até que a $\text{OD}_{600\text{nm}}$ da cultura atingisse a leitura entre 0,4 a 0,5 (aproximadamente 16 horas). O frasco da cultura foi resfriado em banho de gelo por 10 minutos e as células foram recuperadas por centrifugação a 2500 g a 4 °C por 30 minutos. O excesso do meio de cultura foi removido invertendo o tubo de centrifuga por 2 minutos em papel toalha. As células precipitadas foram cuidadosamente ressuspensas em 80 mL do tampão de preparo de *E. coli* quimiocompetente resfriado a 4 °C. As células foram precipitadas por centrifugação e novamente lavadas como descrito anteriormente. Após este passo, as células foram ressuspensas em 10 mL do tampão preparo de *E. coli* quimiocompetente (seção 3.8.4), contendo 750 μL de DMSO (concentração de aproximadamente 1 a 3×10^{10} células/mL), e em seguida as células foram resfriadas a 4 °C por 10 minutos em banho de gelo. A suspensão

de células quimiocompetentes (seção 3.8.4) foi aliquoteada (100 µL) em tubos de micro centrífuga e estocada a -80 °C até o momento do uso.

3.13.9 Quimiotransformação de *E. coli*

O DNA plasmidial foi acrescentado a 1 a 3×10^{10} células quimiocompetentes da linhagem de *E. coli* Rosetta™ (DE3), misturando-se gentilmente. A mistura foi incubada por 30 minutos em gelo, e após transferida para o banho maria a 42 °C por 90 segundos, e em seguida transferida para um banho de gelo por 90 segundos. A seguir, 1 mL de meio LB (seção 3.3.2.1) foi adicionado à mistura, e esta transferida para tubos de centrifuga de 50 mL estéreis e incubada a 37 °C (180 rpm). Após uma hora, a cultura foi semeada em LB sólido (seção 3.3.2.1) acrescido da concentração adequada de antibiótico apropriado e incubada a 37 °C por aproximadamente 16 horas.

3.13.10 Análise de *Southern blot*

Amostras de DNA das linhagens a serem testadas foram digeridas com enzimas de restrição apropriadas de acordo com a estratégia definida, e separadas por eletroforese (60 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 a temperatura ambiente; após, o gel foi lavado com água destilada e desnaturado por 2 vezes com a solução de desnaturação, sendo cada incubação por 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 por 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 20 × concentrada. O sistema de transferência foi mantido *overnight*. No dia seguinte, a membrana foi rapidamente lavada em solução salina-citrato 2 × concentrada, e na sequência ela foi seca sobre papel de filtro.

Para a fixação do material que fora transferido, a membrana foi colocada no transiluminador sob ação de luz ultravioleta por 5 minutos de cada lado, posteriormente a membrana foi levada à estufa de secagem, na temperatura de 80 °C e mantida por 1 hora.

Para a hibridização dos ácidos nucléicos 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 garrafa contendo a solução e 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 foi ajustada na concentração de 20 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 no gelo. A esse material foi somado 10 μL de *reaction buffer*, 2 μL de *labelling* reagente 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 30 minutos. A sonda foi adicionada à membrana pré-hibridizada contida na garrafa de hibridização. A hibridização foi mantida por cerca de 16 a 18 horas no forno de hibridização na temperatura de 48 °C em rotação leve. Após a hibridização a membrana foi lavada 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. O procedimento de lavagem foi feito por duas vezes, e cada uma das lavagens durou 10 minutos, dentro do forno de hibridização a 55 °C com rotação leve. Na sequência, a membrana foi lavada com a solução secundária (tris base 6,2 g/L, NaCl 5,6 g/L), dessa vez ela foi agitada por cinco minutos em temperatura ambiente por duas vezes. Feito isso, a membrana foi colocada em uma superfície plana e sobre ela fora aplicado 30 μL/cm² do agente de detecção CDP-star (GE HealthCare) por cerca de 5 minutos para a revelação. Por último a membrana foi encaminhada para

revelação utilizando o equipamento de detecção quimio luminescente ChemiDoc (Bio-Rad).

3.13.11 Análise do crescimento radial

Inoculou-se 1×10^5 conídios frescos de cada linhagem de *A. fumigatus* testada em placa de Petri contendo meio completo YG sólido (seção 3.3.1.2). As placas de cada linhagem foram incubadas em estufa de acordo com a temperatura a ser testada (30, 37, 45 e 50 °C) por 72 horas. O diâmetro do crescimento das linhagens foi quantificado em todas as temperaturas de incubação a cada 24 horas de crescimento, e posteriormente submetido à análise estatística (teste T de Student). Foram consideradas significativas as diferenças observadas com p valor $\leq 0,05$. As placas foram fotografadas para montagem dos painéis utilizando-se o programa Adobe Photoshop®.

3.13.12 Contagem de esporos

Inoculou-se 1×10^5 conídios frescos das linhagens de *A. fumigatus* a serem testadas no centro da placa de Petri contendo meio completo YG sólido (seção 3.3.1.2). As placas foram incubadas durante 5 dias a 30 °C, 37 °C e 45 °C. O número de conídios foi avaliado por amostragem de quatro fragmentos de ágar de 0,5 cm² aleatoriamente distribuídos em cerca de um quarto do diâmetro das colônias de cada cepa. Cada fragmento de ágar foi depositado em um tubo de centrífuga contendo 10 mL de uma solução 0,01 % de tween 20 em água deionizada estéril. Para a separação dos conídios dos fragmentos de ágar os tubos de centrífuga foram incubados sobre agitação vigorosa por 10 minutos, a suspensão contendo os conídios foi filtrada utilizando Miracloth® (Millipore), e em seguida os conídios em suspensão foram contados utilizando câmara de Neubauer. Os resultados são a média \pm desvio padrão de quatro repetições independentes ($p \leq 0,01$).

3.13.13 Microscopia de polarização

Inoculou-se 1×10^6 conídios em placas de Petri de 30 mm contendo 2 mL de meio YG líquido (seção 3.3.1.2) e uma lamínula estéril no fundo. As placas foram incubadas a 37 e 45 °C por 2, 4, 6, e 8 horas. Cada placa foi retirada no seu tempo de incubação e realizou-se a contagem de 100 conídios de cada temperatura utilizando a microscopia de campo claro. Foram considerados conídios com crescimento polarizado aqueles que mostravam protuberância na superfície do esporo alterando sua forma redonda característica indicando a emissão de um tubo germinativo. Foram analisados 100 germinantes em cada experimento independente e os resultados apresentados representam média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

3.13.14 Determinação do número de protoplastos após a digestão parcial com Lallzyme MMX™

Para realização deste teste 2×10^6 conídios de cada linhagem foram inoculados em meio líquido YG (seção 3.3.1.2) por 16 horas a 180 rpm a 37 °C. 100 mg do micélio obtido foram incubados com o coquetel enzimático Lallzyme MMX™ (400 mg) numa reação de 50 mL da solução 3 de protoplastização (seção 3.8.7.3) contendo 400 mg de BSA por 0, 4 e 6 horas. Os protoplastos de cada tempo foram coletados, filtrados em lã de vidro estéril com auxílio de uma seringa e posteriormente diluídos para possibilitar a quantificação através da câmara de Neubauer. Os resultados apresentados representam média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes.

3.13.15 Extração de hidrofobinas dos conídios de *A. fumigatus*

As hidrofobinas foram extraídas a partir da superfície dos conídios dormentes por incubação de 2×10^8 conídios em tubos de micro centrífuga com ácido fluorídrico a 48 % (HF) durante 72 h a 4 °C, de acordo com a referência [143]. Conídios frescos de cada linhagem de *A. fumigatus* testada foram quantificados através da contagem em câmara de Neubauer, 2×10^8 conídios foram centrifugados a 9000 g durante 10 minutos, e posteriormente

ressuspendidos em HF 48 % durante 72 h a 4 °C, os conídios em solução com HF foram centrifugados (9000 g durante 10 minutos) e o sobrenadante obtido foi seco em atmosfera de N₂. O material seco foi reconstituído em 50 µL de água Milli-Q® e uma alíquota foi submetida a gel de SDS-PAGE 15 %. As bandas correspondentes a 16 kDa e 14,5 kDa RodA foram visualizadas por coloração com nitrato de prata de acordo com protocolo padrão. A quantidade de cada linhagem de conídio sujeita a extração com HF foi ainda validada pela contagem de CFU em placas de Petri contendo meio sólido YG, que foram incubadas por 24 horas a 37 °C.

3.13.16 Avaliação de distribuição de β(1,3) glucana e quitina em hifas de *A. fumigatus*

Para determinar a distribuição de β(1,3) glucanas, 2×10⁶ conídios de *A. fumigatus* foram incubados por 8 horas a 37 °C em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares de 13 mm estéreis e 1 mL de MM filtrado em membrana Miracloth® (Millipore) (para retirar resíduos que possam interferir na microscopia). Após o cultivo, as lamínulas contendo os germinantes aderentes foram irradiadas com luz UV para cessar o crescimento celular. Em seguida, as lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS 1 × estéril por 5 minutos à temperatura ambiente e então bloqueados com solução de bloqueio (seção 3.8.31) para microscopia por 30 minutos à temperatura ambiente, com leve agitação. Após esse período, foi adicionado à solução de bloqueio 1 µg/ml de Dectin-hFc (Invitrogen) e as linhagens foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente sob leve agitação. Em seguida, 20 µL de IgG1 de cabra conjugado com DyLight 594 (1:50, AbCam) foram adicionados às linhagens e incubados à temperatura ambiente por 1 hora sob leve agitação. Depois de marcadas, as lamínulas foram então lavadas uma vez em PBS 1 × e visualizadas em microscópio de fluorescência.

Para a marcação de quitina, 5×10⁶ conídios foram incubados por 8 horas a 37 °C em placas de Petri (60 mm x 15 mm) contendo 5 mL de MM (seção 3.3.1.1) filtrado em membrana Miracloth® (Millipore) (para retirar resíduos que possam interferir na microscopia). Após o cultivo, as lamínulas contendo os

germinantes aderentes foram irradiadas com luz UV, para cessar o crescimento celular, e em seguida tratados com 2 µg/mL de CFW por 5 minutos e posteriormente lavados com PBS 1 × estéril (seção 3.8.21).

As células marcadas em ambos os experimentos foram visualizadas utilizando microscópio de fluorescência Zeiss Observer.Z1 em objetiva de 100 × com imersão de óleo (EC Plan-Neofluar, abertura numérica 1.3) equipado com módulo de epifluorescência. As imagens em campo claro e em campo escuro de fluorescência foram capturadas com câmera AxioCan (Carl Zeiss), visualizadas e processadas com o programa Axio Vision versão 3.1. Para quantificar a fluorescência, foi utilizado o software ImageJ[®], de acordo com a descrição em Bom, de Castro [25].

3.13.17 Formação de biofilme

Para a quantificação da formação inicial de biofilme em *A. fumigatus*, 100 mL de MM líquido (seção 3.3.1.1) contendo 2×10^4 conídios foram adicionados a cada poço de uma placa de 96 poços e posteriormente incubados durante 24 horas a 37 °C em estufa. O meio de cultura foi removido com o auxílio de uma pipeta e os poços foram lavados 3 vezes com PBS 1 × (seção 3.8.21). Em seguida, 150 µL de solução de cristal violeta (0,5 %) foram adicionados a cada poço da placa e esta foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. A solução de cristal violeta foi removida com o auxílio de uma pipeta e o excesso da coloração foi removido suavemente com água Milli-Q[®] com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e, em seguida, cada poço da placa foi 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 ($\lambda = 575 \text{ nm}$) da solução de descoloração obtida após 16 horas de incubação. A leitura foi realizada utilizando um leitor de microplaca (Bio-rad). Os resultados apresentados representam médias \pm desvios padrões de quatro experimentos independentes.

3.13.18 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

A linhagem selvagem, $\Delta rlmA$ e complementante $\Delta rlmA::rlmA^+$ foram crescidas sem agitação em meio YG líquido durante 16 horas. As células foram processadas essencialmente como descrito anteriormente por Bom, de Castro [25] com modificações. Resumidamente, os micélios foram fixados em tampão 0,1 M de fosfato de sódio (pH 7,4) contendo 2,5 % de glutaraldeído (seção 3.8.30.1), durante 24 horas a 4 °C. As amostras foram encapsuladas em ágar 2 % e então submetidas à fixação (OsO₄ a 1 %) (seção 3.8.30.3) e posterior contrastação (1 % de acetato de uranila) (seção 3.8.30.4). Posteriormente as amostras foram desidratadas em um gradiente de etanol na seguinte sequência: etanol 30 % por 10 minutos à temperatura ambiente; etanol 50 % (v/v) 10 minutos à temperatura ambiente; etanol 70 % (v/v) 10 minutos à temperatura ambiente; etanol 90 % (v/v) 10 minutos à temperatura ambiente; etanol 95 % (v/v) por 10 minutos à temperatura ambiente; etanol 100 % por 20 minutos à temperatura ambiente; etanol 100 % por 20 minutos à temperatura ambiente; óxido de propileno 100 % por 10 minutos à temperatura ambiente; óxido de propileno 100 % por 10 minutos à temperatura ambiente, seguidas de um processo de infiltração de duas etapas com óxido de propileno/Embed 812 (*Electron Microscopy Sciences*) de 16 e 3 horas à temperatura ambiente. Uma infiltração adicional foi fornecida sob vácuo à temperatura ambiente antes da incorporação em cápsulas BEEM (*Electron Microscopy Sciences*) e a polimerização a 60 °C durante 72 h. Cortes semifinos (0,5 µm) foram corados com azul de toluidina para identificar as áreas de melhor densidade celular. Seções ultrafinas (60 nm) foram preparadas e novamente contrastadas com acetato de uranila 1 % e citrato de chumbo 2 %. As imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) foram obtidas utilizando um microscópio eletrônico Philips CM-120 a uma tensão de aceleração de 120 kV usando uma câmera MegaView3 na versão 5.0 do software (Olympus *Imaging Solutions GmbH*). Espessuras da parede celular de 100 seções de diferentes germinantes foram medidas utilizando o software ImageJ[®]. Valores de média ± desvio padrão são apresentados.

3.13.19 Microscopia eletrônica de varredura (SEM) de conídios de *A. fumigatus*

Para a realização deste experimento os conídios foram crescidos em placas de Petri contendo meio completo sólido YG (seção 3.3.1.2) por 48 horas a 37 °C, estes foram coletados através de uma fita de carbono, fixados em um porta amostra metálico, e em seguida, recobertos por *sputtering* com uma fina camada de ouro para condução elétrica da amostra. A análise foi realizada no microscópio eletrônico de varredura *Inspect S 50* (FEI).

3.13.20 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de microdiluição

Para a determinação da CIM as linhagens foram inoculadas na concentração de 1×10^5 em placas de 96 poços contendo meio líquido YG (seção 3.3.1.2), a concentração indicada da droga testada e/ou 10 % de *Alamar blue*[™]. Estas placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas A CIM foi determinada por meio da concentração de droga que impediu o crescimento total do fungo. Os resultados apresentados representam médias \pm desvios padrões de pelo menos três experimentos independentes. Este protocolo foi realizado de acordo com a norma M38-A com pequenas modificações.

3.13.21 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pela técnica de *Etest*

Para a realização do *Etest* 1×10^6 conídios das linhagens foram semeados com o auxílio da alça de Drigalski em placa de Petri contendo 20 mL do meio RPMI sólido (seção 3.3.1.4) previamente preparado. Após o inóculo foi necessário aguardar 15 minutos para que a superfície do meio RPMI estivesse completamente seca. Em seguida, a fita de *Etest* foi aplicada na superfície do meio conforme indicado pelo fabricante. As placas foram inoculadas a 37 °C por 30 horas e a CIM foi determinada por meio da elipse de inibição formada. Os resultados apresentados representam pelo menos três experimentos independentes.

3.13.22 Teste de sensibilidade pela técnica de *drop-out*

Para a realização da técnica de *drop-out* as linhagens foram crescidas em meio completo sólido YG (seção 3.3.1.2) por 48 horas a 37 °C. Conídios das linhagens foram coletados em água Milli-Q[®] autoclavada e em seguida filtrados em membrana Miracloth[®] (Millipore). Após a filtração, as amostras foram diluídas e quantificadas utilizando a contagem em câmara de Neubauer. Após a contagem estas foram diluídas sucessivamente nas concentrações de 2×10^7 , 2×10^6 , 2×10^5 , 2×10^4 . A seguir, 5 μ L de cada uma das soluções foram pipetadas em placa de Petri contendo o meio apropriado, com a droga determinada para cada experimento respeitando a ordem decrescente de diluição. Em seguida, as placas foram incubadas a 37 °C por 24-48 horas. Após esse tempo os resultados foram analisados e as placas fotografadas para montagem dos painéis utilizando o programa Adobe Photoshop[®].

3.13.23 Teste de sensibilidade ao peróxido de hidrogênio

Para a observação do halo de inibição formado devido à sensibilidade ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2), este composto foi inoculado no orifício que ocupava o centro da placa de Petri e os conídios foram inoculados pela técnica de *pour plate* conforme descrito em Valiante, Heinekamp [30]. Para tanto, nas placas de Petri foram inicialmente colocados 20 mL do meio sólido YG (seção 3.3.1.2) e em seguida, os conídios foram misturados com 15 mL de meio top ágar YG (seção 3.3.1.2) que foi homogeneizado delicadamente por inversão e então colocado sobre o meio sólido na placa de Petri. No meio top ágar, foi feito um orifício de 0,5 cm², e neste orifício foram adicionados 100 μ L de H_2O_2 3 %. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas, o halo de sensibilidade foi medido, e posteriormente as placas foram fotografadas para montagem dos painéis utilizando o programa Adobe Photoshop[®].

3.13.24 Curva de sobrevivência após exposição a diferentes temperaturas

Para realização deste teste, 200 conídios de cada linhagem foram semeados em placa de Petri contendo meio YG sólido (seção 3.3.1.2) com o

auxílio da alça de Drigalski. As placas de Petri contendo os conídios foram expostas às temperaturas de 45 e 50 °C por 12 e 24 horas em estufa [144]. Em seguida as placas (tratadas e não tratadas) foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas para a recuperação do crescimento. O percentual de sobrevivência foi obtido pela contagem das CFU nas placas tratadas pelo calor em relação ao controle não tratado. Os resultados apresentados representam média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

3.13.25 Ensaio de atividade Lux em *A. fumigatus*

Para a avaliação da função de RlmA na ativação de alvos transcricionais conhecidos foi construído um cassete clonado no plasmídeo denominado pNB04 contendo as regiões 5' e 3' flanqueadoras do gene *pyrG* de *A. fumigatus* para a substituição do locus *pyrG* na linhagem recipiente. Na construção, o gene repórter luciferase (*mLuc*) foi clonado *in frame* com a região promotora do gene e *agsA* (α -glucana sintase) de *A. niger* [145]. Neste promotor estão presentes três *motifs* de reconhecimento RlmA (3xRlm-box) em *tandem*. Junto ao gene *mLuc*, está a região de terminação do gene *trpC* de *A. nidulans*. O gene de resistência à higromicina foi utilizado como marcador e está flanqueado pelas regiões promotoras e de terminação do gene *GpdA* de *A. nidulans*, conforme mostrado na figura 7. O fragmento de DNA NotI-KpnI de pNB04 (*PagsA*::cassete *mLuc*) foi introduzido na linhagem selvagem de *A. fumigatus* (\DeltaakuB^{KU80}) e na linhagem $\Delta rlmA$. As linhagens resultantes foram nomeadas como MAF 6.6 (wt; *PagsA*::*mLuc*) e MAF 8.1 ($\Delta rlmA$; *PagsA*::*mLuc*).

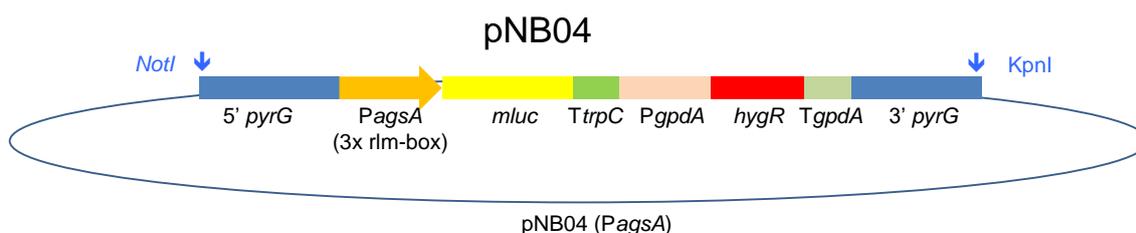


Figura 7: Construção da cassete *PagsA*::*mLuc*. O plasmídeo pNB04 contém a sequência da região do promotor *AgsA* de *A. niger* incluindo domínio de reconhecimento de 3x rlm clonado a jusante do gene repórter de luciferase (*mLuc*). O gene de resistência à higromicina foi utilizado como marcador dominante e é cercado pelo promotor da *gpdA* de *A. nidulans* e da região de terminação. O plasmídeo contém a região 5' e 3' do gene *pyrG* de *A. fumigatus* para impulsionar a integração homóloga no locus *pyrG*.

A atividade luciferase foi medida em DO_{600nm} durante a incubação da linhagem de *A. fumigatus* na linhagem controle (\DeltaakuB^{KU80} reporter lux) com a água deionizada e as linhagens MAF 6.6 (wt; *PagsA::mLuc*) MAF 8.1 (\DeltarlmA ; *PagsA::mLuc*) na presença de 5-40 $\mu\text{g/mL}$ de CFW após 15 h de incubação. Os resultados foram normalizados pelo número de conídios ($1,5 \times 10^4$ por ensaio).

3.13.26 Extração e quantificação do ergosterol das linhagens de *A. fumigatus* por HPLC-UV

A linhagem selvagem e as linhagens mutantes de *A. fumigatus* foram inoculadas em 50 mL de MM líquido (seção 3.3.1.1) (1×10^6 conídios) e cultivadas a 37 °C na rotação constante de 180 rpm. Os micélios foram recolhidos após 48 horas de incubação e separados por filtração sob pressão reduzida e lavados com água destilada. Os micélios foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido, liofilizados e armazenados a -80 °C. 20 mg de micélios foram utilizados para a extração com 50 mL de metanol em banho de ultrassom durante 30 minutos à temperatura constante de 45 °C. Subsequentemente, a mistura foi centrifugada à 13000 g durante 5 minutos, filtrada em filtros de 0,45 μm e 10 μL de amostras de cada fração foram injetados para análise por HPLC-UV. As extrações e análises foram realizadas em quadruplicata.

O sistema de HPLC utilizado para as análises cromatográficas consistiu de um módulo de separação (Waters Alliance 2695), equipado com um software MassLynx 4.1 v (Waters) compreendendo uma bomba quaternária, um desgaseificador a vácuo em linha e um detector de arranjo de fotodiodos. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna Phenyl-hexyl (250 mm x 4 mm, 5 mm, Phenomenex) usando um gradiente de eluição linear de B: acetonitrila e A: água, ambos suplementados com ácido fórmico a 0,1 % a partir de 80 % a 100 % ao longo de 20 minutos. A coluna foi equilibrada em 80 % de B durante 5 minutos antes do início da próxima sequência de injeção. O fluxo da fase móvel foi de 0,5 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e a temperatura da coluna foi fixada

em 40 °C. O pico de ergosterol foi identificado com base no tempo de retenção detectado em $\lambda = 282$ nm. A curva padrão foi obtida por análise de soluções padrão com o método LC-UV otimizado em 7 concentrações, variando de 1 a 0,0156 mg. mL⁻¹ (1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,0312; 0,0156 mg.mL⁻¹) e traçando a área correspondente em função da concentração do ergosterol, um coeficiente de correlação > 0,99 foi obtido. Picos cromatográficos foram posteriormente integrados utilizando o software MassLynx v 4.1 (Waters) e posteriormente analisados no software Microsoft Excel®.

3.13.27 Extração e quantificação de gliotoxina por UPLC-MS/MS

Para a análise da produção de gliotoxina, 1×10^7 conídios da linhagem selvagem e das linhagens mutantes foram inoculados em 50 mL de meio mínimo Czapek-Dox líquido em frascos de *erlenmeyer* de 250 mL. As culturas foram mantidas a 28 °C (180 rpm) durante sete dias, como descrito anteriormente [27]. A extração foi feita duas vezes com 30 mL de acetato de etila. As fases orgânicas combinadas foram secas com sulfato de sódio, e o solvente foi removido sob pressão reduzida. As amostras foram redissolvidas em 1 mL de metanol e a concentração de gliotoxina foi medida por UPLC-MS/MS. Foi utilizado um sistema de ultra alto desempenho Acquity acoplado a um espectrômetro de massa Q triplo quadrupolo (Waters). A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna C18 ACQUITY (1,7 mm) (Waters) e a fase móvel foi composta por A: água contendo 0,1 % de ácido fórmico e B: acetonitrila contendo ácido fórmico a 0,1 %. O gradiente foi: 0 - 0,1 min, 20 % de B; 0,1 - 6 min: linear de 20 a 30 % B; 6-7 min: 98 % B; 7,1 min retorno às condições iniciais. O fluxo da fase móvel foi ajustado para 0,4 mL.min⁻¹ e o volume injetado foi de 10 µL. A Gliotoxina foi detectada no modo de ionização por *electrospray* negativo e a aquisição foi realizada em múltiplas reações de monitorização. Os parâmetros do espectrômetro de massa foram os seguintes: tensão capilar 3,5 kV; cone de tensão de 20 V; extrator tensão 3V; temperatura da fonte, 150 °C; temperatura de solvatação, 400 °C; e solvatação do fluxo de gás, de 600 L/h. Nitrogênio seco foi utilizado como gás de nebulização e de solvatação e o argônio foi utilizado como gás de colisão. *Interchannel* e *interscan*

delay foram de 0,01 e 0,03 s, respectivamente. Todos os dados foram obtidos e processados usando software MassLynx v 4.1 (Waters). O padrão gliotoxina foi adquirido da Sigma Aldrich (34860) e utilizado para confirmar o tempo de retenção do padrão de fragmentação e de gliotoxina nos sobrenadantes de cultura da linhagem selvagem e das linhagens mutantes.

3.13.28 Identificação, quantificação e isolamento das Fqs

Para isolamento das Fqs a linhagem selvagem foi crescida em 50 placas de Petri (90 mm) com meio sólido YG (seção 3.3.1.2) por 5 dias a 37 °C. Para a quantificação das Fqs nas linhagens testadas as mesmas condições foram utilizadas, e nesta condição não foram observadas diferenças na conidiação das linhagens. Após o crescimento de 5 dias, o ágar foi cortado em pedaços de ~1cm², recolhido para um *erlenmeyer* e as Fqs extraídas de acordo com o método de micro extração desenvolvido por Smedsgaard [146]. O solvente de extração foi uma mistura de MeOH-CH₂Cl₂-EtOAc (1:2:3 v/v/v). Os extratos obtidos foram secos para se obter o extrato bruto (351,0 mg). Inicialmente, visando uma pré-purificação de extratos, um fracionamento cromatográfico foi realizado utilizando sílica como fase estacionária e a seguinte ordem de solventes de eluição: diclorometano (100 %); acetato de etilo (100 %); mistura de acetato de etilo:metanol 1:1 e finalmente metanol (100 %). Após evaporação até à *secura*, a fração de acetato de etilo contendo Fqs foi purificada por HPLC preparativa utilizando uma coluna Phenomenex (21,2 x 250 mm, 10 µm) com uma eluição de gradiente de acetonitrilo-H₂O a partir de 20 % a 60 % ao longo de 60 minutos a 10 mL.min⁻¹ de taxa de vazão. O rendimento da secagem a vácuo da FqC foi de 1,1 mg e da FqD foi de 1,0 mg, e foram ainda utilizados como padrões externos para a quantificação. Experimentos 1H e 13C RMN foram registados num espectrômetro Bruker Avance-600 MHz com clorofórmio deutério (CDCl₃) como solvente e TMS como padrão interno. Para fins de determinação da Fq, foi utilizado um sistema de LC de alto desempenho Acquity acoplado a um espectrômetro de massa Quatro Micro triplo quadrupolo de Waters. MS foi operado em ESI⁻ no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM), utilizando o [M-H]⁻ íons como os íons precursores. As

configurações para MRM foram FqC, TR 4,9 min, um precursor de m/z 442,2 e fragmentos de m/z 145,0 e m/z 240,2 (energia de colisão, 30 eV). Para FqD, RT 4,7 min, e as mesmas transições foram monitorizadas. Parâmetros de massa foram otimizados como fonte de temperatura 150 °C, voltagem capilar, 4,5 kV; cone de tensão de 15 V; extrator tensão 3V; temperatura de solvatação, 400 °C; dessolvatação do fluxo de gás, de 600 L/h. *Interchannel* e *interscan delay* foram de 0,01 e 0,03 s, respectivamente. A curva de calibração para FqC e FqD foi obtida por análise de soluções padrão dos metabólitos validados por RMN com sete concentrações: 250; 125; 62,5; 31,3; 15,6, 7,8, 3,9 µg/mL. Todos os dados foram obtidos e processados usando software MassLynx v 4.1[®] (Waters).

3.13.29 Análise de absorção de nutrientes a partir do pulmão murino

Para realização deste experimento 1×10^7 conídios foram inoculados em explantes de pulmão fresco de camundongos. O tecido pulmonar foi recortado com bisturi e depositado sobre uma placa de Petri contendo agarose 1 % estéril. Como controle foram utilizadas culturas das linhagens contadas em placas de Petri contendo o meio YPD (seção 3.3.3.1). As placas de Petri contendo os pulmões e a placa contendo meio YPD (seção 3.3.3.1) foram incubadas a 37 °C por 72 horas e analisadas diariamente. As imagens foram obtidas após 24 horas de crescimento. Os resultados apresentados são representativos de três experimentos independentes.

3.13.30 Preparação de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs), índice de fagocitose, determinação da concentração de TNF- α

Para a determinação da citocina e determinação do índice de fagocitose, os macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) dos camundongos C57BL/6 foram preparados conforme descrito anteriormente [147]. Em resumo, as células da medula óssea do fêmur de ratos adultos foram cultivadas durante 6 dias em meio de cultura RPMI 1640 contendo 20 % de soro fetal bovino (FBS) e 30 % de meio condicionado celular L-929 (LCCM).

Em resumo, incubaram-se 2×10^4 macrófagos com 1 mL do meio de cultura RPMI-FBS a 37 °C com 5 % de CO₂ durante 1 hora em uma placa de 24 poços contendo uma lamínula de 15 mm de diâmetro por poço. Em seguida, as células foram lavadas com 1 mL do meio de cultura para remover células não aderentes. Em cada poço, adicionou-se 1 mL de RPMI-FBS contendo 1×10^5 conídios (razão macrófagos/conídios 1:5). As amostras foram incubadas a 37 °C e 5 % de CO₂ durante 80 minutos, e após a incubação o sobrenadante foi removido e foram adicionados 500 µL de formaldeído a 3,7 % PBS 1 x. Após 15 minutos, as amostras foram lavadas com 1 mL de água ultrapura e incubadas durante mais 20 minutos com 495 µL de água e 5 µL de CFW (10 mg/mL). As amostras foram lavadas e montadas em lâminas. Um microscópio de fluorescência Zeiss *Observer Z1* foi utilizado para avaliar a porcentagem de conídios fagocitados. Como as células de macrófagos não são permeáveis ao CFW, apenas os conídios internalizados permaneceram não marcados e portanto não emitem fluorescência. Pelo menos 100 conídios foram contados por amostra e foi calculado um índice de fagocitose.

Para as medidas de TNF- α , os macrófagos (5×10^5) foram plaqueados em placas de 48 poços durante 16 horas a 37 °C, 5 % de CO₂ em meio RPMI contendo 10 % de FBS e 5 % de LCCM. Para as infecções fúngicas, as cepas foram cultivadas em meio líquido durante 18 horas até um estágio de hifas com uma densidade de 2×10^4 conídios por poço, e depois foram irradiadas por UV e utilizadas para estimular as BMDMs. Após a infecção, as células foram centrifugadas para sincronizar a infecção, deixadas em repouso durante 18 horas. O sobrenadante foi recolhido e a citocina foi medida por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) com um kit de TNF- α de rato (R & D *Quantikine* ELISA) de acordo com as instruções do fabricante. Para o controle positivo, utilizou-se 1 µg / ml de LPS de *E. coli* (Sigma Aldrich).

3.13.31 Análise da fagocitose de conídios de *A. fumigatus* pela ameba de vida livre *Dictyostelium discoideum*

D. discoideum foi cultivado em placas de Petri durante 16 horas a 22 °C em HL5 suplementado com sulfato de estreptomicina (300 µg/mL). Após o

cultivo as placas foram lavadas com meio HL5 e o material obtido foi centrifugado durante 5 minutos a 3200 g. O sobrenadante foi descartado e as células sedimentadas foram ressuspensas em 3 mL de meio HL5 fresco. A densidade de células de *D. discoideum* foi determinada pela contagem das células em um hemócito como descrito em <http://dictybase.org/>.

3.13.31.1 Co-incubação

Conforme descrito por Hillmann, Novohradská [148], 10 conídios por célula de *D. discoideum* (diferentes multiplicidades de infecção - MOIs) foram utilizados para a co-incubação. As células *D. Discoideum* (10^5) e os conídios (10^6) foram adicionados a uma placa de seis poços, a qual foi incubada a 22 °C durante 5 horas. Foram contadas 50 células de *D. discoideum*, analisando a fagocitose dos conídios. Para verificar a cinética de fagocitose, as células de *D. discoideum* foram analisadas a cada hora, até completar cinco horas.

3.13.31.2 Avaliação da sobrevivência dos conídios pós fagocitose por *D. discoideum*

Após 5 horas de incubação, os poços contendo a co-incubação foram lavados com meio HL5 durante 6 vezes e a placa foi incubada a 45 °C durante 10 minutos para inativar as células de *D. Discoideum*. Em seguida 500 µL de água destilada foram adicionados à placa, e removeram-se 100 µL para diluição em série. Uma alíquota de 100 µL de cada diluição foi plaqueada em MM com o auxílio da alça de Drigalski e a placa foi incubada a 37 °C durante aproximadamente 36 horas. Após a incubação contou-se as colônias sobreviventes que foram expressas em CFU.

3.13.32 Análise da virulência do mutante $\Delta rImA$ em modelo murino neutropênico de aspergilose pulmonar invasiva

A virulência das cepas de *A. fumigatus* foi analisada utilizando um modelo murino para aspergilose invasiva, conforme detalhado anteriormente

[137]. Fêmeas da linhagem BALB/c, peso corporal, 20 a 22 g foram alojadas em gaiolas ventiladas contendo 10 animais. Os camundongos foram imunossuprimidos a partir do regime com ciclofosfamida (150 mg/kg de peso corporal), administrado por via intraperitoneal nos dias -4, -1 e +2 da infecção e acetato de hidrocortisona (200 mg/kg) injetado subcutaneamente no dia -3 da infecção. Os conídios de *A. fumigatus* utilizados para inoculações foram cultivados em meio sólido YG durante 2 dias antes da infecção. Os conídios foram recém colhidos em PBS e filtrados usando Miracloth[®] (Millipore). As suspensões de conídios foram centrifugadas durante 5 minutos a 3000 g, lavadas 3 vezes com PBS 1 x, contadas usando um hemocítmetro e ressuspensas a uma concentração de $2,5 \times 10^6$ conídios/mL. As contagens viáveis dos inóculos administrados foram determinadas pela determinação da CFU após diluição em série do inóculo cultivado em meio sólido YG a 37 °C. Para a infecção os camundongos foram anestesiados por inalação de halotano e foram infectados através de instilações intranasais de $5,0 \times 10^4$ conídios em 20 µL de PBS. Para o controle negativo, um grupo de 10 animais recebeu apenas PBS estéril. Os animais foram pesados a cada 24 horas a partir do dia da infecção e inspecionados visualmente duas vezes ao dia. Na maioria dos casos, o ponto final para a experimentação de sobrevivência foi identificado quando foi registrada uma redução de 20 % no peso corporal, momento em que os camundongos foram sacrificados. A significância estatística dos valores de sobrevivência comparativa foi calculada por análise de Log-rank utilizando-se o *software* de análise estatística Prisma[®]. Este estudo e os protocolos envolvendo cuidados com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética Local para Experimentos com Animais da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar (Número de Permissão: Protocolo CEEA nº 062/2009). Todos os animais foram alojados em grupos de 10 de gaiolas ventiladas individualmente, em estrita conformidade com os princípios delineados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal [Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório - SBCAL (anteriormente COBEA - Colégio Brasileiro De Experimentação Animal)]. Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento. Os animais foram monitorados clinicamente pelo menos duas vezes ao dia e sacrificados humanamente se moribundos (conforme definido

por letargia, dispneia, hipotermia e perda de peso). Todos os animais estressados foram sacrificados por deslocamento cervical.

3.13.33 Análises de ChIP-qPCR

3.13.33.1 ChIP-qPCR utilizando a resina GFP-Trap[®]

Para as análises de ChIP-qPCR as linhagens de *A. fumigatus* utilizadas contendo o fator de transcrição de interesse fusionado na porção C-terminal com a GFP foram crescidas em condições pré-estabelecidas de cada experimento. Ao final da incubação o micélio foi transferido para o tampão de *cross-linking* (seção 3.8.28.1) e incubado a 30 °C por 20 minutos a 100 rpm. Após os 20 minutos, foi adicionada glicina na concentração de 125 mM (seção 3.8.28.2) e a amostra foi incubada a 30 °C por 10 minutos a 100 rpm para parar a reação de *cross-linking*. O micélio foi coletado com o auxílio de uma bomba a vácuo, lavado com água deionizada e submetido ao congelamento instantâneo com nitrogênio líquido. Até o momento da lise física por ultrassom, o micélio foi armazenado em freezer a -80 °C.

Para romper a parede celular do fungo, os micélios congelados foram triturados em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e pistilo até a obtenção de um pó fino e uniforme. O micélio foi transferido para um tubo de centrífuga de fundo triangular de 50 mL (a quantidade de micélio adicionada foi o suficiente para ocupar o espaço do fundo triangular do tubo), posteriormente foi adicionado CLB (seção 3.8.28.3) em quantidade suficiente para que a suspensão micélio + CLB (seção 3.8.28.3) não ficasse muito fluída nem muito viscosa, cerca de 6 mL. A suspensão foi agitada vigorosamente por 30 segundos, e após foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente e 10 minutos no gelo. Após a incubação 2 mL desta suspensão foram transferidos para um tubo de centrífuga de 15 mL, e a amostra sofreu lise física por ultrassom com intensidade de 40 % com ciclos de 30 segundos ON e 30 segundos OFF, em banho de gelo. O tempo total de lise foi de 30 minutos, sendo que a cada 10 minutos a reação foi interrompida para a adição de gelo, de forma a manter sempre uma baixa temperatura da amostra durante a lise.

Após a lise física por ultrassom, as amostras foram centrifugadas a 10000 g por 5 minutos, a 4 °C, e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. 60 µL do sobrenadante foram transferidos para um tubo de micro centrífuga para a realização do *reverse cross-linking* para avaliação da eficiência da lise.

Para o *reverse cross-linking* foi adicionado 60 µL da amostra lisada a 140 µL do tampão de eluição preparado no momento do uso e a amostra foi incubada no banho seco a 65 °C por 16 horas. No dia seguinte a amostra foi tratada com 2,5 µg de RNase A (Qiagen) à temperatura ambiente por 60 minutos e o DNA foi purificado utilizando kit de purificação (GE Healthcare), conforme a recomendação do fabricante. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose para avaliação da eficiência da lise. Os fragmentos de DNA deveriam estar entre 200 e 600 pares de base no máximo.

Para a imunoprecipitação foram utilizados 20 µL da resina GFP-Trap[®] por amostra. A resina foi homogeneizada sob agitação vigorosa e posteriormente transferida para um tubo de micro centrífuga. A resina foi equilibrada no CLB (seção 3.8.28.3) antes da incubação, para isto foram adicionados 400 µL de CLB (seção 3.8.28.3) a cada tubo de micro centrífuga contendo 20 µL da resina e ela foi centrifugada a 5000 g por 30 segundos. Este procedimento foi repetido por 3 vezes, a temperatura ambiente. 1 mL do DNA lisado foi adicionado à resina previamente equilibrada, e incubado a 4 °C sob leve rotação utilizando o HulaMixer[®] Sample Mixer. Após a incubação, a resina foi lavada novamente por 3 vezes com o tampão CLB (seção 3.8.28.3) conforme descrito anteriormente.

O DNA foi eluído da resina GFP-Trap[®] utilizando 50 µL do tampão de eluição (seção 3.8.28.5) preparado no momento do uso, e este foi incubado a 65 °C por 10 minutos. A seguir a amostra foi centrifugada a 5000 g por 30 segundos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de micro centrífuga. Uma segunda eluição foi realizada adicionando-se novamente 50 µL do tampão de eluição à resina GFP-Trap[®] ligada ao DNA, esta eluição foi realizada por 16 horas a 65 °C, e o sobrenadante após centrifugação a 5000 g por 30 segundos foi transferido para o tubo de micro centrífuga que continha a amostra da primeira eluição. As amostras foram incubadas a 65 °C por 16 horas conforme descrito acima, para o *reverse cross-linking*, e no dia seguinte

após o *reverse cross-linking* elas foram submetidas à digestão com RNase A e o DNA foi posteriormente purificado utilizando o kit de purificação de DNA de acordo com as recomendações do fabricante. O volume final de eluição do DNA foi de 30 µL. Para cada reação de RT-qPCR foi utilizado 0,4 µL do DNA eluído.

3.13.33.2 CHIP-qPCR utilizando *Dynabeads protein A*[®] (Thermo Scientific, 10001D)

Para as análises de CHIP-qPCR as linhagens de *A. fumigatus* utilizadas contendo o fator de transcrição de interesse fusionado na porção C-terminal com o epítipo 3xFLAG foram crescidas em condições pré-estabelecidas de cada experimento. Ao final da incubação o micélio foi transferido para o tampão de *cross-linking* (seção 3.8.28.1) e incubado a 30 °C por 20 minutos a 100 rpm. Após os 20 minutos, foi adicionada glicina na concentração de 125 mM (seção 3.8.28.2) e a amostra foi incubada a 30 °C por 10 minutos a 100 rpm para parar a reação de *cross-linking*. O micélio foi coletado com o auxílio de uma bomba a vácuo, lavado com água deionizada e submetido ao congelamento instantâneo com nitrogênio líquido. Até o momento da sonicação, o micélio foi armazenado em freezer a -80 °C.

Para romper a parede celular do fungo, os micélios congelados foram triturados em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e pistilo até a obtenção de um pó fino e uniforme. O micélio foi transferido para um tubo de centrífuga de fundo triangular de 50 mL (a quantidade de micélio adicionada foi o suficiente para ocupar o espaço do fundo triangular do tubo), posteriormente foi adicionado CLB (seção 3.8.28.3) em quantidade suficiente para que a suspensão micélio + CLB (seção 3.8.28.3) não ficasse muito fluída nem muito viscosa, cerca de 6 mL. A suspensão foi agitada vigorosamente por 30 segundos, e após foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente e 10 minutos no gelo. Após a incubação 2 mL desta suspensão foram transferidos para um tubo de centrífuga de 15 mL, e a amostra sofreu lise física por ultrassom com intensidade de 40 % com ciclos de 30 segundos ON e 30 segundos OFF, em banho de gelo. O tempo total de lise foi de 30 minutos, sendo que a cada 10 minutos a reação foi interrompida para a adição de gelo, de forma a manter sempre uma baixa temperatura da amostra durante a lise.

Após a lise física por ultrassom, as amostras foram centrifugadas a 10000 g por 5 minutos, a 4 °C, e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. 60 µL do sobrenadante foram transferidos para um tubo de micro centrífuga para a realização do *reverse cross-linking* para avaliação da eficiência da lise.

Para o *reverse cross-linking* foi adicionado 60 µL da amostra lisada a 140 µL do tampão de eluição (seção 3.8.28.5) preparado no momento do uso e a amostra foi incubada no banho seco a 65 °C por 16 horas. No dia seguinte a amostra foi tratada com 2,5 µg de RNase A (Qiagen) à temperatura ambiente por 60 minutos e o DNA foi purificado utilizando kit de purificação (GE Healthcare), conforme a recomendação do fabricante. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose para avaliação da eficiência da lise. Os fragmentos de DNA deveriam estar entre 200 e 600 pares de base no máximo.

Para a imunoprecipitação foram utilizados 20 µL da resina *Dynabeads protein A*[®] por amostra. A resina foi homogeneizada sob agitação vigorosa e posteriormente transferida para um tubo de micro centrífuga. A resina foi equilibrada por 5 minutos a 4 °C no CLB (seção 3.8.28.3) antes da incubação, para isto foram adicionados 500 µL de CLB (seção 3.8.28.3) a cada tubo de micro centrífuga contendo 20 µL da resina, estas foram posteriormente incubadas a 4 °C sob leve rotação utilizando o HulaMixer[®] Sample Mixer, a resina foi acoplada a *DynaMag*[™] magnet rack, e o sobrenadante foi removido com o auxílio de uma micropipeta. Este procedimento foi repetido por duas vezes. Em seguida 3 µL do anticorpo anti FLAG (Sigma Aldrich, F1804) diluído em 100 µL da solução de bloqueio (seção 3.8.28.4), esta solução foi adicionada à *Dynabeads protein A*[®] e estes foram posteriormente incubados por 16 horas a 4 °C sob leve rotação utilizando o HulaMixer[®] Sample Mixer. Após a incubação a resina foi lavada por 5 minutos a 4 °C no CLB (seção 3.8.28.3), para isto foram adicionados 500 µL de CLB (seção 3.8.28.3) a cada tubo de micro centrífuga contendo 20 µL da resina ligado ao anticorpo anti FLAG e, estes foram posteriormente incubados a 4 °C sob leve rotação utilizando o HulaMixer[®] Sample Mixer, a resina foi acoplada a *DynaMag*[™] magnet rack, e o sobrenadante foi removido com o auxílio de uma micropipeta. Este procedimento foi repetido por 3 vezes. Imediatamente, após a lavagem 1 mL do lisado foi adicionado à resina, e incubado a 4 °C por 16 horas sob leve

rotação utilizando o HulaMixer® Sample Mixer. Após a incubação, a resina foi lavada novamente por 3 vezes com o tampão CLB (seção 3.8.28.3) conforme descrito anteriormente.

O DNA foi eluído da resina *Dynabeads protein A*® utilizando 50 µL do tampão de eluição (seção 3.8.28.5) preparado no momento do uso, e este foi incubado a 65 °C por 10 minutos. A seguir a amostra foi acoplada a *DynaMag*™ magnet rack, e o sobrenadante foi removido com o auxílio de uma micropipeta. Uma segunda eluição foi realizada adicionando-se novamente 50 µL do tampão de eluição à resina ligada ao DNA, esta eluição foi realizada por 16 horas a 65 °C, após a eluição a amostra foi acoplada a *DynaMag*™ magnet rack, e o sobrenadante foi removido com o auxílio de uma micropipeta. As amostras foram incubadas a 65 °C por 16 horas conforme descrito acima, para o *reverse cross-linking*, e no dia seguinte após o *reverse cross-linking* elas foram submetidas à digestão com RNase e o DNA foi posteriormente purificado utilizando o kit purificação de DNA de acordo com as recomendações do fabricante. O volume final de eluição do DNA foi de 30 µL. Para cada reação de RT-qPCR foi utilizado 0,4 µL do DNA eluído.

3.13.34 Experimentos de imunoprecipitação

3.13.34.1 Imunoprecipitação utilizando *Dynabeads protein A*® (Thermo Scientific, 10001D)

Para a realização dos experimentos de Co-IP da linhagem MpkA 3×HA e PkcA 3×HA as imunoprecipitações foram realizadas utilizando *Dynabeads protein A*®. As proteínas foram extraídas conforme protocolo descrito (seção 3.14.37) utilizando o tampão B250 (seção 3.8.29.2), e estas foram posteriormente quantificadas pelo método de Lowry modificado (seção 3.13.38). A imunoprecipitação foi realizada no mesmo dia em que as proteínas foram extraídas para evitar a ação de proteases. Para a imunoprecipitação as *Dynabeads protein A*® foram ressuspensas por 30 segundos sob agitação vigorosa. 20 µL das *Dynabeads protein A*® foram transferidos para um tubo de micro centrífuga. O tubo de micro centrífuga foi acoplado à *DynaMag*™ magnet

rack, e o sobrenadante foi removido com o auxílio de uma micropipeta. Posteriormente, o tubo de micro centrífuga foi removido da *DynaMag™ magnet rack* e foi adicionada às *Dynabeads protein A®* uma solução PBS tween 20 0,01 %, contendo 5 µL do anticorpo anti HA (Sigma Aldrich, H3663). As *Dynabeads protein A®* na suspensão de PBS tween 20 0,01 % + anticorpo anti HA foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente sob baixa rotação utilizando HulaMixer® Sample Mixer. Após os 30 minutos de incubação, as *Dynabeads protein A®* foram novamente acopladas à *DynaMag™ magnet rack*, e o sobrenadante foi removido com o auxílio de uma micropipeta, o tubo de micro centrífuga foi removido da *DynaMag™ magnet rack* e as *Dynabeads protein A®* foram gentilmente lavadas em 200 µL da solução PBS tween 20 0,01 % vertendo o tubo de micro centrífuga. As *Dynabeads protein A®* foram novamente acopladas a *DynaMag™ magnet rack*, o sobrenadante foi removido com o auxílio de uma micropipeta. O tubo de micro centrífuga foi removido da *DynaMag™ magnet rack* e as *Dynabeads protein A®* foram ressuspensas em 50 µL do tampão B250 e, em seguida 40 mg de proteína total (contido em cerca de 10 mL) foram adicionados à suspensão de *Dynabeads protein A®* contidas em 50 µL do tampão B250 (seção 3.8.29.2) em tubo de centrífuga de fundo triangular de 15 mL. O material foi incubado por 2 horas e 30 minutos a 4 °C sob baixa rotação utilizando HulaMixer® Sample Mixer para a imunoprecipitação. Após a incubação, as *Dynabeads protein A®* + 50 µL do tampão B250 (seção 3.8.29.2) + 40 mg de proteínas foram acopladas à *DynaMag™ magnet rack*, e o sobrenadante foi removido com o auxílio de uma micropipeta. As *Dynabeads protein A®* foram gentilmente lavadas em 400 µL do tampão B250 (seção 3.8.29.2) por 3 vezes vertendo delicadamente o tubo de micro centrífuga, sendo que entre cada lavagem as *beads* eram acopladas à *DynaMag™ magnet rack*, e o sobrenadante removido com o auxílio de uma micropipeta. Na última lavagem as *Dynabeads protein A®* + tampão B250 (seção 3.8.29.2) foram transferidas para um novo tubo de micro centrífuga para evitar possíveis contaminações. As *Dynabeads protein A®* foram acopladas à *DynaMag™ magnet rack*, o sobrenadante foi removido com o auxílio de uma micropipeta e as *Dynabeads protein A®* foram ressuspensas em 20 µL do tampão de *Laemmli 2x*, DTT 0,1 M e posteriormente foram incubadas em

banho-maria a 100 °C por 5 minutos para a eluição. Como controle de carregamento do experimento foi utilizado o gel de SDS-PAGE contendo 50 µg de cada extrato bruto proteico utilizado na imunoprecipitação. Como controle negativo foi utilizada a linhagem selvagem de *A. fumigatus* que não continha o epítopo 3xHA fusionado à proteína de interesse.

3.13.34.2 Imunoprecipitação utilizando a resina *Anti FLAG M2 Affinity Gel*[®]

Para a realização dos experimentos de Co-IP da linhagem RImA 3xFLAG foi realizada a imunoprecipitação utilizando a resina *Anti FLAG M2 Affinity Gel* (Sigma Aldrich A2220). As proteínas foram extraídas conforme protocolo descrito nesta tese (seção 3.14.37) utilizando o tampão B250 (seção 3.8.29.2) e, estas foram posteriormente quantificadas pelo método de Lowry modificado (seção 3.13.38). A imunoprecipitação foi realizada no mesmo dia em que as proteínas foram extraídas para evitar a ação de proteases. Para a imunoprecipitação a resina *Anti FLAG M2 Affinity*[®] foi ressuspensa sob agitação vigorosa até a formação de uma suspensão uniforme. Imediatamente, 40 µL desta suspensão foram transferidos para um tubo de micro centrífuga. O tubo de micro centrífuga foi centrifugado a 8000 g por 30 segundos a 4 °C, o sobrenadante foi removido cuidadosamente com o auxílio de uma micropipeta, e a *Anti FLAG M2 Affinity Gel*[®] foi lavada duas vezes com 500 µL de TBS (seção 3.8.11.3). Para cada lavagem adicionou-se 500 µL de TBS (seção 3.8.11.3) a *Anti FLAG M2 Affinity Gel*[®], esta foi centrifugada por 30 segundos a 8000 g a 4 °C, e o sobrenadante foi removido com o auxílio de uma micropipeta. Após as lavagens, 40 mg de proteína total (contidas em cerca de 10 mL) foram adicionadas à *Anti FLAG M2 Affinity Gel*[®], e estas foram incubadas por 2 horas e 30 minutos a 4 °C sob baixa rotação utilizando HulaMixer[®] Sample Mixer. Após a incubação a suspensão contendo a *Anti FLAG M2 Affinity Gel*[®] + 40 mg de proteínas foi centrifugada a 8000 g por 30 segundos a 4 °C, o sobrenadante foi removido com o auxílio de uma micropipeta e a resina *Anti FLAG M2 Affinity Gel*[®] foi lavada 3 x com 500 µL de TBS (seção 3.8.11.3) como descrito anteriormente. Na última lavagem a suspensão de *Anti FLAG M2 Affinity Gel*[®] + TBS (seção 3.8.11.3) foi transferida

para um novo tubo de micro centrífuga para evitar possíveis contaminações. A *Anti FLAG M2 Affinity Gel*[®] foi ressuspensa em 20 µL do tampão de *Laemmli 2x*, DTT 0,1 M e posteriormente incubada em banho-maria a 100 °C por 5 minutos para a eluição. Como controle de carregamento do experimento foi utilizado o gel de SDS-PAGE contendo 50 µg de cada extrato bruto proteico utilizado na imunoprecipitação. Como controle negativo foi utilizada a linhagem selvagem de *A. fumigatus* que não continha o epítipo 3xFLAG fusionado à proteína de interesse.

3.13.35 Extração de RNA total de *A. fumigatus*

As linhagens foram crescidas conforme descrito em cada experimento e tratadas com agentes estressores quando necessário. O micélio foi filtrado a vácuo e imediatamente congelado em nitrogênio líquido para se evitar a degradação do RNA. Para romper a parede celular do fungo, os micélios congelados foram triturados em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e pistilo esterilizados. O RNA foi extraído utilizando-se o reagente Trizol[®] (Thermo Scientific). Resumidamente, adicionou-se 1 mL de Trizol[®] ao micélio pulverizado, a mistura foi agitada mecanicamente por 10 minutos e após adicionou-se 200 µL de clorofórmio e a mistura foi agitada mecanicamente novamente por 1 minuto. Para sedimentar as proteínas precipitadas e debris celulares, as amostras foram centrifugadas a 16000 g por 20 minutos a 4 °C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de micro centrífuga onde foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio para a retirada de resíduos de Trizol[®]. As amostras foram centrifugadas a 16000 g por 10 minutos a 4 °C e a fase aquosa superior foi novamente transferida para outro tubo de micro centrífuga, onde foram adicionados 900 µL de isopropanol para precipitar o RNA. A amostra foi incubada a -80 °C por 30 minutos e posteriormente centrifugada a 16000 g por 15 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi lavado com etanol 70 % e centrifugado novamente a 16000 g por 1 minuto a 4 °C. O sobrenadante foi novamente descartado e o resíduo de etanol evaporado a temperatura ambiente por 30 minutos. O RNA sedimentado foi ressuspendido em água Milli-Q[®] estéril adicionada de DEPC e estocado a -80 °C.

A integridade do RNA total foi verificada em gel de agarose 1,2 % corado com brometo de etídio sob condições desnaturante e visualizado sob luz UV. 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 utilizado como critério de integridade do RNA total.

Para a utilização nos experimentos de RT-qPCR, 10 µg de RNA total de cada amostra foram tratados com a enzima Ambion Turbo DNase (Thermo Scientific) de acordo com as recomendações do fabricante em 50 µL de reação. O sucesso de tratamentos 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 utilizando na reação 0,1 µL do RNA pós-tratamento com a DNase. Após tratadas e validadas, as amostras foram transcritas para a obtenção do cDNA a ser usado nas análises de expressão. Para a transcrição foi utilizado o kit High Capacity (Life Technologies) de acordo com as recomendações do fabricante com as modificações à seguir: foram utilizados 2 µg de RNA total, 1 µL de oligo dTV (estoque 100 µM) e 1 µL de *random primers* (estoque 10x).

3.13.36 Análises de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

Alíquotas de cDNA obtidas de acordo com cada experimento foram utilizadas como molde da PCR. Utilizaram-se oligonucleotídeos construídos especificamente para o gene de interesse utilizando-se o programa Primer Express[®] (Thermo Scientific). A concentração ideal de oligonucleotídeos a ser utilizada em cada reação de RT-qPCR foi determinada, além dos padrões de eficiência da reação (foram apenas aceitos valores variando entre 95-105 %), *slope*, intercepto e desvios de acordo com Bustin [149]. Como controle endógeno (normalizador) utilizaram-se oligonucleotídeos para amplificação do gene *tubA* de *A. fumigatus* (β -tubulina). A detecção da amplificação em tempo real foi feita no equipamento Step One Plus[®] (Applied Biosystems) utilizando-se o reagente Syber Green PCR Master Mix[®] (Thermo Scientific). A quantificação

dos resultados foi realizada conforme descrição do fabricante e se baseia na derivação da fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ [150].

3.13.37 Extração de proteínas totais de *A. fumigatus*

Os micélios utilizados para a extração de proteína foram crescidos e tratados conforme as necessidades de cada experimento. Em seguida foram filtrados a vácuo e imediatamente congelados em nitrogênio líquido para evitar a degradação das proteínas. Para romper a parede celular do fungo, os micélios congelados foram triturados em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e pistilo. O extrato proteico total foi extraído com tampão de extração de proteína (seção 3.8.8), adicionado dos 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. As amostras foram centrifugadas a 20000 *g* por 40 minutos a 4 °C para a retirada do material precipitado. O sobrenadante de cada amostra foi congelado e estocado a -80 °C. A integridade da proteína foi verificada através de eletroforese em gel SDS-PAGE 12 % (seção 3.11) e quantificada pelo método de Lowry modificado.

3.13.38 Quantificação de proteína total pelo método de Lowry modificado

Para a dosagem das proteínas totais pelo método de Lowry modificado por Hartree [139] foi realizada uma curva padrão com concentrações previamente conhecidas de BSA. E após, as amostras foram quantificadas em triplicata. Brevemente, 10 μ L das amostras a serem testadas foram diluídos em 190 μ L de água Milli-Q[®] em um tubo de micro centrifuga. A estas amostras diluídas foi adicionado 1 mL da solução de tartarato de sódio e potássio + carbonato de sódio + sulfato de cobre preparadas no momento do uso, e estas foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação foram adicionados 100 μ L da solução de reagente de Folin 1x diluído, as amostras foram agitadas vigorosamente e incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente, e a leitura foi realizada utilizando um espectrofotômetro no comprimento de onda de 650 nm. O espectrofotômetro foi zerado com o

branco (solução com todos os reagentes exceto a amostra). O resultado obtido na leitura foi utilizado na curva padrão previamente obtida para a obtenção da concentração das amostras em μg de proteína por μL de extrato bruto.

3.13.39 Análises de *Western blot*

Os extratos brutos proteicos referentes a cada experimento foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (seção 3. 11), utilizando-se uma cuba de eletroforese vertical (Bio-Rad). As proteínas foram então transferidas do gel para membrana de PVDF em procedimento de transferência submerso de acordo com o protocolo do fabricante. O bloqueio das membranas de PVDF foi feito com TBST 1 \times (seção 3.8.11.4) contendo 9 % de leite em pó desnatado, por 16 horas a 4 °C ou por 4 horas a temperatura ambiente sob leve agitação. As membranas foram então incubadas com o anticorpo primário na diluição adequada em TBST 1 \times (seção 3.8.11.4) contendo 3 % de leite em pó desnatado ou BSA 5 %, por 16 horas a 4 °C sob leve agitação. A membrana foi incubada com anticorpo secundário conjugado com peroxidase em TBST 1 \times a temperatura ambiente por 2 horas sob leve agitação, na diluição determinada para cada anticorpo primário utilizado. A imunodeteção foi realizada através de substrato quimio luminescente (ECL Prime, GE Healthcare) e as imagens das membranas geradas pelo equipamento de detecção quimio luminescente ChemiDoc (Bio-Rad).

Para a detecção da fração fosforilada de MpkA utilizou-se um anticorpo anti P-p44/42 MAPK (Cell Signaling Technologies, 9101) que reconhece a fração fosforilada de MpkA, e como controle experimental utilizou-se o anticorpo anti p44/42 MAPK (Cell Signaling Technologies, 4370), ambos os anticorpos foram utilizados na diluição de 1:1000 em tampão TBST 1 \times (seção 3.8.11.4) contendo 5 % de BSA e incubados em uma plataforma de balanço por 16 horas a 4 °C.

Para detecção da proteína GFP foi utilizado o anticorpo anti GFP (Sigma Aldrich G1544), este foi incubado na diluição de 1:1000 em TBST 1 \times (seção 3.8.11.4) contendo 3 % de leite desnatado em uma plataforma de balanço durante 16 horas a 4 °C.

O anticorpo anti Hsp90 (este trabalho) foi incubado na diluição de 1:12500 em TBST 1 × (seção 3.8.11.4) contendo 5 % de leite desnatado em uma plataforma de balanço durante 16 horas a 4 °C.

Para a detecção do epítipo 3×FLAG foi utilizado o anticorpo anti FLAG (Sigma Aldrich, F1804), este foi incubado na diluição de 1:1000 em TBST 1 × (seção 3.8.11.4) contendo 3 % de leite desnatado em uma plataforma de balanço durante 16 horas a 4 °C.

Para a detecção do epítipo 3×HA foi utilizado o anticorpo anti HA (Sigma Aldrich, H6908), este foi incubado na diluição de 1:1000 em TBST 1 × (seção 3.8.11.4) contendo 5 % de BSA em uma plataforma de balanço durante 16 horas a 4 °C.

Como controle de carregamento dos experimentos de *Western blot* foi utilizado o anticorpo anti γ -tubulin (γ N-20; Santa Cruz Biotechnology), este foi incubado na diluição de 1:2000 em TBST 1 × (seção 3.8.11.4) contendo 3 % de leite desnatado e incubado em uma plataforma de balanço durante 16 horas a 4 °C.

O resultado de *Western blot* foi quantificado utilizando o software ImageJ®.

3.13.40 Análises de expressão gênica global da linhagem $\Delta rlmA$ pela técnica de *microarray*

Para a realização dos experimentos de *microarray* cujo desenho experimental está mostrado a seguir (figura 8), foi construída uma lâmina de *microarray* utilizando o programa *Agilent E-array* (disponível em <https://earray.chem.agilent.com/earray>). Foram utilizadas 9.846 sequências de cDNA e as sondas geradas neste estudo estão descritas em da Silva Ferreira, Malavazi [151]. As lâminas foram sintetizadas no formato 4x44K, isto é, quatro *microarrays* em cada lâmina.

Para as hibridizações utilizaram-se dois grupos de RNAs obtidos de acordo com o desenho experimental da figura 8.

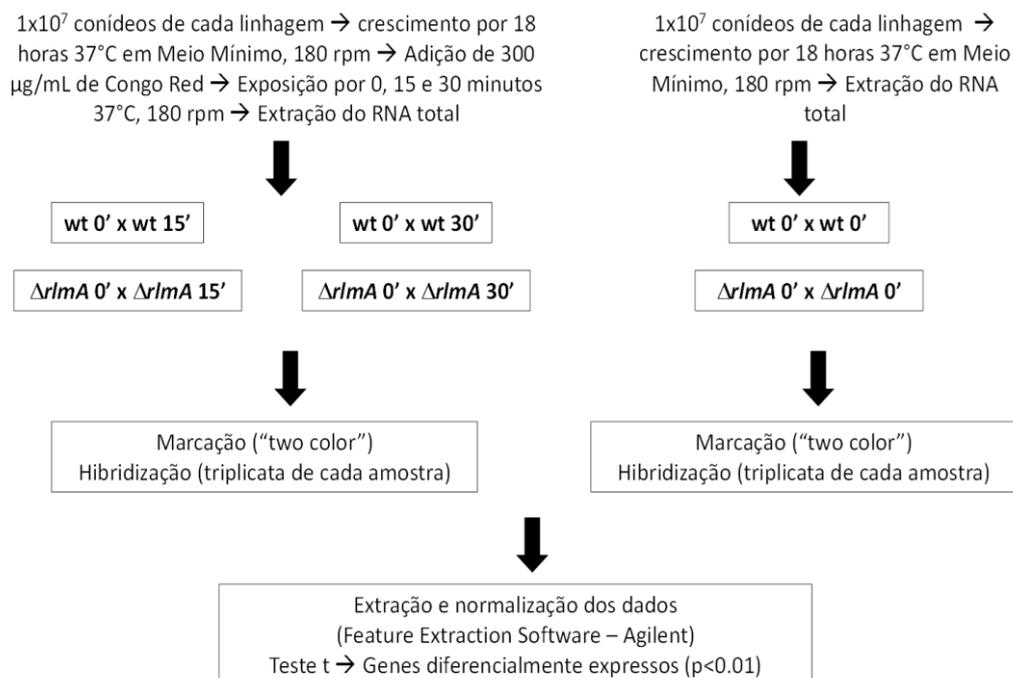


Figura 8: Desenho experimental das hibridizações de *microarray*. As hibridizações foram feitas em triplicata para cada comparação utilizando-se sistema de marcação *two color* (Agilent Technologies) e amostras biológicas completamente independentes para cada replicata.

Para a obtenção dos RNAs destinados às hibridizações de *microarray*, as amostras de micélio foram coletadas de acordo com o desenho experimental estabelecido acima. O micélio foi filtrado a vácuo e imediatamente congelado em nitrogênio líquido para se evitar a degradação do RNA, e posteriormente triturado em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e pistilo esterilizados. O RNA foi extraído utilizando-se o *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante. Os RNAs foram tratados com DNase livre de RNase (Qiagen). As amostras de RNA extraídas foram quantificadas usando o nanofotômetro NanoVue (GE HealthCare) e corridas em gel de agarose sob condições desnaturantes corado com brometo de etídio e visualizado sob luz UV. A integridade do RNA total foi avaliada pelo equipamento 2100 *Bioanalyzer* (Agilent Technologies) e amostras com RIN (*RNA Integrity Number*) maior que 8 gerados pelo equipamento foram utilizadas nas hibridizações (dados não mostrados).

O RNA foi utilizado para a produção de cRNA marcado seguindo as instruções do fabricante utilizando o *Low Input Quick Amp RNA Labeling kit* (Agilent Technologies) para o sistema de marcação de duas cores utilizando Cy3 e Cy5. As lâminas foram escaneadas em scanner *Sure Scan Microarray Scanner* (Agilent

Technologies), seguindo os parâmetros do fabricante para as lâminas do tipo 4x44K e marcação de duas cores com resolução de 3 μm . Os arquivos .tiff gerados pelo scanner foram carregados no programa *Feature Extraction* (versão 11.5 – Agilent Technologies). Os dados de cada uma das hibridizações (triplicata de cada condição com amostras biológicas independentes) foram extraídos e normalizados pelo programa gerando os dados finais para a análise. Os arquivos gerados pelo *Feature Extraction* foram antes convertidos para o formato .mev (*Multiple Experiment View*) utilizando o programa *Express Converter* (versão 2.1, disponível em <http://www.tm4.org/utilities.html>) permitindo o uso dos softwares gratuitos de análise de *microarray* TM4 (<http://www.tm4.org/>). Os arquivos .mev gerados após essa análise foram utilizados para carregar o programa TMEV para visualização dos dados e análise estatística para a identificação dos genes diferencialmente expressos (“log₂ ratio”). Para evidenciar as diferenças entre os grupos ($p \leq 0,01$) foi utilizado o Teste T. Para a análise, os genes diferencialmente expressos identificados pelo Teste T foram hierarquicamente agrupados utilizando como algoritmo aglomerativo a distância euclidiana.

3.13.41 Expressão de proteínas recombinantes

Para realizar os testes de expressão foram feitos pré-inóculos das colônias resultantes da transformação de células da linhagem Rosetta™ (DE3) com os plasmídeos pET-15b clonados com os cDNA de interesse. As colônias que continham essas construções foram inoculadas, individualmente, em meio LB líquido (seção 3.3.2.1) contendo o antibiótico ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$) e cloranfenicol (34 $\mu\text{g/ml}$) e crescidas por 16 horas a 37 °C sob agitação de 180 rpm. As culturas foram então diluídas na proporção 1:100 com LB líquido (seção 3.3.2.1) contendo os antibióticos e incubadas novamente, a 37 °C até alcançar a OD_{600nm} entre 0.6-0.8. Antes da adição de IPTG no restante da cultura, alíquotas de 50 mL de cada frasco, representando os controles não induzidos, foram centrifugadas a 10000 g por 10 minutos a 4 °C, e o precipitado obtido foi congelado a - 20 °C. O restante das culturas de células foi induzido com variações das concentrações de IPTG (seção 3.12), variações de temperatura e tempo até que fosse obtida uma condição ideal de expressão

para cada proteína testada. As culturas induzidas restantes foram centrifugadas a 10000 g por 30 minutos a 4 °C. Os precipitados bacterianos obtidos de cada cultura induzida foram congelados a -20 °C e descongelados antes do uso.

3.13.42 Lise das células de *E. coli* utilizadas para a expressão de proteínas recombinantes

As culturas bacterianas que expressaram a proteína recombinante de interesse foram centrifugadas a 10000 g por 30 minutos a 4 °C. Após, as células foram lisadas em duas etapas: na primeira etapa de lise o precipitado bacteriano foi ressuscitado em tampão de ligação/lise (seção 3.8.9), sendo acrescido 1 mg/mL de lisozima para a digestão da parede bacteriana e DNase para a degradação do DNA da *E. coli*. A reação foi incubada em gelo por 30 minutos. Em seguida, a amostra sofreu lise física por ultrassom com intensidade de 30 % (20 pulsos de 6 segundos, com intervalos de 60 segundos para Hsp90 e 20 pulsos de 6 segundos com intervalo de 180 segundos para MpkA), em banho de gelo. A amostra foi centrifugada a 13000 g por 30 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, e o precipitado foi ressuscitado ao volume anterior usando tampão de lise (seção 3.8.9). Ambas as frações, sobrenadante e precipitado, foram analisadas por SDS-PAGE e *Western blotting* para determinação da solubilidade da proteína recombinante.

3.13.43 Cromatografia de afinidade em resina de níquel

A eluição das proteínas de interesse foi realizada utilizando-se uma solução de imidazol, pois o anel imidazólico se liga ao Ni²⁺ assim como o aminoácido histidina, porém, com maior afinidade ao Ni²⁺ do que a histidina. Após a lise por ultrassom, os sobrenadantes foram filtrados em membrana de 5 µm e inseridos em colunas contendo 5 mL de resina de níquel pré-equilibrada com tampão de lise (seção 3.8.9). Após, as colunas foram lavadas com 30 mL do tampão de lise (seção 3.8.9) para a remoção de outras proteínas que

poderiam aderir à coluna. Para a remoção de proteínas que se aderiram inespecificamente a coluna de níquel, utilizou-se o tampão de lise contendo 15 % da solução de Imidazol a 500 mM (tampão B) (seção 3.8.9), e para a eluição da proteína que se ligou a coluna de níquel utilizou-se 100 % do tampão de lise contendo 500 mM de Imidazol (tampão B) (seção 3.8.9). Alíquotas de 20 μ L de todas as frações de lavagem e eluição foram avaliadas e o grau de pureza das proteínas recombinantes foi analisado por SDS-PAGE (seção 3.11) para posterior purificação por cromatografia de exclusão molecular (SEC).

3.13.44 Cromatografia de exclusão molecular em colunas Superdex

A cromatografia de exclusão por tamanho foi realizada à temperatura ambiente empregando-se a coluna HiLoad Superdex 16/60 200 prep grade (GE HealthCare) acoplada ao sistema de HPLC, utilizando o equipamento Aktä Prime (GE HealthCare). As colunas foram previamente lavadas com água Milli-Q® e pré-equilibradas com tampão de lise (seção 3.8.9). Os eluatos foram monitorados por absorvância no UV a 280 nm e coletados em frações, empregando-se uma velocidade de fluxo de 0,5 mL min⁻¹. As frações contendo as proteínas recombinantes purificadas foram reunidas e concentradas utilizando concentradores com membranas de 10 kDa .

As concentrações das proteínas recombinantes purificadas foram determinadas medindo-se suas absorvâncias em espectrofotômetro UV-VIS a 280 nm. As absorvâncias foram relacionadas aos seus respectivos coeficientes de extinção molar obtidos através do cálculo do conteúdo teórico de resíduos de triptofano, tirosinas e fenilalaninas [152].

3.13.45 Espectropolarimetria de Dicroísmo Circular

As medidas de CD foram realizadas à temperatura controlada de 25 °C utilizando o espectropolarímetro JASCO J-815 (JASCO Corporation, Tóquio, Japão), na faixa de 190 a 260 nm em cubetas cilíndricas de quartzo de caminho óptico de 1 mm. Os espectros de CD foram tipicamente recuperados

empregando-se médias de 30 varreduras. As contribuições dos tampões obtidos sob condições idênticas foram subtraídas e todos os espectros de CD foram corrigidos a fim de eliminar quaisquer efeitos de ruído. Os espectros originais foram transformados em elipticidade molar residual ($[\theta]$), conforme descrito pela equação abaixo:

$$EMR = \frac{\theta \times 100 \times MM}{n \times C \times l}$$

Onde, θ é o sinal de CD em graus, MM é a massa molecular em kDa, n é o número de resíduos de aminoácidos da proteína, l é o caminho óptico em cm, e c é a concentração de proteínas em mg mL⁻¹.

O desenovelamento térmico da MpkA foi monitorado pelo sinal de CD a 220 nm com a variação de temperatura de 15 a 90 °C, e 90 a 15 °C (aumento ou redução de 1 °C por minuto). O ajuste dos dados de desenovelamento térmico foi realizado com o uso da função de Boltzmann, no programa Origin. O valor de T_m (temperatura média da transição) não foi determinado, pois não foi possível observar o desnaturamento térmico nas condições testadas.

3.13.46 Espectroscopia de emissão de fluorescência

As medidas de emissão de fluorescência das proteínas recombinantes foram realizadas no modo estático utilizando-se o equipamento Varioskan™ LUX *multimode microplate reader* (Thermo Scientific). Os espectros de fluorescência foram obtidos à temperatura controlada de 25 °C, utilizando 5 μM de proteína. Amostras foram excitadas a 295 nm e a 280 nm e a emissão de fluorescência foi monitorada no intervalo de 313-420 nm, e 298-420 nm respectivamente. Placas de 96 poços *UV-Star Half-area* (Greiner) foram utilizadas para a leitura. A fim de minimizar o efeito do espalhamento de luz, os espectros de emissão de fluorescência dos tampões foram subtraídos dos espectros das correspondentes amostras.

Os experimentos de desenovelamento químico foram realizados com os mesmos parâmetros experimentais descritos acima. Os espectros de fluorescência das proteínas, tituladas com concentrações crescentes de guanidina HCl, foram tratados para $\langle \lambda \rangle$ conforme a equação abaixo:

$$\langle \lambda \rangle = \frac{\sum F_i \lambda_i}{\sum F_i}$$

Onde, F_i são as intensidades de fluorescência e λ_i os respectivos comprimentos de onda.

Os ajustes dos dados foram realizados pelo programa Origin, com as funções de Boltzmann. A partir destes ajustes, o valor de C_m , isto é, a concentração de agente desnaturante no ponto médio de uma transição, foi obtida.

3.13.47 Cromatografia de exclusão molecular analítica

As cromatografias de exclusão molecular analítica (aSEC) foram realizadas em coluna Superdex 200 10/300 GL (GE HealthCare), equilibrada com o tampão específico para cada proteína utilizando o equipamento Äkta Prime (GE HealthCare). Os volumes de eluição das proteínas foram monitorados por absorvância a 280 nm. Como padrão, proteínas globulares com respectivos raios de Stokes (RS) e massa molecular conhecidas foram utilizadas na concentração de, aproximadamente, 1 mg/mL⁻¹. O volume morto da coluna foi determinado pela corrida de blue dextran 1 mg/mL⁻¹ (Sigma Aldrich, D5751). Os volumes de eluição das proteínas foram utilizados para os cálculos dos respectivos coeficientes de partição (K_{av}), segundo a equação:

$$K_{av} = (V_t - V_e) / (V_t - V_0)$$

na qual V_t é o volume total da coluna, V_e é o volume de eluição da proteína e V_0 é o volume morto da coluna, todos em mL. Um gráfico de RS em função de $-(\log K_{av})^{1/2}$ foi construído e RS das proteínas foram obtidos empregando-se a equação da reta e os coeficientes angular e linear resultantes do ajuste linear das proteínas-padrão, feito pelo programa Origin®.

3.13.48 Avaliação da atividade chaperona da Hsp90 de *A. fumigatus*

Os ensaios de atividade chaperona foram realizados em tampão HEPES 40 mM pH 7,5 +100 mM de KCl (seção 3.8.9.1.3) com 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2,5 e 5 μ M da proteína Hsp90 de *A. fumigatus*. A proteína-cliente, malato desidrogenase (MDH) (Sigma Aldrich), foi empregada na concentração final de

1 μM . Estes experimentos foram executados em placas de 96 poços UV-Star Half-area (Greiner), a 42 °C, e a agregação das proteínas foi monitorada a 320 nm em leitor de placas Varioskan™ LUX *multimode microplate reader* (Thermo Scientific). Controles contendo a Hsp90 de *A. fumigatus* nas concentrações indicadas foram realizados para verificar a agregação desta proteína.

3.13.48.2 Atividade chaperona da Hsp90 com a proteína MpkA

Os ensaios de atividade chaperona foram realizados em tampão A (seção 3.8.9.2.1) utilizado para lise e purificação da MpkA com 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 20, 30, 40, 50 μM da proteína Hsp90 de *A. fumigatus*. A possível proteína-cliente, MpkA, foi empregada na concentração final de 10 μM . Estes experimentos foram executados em placas de 96 poços UV-Star Half-area (Greiner), a 42 °C, e a agregação das proteínas foi monitorada a 320 nm em leitor de placas Varioskan (Thermo). Controles contendo a Hsp90 de *A. fumigatus* nas concentrações indicadas foram realizados para verificar a agregação desta proteína. Como controle negativo de prevenção da agregação proteica foi utilizada a proteína BSA nas concentrações de 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 20, 30, 40 e 50 μM (mesmas concentrações de Hsp90 utilizadas), com 10 μM da proteína MpkA.

3.13.49 Calorimetria de titulação isotérmica para determinação da afinidade de ligação de Hsp90 pelo ATP e ADP

Os experimentos de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) foram realizados no equipamento iTC200 (GE HealthCare). A proteína Hsp90 foi dialisada por 12 horas em tampão HEPES 40 mM (pH 7,5), KCl 5 mM (seção 3.8.9.1.3), a Hsp90 foi utilizada na célula em concentrações de 30 μM de monômero e; 2 μM de magnésio. O ATP e ADP foram empregados na seringa em concentrações de 2 μM e 1 μM respectivamente. O regime de injeção foi de 2 μL . Os experimentos foram realizados na temperatura de 25 °C. Na análise dos dados, o calor da interação (Q) foi determinado a partir da integração das áreas dos picos a cada injeção ($\mu\text{cal seg}^{-1}$), as quais são proporcionais ao

volume da célula (V_{cel}), concentração de ligante ($[L]$) e ΔH . O calor de diluição do titulante e do titulado foi calculado a partir da linha de base ao final da titulação, em condições onde todos os sítios foram saturados, e foi subtraído do calor de interação determinado. O Q obtido por mol de ligante injetado foi analisado em função da razão molar entre titulante/titulado e os valores de ΔH , n e K_A foram estimados pelo ajuste dos dados, realizado com auxílio do programa Origin Microcal[®]. O programa Origin Microcal[®] supôs, inicialmente, valores de n , K_A e ΔH , calculando a variação do calor (ΔQ) em cada injeção e comparando-os com o calor medido experimentalmente em cada injeção. Os valores de n , K_A e ΔH foram otimizados progressivamente até que melhoras significativas nestes valores não fossem mais observadas. A variação de entropia aparente (ΔS_{app}) e variação de energia livre de Gibbs aparente (ΔG_{app}) foram calculadas. A variação da capacidade calorífica aparente da interação ($\Delta C_{p,app}$) foi calculada pela dependência da ΔH_{app} em função da temperatura.

3.13.50 Análise da interação proteína-proteína pela técnica de far *Western blot*

Esta técnica foi realizada de acordo com o método descrito por Wu, Li [156]. Brevemente, as proteínas recombinantes a serem utilizadas no experimento foram expressas e lisadas conforme descrito neste trabalho. Um gel de SDS-PAGE foi feito contendo as proteínas “isca” de interesse neste trabalho, isto é, PkcA e MpkA além de todos os controles necessários para o experimento. Após a corrida eletroforética foi realizada a transferência submersa para a membrana de PVDF de acordo com protocolo padrão.

A membrana de PVDF contendo a proteína “isca” foi submetida à desnaturação e renaturação “*in loco*”. Para isto a membrana foi incubada à temperatura ambiente sob leve agitação na solução de desnaturação da membrana de PVDF contendo 6 M de guanidina HCl (seção 3.8.27.1) por 30 minutos à temperatura ambiente. Após este período de incubação a solução foi removida e a membrana foi incubada sob leve agitação na solução de renaturação da membrana de PVDF contendo 3 M de guanidina HCl (seção 3.8.27.1) por 30 minutos à temperatura ambiente. Após este período de

incubação a solução foi removida e a membrana foi incubada sob leve agitação na solução de renaturação da membrana de PVDF contendo 0,1 M de guanidina HCl (seção 3.8.27.1) por 30 minutos a 4 °C. Após este período de incubação a solução foi removida e a membrana foi incubada sob leve agitação na solução de renaturação da membrana de PVDF sem guanidina HCl (seção 3.8.27.1) por 16 horas a 4 °C para completa renaturação da proteína.

Após a desnaturação/renaturação das proteínas, a membrana foi bloqueada em uma solução TBST 1 × + leite em pó desnatado 9 % por 1 hora à temperatura ambiente. A solução de bloqueio foi removida e adicionou-se 50 µM da proteína “presa” isto é, Hsp90 purificada no tampão de ligação (seção 3.8.27.2). A membrana foi incubada com a proteína “presa” Hsp90 por 16 horas a 4 °C sob leve agitação. Após a incubação a membrana foi lavada por 3 vezes com solução de TBST 1 × (seção 3.8.11.4) à temperatura ambiente sob leve agitação, sendo que cada lavagem foi realizada por 5 minutos. O anticorpo primário anti Hsp90 (este trabalho) foi incubado por 16 horas a 4 °C, na diluição de 1:12500 em leite 5 % + TBST 1 × (seção 3.8.11.4). Após a incubação, a membrana foi lavada 3 vezes com solução de TBST 1 × (seção 3.8.11.4) à temperatura ambiente sob leve agitação, sendo que cada lavagem foi realizada por 5 minutos, em seguida o anticorpo secundário anti *rabbit* foi incubado em TBST 1 × (seção 3.8.11.4) na diluição de 1:5000 à temperatura ambiente por 2 horas e o *Western blot* foi revelado conforme protocolo padrão.

3.13.51 Coloração do gel de SDS-PAGE utilizando nitrato de prata

Primeiramente, o gel SDS-PAGE contendo as proteínas foi submerso na solução de fixação (seção 3.8.32.1) e incubado por 16 horas a 4 °C sob leve agitação. Após, o gel foi incubado em 30 % de etanol por 15 minutos à temperatura ambiente sob leve agitação, seguido de 3 lavagens do gel com água Milli-Q®, e cada lavagem foi realizada por 5 minutos sob leve agitação à temperatura ambiente. Após as lavagens o gel foi submerso por 90 segundos na solução de sensibilização (seção 3.8.32.2), seguido de 3 lavagens do gel com água Milli-Q®, e cada lavagem foi realizada por 30 segundos sob leve agitação à temperatura ambiente. Posteriormente, o gel foi incubado por 1 hora

na solução de coloração (seção 3.8.32.3) sob leve agitação à temperatura ambiente, seguido de 3 lavagens do gel com água Milli-Q®, cada lavagem foi realizada por 30 segundos sob leve agitação a temperatura ambiente. Após, o gel foi submerso na solução de revelação até que fosse possível visualizar as bandas referentes às proteínas. A solução de revelação (seção 3.8.32.4) foi descartada e o gel foi incubado por 10 minutos na solução de parada sob leve agitação à temperatura ambiente, seguido de 3 lavagens do gel com água Milli-Q®, cada lavagem foi realizada por 30 segundos sob leve agitação à temperatura ambiente. O gel foi fotografado.

3.15.52 *Ambient mass spectrometry imaging on agar culture*

Estes experimentos foram realizados de acordo com o protocolo descrito por Angolini, Vendramini [157] com modificações. As amostras foram crescidas em meio completo YG sólido (seção 3.3.1.2) por 48 horas a 37 °C.

3.15.53 Síntese do anticorpo anti Hsp90

O anticorpo anti Hsp90 policlonal foi sintetizado a partir da proteína recombinante Hsp90 de *A. fumigatus* obtida neste trabalho. A síntese foi realizada pela empresa Rheabiotech Ltda em coelhos. O anticorpo foi purificado por cromatografia de afinidade à proteína G, estabilizado em solução de Tris-Glicina 0,1M, pH 7,4.

4.0 Resultados e discussão

Módulo 4.1 Isolamento e caracterização fenotípica do mutante $\Delta rlmA$ em *A. fumigatus*

Aspergillus fumigatus MADS-box Transcription Factor *rlmA* Is Required for Regulation of the Cell Wall Integrity and Virulence
G3: GENES, GENOMES, GENETICS September 1, 2016 vol. 6 no. 9 2983-3002; <https://doi.org/10.1534/g3.116.031112>.

4.1.1. Identificação do homólogo de RlmA em *A. fumigatus* e construção da linhagem $\Delta rlmA$, $\Delta rlmA::rlmA^+$ em *A. fumigatus*

Para identificar o ortólogo predito do fator de transcrição pertencente à família MADS-box possivelmente envolvido na manutenção da integridade da parede celular em *A. fumigatus*, buscaram-se as sequências de ORFs da linhagem Af293 de *A. fumigatus*, comparando sequências das proteínas RlmA de *A. nidulans*, *A. niger* (AN2984 e An02g12210, respectivamente) e Rlm1 de *S. cerevisiae* utilizando o algoritmo BLASTtp. O resultado revelou um único ortólogo putativo em *A. fumigatus*, Afu3g08520, que foi nomeado de RlmA para ser consistente com a nomenclatura anterior em *A. niger* e *A. nidulans* [48, 145]. A sequência da proteína RlmA de *A. nidulans* e *A. fumigatus* apresentou uma identidade compartilhada de aminoácidos de 66,0 % e uma similaridade de proteína de 73,9 % (e-value 0,0) enquanto Rlm1 de *S. cerevisiae* e RlmA de *A. fumigatus* apresentaram uma identidade compartilhada de aminoácidos de 62,4 % e uma similaridade de sequência de proteína de 71,8 % (e-value 1e-27). O modelo do gene *rlmA* (que está disponível em <http://www.aspgd.org>) é suportado por experimentos de RT-PCR que indicam um produto de cDNA de 1.803 pb e uma sequência genômica de 1.929 pb. O sequenciamento do cDNA de *rlmA* na linhagem A1163 confirmou a existência dos dois íntrons previstos como listados, um que contém 74 pb, localizado entre os nucleotídeos 57 e 130, e um de 52 pb localizado entre os nucleotídeos 288 e 339 (dados não mostrados). Além disso, detectou-se um único polimorfismo de nucleotídeos na linhagem A1163 (AFUB_040580) em comparação com a linhagem Af293 na posição 522 da sequência de cDNA, o que resulta em uma mutação silenciosa de "CCC" (na linhagem Af293) para "CCG" (na linhagem A1163) que codifica para um resíduo de prolina em ambos os casos. A proteína hipotética que é codificada por *rlmA* possui 600 aminoácidos e tem um peso molecular calculado de 64,4 kDa. A organização do domínio proteico de RlmA de *A. fumigatus* assemelha-se à do homólogo de *S. cerevisiae* e outros homólogos de RLM em fungos filamentosos [145], indicando a presença do domínio MADS-box altamente conservado (aminoácido 1-61) conforme avaliado por análise de domínios utilizando a ferramenta Interpro

(<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>; PROSITE entrada PS50066 - perfil de domínio MADS-box). Esses resultados sugerem que Afu3g08520 codifica o fator de transcrição MADS-box de *A. fumigatus*, RlmA.

Para determinar o papel do RlmA na homeostase da parede celular de *A. fumigatus*, gerou-se um mutante nulo substituindo a sequência genômica de *rlmA* pelo marcador de seleção *pyrG* na linhagem \DeltaakuB^{KU80} (figura 9A). Após a transformação com o cassete de deleção, as linhagens candidatas à deleção de RlmA ($\Delta rlmA$) foram identificadas por PCR diagnóstica. A deleção do gene *rlmA* em transformantes positivos nestas PCRs foi confirmada pela análise de *Southern blot* (dados não mostrados e figura 9B). Todas as linhagens candidatas a $\Delta rlmA$ testadas produziram os sinais de hibridação esperados quando o DNA genômico digerido com *Bam*HI ou *Xho*I foi hibridizado com uma sonda de DNA da região flanqueadora 5' da ORF de *rlmA* (figura 9B). O mutante $\Delta rlmA$ apresentou bandas únicas em 4,81 kb e 4,63 kb após a digestão com *Bam*HI e *Xho*I, como esperado para uma substituição precisa da ORF de *rlmA* pelo marcador prototrófico *pyrG* de *A. fumigatus* (figura 9B). Para confirmar que os fenótipos que seriam observados na linhagem $\Delta rlmA$ foram causados pela perda de RlmA, gerou-se uma linhagem complementante ($\Delta rlmA::rlmA^+$) através da reintrodução ectópica do gene *rlmA* da linhagem selvagem na linhagem mutante $\Delta rlmA$. A complementação do gene *rlmA* na linhagem mutante $\Delta rlmA$ foi confirmada por PCR (figura 9C). O fenótipo observado na linhagem complementada era indistinguível ao fenótipo da linhagem selvagem. A abundância de mRNA do gene *rlmA* foi determinada na linhagem complementante por RT-qPCR e a expressão de *rlmA* foi equivalente entre a linhagem selvagem e a linhagem complementante $\Delta rlmA::rlmA^+$, e ausente no mutante $\Delta rlmA$ (dados não mostrados).

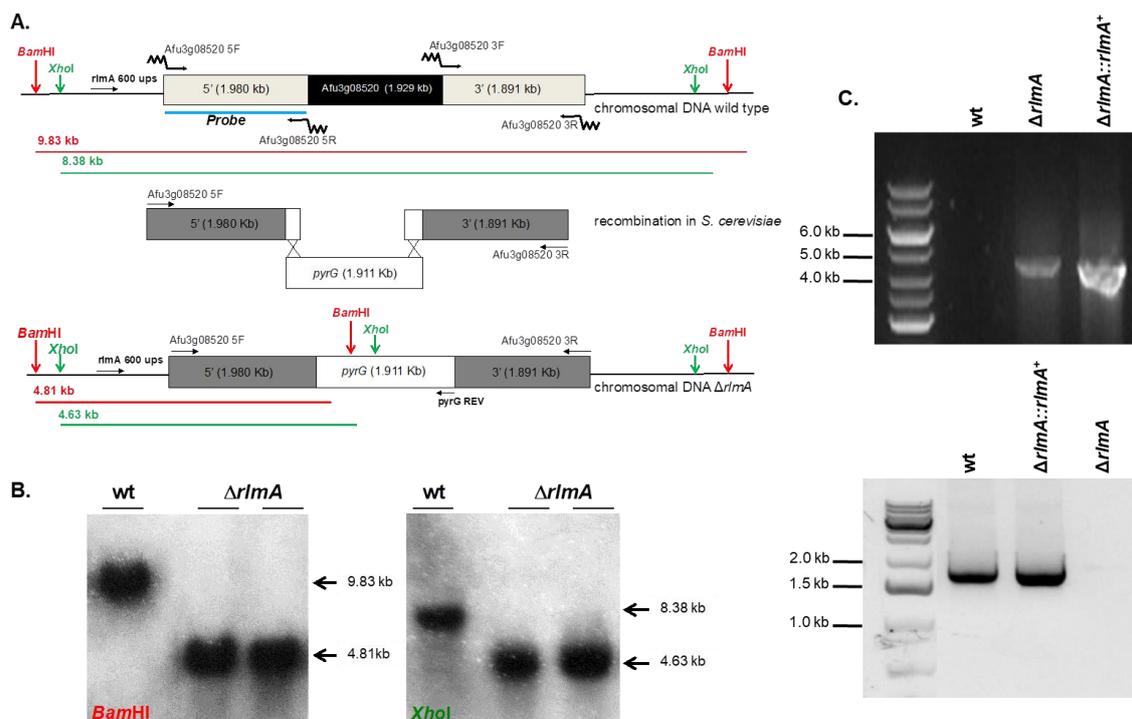


Figura 9: Construção do mutante $\Delta rlmA$ e da linhagem complementante $\Delta rlmA::rlmA^+$. (A) A estratégia de substituição genética para o gene *rlmA*. O gene *pyrG* foi utilizado como marcador de seleção. Os nomes dos oligonucleotídeos e os locais de ligação são indicados por setas (ver tabela 3 para as sequências de oligonucleotídeos). O cassete de deleção foi construído por recombinação *in vivo* em *S. cerevisiae*. (B) Análise de *Southern blot* do DNA genômico digerido com *Bam*HI e *Xho*I com uma sonda que se liga especificamente à região 5'-*rlmA* como indicado em (A) para as bandas predispostas de 4,81 e 4,63 Kb no mutante $\Delta rlmA$ para digestão do DNA com *Bam*HI e *Xho*I respectivamente. (C) A complementação bem sucedida do gene *rlmA* foi confirmada em transformantes monoconidiais resistentes a CFW e CR, e por PCR utilizando os oligonucleotídeos *rlmA* 600 ups/*pyrG* REV e *rlmA* ST SC 5F/*rlmA* ORF REV (painel superior e inferior).

4.1.2 Caracterização funcional do mutante $\Delta rlmA$ em *A. fumigatus*

4.1.2.1 A deleção de *rlmA* leva a alterações no crescimento radial e taxas de germinação em *A. fumigatus*

A análise do crescimento radial dos mutantes isolados foi realizada no intuito de avaliar possíveis defeitos de crescimento vegetativo do mutante, bem como a interferência da temperatura na taxa de desenvolvimento vegetativo nas linhagens produzidas. A exposição das linhagens às temperaturas de 30 °C, 37 °C e 45 °C permitiu a observação dos fenótipos produzidos por cada uma das linhagens testadas (figura 10A). As diferenças de crescimento radial foram quantificadas e estão relatadas na figura 10B, com a qual se pode observar nas temperaturas de 30 °C e 45 °C a redução do crescimento radial no mutante nulo de *rlmA* ($\Delta rlmA$).

No processo de divisão celular do *Aspergillus ssp.* o conídio germinante passa por uma etapa inicial de incorporação de água, passando por uma fase de crescimento isotrópico (*swelling*). Posteriormente ocorre a formação de um eixo de polaridade com deposição de novas camadas de parede celular em todas as direções [158] dando origem ao tubo germinativo, que gera um eixo de crescimento polarizado. A deposição de parede celular exclusivamente na ponta do tubo germinativo é chamada de extensão apical, e confere à hifa o aspecto de um filamento alongado [159, 160]. Sendo assim a perfeita formação da parede celular é essencial para o crescimento polarizado em *A. fumigatus* e, em *A. nidulans* foi relatado que a perda da função de RImA altera o crescimento polarizado [61]. Para verificar se a perda da função de RImA causaria alteração do crescimento polarizado em *A. fumigatus*, as linhagens foram incubadas a 37 °C e a 45 °C no intervalo de 8 horas (figura 10C e 10D, respectivamente), sendo retirada uma amostra a cada 2 horas deste intervalo para contagem dos conídios. Foram considerados conídios com crescimento polarizado aqueles que mostravam protuberância na superfície do esporo, alterando sua forma redonda característica [159]. A contagem de conídios por microscopia em campo claro permitiu verificar uma redução do crescimento polarizado da linhagem $\Delta rImA$ testada neste intervalo, assim como observado em *A. nidulans*.

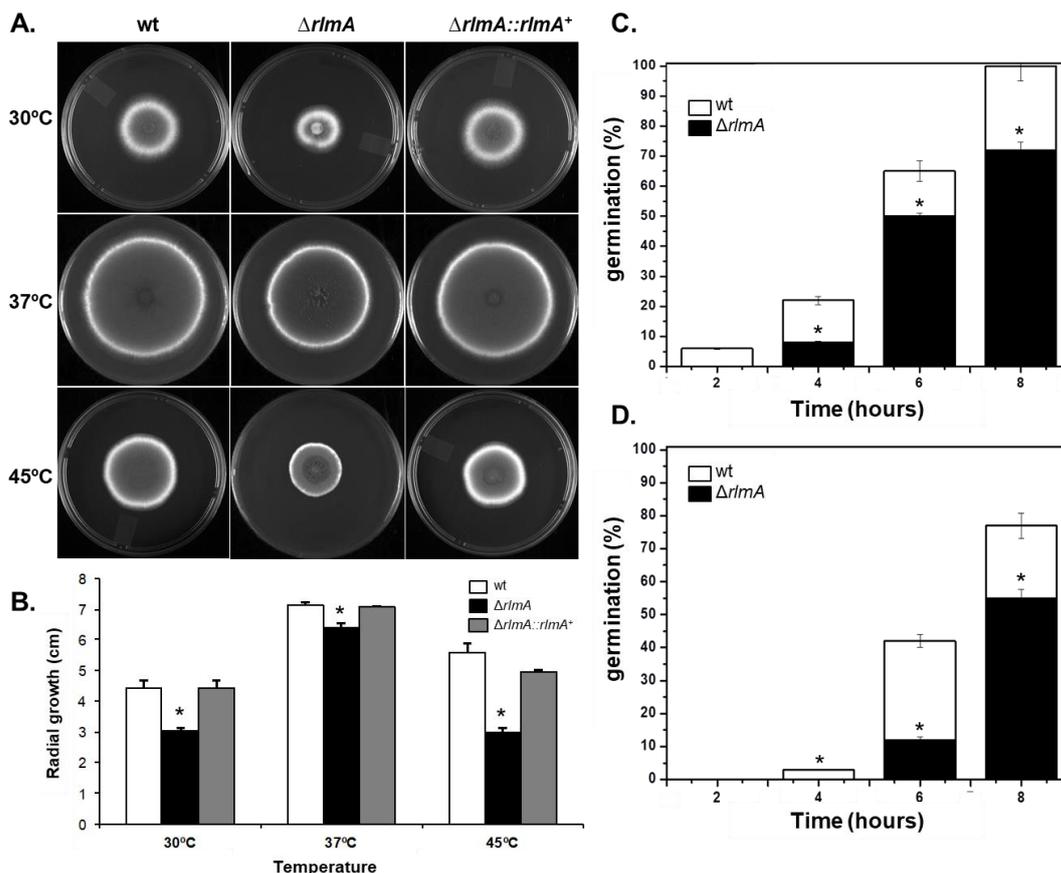


Figura 10: Crescimento radial e taxas de germinação da linhagem $\Delta rlmA$. 1×10^4 conídios de cada linhagem foram inoculados no centro da placa contendo meio sólido completo (YG) e seu crescimento radial foi medido após 72 horas nas temperaturas indicadas (A-B). Para a determinação do crescimento polarizado foram inoculados 1×10^6 conídios de cada linhagem em 2 mL de meio cultura completo líquido YG, as placas contendo os conídios foram incubadas a 37 °C (C) e 45 °C (D) durante 2, 4, 6 e 8 horas, e através de microscopia foi determinada a porcentagem de conídios germinados em cada tempo/temperatura determinados. Os resultados indicam a média \pm desvio padrão; $n = 3$. * $p \leq 0,01$.

4.1.2.2 O mutante nulo $\Delta rlmA$ apresenta defeitos relacionados ao crescimento vegetativo e à integridade da parede celular

A parede celular está relacionada à resistência de agentes estressores e drogas quimioterápicas em *A. fumigatus* [30]. Assim, as linhagens selvagem, mutante e complementante foram expostas a alguns destes agentes e drogas com o intuito de entender a função de RlmA na manutenção da integridade da parede celular neste patógeno. Os testes foram realizados em placas de Petri contendo meio completo sólido YG na presença e ausência dos agentes testados. Uma das drogas testadas foi a cafeína (CAFF). A cafeína ainda não possui um mecanismo de ação completamente elucidado, porém acredita-se que esta droga tem como alvo o complexo de proteínas TOR quinases, cuja

inibição em *S. cerevisiae* acidentalmente ativa a cascata Pkc1-Mpk1, e induz uma rápida fosforilação do Mpk1 acompanhada por uma ativação do fator de transcrição Rlm1 [161]. Esta droga foi testada em diversas concentrações, onde foi possível observar que a linhagem mutante apresentou pequena sensibilidade equiparada à linhagem selvagem (figura 11A). Agentes classicamente usados para identificar a sensibilidade de mutantes com alteração na via da integridade da parede celular são o CFW e o CR. Ambos compostos possuem dois grupos de ácido sulfônico, de tal forma que exercem sua atividade somente quando estão solubilizados em condições ligeiramente básicas ou neutras, quando um dos seus grupos de ácido sulfônico se torna negativamente carregado [162]. Em fungos CFW e CR se ligam preferencialmente às cadeias de quitinas, interferindo na montagem da parede celular. Estes, ao se ligarem às quitinas impedem a ligação de $\beta(1,3)$ glucana e $\beta(1,6)$ glucana. Como resultado, a parede celular se torna enfraquecida. A presença de CFW ou CR também resulta em entumescimento ou lise da extremidade de hifas dos fungos filamentosos, como *A. niger*, resultando no enfraquecimento da parede e alteração da pressão interna de turgor [163]. Na figura 11A observa-se o aumento da susceptibilidade da linhagem $\Delta rlmA$ a estes agentes. Menores concentrações de CR e CFW também foram testadas e indicaram que a diminuição da tolerância da linhagem $\Delta rlmA$ para CFW e CR ocorreu quando as concentrações eram tão baixas quanto 25 $\mu\text{g/mL}$ e 30 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (APÊNDICE A, figura A1).

O dodecil sulfato de sódio (SDS) é um detergente aniônico, sua ação na célula fúngica se dá possivelmente pela ação direta na membrana plasmática e pela desnaturação local de proteínas da membrana e da parede celular, porém, sabe-se que mutantes com deficiência da formação de parede celular apresentam maior sensibilidade a este agente [30]. Um aumento da susceptibilidade a este agente na linhagem mutada $\Delta rlmA$ pode ser observado na figura 11A.

As equinocandinas semissintéticas (por exemplo, caspofungina e anidulafungina) possuem como alvo a parede celular fúngica, através da inibição da síntese de $\beta(1,3)$ glucana pela inibição não competitiva da enzima β -1,3 glucana sintase (Fks1). Essas drogas induzem alterações morfológicas e

de crescimento devido à formação deficiente da parede celular, e demonstraram potentes valores de CIM em ensaios epidemiológicos [21], embora clinicamente as equinocandinas são drogas de segunda escolha para tratamento da aspergilose pulmonar invasiva. As linhagens tiveram sua sensibilidade avaliada às equinocandinas anidulanfungina (AF) e caspofungina (CASP) tendo sido observado aumento da sensibilidade a estas drogas no mutante $\Delta rlmA$ como pode ser observado na figura 11A.

A limitação de nutrientes é um dos estresses mais significativos encontrados por microrganismos na natureza [164]. Para determinar se RlmA estaria relacionado à proteção de *A. fumigatus* das consequências deletérias da depleção de cátions divalentes, realizou-se o teste de crescimento das linhagens selvagem, mutante $\Delta rlmA$ e complementante na presença do EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), um agente quelante de cálcio e magnésio, e foi possível observar que a linhagem $\Delta rlmA$ foi mais sensível à privação de metal causada pelo agente quelante EDTA (1 mM) (figura 11A).

A nikomicina Z é uma droga que promove a inibição da síntese de quitina atuando como análogo competitivo do substrato UDP-N-acetilglucosamina no sítio catalítico [165]. A quitina é um importante componente para a formação da parede celular em *Aspergillus ssp.* [12]. Como um teste inicial para verificarmos se a deleção de *rlmA* estaria levando a redução da síntese de quitina na parede celular e portanto causando uma maior sensibilidade a esta drogas, linhagens foram cultivadas na presença deste agente onde foi possível verificar que a deleção de *rlmA* promoveu um aumento da sensibilidade de *A. fumigatus* a nikomicina Z (figura 11B) podendo desta forma relacionar RlmA como sendo um dos ativadores das enzimas de biossíntese de quitina em *A. fumigatus*.

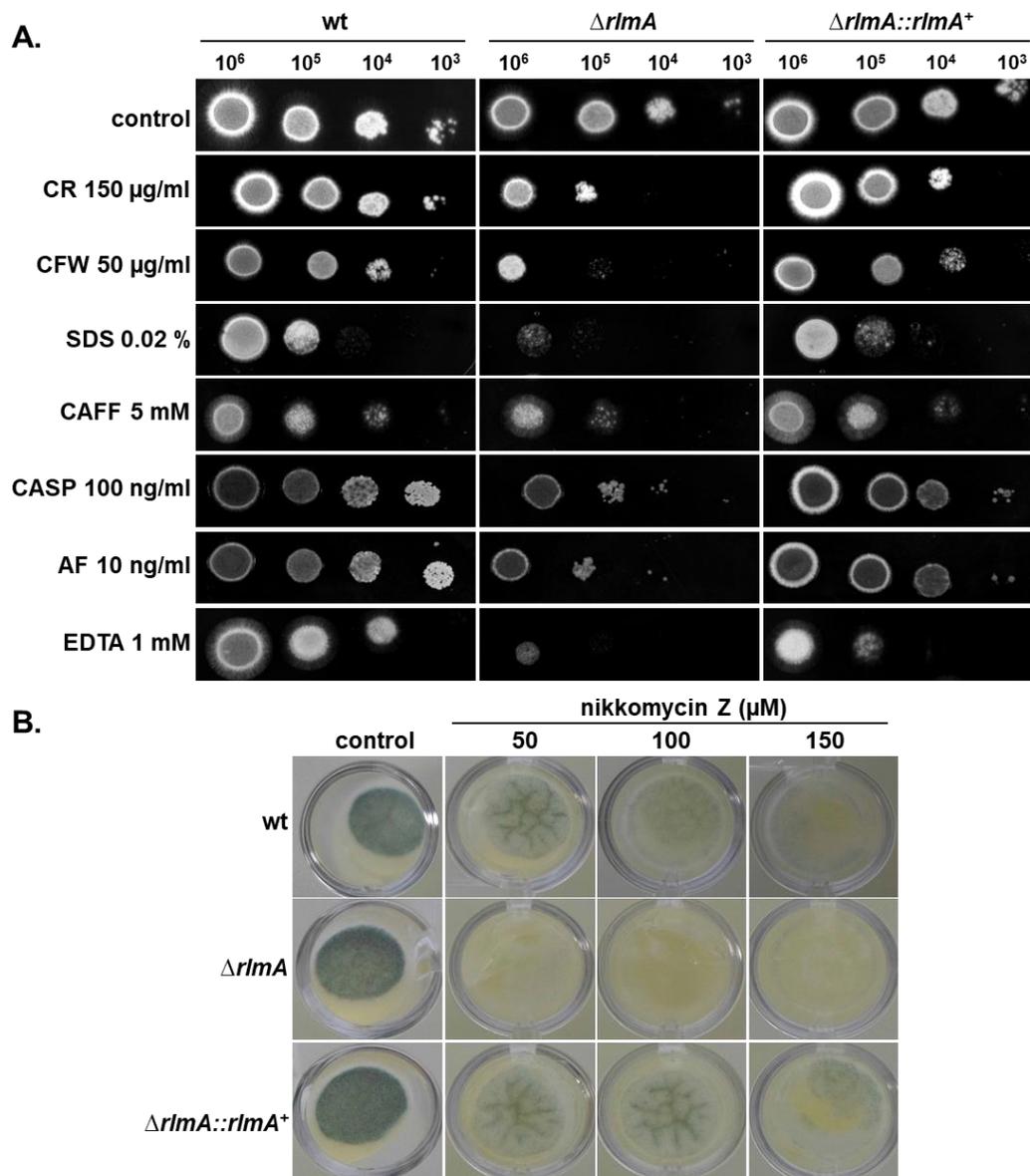


Figura 11: Teste de sensibilidade do mutante $\Delta rlmA$ a diferentes drogas que causam estresse de parede celular. (A) A determinação da sensibilidade às drogas estressoras foi realizada através da técnica de *drop-out*. Diluições seriadas da suspensão de conídios de cada linhagem foram inoculadas em placa de Petri contendo meio completo sólido YG com as concentrações das drogas determinadas. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Observa-se que a linhagem $\Delta rlmA$ possui uma maior sensibilidade a ação destes agentes. **(B)** 1×10^5 conídios das linhagens foram inoculados em placa de 24 poços contendo meio sólido completo YG na presença das concentrações indicadas de nikomicina Z a 37 °C por 48 horas. Observa-se que a linhagem $\Delta rlmA$ possui uma maior sensibilidade a ação deste agente.

Como mostrado CR e CFW evidenciam os efeitos fenotípicos mais pronunciados sobre o mutante $\Delta rlmA$. O fenótipo de aumento da sensibilidade a estes agentes e também à cafeína pode ser parcialmente resgatado em meio mínimo contendo o estabilizador osmótico D-sorbitol (1,2 M) (figura 12), o que sugere um possível defeito da parede celular na linhagem mutante $\Delta rlmA$. Entretanto não foi possível observar fenótipos de lise no mutante $\Delta rlmA$ na

presença de dano da parede celular causado por CR ou CFW em análises microscópicas (dados não mostrados).

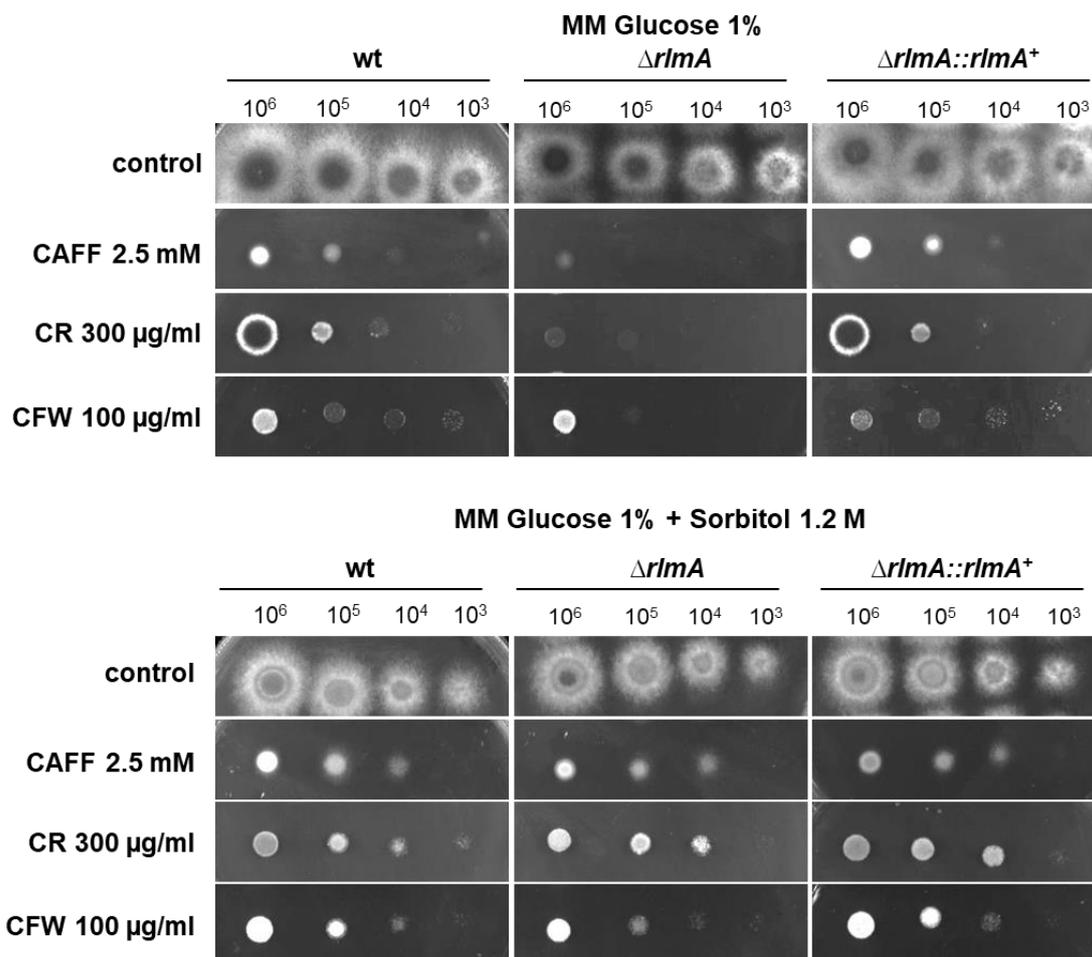


Figura 12: A sensibilidade às drogas que causam estresse de parede é parcialmente revertida na presença do estabilizador osmótico D-sorbitol. Diluições seriadas da suspensão de conídios de cada linhagem foram inoculadas em placa de Petri contendo meio mínimo glicose 1 % e meio mínimo glicose 1 % acrescido de sorbitol 1,2 M, ambos com as concentrações de drogas determinadas. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas.

A remoção enzimática da parede celular leva à formação de protoplastos esféricos e à perda do crescimento polarizado. Entretanto, se houver nova deposição de parede celular o eixo polarizado se restabelece [166]. A indução do estado de protoplastos nestes germinantes é um evento necessário, utilizado para as transformações em *A. fumigatus*. A alteração na formação da parede celular em *A. fumigatus* pode alterar a capacidade de remoção enzimática da parede celular neste patógeno. Assim, como uma abordagem indireta para investigar a composição e a arquitetura da parede celular na linhagem $\Delta rlmA$, hifas das linhagens $\Delta rlmA$, selvagem e complementante $\Delta rlmA::rlmA^+$ foram submetidas à digestão enzimática por Lallzyme MMX™, um

mix enzimático composto por glucanases e pectinases de *Trichoderma sp.* e *A. niger*. Uma alíquota da reação de protoplastização foi retirada a cada 2 horas em um intervalo de 6 horas de incubação, e os protoplastos obtidos em cada linhagem testada neste intervalo foram quantificados em câmara de Neubauer. Desta forma foi possível observar que a linhagem mutante $\Delta rlmA$ possui uma capacidade de 79,1 % e 81,3 % de protoplastização maior que a linhagem selvagem após 4 e 6 horas de reação, respectivamente, como pode ser observado na figura 13A, indicando que a parede celular do mutante $\Delta rlmA$ era muito mais susceptível à degradação enzimática. Este resultado sugere que a linhagem mutante possuía uma composição de carboidratos modificados, o que levaria a uma maior acessibilidade à digestão por via enzimática.

Devido a este resultado e aos testes fenotípicos que demonstraram que *rlmA* está relacionado à resistência a agentes agressores da parede celular como CR e CFW (figura 11), tornou-se interessante continuar os estudos analisando a composição e a morfologia da parede celular no mutante $\Delta rlmA$. Para investigar se era a modificação da organização dos carboidratos que estaria afetando a formação da parede celular em *A. fumigatus*, o conteúdo de $\beta(1,3)$ glucana e quitina foram avaliados na linhagem mutante $\Delta rlmA$, na linhagem selvagem e na complementante $\Delta rlmA::rlmA^+$ através da ligação de dextina-1 solúvel e CFW, respectivamente. A intensidade de marcação com dextina-1 e coloração CFW por área fúngica foi, respectivamente, 91,8 % e 43,5 % mais elevado no mutante $\Delta rlmA$ do que na linhagem selvagem e complementante (figura 13B-C).

O biofilme se trata de uma comunidade de microrganismos associados e firmemente aderidos a uma superfície por meio de uma matriz extracelular de polímeros (substâncias de cadeia longa). Esta matriz é permeada por canais os quais permitem a passagem de substâncias, colocando os microrganismos ali presentes em contato com o ambiente mais externo. Uma das vantagens dos biofilmes é conferir maior resistência a estresses biológicos, químicos e físicos dos microrganismos. Uma consequência disso é o baixo sucesso no uso de antibióticos e biocidas contra microrganismos infecciosos organizados na forma de biofilme [167].

Embora os padrões de formação de biofilmes por diferentes organismos sejam similares, em fungos filamentosos o padrão da formação deste ainda é desconhecido. Fanning and Mitchell [168] propuseram um modelo da formação de biofilme nestes microrganismos que é dividido em 6 estágios que vão da formação inicial de biofilme que compreende a adesão dos esporos ou fragmentos de hifas em uma superfície, até o estágio de dispersão, no qual são liberados esporos ou fragmentos do biofilme, que atuam como novos propágulos, podendo dar origem a novos biofilmes. A parede celular é pigmentada por hidrofobinas denominadas *rodlets*, estas estão relacionadas à adesão em *A. fumigatus* [168].

Sendo a parede celular o suporte para estas moléculas relacionadas à adesão em *A. fumigatus* [24, 169] buscou-se investigar se a perda da função de RlmA poderia causar alguma alteração na adesão de *A. fumigatus*. Para isto, a capacidade da formação inicial de biofilme nas linhagens foi quantificada pelo ensaio de adesão em placas de poliestireno. Foi observada uma redução da capacidade de formação de biofilme na linhagem $\Delta rlmA$ como mostrado na figura 13D.

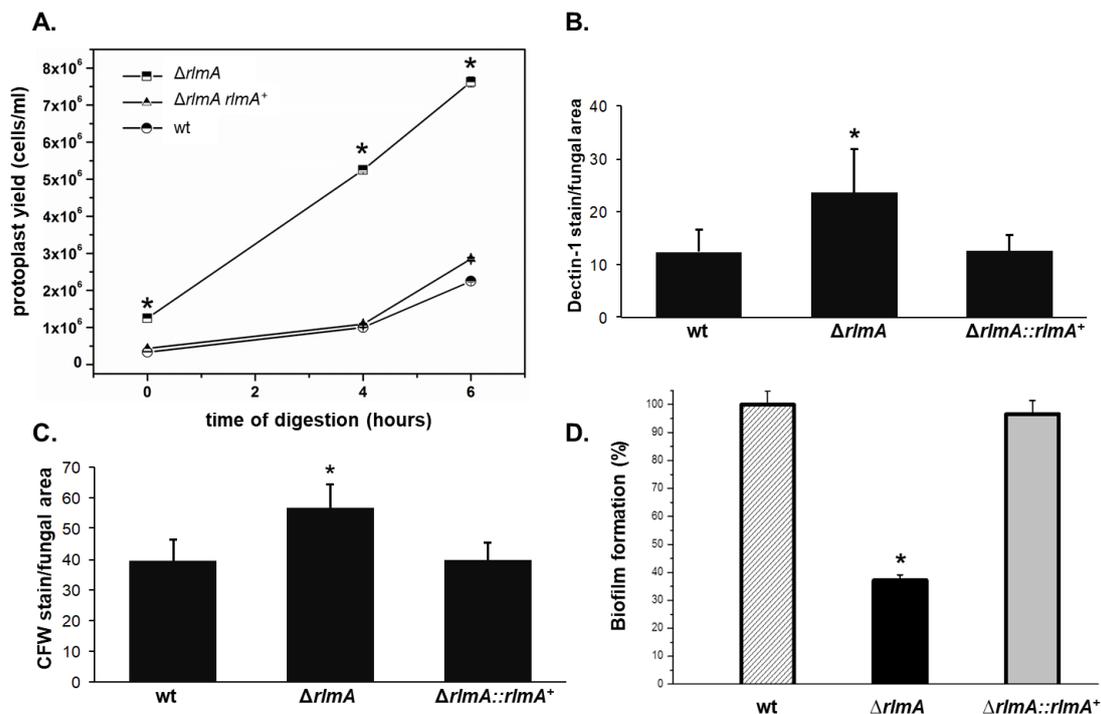


Figura 13: A perda da função de RlmA causa aumento da hidrólise enzimática da parede celular, maior detecção de $\beta(1,3)$ glucana e quitina, e diminuição da formação de biofilme. (A) 100 mg de micélio foram incubados em 50 mL da mistura de digestão contendo Lallzyme MMX™ nos tempos de incubação indicados. Os protoplastos foram quantificados em uma câmara de Neubauer (* $p \leq 0,01$). Os conídios de *A. fumigatus* foram cultivados em meio líquido para o estágio de hifas, estas foram fixadas por UV e coradas com dectina-1 solúvel ou CFW para detectar o conteúdo de $\beta(1,3)$ glucana exposta **(B)** ou de quitina **(C)**. A intensidade de coloração foi calculada pela média da quantidade de coloração relativa à área total de cada célula fúngica utilizando o software ImageJ®. Os experimentos foram realizados em triplicata, e os resultados são exibidos como valores da média \pm desvio padrão (* $p \leq 0,05$). **(D)** A formação de biofilme foi avaliada por absorbância do cristal violeta a 570 nm e expressa como a porcentagem de adesão considerando 100 % para a linhagem selvagem. Os experimentos foram realizados em quintuplicata e os resultados são as médias \pm desvio padrão (* $p \leq 0,05$).

Subsequentemente, investigou-se também a organização da parede celular no mutante $\Delta rlmA$ por microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Os germinantes da linhagem $\Delta rlmA$ possuíam a parede celular cerca de duas vezes mais espessa do que a parede celular observada na linhagem selvagem e na linhagem complementante (figura 14).

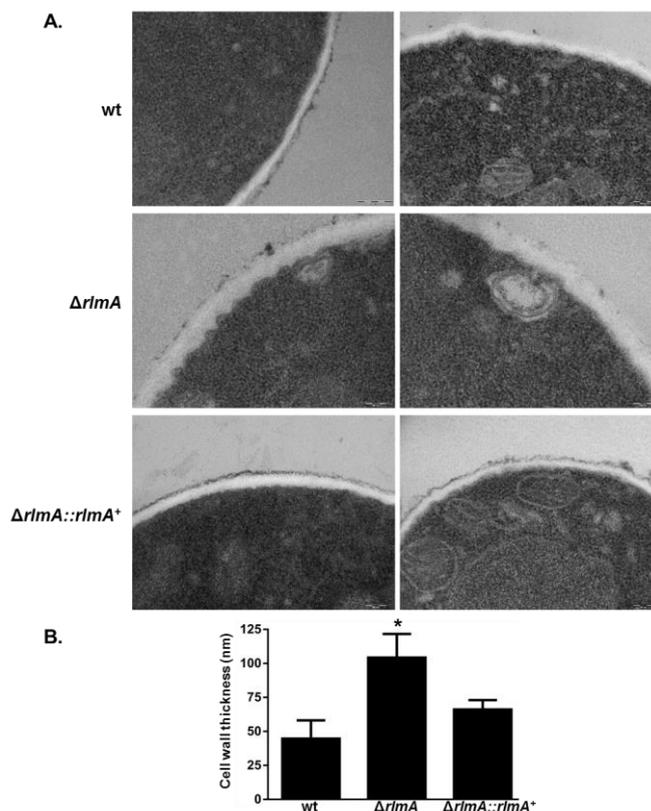


Figura 14: Germinantes da linhagem $\Delta rlmA$ apresentam parede celular mais espessa. (A) A linhagem selvagem, mutante $\Delta rlmA$ e complementante $\Delta rlmA::rlmA^+$ foram cultivadas em meio completo YG e preparados para análise de TEM. Barras = 200 nm. (B) Medida da espessura da parede celular dos germinantes. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão de 100 diferentes germinantes. * $p \leq 0,05$ (One Way ANOVA).

Existem diferenças estruturais marcantes na composição da parede celular de conídios e da fase filamentosa (hifa) do *A. fumigatus*. A parede celular conidial é pigmentada e apresenta uma superfície altamente hidrofóbica. Esta característica é conferida pela presença de melanina e de agregados de proteínas denominadas hidrofobinas [33, 170]. As hidrofobinas de classe I, com baixo peso molecular (10 a 20 kDa) estão organizadas na superfície dos conídios de *A. fumigatus* formando uma estrutura denominada *rodlet* [171]. Esta estrutura é característica dos conídios dormentes e se perdem à medida que o conídio germina e se diferencia em hifas. Estas podem estar envolvidas em várias funções, como adesão inicial às células do hospedeiro, proteção contra agentes químicos, enzimáticos e células fagocíticas no nicho ecológico e, além disso, facilitam a dispersão dos conídios por correntes de ar [172]. Para verificar a arquitetura da parede externa dos conídios e possíveis alterações na distribuição dos *rodlets*, conídios da linhagem selvagem, mutante $\Delta rlmA$ e complementante $\Delta rlmA::rlmA^+$ foram

analisados por microscopia eletrônica de varredura (SEM). Os resultados mostraram uma redução na distribuição de *rodlets* no mutante $\Delta rlmA$ em relação a linhagem selvagem e complementante $\Delta rlmA::rlmA^+$ (figura 15A). De fato, a extração de hidrofobinas presentes na superfície dos conídios com ácido fluorídrico (HF) seguida de SDS-PAGE 15 % permitiu validar a observação de que menos hidrofobinas são acumuladas no mutante $\Delta rlmA$ (figura 15B).

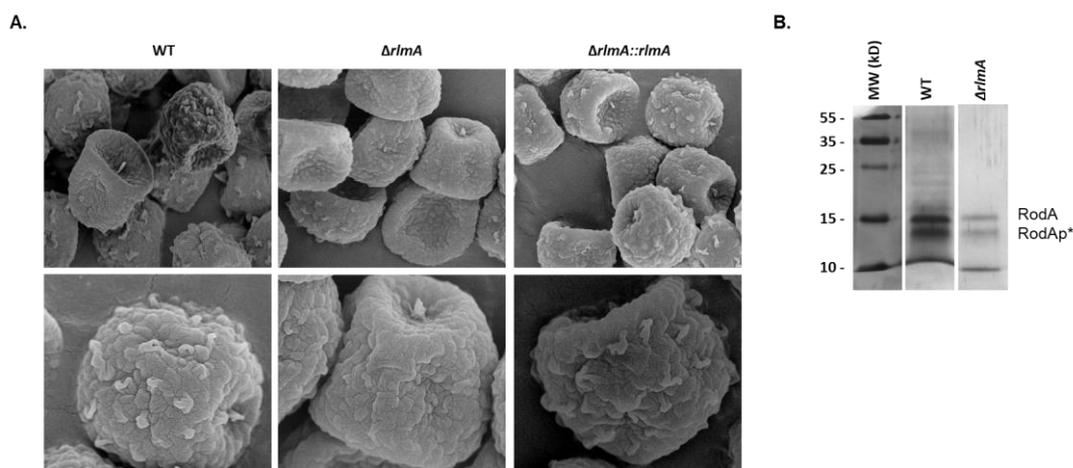


Figura 15: Análise da superfície dos conídios de *A. fumigatus* e quantificação da hidrofobina na linhagem selvagem e mutante $\Delta rlmA$. (A) Os conídios foram crescidos em meio completo sólido YG por 48 horas, em seguida coletados através de uma fita de carbono, fixados no porta amostra metálico e recobertos por *sputtering* com ouro, para posterior análise no microscópio eletrônico de varredura (Inspect S 50, FEI). Os aumentos observados são de 15.000 \times e 40.000 \times respectivamente. (B) Gel de SDS-PAGE 15 % corado com prata contendo extratos de conídios tratados com ácido hidrófluorídrico da linhagem selvagem e do mutante $\Delta rlmA$. O número de conídios submetido à extração de hidrofobinas foi validado através da contagem de UFC em meio YG sólido como normalizador do experimento. RodA corresponde à RodA nativa e RodAp* a RodA parcialmente degradada.

Em conjunto, esses resultados sugerem que a linhagem mutante $\Delta rlmA$ possui uma organização da parede celular modificada que afeta várias respostas aos estímulos ambientais.

4.1.3 Os genes *pkcA*, *mpkA* e *rlmA* da CWIP interagem geneticamente em *A. fumigatus*

Recentemente, Rocha e colaboradores demonstraram que PkcA atua juntamente a MpkA [42]. No entanto, ainda não se sabe se RlmA é o fator de transcrição MADS-box que em última análise, ativado pela fosforilação de MpkA, responde ao dano da parede celular em *A. fumigatus*. Para investigar esta questão, foram analisadas as possíveis interações genéticas entre *pkcA*,

mpkA e *rlmA* durante o dano da parede celular. Para tanto foram construídos os duplos mutantes $\Delta rlmA$ *pkcA*^{G579R}, $\Delta rlmA$ $\Delta mpkA$ e *pkcA*^{G579R} $\Delta mpkA$ (figura 16 A-B-C).

Para a construção do duplo mutante $\Delta rlmA$ *pkcA*^{G579R}, a linhagem $\Delta rlmA$ teve o marcador auxotrófico *pyrG* removido utilizando o Ácido 5-Fluoroorotico (5-fluorouracil-6-carboxylic acid monohydrate; 5-FOA) (Thermo Scientific), e posteriormente o cassete da linhagem *pkcA*^{G579R} [42] que continha novamente o marcador auxotrófico *pyrG* foi reinserido através da técnica de transformação em *A. fumigatus*. Já para a construção dos duplos mutantes $\Delta rlmA$ $\Delta mpkA$ e *pkcA*^{G579R} $\Delta mpkA$ foi amplificado o cassete de deleção gênica da linhagem $\Delta mpkA$ [30] e este foi posteriormente transformado nas linhagens *pkcA*^{G579R} e $\Delta rlmA$ de *A. fumigatus*. O cassete desta linhagem continha o gene de resistência a piritiamina, e utilizando esta droga no meio de cultura foram selecionados candidatos resistentes que foram posteriormente confirmados por PCR (figura 16 B-C).

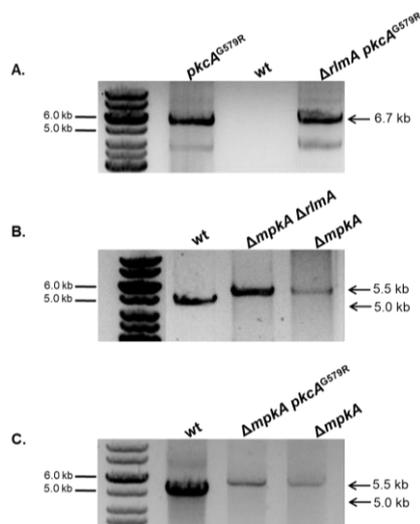


Figura 16: PCR de validação dos duplos mutantes de CWIP. (A) O cassete de substituição *pkcA*^{G579R} foi amplificado a partir do plasmídeo pRS426 que contém o cassete recombinado como descrito anteriormente por Rocha, Godoy [29], este cassete foi transformado na linhagem receptora $\Delta rlmA$ *pyrG*- para obter o duplo mutante $\Delta rlmA$ *pkcA*^{G579R}. A reposição do gene *pkcA* neste mutante foi verificada por PCR com o conjunto de oligonucleotídeos *cpkcA* FW e *pyrG* REV, produzindo uma banda de amplificação de 6,7 kb. **(B-C)** Para gerar os mutantes duplos $\Delta mpkA$ $\Delta rlmA$ e $\Delta mpkA$ *pkcA*^{G579R}, o cassete de deleção de *mpkA* foi amplificado a partir do DNA genômico da linhagem $\Delta mpkA$ utilizando o conjunto de oligonucleotídeos *MpkA*_5'_FW e *MpkA*_3'_REV e transformado em ambas as linhagens $\Delta rlmA$ e *pkcA*^{G579R}. O cassete de deleção de *mpkA* contém o gene *ptrA* como marcador de seleção [40]. A substituição do *mpkA* nestes duplos mutantes foi verificada utilizando o conjunto de oligonucleotídeos *MpkA* 600 ups e *MpkA*_3'_REV, que podem ser usados para discriminar a remoção de *mpkA* do *locus* selvagem, produzindo uma banda de amplificação de 5,5 kb no mutante nulo, ou 5,0 kb na linhagem que contém o *locus mpkA* selvagem.

A análise do crescimento radial dos duplos mutantes isolados foi realizada no intuito de avaliar possíveis defeitos de crescimento vegetativo, bem como a interferência da temperatura na taxa de desenvolvimento vegetativo nas linhagens produzidas. O crescimento e morfologia de colônias vegetativas dos duplos mutantes em meio sólido YG são apresentados na figura 17. Curiosamente, os três duplos mutantes não conidiam a 45 °C (figura 17).

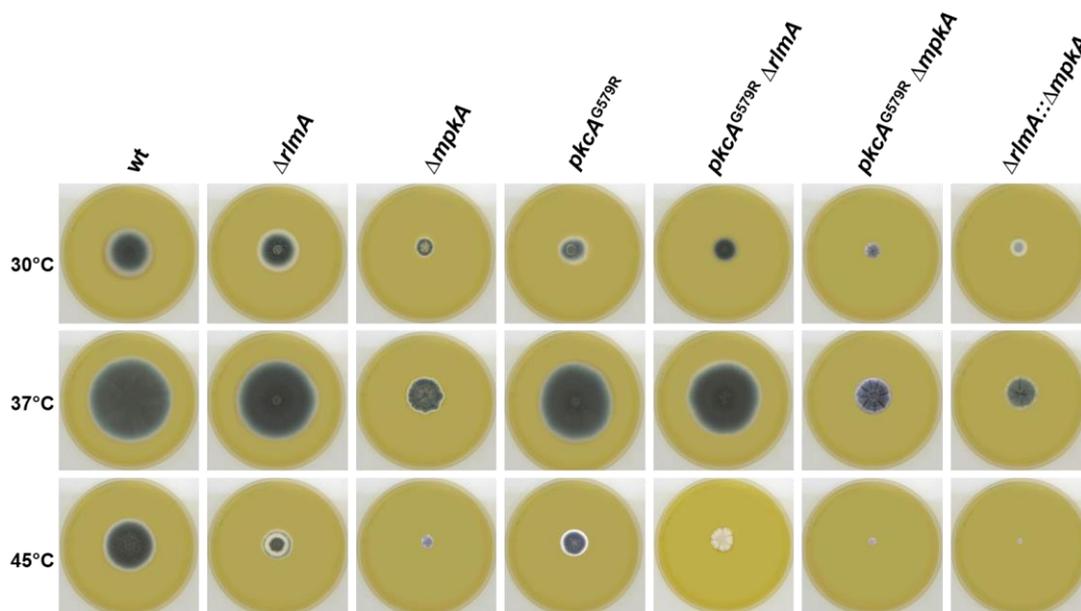


Figura 17: Crescimento radial e morfologia das colônias dos mutantes simples parentais e duplos da CWIP. 1×10^5 conídios foram inoculados no centro da placa de Petri contendo meio de cultura sólido YG, e posteriormente incubaram-se as linhagens em diferentes temperaturas durante 72 horas.

A epistasia entre os genes da CWIP foi determinada através da avaliação da sensibilidade dos duplos mutantes a CR, CFW, CASP e SDS em relação à sensibilidade dos mutantes simples parentais. O duplo mutante $\Delta rlmA \text{ } pkcA^{G579R}$ foi inibido da mesma forma que as linhagens parentais correspondentes na presença de CR, CFW, CASP e SDS, indicando que *pkcA* e *rlmA* exibem a epistasia esperada para a organização da via (figura 18, APÊNDICE B, figura B1A-B-C-D). Os genes *rlmA mpkA* também parecem estar interagindo geneticamente na presença de CR, CFW e CASP, mas não na presença de SDS, mas sabe-se que a linhagem $\Delta mpkA$ é intrinsecamente mais resistente ao SDS [40]. No entanto, o fenótipo do duplo mutante $pkcA^{G579R} \Delta mpkA$ se assemelha ao da linhagem $\Delta mpkA$ (figura 18, APÊNDICE B, figura B1-D). Uma possível explicação para isso é a de que há uma atividade residual

de PkcA no mutante *pkcA*^{G579R} e, desta forma, *mpkA* está atuando como o regulador central na CWIP de *A. fumigatus*, tal como avaliado pelos seus fenótipos mais severos na presença do estresse de parede celular. Vale ressaltar que PkcA é um gene essencial em *A. fumigatus* [29]. Estes dados indicam que a organização da CWIP em *A. fumigatus* é semelhante à via canônica em *S. cerevisiae*, e que RlmA é o fator de transcrição regulado pela via MAP quinase em *A. fumigatus*.

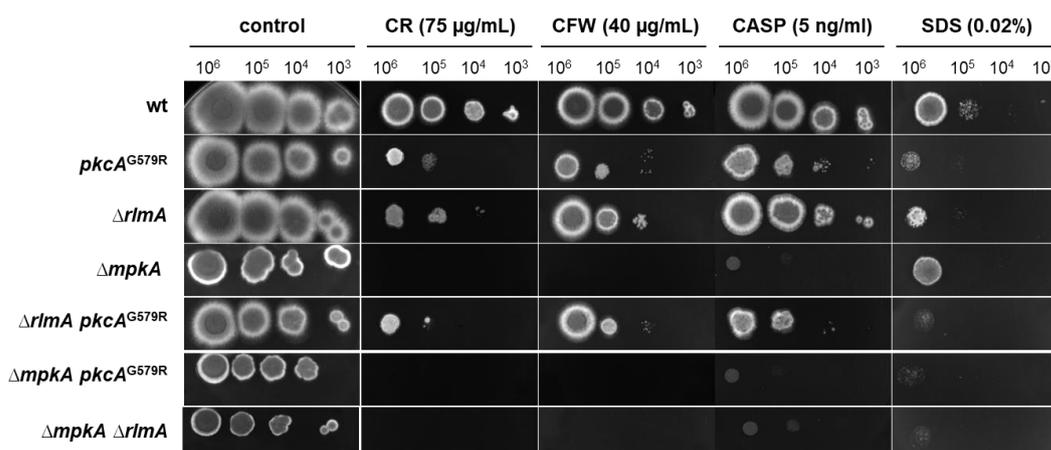


Figura 18: *rlmA*, *pkcA* e *mpkA* interagem geneticamente durante o estresse da parede celular. Fenótipos de crescimento das linhagens selvagem, *pkcA*^{G579R}, Δ *rlmA*, Δ *mpkA* e duplos mutantes correspondentes. O número indicado de conídios foi inoculado em placas de Petri contendo meio completo sólido YG suplementado com CR, CFW, CASP e SDS. As placas foram incubadas durante 48 horas a 37 °C. A interação genética foi determinada através da avaliação da sensibilidade dos duplos mutantes e dos simples mutantes parentais às drogas.

4.1.4 RlmA regula positivamente a fosforilação de MpkA e é induzido a nível proteico e transcricional durante o estresse de parede celular

Recentemente foi relatado que a fosforilação de MpkA induzida por CR é dependente de PkcA, pois a perda da função ou a inibição farmacológica de PkcA leva a níveis mais baixos da fosforilação de MpkA [42, 173], e conforme demonstrado na figura 18, *pkcA*, *mpkA* e *rlmA* interagem geneticamente durante o estresse da parede celular causado por CR. Desta forma, torna-se interessante investigar o nível de fosforilação de MpkA sob essas condições na linhagem mutante Δ *rlmA*, o que equivale dizer que essas duas proteínas interagem fisicamente durante o estresse de parede celular. Esta questão da interação entre essas duas proteínas será retomada no módulo 3 desta tese.

Com o intuito de verificar se RlmA é ativado via fosforilação pela MAP quinase MpkA na presença de um agente estressor da parede celular, a linhagem mutante $\Delta rlmA$ e a linhagem selvagem foram expostas ao CR por 15, 30 e 60 minutos. Para a detecção da fração fosforilada de MpkA utilizou-se um anticorpo anti P-p44/42 MAPK (Cell Signaling Technologies, 9101) que reconhece a fração fosforilada de MpkA, e como controle experimental utilizou-se o anticorpo anti p44/42 MAPK (Cell Signaling Technologies, 4370), que detecta MpkA total (figura 19A). Adicionalmente, como controle experimental foi utilizado também o anticorpo anti γ -tubulin (γ N-20; Santa Cruz Biotechnology) (figura 19A). O resultado de *Western blot* foi quantificado (figura 19B) utilizando o software ImageJ[®].

A proteína MpkA foi fosforilada em resposta a CR ao longo do tempo de experimento apresentando aumento de sinal de 1,5, 2,0, e 3,5 vezes após 15, 30 e 60 minutos de exposição ao CR na linhagem selvagem, respectivamente (figura 19A-B), confirmando que o CR pode induzir a CWIP em *A. fumigatus*. Surpreendentemente, a fosforilação de MpkA foi mantida a níveis mais baixos após a exposição do mutante $\Delta rlmA$ ao CR (figura 19A-B). Estes resultados sugerem que existe um possível papel regulador positivo de *rlmA* durante o estresse da parede celular que pode intensificar a atividade da CWIP, e o efeito final é o aumento da fosforilação de MpkA.

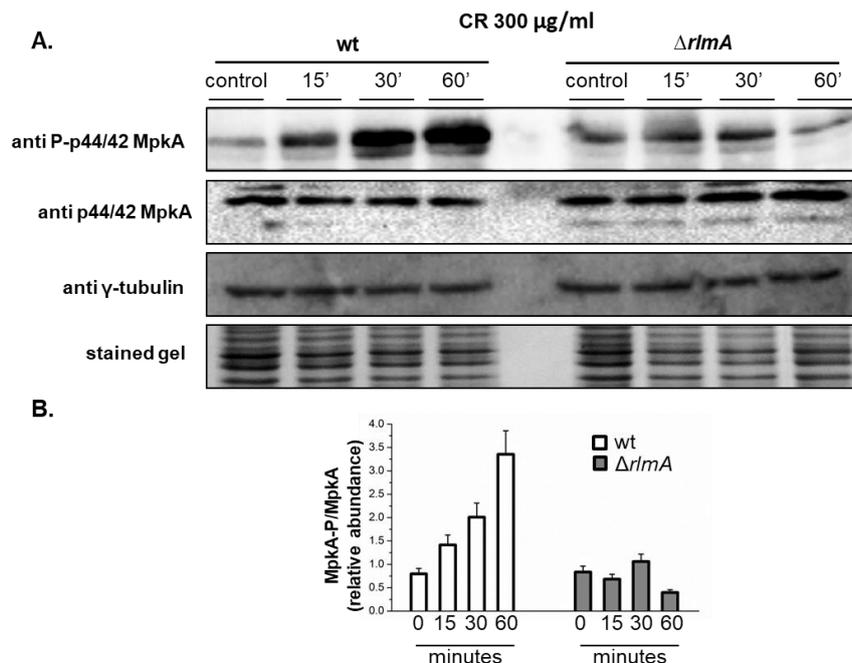


Figura 19: A deleção de *rlmA* reduz a fosforilação da MAP quinase MpkA na presença do estresse de parede celular provocado por CR. As linhagens foram cultivadas durante 16 horas em meio completo YG a 37 °C, e na sequência 300 $\mu\text{g/mL}$ de CR foram adicionados às culturas. Estas foram incubadas por 0, 15, 30 e 60 minutos na presença do agente indutor. As proteínas foram extraídas, posteriormente quantificadas e preparadas para *Western blot*. **(A)** Marcação com o anticorpo anti P-p44/42 MAPK (Cell Signaling Technologies) e anti p44/42 MAPK (Cell Signaling Technologies). Como controle de carregamento foi utilizado o gel de SDS-PAGE 12 % corado com *coomassie blue* e o anticorpo anti Y-tubulin (Santa Cruz Biotechnology). **(B)** O resultado de *Western blot* foi quantificado utilizando o software ImageJ® para a obtenção dos valores de abundância relativa.

Para avaliar a abundância proteica de RlmA durante o estresse da parede celular, foi gerada uma linhagem *rlmA::gfp*, mantendo-se o promotor endógeno e substituindo o alelo *rlmA* da linhagem selvagem de *A. fumigatus* (figura 20A). Para a construção do cassete de substituição gênica utilizou-se a técnica de recombinação *in vivo* em *S. cerevisiae* [140], que permitiu a recombinação dos fragmentos independentes no plasmídeo pRS426. Posteriormente este cassete foi amplificado por PCR utilizando os oligonucleotídeos da extremidade 5' e 3', e o produto de PCR foi purificado e posteriormente transformado na linhagem $\Delta akuB^{KU80}$ [136] de *A. fumigatus* (figura 20A). As linhagens candidatas a transformantes de *A. fumigatus* tiveram seu DNA genômico extraído e foram testadas através da técnica de PCR para a triagem dos transformantes (figura 20B). Esta linhagem resultante se comporta exatamente como a linhagem selvagem em termos de crescimento vegetativo e tolerância a agentes que causam estresse de parede celular (figura 21).

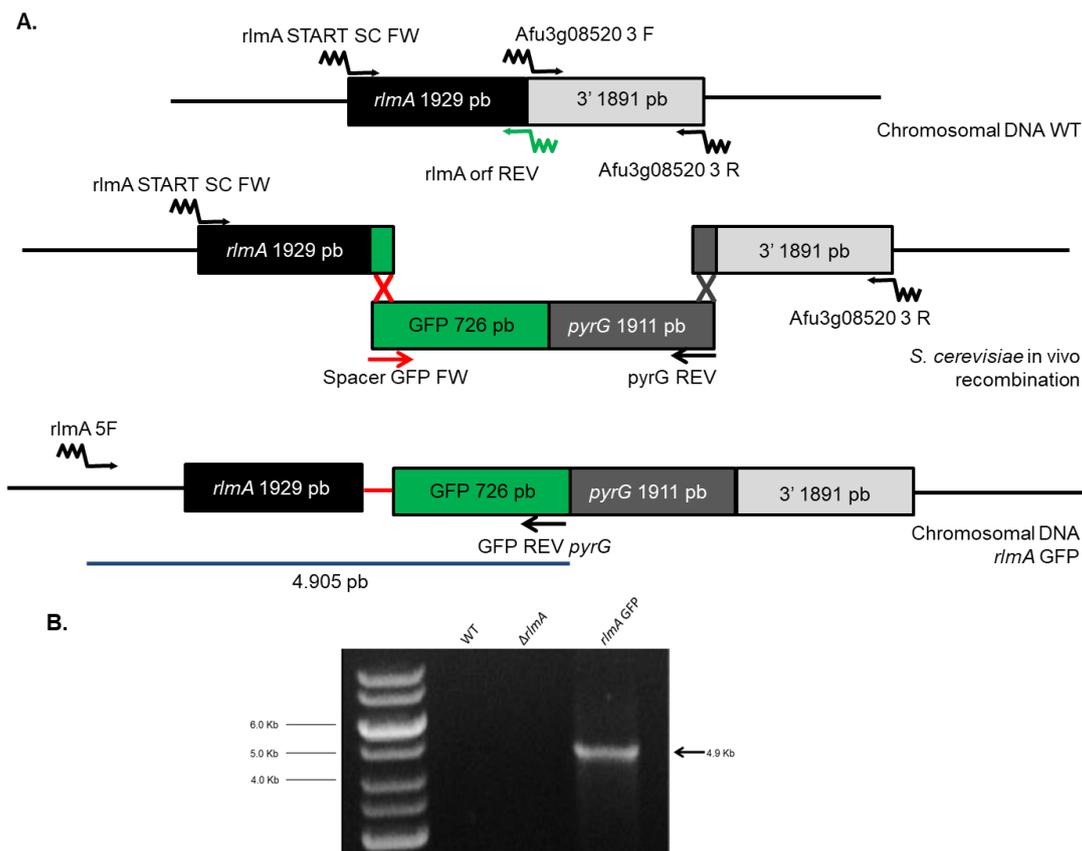


Figura 20: Construção da linhagem *rlmA::gfp* de *A. fumigatus*. (A) Estratégia de substituição genética para a construção da linhagem *rlmA::gfp*. A sequência genômica de *rlmA* sem o *stop códon* foi clonada *in frame* com o gene da proteína fluorescente verde (GFP) em uma fusão C-terminal separada por um espaçador Gly-Thr-Arg-Gly. O gene *pyrG* foi usado como um marcador de prototrofia. O ensaio de recombinação *in vivo* em *S. cerevisiae* foi realizado como descrito anteriormente. O cassete *rlmA::gfp* foi amplificado por PCR, e posteriormente transformado na linhagem selvagem de *A. fumigatus* $\Delta ku80 pyrG^-$. (B) Os transformantes foram cuidadosamente testados por PCR com os oligonucleotídeos *rlmA* 5F e GFP REV *pyrG* para confirmar a substituição do locus *rlmA* para a criação da fusão *rlmA::gfp*.

Além disso, como um procedimento de controle adicional, realizou-se a transformação do cassete *rlmA::gfp* na linhagem mutante $\Delta rlmA pyrG^-$ gerando linhagens complementantes que foram capazes de resgatar completamente o fenótipo de defeitos associados à parede celular no mutante nulo $\Delta rlmA$ (figura 21).

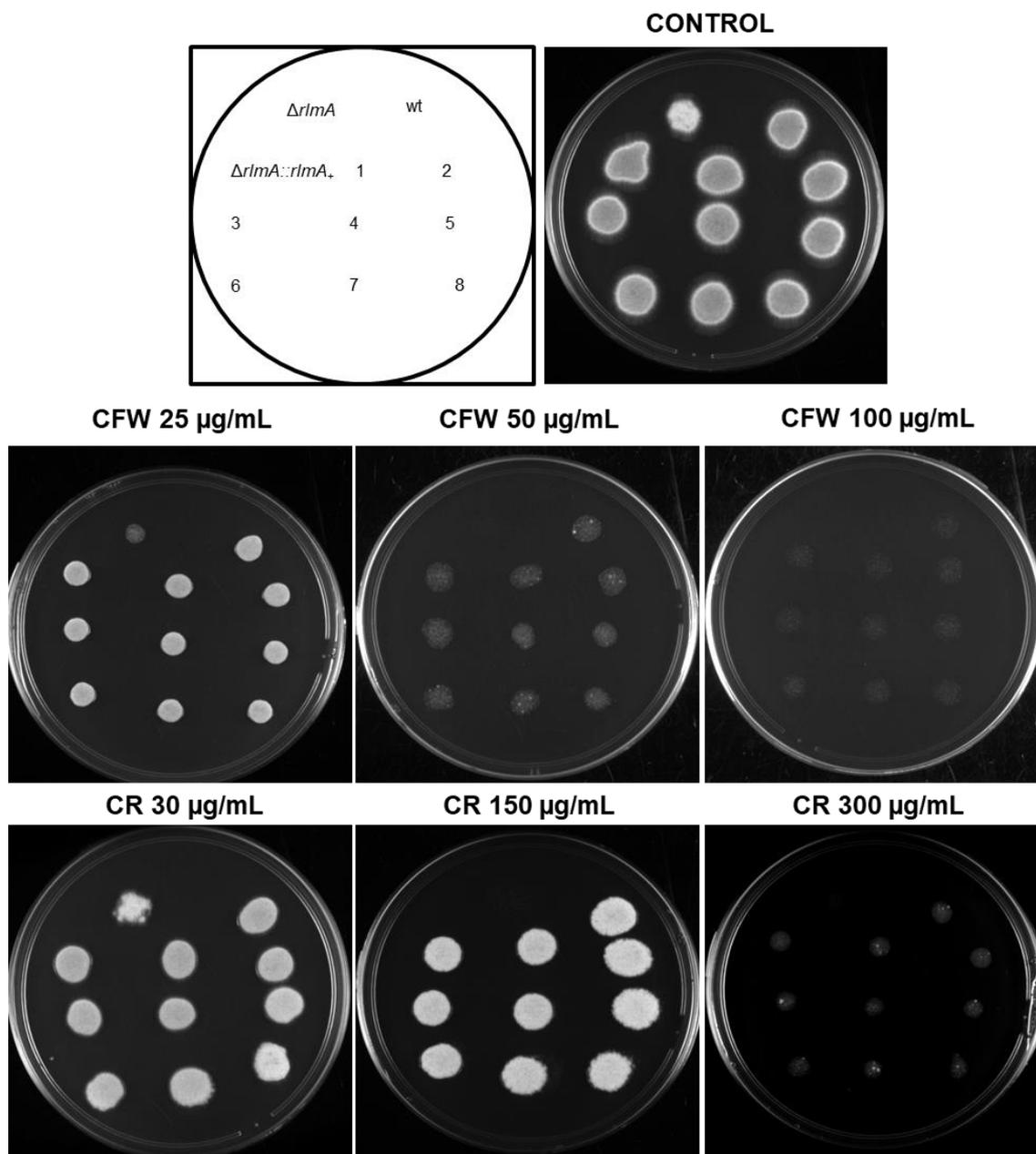


Figura 21: O cassete *rlmA::gfp* complementa funcionalmente o mutante nulo $\Delta rlmA$. O cassete *rlmA::gfp* foi amplificado a partir do plasmídeo pRS426 que continha o cassete de substituição gênica e posteriormente transformado na linhagem receptora $\Delta rlmA$ *pyrG*⁻. Vários $\Delta rlmA::rlmA::gfp^+$ revertentes foram analisados fenotipicamente na presença do estresse da parede celular causado por CFW e CR. 1×10^5 conídios de cada linhagem foram inoculados em meio sólido YG suplementado com diferentes concentrações dos agentes perturbadores da parede celular.

Para verificar se a quantidade total de RlmA é modulada na presença do estresse de parede celular, análises de *Western blot* foram realizadas utilizando o anticorpo anti GFP (Sigma Aldrich G1544). Foram analisados extratos da proteína da linhagem *rlmA::gfp* cultivada sob condições de estresse induzidas pelo CR (300 $\mu\text{g/mL}$ de CR por 15, 30 e 60 minutos). Observou-se

um aumento de cerca de 2,4 vezes na expressão de proteínas RlmA após os primeiros 15 minutos de exposição ao CR (figura 22). Consistentemente, a linhagem funcional *rlmA::gfp* apresenta os níveis de fosforilação de MpkA iguais ao da linhagem selvagem de *A. fumigatus* nas mesmas condições (figura 22).

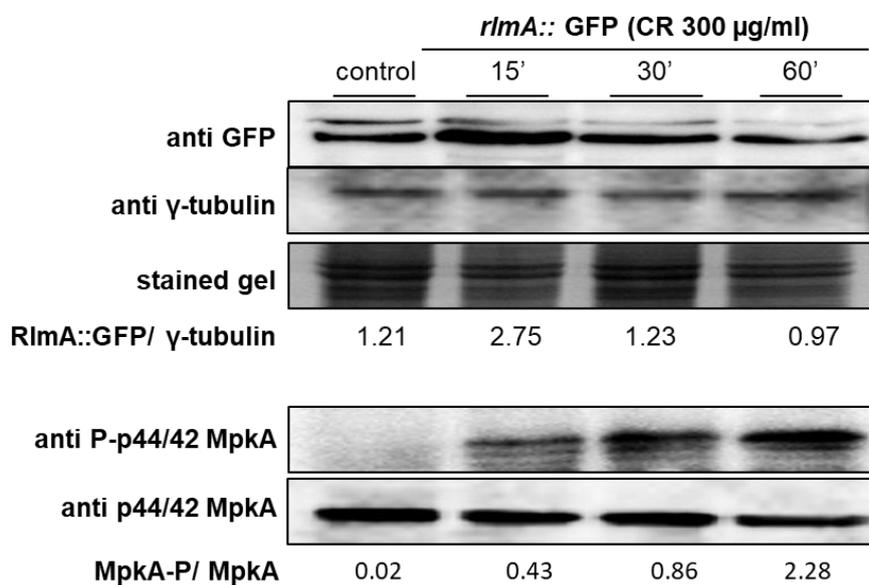


Figura 22: Análise da expressão proteica de RlmA na presença de CR. A linhagem foi cultivada durante 16 horas em meio completo YG a 37 °C, na sequência, 300 μg/mL de CR foram adicionados às culturas. Estas foram incubadas por 0, 15, 30 e 60 minutos na presença do agente indutor. As proteínas foram extraídas, quantificadas e preparadas para *Western blot*. Marcação com o anticorpo anti P-p44/42 MAPK (Cell Signaling Technologies, 9101), anti p44/42 MAPK (Cell Signaling Technologies, 4370), anti GFP (Sigma Aldrich G1544) e com o anticorpo anti Y-tubulin (yN-20; Santa Cruz Biotechnology) como controle de carregamento. O gel de SDS-PAGE 12 % corado com *coomassie blue* (Sigma Aldrich) foi utilizado como controle adicional de carregamento. O resultado de *Western blot* foi quantificado utilizando o software ImageJ® e os valores numéricos abaixo dos painéis indicam a abundância relativa.

As mesmas condições de indução do mutante $\Delta rlmA$ e da linhagem selvagem de *A. fumigatus* utilizadas para a análise da fosforilação de MpkA por *Western blot* (figura 19A), juntamente com amostras da linhagem $\Delta mpkA$, foram utilizadas para avaliar o acúmulo de mRNA do gene *rlmA* e de outros genes que codificam enzimas envolvidas na biossíntese de parede celular durante esta condição de estresse. Essa abordagem tem como objetivo compreender as eventuais alterações da transcrição, que ocorrem na célula quando o fator de transcrição *rlmA* ou a MAP quinase *mpkA* estão ausentes, o que poderia explicar o aumento da sensibilidade dos mutantes $\Delta rlmA$ e $\Delta mpkA$ a agentes estressores da parede celular. Foram analisados os níveis de mRNA

de *pkcA*, *mpkA*, *rlmA* e os principais genes que codificam enzimas da biossíntese da parede celular: a subunidade catalítica $\beta(1,3)$ glucana sintase (*fksA*); $\alpha(1,3)$ glucana sintases (*agsA-C*); 1,3- β glucanosil transferases (*gelA-C* e *gel4*), e as oito quitinas sintases de *A. fumigatus* (*chsA-G* e *csmB*) (figura 23 A-B e APÊNDICE C, figura C1A-B).

Uma análise mais detalhada dos dados os quais estão mostrados no *heat map* da figura 23 permitiu identificar os genes regulados pela CWIP em resposta ao CR, e possibilitou a divisão da resposta em três categorias: (i) os genes que respondem ao estresse por CR, e que tem a expressão aumentada (*up-regulated*) por CR, sendo eles *rlmA*, *mpkA*, *fksA*, *agsA-B-C*, *gel4* e *chsA-C-E-F-G*; (ii) os genes que não respondem ao CR e, que portanto mostram pouca ou nenhuma resposta ao CR, sendo eles *pkcA*, *gelA-B-C*, e *csmB*; e (iii) os genes de resposta negativa, que são portanto regulados negativamente por CR, sendo eles especificamente *chsB* e *chsD* (figura 23A-B). Os gráficos de expressão relativa estão apresentados no APÊNDICE C, figura C1A-B.

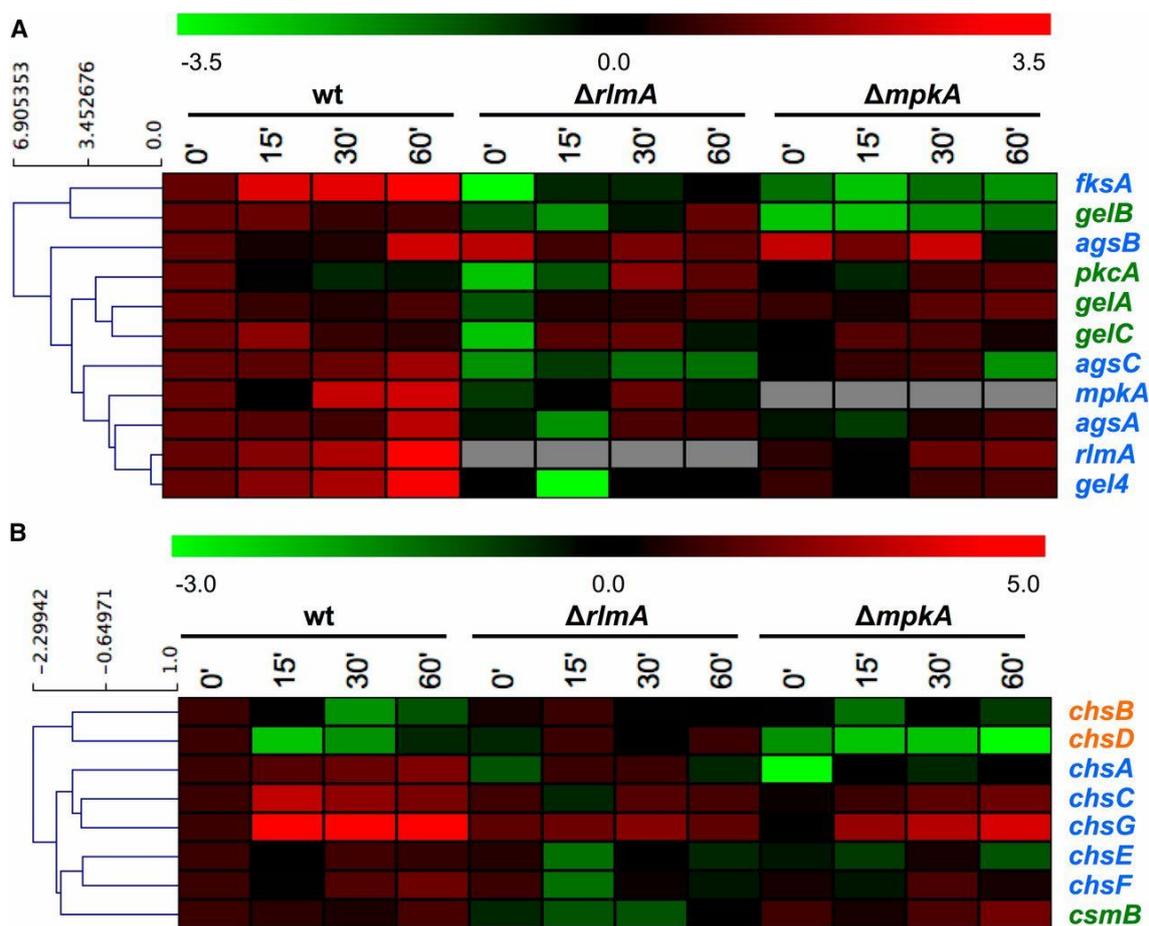


Figura 23: Análise de agrupamento hierárquico evidenciando o perfil de expressão dos genes selecionados para a linhagem selvagem e mutantes $\Delta rlmA$ e $\Delta mpkA$ em resposta ao estresse da parede celular induzido por CR. Os níveis relativos de cada transcrito foram quantificados por RT-qPCR utilizando mRNA extraído após 0, 15, 30, e 60 minutos de exposição ao CR. Os valores foram transformados em \log_2 e submetidos a um algoritmo de agrupamento hierárquico (distância Euclidiana) usando o software TMEV (disponível em <http://www.tm4.org/mev.html>). O esquema de cores foi usado para designar genes que foram regulados negativamente (verde) ou regulados positivamente (vermelho). A cor dos nomes dos genes indicam a resposta da linhagem selvagem ao estresse da parede celular induzida por CR, conforme mencionado no texto: (i) genes *up-regulated* (azul); (ii) genes com resposta limitada (verde); (iii) genes de resposta negativa (laranja). **(A)** diversos genes que regulam a biossíntese da parede celular e **(B)** genes que regulam as quitinas sintases. O APÊNDICE C, figura C1A-B mostra os gráficos de barras e o valor da expressão relativa de cada ponto de tempo.

Os resultados mostram que há padrões variáveis para a expressão dos genes relacionados à síntese de parede celular no *background* genético das linhagens mutantes $\Delta rlmA$ e $\Delta mpkA$. Assim, torna-se interessante agrupar os genes com o objetivo de mostrar a ativação/inibição ou a não correlação entre *rlmA*, *mpkA* e os genes da biossíntese da parede celular selecionados neste estudo transcricional. Estes resultados estão resumidos no diagrama apresentado na figura 24, onde o esquema de cores é o mesmo descrito na figura 23.

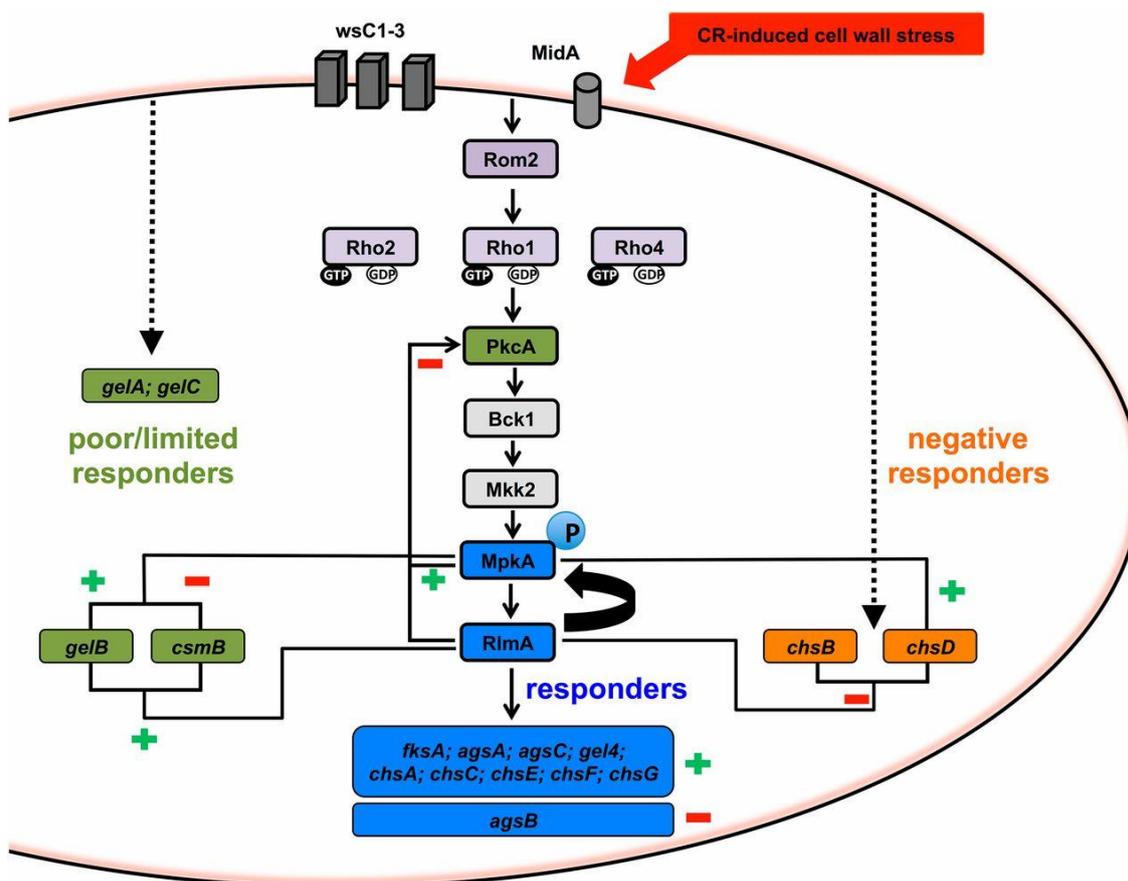


Figura 24: Esquema demonstrando a proposta de regulação gênica para a ativação/inibição ou a não correlação entre *rlmA*, *mpkA* e os genes da biossíntese da parede celular durante o estresse induzido por CR. Na CWIP MidA é o principal mecanossensor envolvido no estresse de parede celular responsável pela indução de agentes após o tratamento com CR. A conexão do módulo PkcA-Bck1-Mkk2-MpkA aos elementos *upstream* de sinalização é mediada pelo fator de troca do nucleotídeo guanina Rom2 e pela Rho GTPase Rho1. As caixas azuis indicam genes que respondem ao CR e são, portanto, transcricionalmente regulados. As caixas verdes indicam genes agrupados na categoria de respondedores limitados ao CR que resulta em ausência de resposta ou resposta limitada ao CR. As caixas laranja representam os genes de resposta negativa (*down-regulated*) por CR. Os símbolos (+) e (-) mostrados em verde ou vermelho indicam uma sequência reguladora de *rlmA* e/ou *mpkA* na regulação positiva ou negativa (respectivamente) na transcrição de genes alvos. A seta curva indica o efeito regulador de *feedback* positivo de *rlmA* na manutenção da fosforilação de MpkA durante o estresse da parede celular induzido por CR. As linhas tracejadas indicam mecanismo adicional de transdução de sinalização hipotético. Este diagrama é baseado nos dados apresentados neste trabalho e em dados publicados anteriormente [23, 29, 32, 39].

Os genes de resposta (letras azuis e caixas azuis na figura 23 e figura 24, respectivamente) são transcricionalmente regulados por ambos, RlmA e MpkA, de forma positiva, exceto *agsB*, cuja expressão foi significativamente aumentada em ambos os mutantes $\Delta rlmA$ e $\Delta mpkA$, especialmente na ausência de CR (3,7- e 3,9- vezes de aumento, respectivamente). Dentre os genes que possuem pouca resposta ao CR (mostrado por letras verdes e

caixas verdes na figura 23 e figura 24, respectivamente), *pkcA* é regulado negativamente por *rlmA* e *mpkA*, enquanto a quitina sintase *csmbB* é regulada positivamente por *rlmA* e regulada negativamente por *mpkA*. Além disso, *gelB* é regulado positivamente por *rlmA* e *mpkA*. Curiosamente, *gelA* e *gelC* parecem não ser controlados pelo circuito de sinalização da MpkA-RlmA durante a exposição ao CR. Em relação aos dois genes de resposta negativa (*chsB* e *chsD*; mostrados em letras laranjas e caixas laranjas na figura 23 e figura 24, respectivamente), ambos também são regulados negativamente por *rlmA*, enquanto *chsD* é regulado positivamente exclusivamente por *mpkA* (os valores de expressão estão demonstrados no APÊNDICE C , figura C1A-B).

Em relação aos genes reguladores *mpkA* e *rlmA* (respondedores ao CR: letras azuis e caixas azuis na figura 23 e figura 24, respectivamente), a ativação transcricional de *rlmA* na linhagem selvagem é acompanhada por um aumento nos níveis da proteína RlmA (figura 22). Em contraste, esse aumento na abundância do mRNA de *rlmA* é significativamente reduzido na linhagem $\Delta mpkA$ em comparação com a linhagem selvagem (2,2 vezes após 60 minutos de tratamento com CR, APÊNDICE C , figura C1A), sugerindo que a ativação de *rlmA* em resposta a CR depende da sinalização PkcA-MpkA. Do mesmo modo, há também uma menor abundância de transcritos de *mpkA* no mutante $\Delta rlmA$ em comparação com a linhagem selvagem, correlacionando-se com os níveis mais baixos de fosforilação de MpkA observados na figura 19A.

Estes resultados sugerem que existe um ciclo de *feedback* positivo entre MpkA e RlmA, e que esses genes estão envolvidos na ativação transcricional de vários genes relacionados à parede celular e também na regulação da CWIP.

Como uma abordagem adicional para compreender a função de *rlmA* de *A. fumigatus* na ativação de genes envolvidos na manutenção da parede celular, construiu-se uma linhagem contendo o gene da luciferase (*mLuc*), um gene repórter, sob o controle do promotor de *agsA* ($\alpha(1,3)$ glucana sintase) de *A. niger*, para monitorar e medir as mudanças temporais na expressão da luciferase. Esta abordagem foi escolhida porque em *A. niger*, RlmA e o domínio BOX de RlmA TA(A/T)4TAG no promotor de *agsA* são necessários para induzir o gene *agsA* na presença de CFW [145]. Por conseguinte, duas linhagens

foram geradas, uma em que o *locus pyrG* da linhagem selvagem (*akuB*^{KU80}) foi substituído pelo cassete *PagsA::mLuc* (MAF 6.6) e outro em que o *locus pyrG* da linhagem $\Delta rlmA$ foi substituído pelo cassete *PagsA::mLuc* (MAF 8.1). A atividade da luciferase destas linhagens foi determinada em um ensaio de atividade de luciferase na presença do estresse de parede celular induzido por CFW (figura 25). Os resultados mostram que a atividade da luciferase foi de ~5 a 20 vezes maior na linhagem MAF 6.6, sendo dose dependente de CFW em comparação com a linhagem 8.1 MAF ($\Delta rlmA$). Estes resultados indicam que RlmA de *A. fumigatus* pode ligar-se ao *motif* de ligação de *agsA* e ativar a expressão da luciferase em resposta a um dano da parede celular, o que sugere ainda um papel direto para *rlmA*, onde este regula a expressão de genes envolvidos na resposta ao estresse da parede celular.

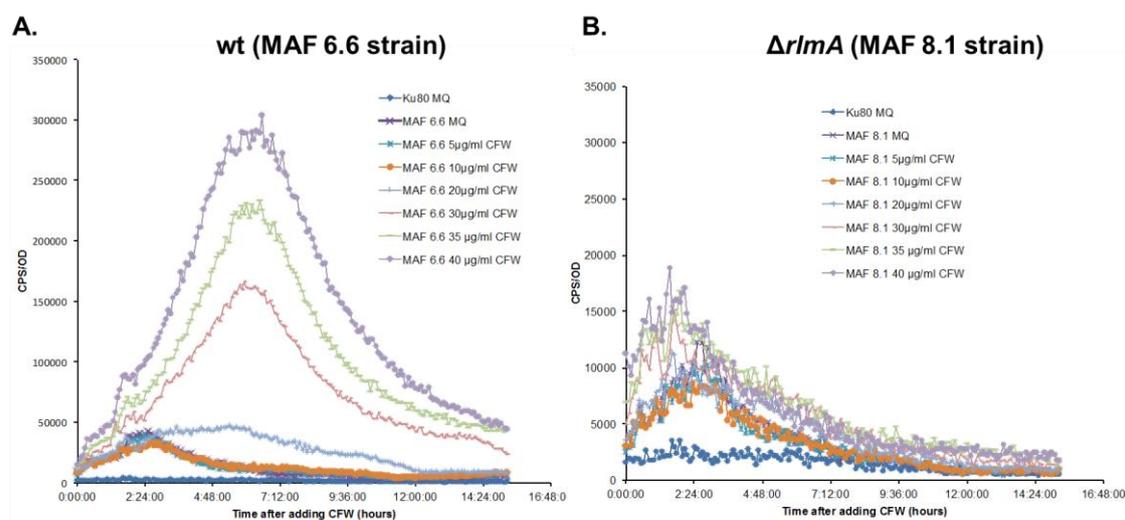


Figura 25: Ensaio de atividade Lux em *A. fumigatus* MAF 6.6 (wt; *PagsA::mLuc*) e MAF 8.1 ($\Delta rlmA$; *PagsA::mLuc*) incubadas com diferentes concentrações de CFW. (A) Atividade da luciferase medida em OD_{600nm} durante a incubação da linhagem controle de *A. fumigatus* ($\Delta akuB$ ^{KU80} reporter lux) com água deionizada e MAF 6.6 na presença de 5-40 µg/mL de CFW após 15 h de incubação. (B) Atividade da luciferase medida em OD_{600nm} durante a incubação da linhagem controle de *A. fumigatus* ($\Delta akuB$ ^{KU80} reporter lux) com água deionizada e MAF 8.1 ($\Delta rlmA$; *PagsA::mLuc*) na presença de 5-40 µg/mL de CFW após 15 horas de incubação. Os resultados foram normalizados pelo número de conídios ($1,5 \times 10^4$ por ensaio) e são expressos como resultado de três repetições independentes.

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram, desde as primeiras análises fenotípicas do mutante $\Delta rlmA$, o seu acentuado defeito na manutenção da integridade da parede celular (figura 11). Dessa forma, embora já tenham sido apresentados resultados de análise transcricional desse

mutante durante o estresse de parede celular (figura 23, APÊNDICE C , figura C1A-B), estes foram realizados somente com um grupo particular de genes. Uma das observações desse trabalho é a de que a função de RlmA pode ser mais extensa e não completamente correlata ao mecanismo regulatório em *S. cerevisiae* em termos dos genes envolvidos na síntese e reforço da parede que estariam sob o controle transcricional de *rlmA*. Dessa forma, realizou-se experimentos de *microarray* que tiveram como objetivo: (i) aumentar o conhecimento sobre quais genes podem ser modulados positivamente por *rlmA*; (ii) quais genes são diferencialmente expressos como um efeito de resposta da célula, e que podem estar relacionados à manutenção da integridade da parede celular e que portanto são independentes de *rlmA*.

Devido aos resultados anteriores que mostraram que CR na concentração de 300 µg/mL foi capaz de ativar a via da integridade da parede celular via ativação de MpkA por fosforilação (figura 19), esta concentração de CR foi escolhida para estudar como a linhagem $\Delta rlmA$ se adapta à perturbação da integridade da parede celular sob a ação deste agente.

Embora os dados desse trabalho revelem que *rlmA* desempenha um papel chave na integridade da parede celular em *A. fumigatus*, a análise do perfil transcricional mostrada na figura 23 abordou um número bem pequeno de genes sabidamente envolvidos na biossíntese e reforço da parede celular. De modo interessante, um estudo de análise transcricional do mutante da MAP quinase *mpkA* indicou também que poucos genes diretamente relacionados e conhecidos como importantes para a manutenção da integridade da parede celular foram observados em análises de *microarray* [27].

Dentre os genes que puderam ser identificados após exposição ao CR nas análises de *microarray* estão o próprio *rlmA* (Afu3g08520), *fksA* (Afu6g12400), *gel4* (Afu2g05340), Afu1g12040 (*chitin biosynthesis protein*), Afu3g05580 (*Protein with a predicted role in the regulation of chitin synthase activity*) como mais expressos na linhagem selvagem, e estes dados foram validados através das análises de RT-qPCR em tempo real (dados não mostrados). Entretanto não houve modulação desses genes quando a linhagem selvagem e $\Delta rlmA$ foram comparadas em condições de não indução por CR.

O aumento da expressão de *rlmA* durante a exposição à droga CR reafirma a participação deste gene na manutenção da integridade da parede celular e valida os resultados obtidos por RT-qPCR em tempo real apresentados na figura 23A-B.

A análise de *microarray* mostrou indução do gene *fksA* (Afu6g12400; subunidade catalítica da enzima $\beta(1,3)$ glucana sintase) na presença do CR e um comportamento de dependência parcial de *rlmA*, conforme também demonstrado anteriormente (figura 23A). Isto é, houve uma menor expressão desse gene na linhagem mutante sob estresse de parede celular. Entretanto, neste mesmo experimento não foram observadas alterações significativas da expressão de genes codificando para as quitinas sintases (*chsA-G*) e $\alpha(1,3)$ glucana sintases (*agsA-C*), apesar desses genes terem apresentado variação de expressão quando analisados por RT-qPCR em tempo real (figura 23A-B).

Os genes que codificam as enzimas glucanosiltransferases (*gel*) são necessários para a alongação das cadeias de $\beta(1,3)$ glucana da parede celular [174, 175]. *gelA-C* também não apresentaram modulação significativa durante exposição ao CR. Porém o gene *gel4* (Afu2g05340) apresentou-se como mais expresso na linhagem selvagem e reprimido na linhagem $\Delta rlmA$ na presença de CR, e estes dados foram validados através da análise de RT-qPCR em tempo real (figura 23A). O gene *gel4* é uma glucanosiltransferase essencial constitutivamente expressa durante o crescimento da hifa e também induzida durante a hipóxia [176, 177]. Ao contrário dos outros genes da família estudados até agora (sete no total), o *gel4* é o único essencial [176].

Além disso, alguns outros genes relacionados à síntese da parede celular foram diferencialmente expressos exclusivamente no experimento de comparação da linhagem selvagem em relação ao mutante sem exposição ao CR. Dentre esses está o gene *agsA* (Afu3g00910) que codifica uma $\alpha(1,3)$ glucana sintase, *gelA* (Afu2g01170) (cerca de 3,0 vezes mais expresso na linhagem selvagem), *gel5* (Afu8g02130) (cerca de 2,5 vezes mais expresso na linhagem selvagem), ambos codificando glucanosiltransferases e a quitina sintase *chsE* (Afu2g13440). A figura C2 (APÊNDICE C) mostra um *heat map* apresentando o padrão de expressão de genes selecionados nos experimentos

de comparação da linhagem selvagem e da linhagem $\Delta rlmA$ na ausência de exposição ao CR.

Durante a exposição ao CR foram modulados negativamente também vários genes relacionados principalmente à remodelação da parede celular, a maioria são ORFs ainda não caracterizadas em *A. fumigatus*, como, por exemplo, genes envolvidos no metabolismo de β glucanas: Afu4g06820 que é uma proteína GPI (glicosfosfatidilinositol) envolvida na biossíntese de parede celular de conídios [178]; Afu7g01540 uma endo 1,4 β glucanase; Afu8g02330, uma endoglucanase, putativa; Afu6g01800 (endoglucanase 1,4 β glucanase); Afu2g09520 (endo 1,4 β glucanase); Afu7g08510 (α (1,3) glucanase); e Afu1g04260 endo-1,3 β glucanase (*engl1*). A deleção de *engl1*, entretanto, não apresentou fenótipos evidentes em relação à linhagem selvagem [179].

As análises de *microarray* permitiram identificar vários genes relacionados à remodelação da parede celular diferencialmente expressos entre a linhagem selvagem e a linhagem mutante $\Delta rlmA$, que não foram demonstrados como dependentes de RlmA em outros organismos fúngicos, tanto na ausência como na presença do estresse de parede celular.

Iniciando os estudos dos possíveis novos alvos de RlmA durante o estresse de parede celular em *A. fumigatus*, uma análise *in silico* foi realizada usando o preditor MEME [180] e a ferramenta de comparação de motivos TOM-TOM [181], para a identificação dos genes que apresentam o domínio de ligação de *rlmA* identificado anteriormente em *A. niger* o qual mostrou-se conservado também em *A. fumigatus* TA(A/T)4TAG [58, 182]. A partir dessa análise, alguns genes que continham o domínio de ligação predito de RlmA (RLM Box), e estavam ou não presentes nas análises de *microarray*, foram escolhidos de acordo com a sua função e possível relação com o remodelamento da parede celular em *A. fumigatus* e também em outros fungos filamentosos. Para estes genes selecionados foram desenhados oligonucleotídeos direcionados para a análise por ChIP-qPCR da sua região promotora. Os genes escolhidos, assim como as sequências do domínio de ligação de RlmA na região promotora encontrado em cada gene estão listados na tabela 11. A localização do RLM Box na região promotora destes genes está esquematizada na figura 26A.

Tabela 11: Genes relacionados a biossíntese e manutenção da integridade da parede celular de *A. fumigatus* selecionados para a análise por ChIP-qPCR do fator de transcrição RlmA.

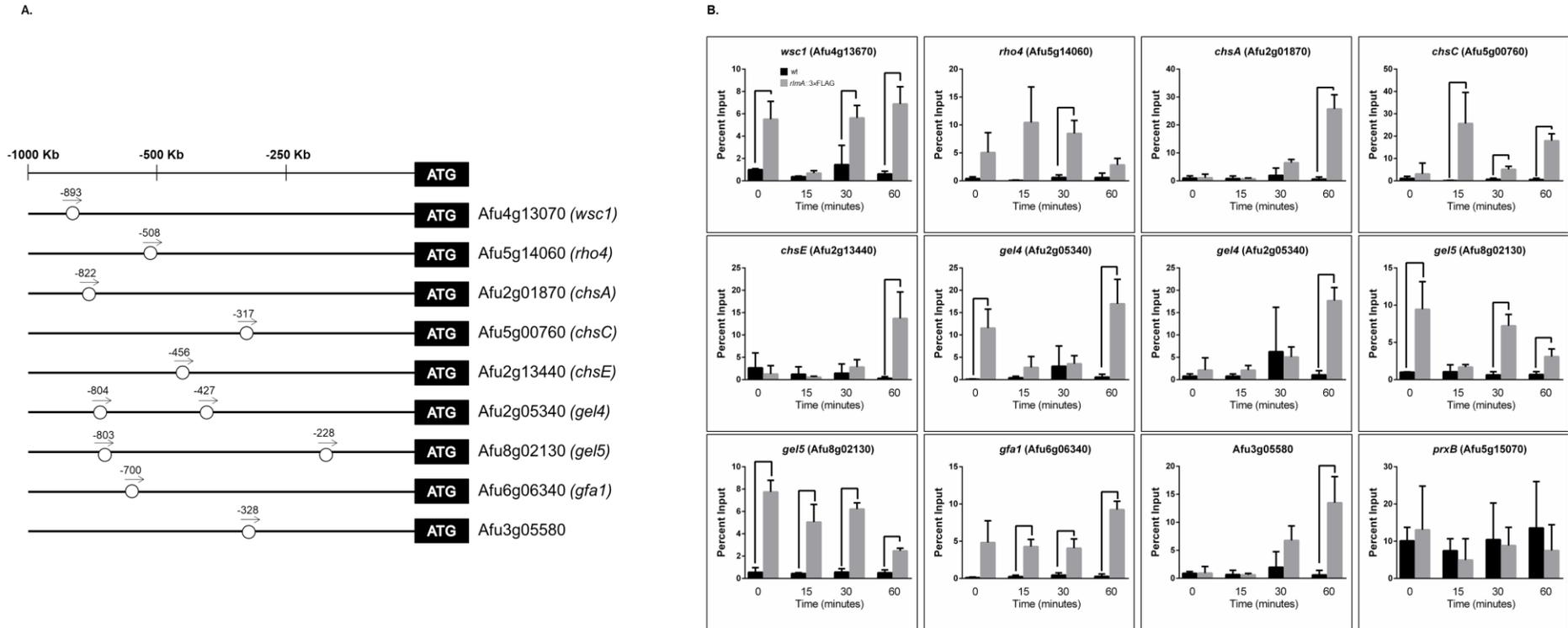
Gene	Sequência do RLM Box na região promotora
Afu4g13070 (<i>wsc1</i>)	TTATTTTTAA
Afu5g14060 (<i>rho4</i>)	CTAAAAATAA
Afu2g01870 (<i>chsA</i>)	TTATTTTTAG
Afu5g00760 (<i>chsC</i>)	CTAATAATAA
Afu2g13440 (<i>chsE</i>)	TTAATAATAA
Afu2g05340 (<i>gel4</i>)	ATTAATAATAA
Afu2g05340 (<i>gel4</i>)	TTAATATTAA
Afu8g02130 (<i>gel5</i>)	ATTATTTTTA
Afu8g02130 (<i>gel5</i>)	ATTATATATA
Afu6g06340 (<i>gfa1</i>)	TTATTTTTAA
Afu3g05580	TTTATTTTTA

Os ensaios de ChIP-qPCR foram realizados conforme Ries, Rocha [183] com modificações. Brevemente, a linhagem *rlmA::3xFLAG* (figura 63, módulo 3) e a linhagem selvagem de *A. fumigatus* foram cultivadas por 16 horas em meio completo líquido YG, e após foram incubadas com 300 µg/mL de CR por 15, 30 e 60 minutos, seguindo o mesmo regime anterior para induzir o estresse de parede celular. As amostras de micélio foram posteriormente transferidas para outro *erlenmeyer* e submetidas ao *cross-linking* químico DNA-proteína. As amostras foram pulverizadas utilizando almofariz e pistilo até a obtenção de um pó fino. Este pó foi ressuspendido no tampão CLB (seção 3.8.29.3), e em seguida as amostras foram lisadas utilizando ultrassom de ponteira de acordo com o ciclo estabelecido [183]. Após a lise das amostras, foi realizado o *reverse cross-linking*, as amostras foram digeridas com RNase, o DNA foi purificado e correu-se um gel de agarose para verificar a qualidade da lise onde esperava-se observar fragmentos entre 200 e 600 bp (dados não mostrados). Após a validação da sonicação, o lisado foi imunoprecipitado utilizando a resina *Dynabeads protein A*[®], e através da realização de qPCR em tempo real identificou-se os parceiros de RlmA durante o estresse de parede celular em *A. fumigatus*. Como controle negativo foi utilizado um oligonucleotídeo que se liga a uma sequência exônica no gene *PrxB* (figura 26B).

As análises de ChIP-qPCR demonstraram que RlmA se liga a região promotora do mecanossensor *Wsc1* (figura 26B), o mutante nulo deste mecanossensor, $\Delta wsc1$, possui alteração no crescimento de colônias e na produção de conídios [23], RlmA também se ligou a Rho GTPase *downstream* a *Wsc1*, *Rho4* (figura 26B). *Rho4* está localizado no septo durante o crescimento

polarizado em *A. fumigatus*, e o mutante nulo $\Delta\rho4$ possui redução na conidiação e aumento da susceptibilidade a agentes e condições perturbadoras da parede celular (CFW, CR, temperatura), e além disso Wsc1 e Rho4 demonstraram ser importantes na resistência ao caspofungina, inibidor de $\beta(1,3)$ glucana síntase [23]. Rho GTPases são conservadas em diversos organismos fúngicos incluindo *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans* e *A. fumigatus* [53], e são responsáveis pela ativação da proteína quinase C, a quinase apical da CWIP, porém Dichtl, Helmschrott [23] sugerem que a GTPase Rho4 não tem a sua ação na manutenção e integridade da parede celular via CWIP, e sim por meio de alguma via acessória que promove a ativação do fator de transcrição RlmA [23].

As análises de ChIP-qPCR demonstraram também que RlmA se liga a região promotora dos genes que codificam enzimas envolvidas na biossíntese de quitina, *chsA-C-E*, e a Afu3g05580 (*Protein with a predicted role in the regulation of chitin synthase activity*) e a *gsfA* (glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase), estas duas últimas ainda não estão caracterizadas em *A. fumigatus*, porém em *S. cerevisiae* demonstraram estar envolvidas na ativação da biossíntese de quitina em resposta a danos causados a parede celular [184, 185], e além disso RlmA se ligou a região promotora de duas enzimas glucanosiltransferases (*gel*) necessárias para a elongação das cadeias de $\beta(1,3)$ glucana da parede celular, *gel4* e *gel5* (figura 26B).



4.1.5 A perda de *rlmA* aumenta a susceptibilidade a drogas antifúngicas e altera a produção de ergosterol

Baseado nos fenótipos relacionados à parede celular, e para determinar como a perda de *rlmA* afeta o crescimento na presença das principais classes de compostos antifúngicos no uso clínico [186], avaliou-se a sensibilidade das linhagens selvagem e Δ *rlmA* para o triazol voriconazol, anfotericina B e para caspofungina pelo método de *Etest*. Mesmo sendo processado como teste de difusão em disco, o *Etest* difere do método de disco convencional pelo uso de um gradiente pré-formado e estável do fármaco.

A anfotericina B interage especificamente com o ergosterol, esteroide constituinte exclusivo da membrana celular fúngica, levando à formação de poros através de membranas lipídicas [187]. A alteração da permeabilidade celular permite, portanto, o escape de pequenos íons e metabólitos, principalmente íons potássio, levando eventualmente à morte celular [188].

As equinocandinas constituem a classe mais nova de agentes antifúngicos. A caspofungina atua na parede celular do fungo ao inibir a síntese de $\beta(1,3)$ glucana, onde induz alterações morfológicas e de crescimento que podem resultar na ruptura da parede celular, possuindo uma ação fungicida [21]. Atualmente, a caspofungina só é aprovada para terapia de recuperação em pacientes com AI refratária, que não respondem ao voriconazol [186].

Os azóis constituem um grupo de agentes fungistáticos sintéticos com amplo espectro de atividade [189]. O principal alvo dos antifúngicos azólicos é a enzima citocromo P450 lanosterol $\alpha(1,4)$ desmetilase, codificada pelo gene *erg11*. A consequente depleção de ergosterol altera a fluidez da membrana, interferindo na ação das enzimas associadas à membrana. O efeito global consiste em inibição da replicação. Os principais fármacos disponíveis incluem fluconazol, itraconazol, cetoconazol, miconazol e econazol, sendo o voriconazol o mais amplamente utilizado desta classe para o tratamento de AI [20].

Não foram observadas diferenças entre as três linhagens na presença da anfotericina B (dados não mostrados). No entanto, houve um aumento sutil na sensibilidade ao voriconazol na linhagem Δ *rlmA* (CIM = 0,125 e 0,094 para as linhagens selvagem e mutante Δ *rlmA*, respectivamente) (figura 27A).

Na presença de tiras de caspofungina, houve uma área maior de inibição do crescimento para a linhagem mutante $\Delta rlmA$ (CIM = 0,094 e 0,032 para as linhagens selvagem e mutante $\Delta rlmA$, respectivamente) (figura 27B), o que confirma os resultados observados em testes de *drop-out* (figura 11). A zona de inibição foi notavelmente mais clara em tiras de caspofungina no mutante $\Delta rlmA$ contrastando com a zona de compensação incompleta em torno da tira de caspofungina observada na linhagem selvagem, que pode ser parcialmente explicado pela natureza fungistática desta droga em *A. fumigatus* [21, 186]. O mesmo fenótipo foi anteriormente relatado no mutante $pkcA^{G579R}$, indicando que *rlmA* e *pkcA* podem interagir durante o dano da parede celular [42].

O aumento da sensibilidade ao voriconazol e fluconazol no mutante $\Delta rlmA$ (figura 27A e C, respectivamente) levou a investigar o conteúdo de ergosterol nos simples mutantes parentais e duplos mutantes da CWIP (figura 27D). Todas as linhagens mutantes testadas apresentaram menor produção de ergosterol em comparação com a linhagem selvagem (* $p \leq 0,0001$). Os mutantes $\Delta rlmA$, $pkcA^{G579R}$ e $\Delta mpkA$ apresentaram cerca de 23 %, 30 % e 48 % de redução do teor de ergosterol, respectivamente. Além disso, há um efeito sinérgico nos mutantes duplos $\Delta mpkA \Delta rlmA$ e $pkcA^{G579R} \Delta rlmA$ uma vez que o teor de ergosterol foi reduzido cerca de 55 %. Com base nestas observações, sugere-se que os genes da CWIP *pkcA*, *mpkA* e *rlmA* desempenham um papel na produção de ergosterol endógeno. É possível que os defeitos de integridade da parede celular notável nestes mutantes permitam a potencialização da eficiência do voriconazol e do fluconazol, o que é um pressuposto para uma estratégia terapêutica combinada com estas classes de drogas.

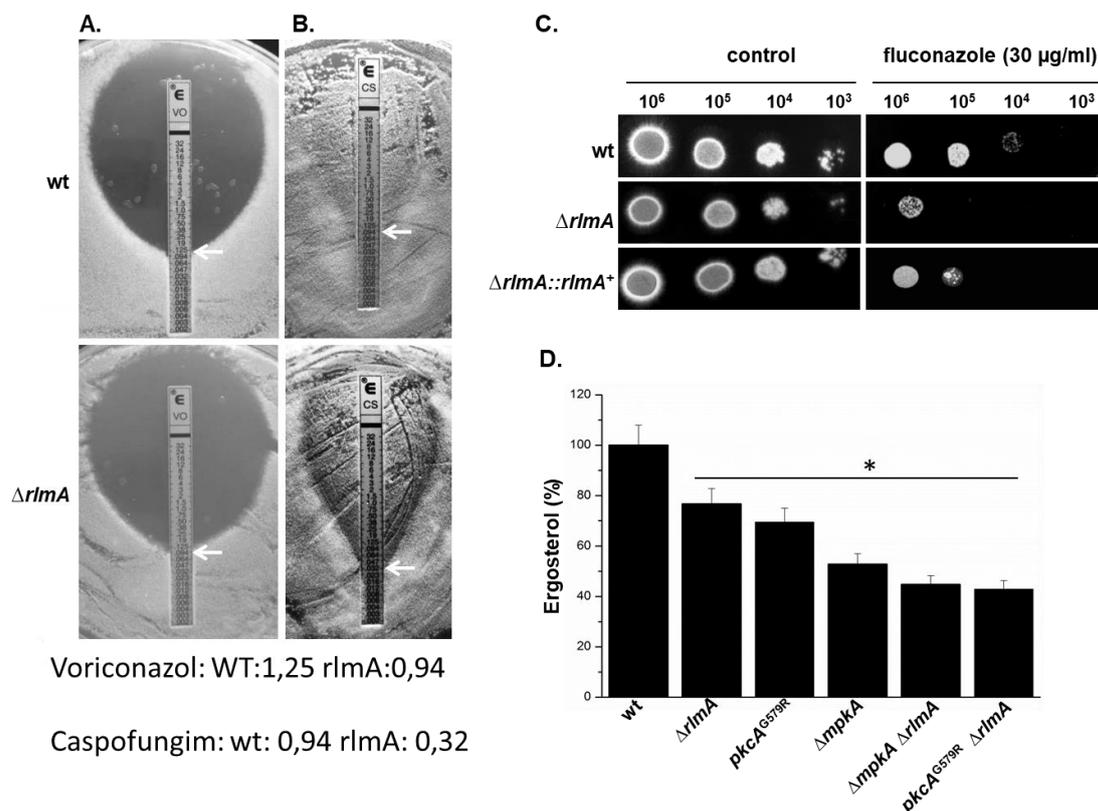


Figura 27: RlmA está relacionado à resistência a azóis e a equinocandinas. (A-B) 1×10^5 conídios das linhagens foram inoculados com auxílio de um *swab* em placas de Petri contendo meio RPMI sólido. Em seguida adicionou-se a fita de *Etest*. As amostras foram incubadas a 37 °C por 30 horas, e em seguida foi determinada a CIM através da interseção do início do halo de inibição formado e a concentração de droga na fita. Drogas indicadas nas fitas; CS: caspofungina e VO: voriconazol. **(C)** A determinação da sensibilidade ao fluconazol foi realizada utilizando a técnica de *drop-out*. Diluições seriadas da suspensão de esporos (1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 e 1×10^3) de cada linhagem foram inoculadas em placa de Petri contendo meio completo sólido YG com a concentração de fluconazol determinada. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. **(D)** O ergosterol foi extraído a partir de micélio fúngico e quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A produção de ergosterol em cada linhagem (ergosterol/peso seco) foi registrada como porcentagem baseada na quantificação de ergosterol da linhagem selvagem, que representa 100 %. *Significativamente diferente da linhagem selvagem (* $p \leq 0,0001$, $n=4$). Diferenças significativas foram observadas usando o teste o *one-way* ANOVA seguido de Student-Newman Keuls como teste *post-hoc*.

4.1.6 RlmA desempenha um papel na resistência ao estresse oxidativo em *A. fumigatus*

O sítio de infecção de *A. fumigatus* no hospedeiro humano é o pulmão. Ao se instalar neste órgão, o fungo ativa respostas de imunidade inata, desencadeando um mecanismo de inflamação [18]. Esse processo inflamatório desencadeado pela infecção gera um ambiente dominado por radicais livres e espécies reativas do oxigênio (EROs), obrigando o patógeno a se adaptar nesse ambiente para sua sobrevivência e invasão dos tecidos do hospedeiro [18]. De tal

forma, a resistência ao estresse oxidativo é fundamental para a colonização deste patógeno no sítio de infecção. Devido à importância da tolerância a EROs em *A. fumigatus*, as linhagens foram inoculadas com diferentes agentes oxidantes para que se pudesse verificar se RImA estaria envolvido no processo de depuração do estresse oxidativo em *A. fumigatus*.

Inicialmente, para a análise fenotípica sob indução de estresse oxidativo gerado por peróxido de hidrogênio (H_2O_2), foi utilizado um ensaio que permitiu a observação do halo de inibição formado devido à sensibilidade a este composto. Para isto o H_2O_2 foi inoculado no orifício que ocupava o centro da placa de Petri e os esporos foram inoculados pela técnica de *pour plate* em meio YG top ágar (1 % de ágar) [30]. Neste teste é possível verificar os resultados com cerca de 16 a 24 horas de incubação. A figura 28D mostra os resultados obtidos com o tratamento com peróxido de hidrogênio na concentração de 3 %. O halo de sensibilidade foi medido após 24 horas de crescimento.

Outra droga utilizada para verificar se RImA estaria relacionado à resistência ao estresse oxidativo em *A. fumigatus* foi a menadiona. Esta droga tem sua ação mediada pela geração de EROs, como o ânion superóxido (O^{2-}) e H_2O_2 [190]. O resultado do teste desenvolvido com esta droga pode ser observado na figura 28B, e demonstra que possivelmente RImA parece estar envolvido no processo de depuração do estresse oxidativo causado por essa droga, uma vez que a deleção deste provocou um aumento significativo da sensibilidade à sua ação.

O papel de RImA frente à resistência ao estresse oxidativo em *A. fumigatus* também foi verificado pelo teste de sensibilidade à droga paraquat. O paraquat tem sua ação mediada pela geração de ânions superóxido ($O^{2-\bullet}$), H_2O_2 e radical hidroxila (OH^\bullet) [191]. A linhagem $\Delta rImA$ apresentou maior susceptibilidade ao estresse oxidativo gerado pelo paraquat, como pode ser observado na figura 28A.

O terc butyl (t-butyl), composto que também foi utilizado nos ensaios fenotípicos para determinar se RImA estaria relacionado à depuração do estresse oxidativo, é um hidroperóxido orgânico, logo, apresenta uma estrutura caracterizada pela ligação (ROOH), que quebra-se facilmente originando

radicais hidroxila (OH^{\bullet}), promovendo o estresse oxidativo [192]. Assim como foi verificado em outros agentes causadores de estresse oxidativo, a linhagem $\Delta rlmA$ possui maior susceptibilidade também ao estresse oxidativo gerado pelo t-butyl (figura 28C).

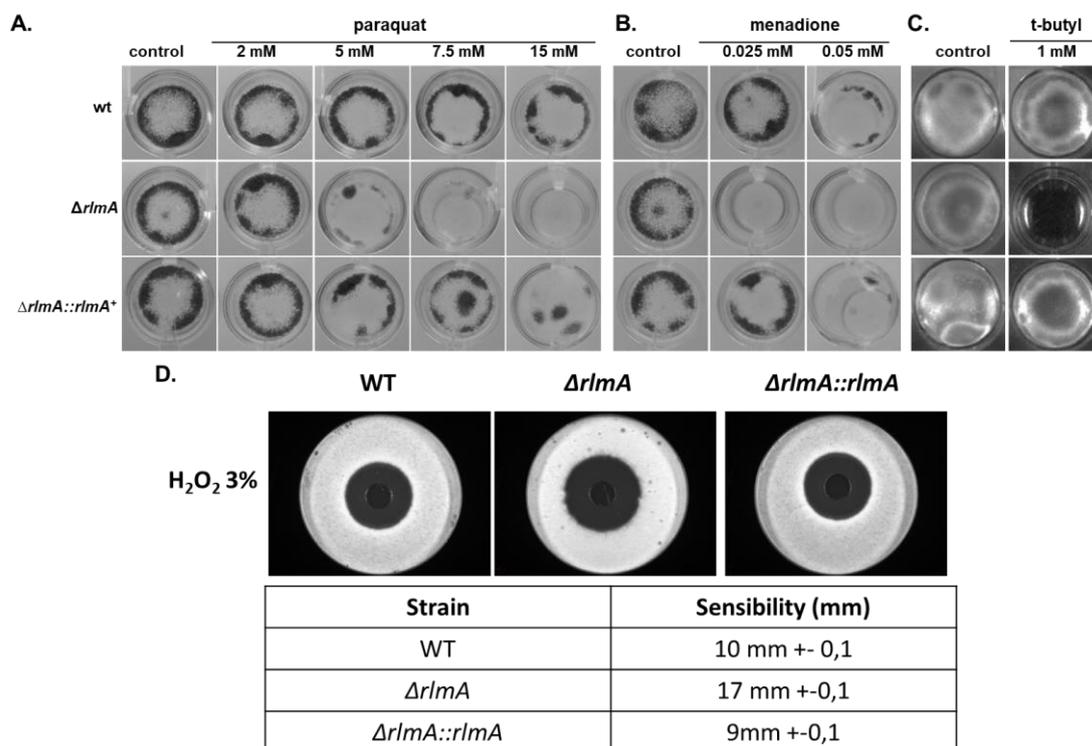


Figura 28: Análise da sensibilidade do mutante a drogas que promovem o estresse oxidativo. (A) Análise da sensibilidade do mutante $\Delta rlmA$ ao estresse oxidativo provocado por paraquat. 1×10^5 conídios das linhagens foram inoculados em meio mínimo líquido em placa de 24 poços e acrescentou-se a droga paraquat nas devidas concentrações. As placas preparadas foram incubadas a 37 °C por 48 horas. Na linhagem mutante ($\Delta rlmA$), não é possível observar crescimento a partir da concentração de 7,5 mM. (B) Análise da sensibilidade do mutante $\Delta rlmA$ ao estresse oxidativo provocado pela menadiona. 1×10^5 conídios das linhagens foram inoculados em meio mínimo líquido em placa de 24 poços e acrescentou-se a droga menadiona nas devidas concentrações. As placas preparadas foram incubadas a 37 °C por 48 horas. Na linhagem mutante ($\Delta rlmA$), não é possível observar crescimento a partir da concentração de 0,025 mM. (C) Análise da sensibilidade do mutante $\Delta rlmA$ ao estresse oxidativo provocado pelo t-butyl. 1×10^5 conídios das linhagens foram inoculados em meio mínimo líquido em placa de 24 poços e acrescentou-se a droga t-butyl na devida concentração. As placas preparadas foram incubadas a 37 °C por 48 horas. Na linhagem mutante ($\Delta rlmA$), não é possível observar crescimento a partir da concentração de 1 mM. (D) Ensaio fenotípico realizado com o H_2O_2 utilizando a técnica de *pour plate* na concentração de 3 % de H_2O_2 . O halo de sensibilidade foi medido após 24 horas de crescimento.

Este conjunto de testes fenotípicos realizados permitiu observar que RlmA poderia estar relacionado à resistência ao estresse oxidativo em *A. fumigatus*. Desta forma decidiu-se testar a expressão de genes que são conhecidos como

responsáveis pela detoxificação do estresse oxidativo em *A. fumigatus*, e que fazem parte do sistema enzimático antioxidante, como *cat1*, *cat2*, *sod1* e *sod2*. Além disso, foi avaliada a expressão do fator de transcrição *yapA*, um importante fator de transcrição necessário para a tolerância ao estresse oxidativo [193].

Grande parte destes genes relacionados à resposta ao estresse oxidativo já está identificada e caracterizada em *S. cerevisiae*, um dos principais modelos de estudo, sendo que alguns destes já estão também caracterizados em *A. fumigatus* [194]. Neste trabalho, o conhecimento destas vias de resposta ao estresse oxidativo já caracterizadas foi utilizado para uma primeira abordagem e caracterização funcional da relação da CWIP com a resistência ao estresse oxidativo em *A. fumigatus*, utilizando a técnica de RT-qPCR.

Em *A. fumigatus* há três catalases ativas no genoma, *catA*, *cat1* e *cat2*, de forma que *catA* está presente somente nos conídios, enquanto *cat1* e *cat2* estão presentes nos micélios. Estas últimas estão diretamente ligadas ao mecanismo antioxidante das células, sendo a *cat2* uma enzima bifuncional, pois apresenta atividade de catalase e peroxidase, ou seja, promove a degradação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, e sua atividade peroxidásica promove a oxidação de substratos orgânicos e a utilização do peróxido de hidrogênio como uma molécula receptora de elétrons. Ambas estão envolvidas na detoxificação do meio intracelular, sendo que em *A. fumigatus*, em condições de estresse oxidativo gerado por H_2O_2 , essas enzimas encontram-se expressas, e as linhagens deletadas de *cat1* e *cat2* apresentaram alta sensibilidade a este agente [195]. Neste trabalho (figura 29), foi observada a redução da ativação destas enzimas quando expostas ao H_2O_2 no mutante nulo de *rlmA*, sendo que *cat1* apresentou um aumento de expressão quando esta linhagem foi exposta por 60 minutos a este agente.

A superóxido dismutase é uma enzima responsável pela detoxificação de compostos superóxidos. Esta enzima promove a dismutação destes compostos em oxigênio e peróxido de hidrogênio, sendo que, o íon superóxido é o primeiro intermediário da cascata de EROs produzido pelo complexo NADPH oxidase dos fagócitos. *A. fumigatus* possui quatro enzimas superóxido dismutases ativas, uma Cu/ZnSOD citoplasmática (*Sod1*), uma MnSOD

mitocondrial (Sod2), uma MnSOD citoplasmática (Sod3) e a Sod4 exibindo uma MnSOD de domínio C-terminal. Em estudo realizado por Lambou, Lamarre [194] analisou-se a expressão dessas enzimas durante o crescimento celular neste patógeno, mostrando que *sod1* e *sod2* possuem maior expressão nos conídios, sendo que *sod2* é expressa em fases mais tardias do crescimento celular, e induzida na presença de menadiona e paraquat. Já a *sod3* é mais expressa no micélio e *sod4*, apesar de essencial para *A. fumigatus* [194], foi pouco expressa em comparação às outras. Neste trabalho, observou-se que quando *A. fumigatus* é exposto ao H₂O₂ há o aumento da expressão das enzimas superóxido dismutases testadas (*sod1* e *sod2*), porém o mesmo não ocorre com a mesma intensidade na linhagem $\Delta rlmA$, demonstrando que a ausência de RlmA promove uma alteração na resposta ao estresse oxidativo em *A. fumigatus* (figura 29).

O fator de transcrição *yapA*, homólogo do gene Yap1 de *S. cerevisiae*, é essencial para a resposta ao estresse oxidativo. Esse fator de transcrição é ativado pela formação de ligações dissulfeto em seus resíduos de cisteína [196]. Juntamente com o fator de transcrição Yap1, encontrou-se atuando em conjunto o fator de transcrição Skn7, também envolvido na regulação da resposta ao estresse oxidativo. Na indução com H₂O₂, o fator de transcrição Yap1 controla 32 proteínas de resposta ao estresse oxidativo, sendo que 15 destas requerem também a presença do fator de transcrição Skn7 [197]. Além disso, sabe-se que o fator de transcrição Skn7 é modulado pelo osmosensor Sln1-Ypd1 que contribui com a via de HOG, responsável pela resposta ao estresse osmótico, sendo que esse regulador também é encontrado em vias de biossíntese da parede celular e controle do ciclo celular [197]. O envolvimento de Skn7 em tais caminhos diversos levanta a questão da possível conexão entre estas vias [197]. Curiosamente, o fator de transcrição YapA apresentou uma redução significativa da sua ativação na presença da deleção do fator de transcrição RlmA em *A. fumigatus* quando exposto ao H₂O₂ (figura 29).

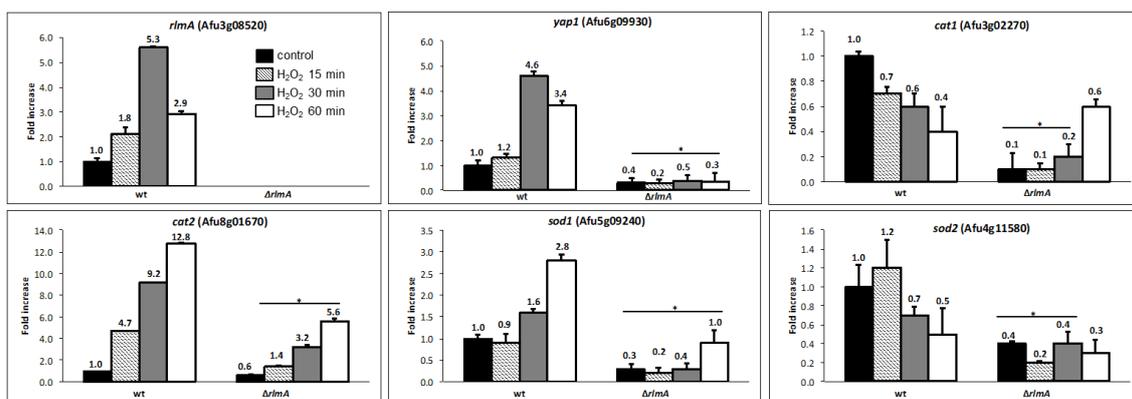


Figura 29: Análise da expressão gênica de RlmA na presença de estresse oxidativo provocado por H_2O_2 . A linhagem selvagem e mutante foram cultivadas durante 24 horas em meio mínimo a 37 °C sob agitação de 180 rpm. Na sequência, 3 % de H_2O_2 foram adicionados às culturas. As culturas foram incubadas por 0, 15, 30 e 60 minutos na presença do agente indutor. O RNA total foi extraído, tratado com DNase turbo (Ambion®) e as transcrições reversas foram realizadas para a obtenção do cDNA, que foi usado como molde nas reações de RT-qPCR em tempo real. O gene da tubulina (*tubA*) foi usado como normalizador dessas reações e a quantificação relativa foi obtida comparando-se a expressão da linhagem $\Delta rimA$ em relação ao tempo 0 de exposição ao H_2O_2 da linhagem selvagem.

Em conjunto, esses resultados indicam fortemente que RlmA em *A. fumigatus* afeta a capacidade do fungo para lidar com o dano oxidativo, possivelmente afetando a transcrição de alguns genes relacionados à resposta ao estresse oxidativo.

4.1.7 RlmA está relacionado ao estresse de retículo em *A. fumigatus*

Tem sido descrita uma relação entre a integridade da parede celular e o estresse de retículo, uma vez que mutantes defectivos na ativação da UPR são mais sensíveis a agentes estressores da parede celular [28, 144, 198]. Esta relação é suportada devido ao fato de que UPR mantém a funcionalidade do RE para recrutar novas proteínas necessárias para a capacidade de processamento, por exemplo, durante o estresse da parede celular, influenciando a secreção e homeostase da parede celular e, finalmente, sua patogênese [198, 199]. Com base nesta informação, quis se determinar como a deleção de RlmA afeta o fungo na presença de agentes estressores do RE, tais como o DDT (ditiotreitol), tunicamicina (TM) e brefeldina A (BFA), que ativam UPR por desdobramento de proteínas através da redução de ligações dissulfeto, inibindo a N-glicosilação, interferindo na forma da proteína e no transporte do RE para o Golgi [200]. O mutante $\Delta rimA$ foi mais sensível a todos os agentes de RE testados, e este fenótipo assim como os provocados por

drogas estressoras da parede celular (figura 11) também pode ser parcialmente resgatado pela adição de D-sorbitol (figura 30D).

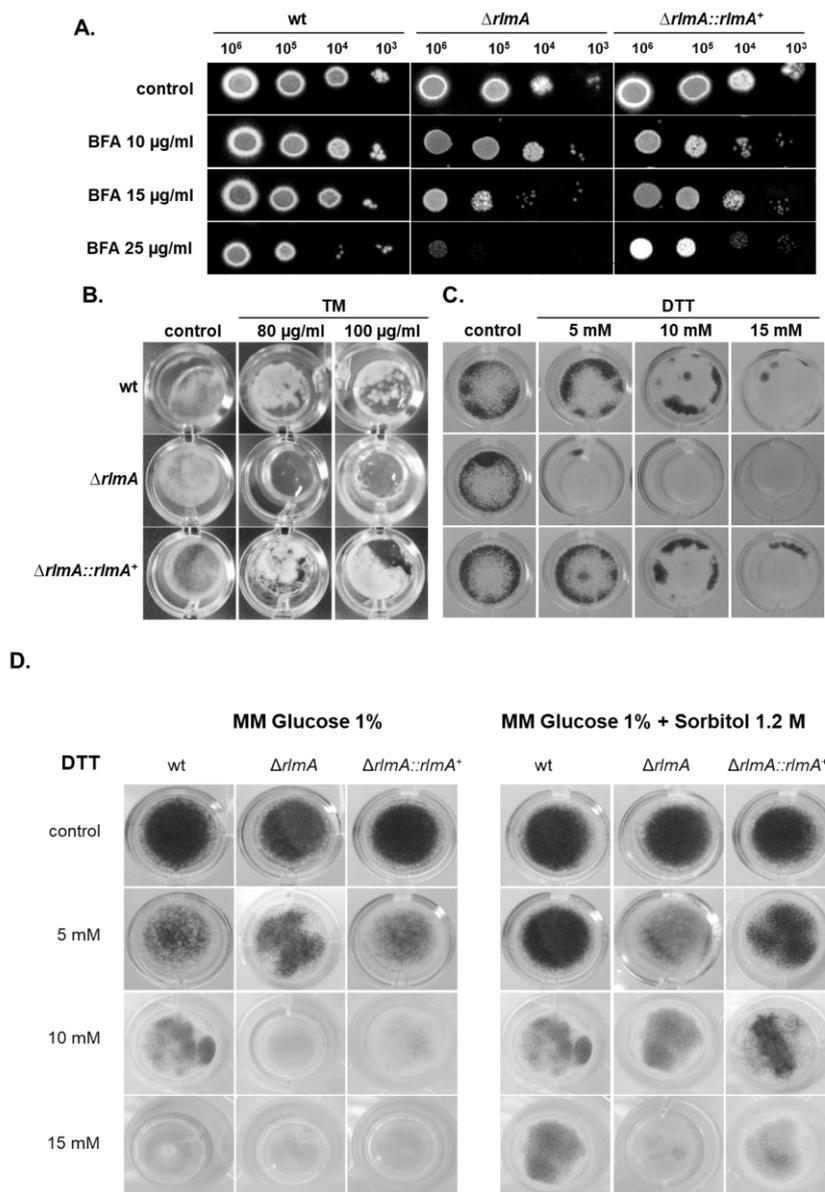


Figura 30: O estresse da parede celular causado pela perda de *rimA* está ligado à sinalização da UPR em *A. fumigatus*. (A) A determinação da sensibilidade a BFA foi realizada pela técnica de *drop-out*. Diluições seriadas da suspensão de esporos (1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 e 1×10^3) de cada linhagem foram inoculadas em placa de Petri contendo meio completo sólido YG com as concentrações de BFA determinadas. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. **(B)** 1×10^5 conídios das linhagens foram inoculadas em meio completo sólido YG em placa de 24 poços e acrescentou-se a droga TM nas devidas concentrações. As placas preparadas foram incubadas a 37 °C por 48 horas. **(C)** 1×10^5 conídios das linhagens foram inoculados em meio completo líquido YG em placa de 24 poços e, acrescentou-se a droga DTT nas devidas concentrações. As placas preparadas foram incubadas a 37 °C por 48 horas. **(D)** 1×10^5 conídios das linhagens foram inoculados em meio mínimo líquido e meio mínimo líquido acrescido de 1,2 M de D-sorbitol em placa de 24 poços e, acrescentou-se a droga DTT nas devidas concentrações. As placas preparadas foram incubadas a 37 °C por 48 horas.

4.1.8 O mutante $\Delta rlmA$ é avirulento em um modelo murino de infecção neutropênica e leva ao aumento dos níveis de TNF- α e reconhecimento de macrófagos

Mutantes de *A. fumigatus* pertencentes à CWIP demonstraram resultados diferentes quando testados em relação a sua virulência. Por exemplo, os mutantes que possuem deficiência da MAPK MpkA ou da proteína quinase C, PkcA não possuem virulência atenuada [30, 42]. Em contraste, *mkk2* MAPKK é necessária para a virulência de *A. fumigatus* [35], e ainda não há informação atualmente disponível para as propriedades de virulência da *bck1* MAPKKK. A análise comparativa da virulência da linhagem selvagem e complementante em relação à linhagem mutante $\Delta rlmA$ foi realizada em modelo murino neutropênico de aspergilose pulmonar invasiva, onde foi possível observar que a deleção de *rlmA* foi suficiente para atenuar a virulência de *A. fumigatus*. A linhagem selvagem resultou em 100 % de mortalidade após 15 dias de infecção, enquanto que a infecção causada pelo mutante $\Delta rlmA$ obteve uma taxa de mortalidade significativamente reduzida de 10 % depois de 15 dias pós-infecção, como pode ser observado na figura 31A ($p \leq 0,0001$ para a comparação entre os testes da linhagem selvagem e mutante, Log-rank, Mantel-Cox e Gehan-Breslow-Wilcoxon, respectivamente).

O mutante nulo $\Delta rlmA$ possui uma resposta inadequada ao estresse da parede celular. Isto sugere que estes fenótipos tenham um impacto sobre a resposta imune do hospedeiro. Por conseguinte, utilizou-se BMDMs para medir os níveis da citocina pró-inflamatória do Factor de Necrose Tumoral α (TNF- α) liberado por estas células, após co-incubação com conídios de *A. fumigatus*. TNF- α é um importante mediador inflamatório secretado por macrófagos quando expostos a *A. fumigatus* ou outros agentes patogênicos fúngicos [201, 202]. BMDMs co-cultivadas com a linhagem $\Delta rlmA$ demonstraram cerca de 3,5 vezes de aumento da produção de TNF- α em relação à linhagem selvagem ou à linhagem complementante ($p \leq 0,005$; figura 31B). Testou-se também a capacidade de BMDMs na fagocitose dos conídios da linhagem selvagem, mutante e complementante. Cerca de 11 % dos conídios da linhagem $\Delta rlmA$ foram fagocitados após 80 minutos de co-incubação. Em contraste, apenas 6,4 %

dos conídios da linhagem selvagem e complementantes foram fagocitados (* $p \leq 0,005$; figura 31C). Estes resultados sugerem que o efeito causado pela perda da função de *rlmA* em *A. fumigatus* na CWIP é importante para o reconhecimento de macrófagos e respostas inflamatórias. Em conjunto, estes resultados indicam um efeito mais proeminente de RImA na virulência e patogenicidade de *A. fumigatus*.

A versatilidade nutricional é um dos fatores que contribuem para a virulência de *A. fumigatus* [17]. Este patógeno possui proteases extracelulares que reciclam a matéria orgânica no meio ambiente e estas mesmas proteases, durante o processo de infecção do hospedeiro, quebram barreiras estruturais para a obtenção de nutrientes [203]. Sendo assim a alteração da versatilidade nutricional de *A. fumigatus* pode contribuir para a redução ou aumento da virulência neste patógeno.

Como foi observado a redução da virulência no mutante nulo de *rlmA*, torna-se interessante avaliar a capacidade da linhagem $\Delta rlmA$ em crescer em um substrato complexo *ex-vivo* utilizando explantes pulmonares frescos de ratos. Em meio rico (YPD) as características de crescimento foram comparáveis entre as linhagens após 48 horas de incubação a 37 °C. Por outro lado, a linhagem $\Delta rlmA$ teve o crescimento reduzido nos tecidos de pulmão (figura 31D). Estes resultados indicam que a perda de *rlmA* causa deficiência na absorção de nutrientes de substratos complexos a partir do tecido pulmonar murino.

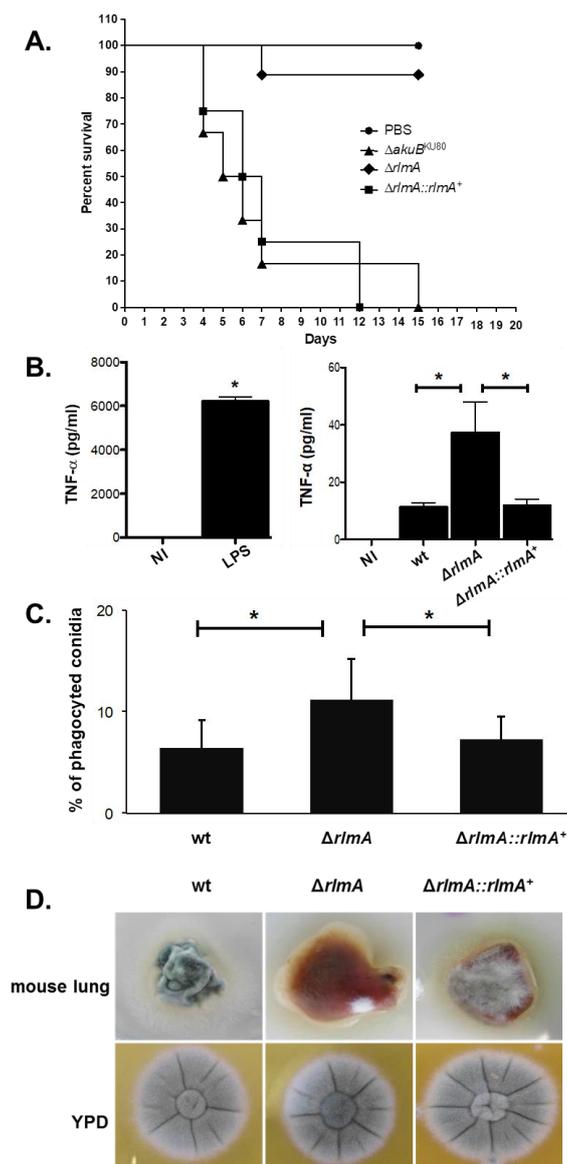


Figura 31: RlmA de *A. fumigatus* é necessário para virulência completa em um modelo murino de aspergilose pulmonar invasiva, para a ativação da imunidade inata contra *A. fumigatus* e para a absorção de nutrientes a partir do tecido pulmonar murino. (A) Análise da virulência da linhagem $\Delta rlmA$ em modelo murino de aspergilose pulmonar invasiva. 5×10^4 esporos de cada linhagem foram inoculados por via intranasal em camundongos BALBc submetidos ao regime de imunossupressão conforme descrito em materiais e métodos. Os animais controle foram inoculados apenas com PBS 1 \times . (B) RlmA também se demonstrou necessário para a ativação da imunidade inata em *A. fumigatus*. Secreção de TNF- α a partir de macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) após co-incubação com hifas de *A. fumigatus* da linhagem selvagem, $\Delta rlmA$ e da linhagem complementante $\Delta rlmA::rlmA^+$. Os níveis de TNF- α foram quantificados por ELISA utilizando o sobrenadante da cultura, após 18 horas de infecção de BMDMs. Os dados mostram a média \pm desvio padrão (*p \leq 0,005). NI: Não infectados; LPS: lipopolissacárido (controle positivo). (C) O índice de fagocitose é aumentado na linhagem mutante $\Delta rlmA$ em comparação com a linhagem selvagem e a complementante $\Delta rlmA::rlmA^+$. Os dados mostram média \pm desvio padrão (*p \leq 0,005). (D) O mutante $\Delta rlmA$ tem a capacidade reduzida de absorver nutrientes do tecido pulmonar murino. 1×10^7 esporos foram inoculados em pulmão fresco de camundongo em placa de Petri contendo agarose 5 % estéril. Como controle foram utilizadas placas de Petri contendo o meio YPD. Ambas foram incubadas a 37 $^{\circ}$ C por 24 horas e fotografadas. O experimento foi acompanhado por até 72 horas.

4.1.9 Discussão

A manutenção da integridade da parede celular é um dos eventos fundamentais que permitem que as células fúngicas possam lidar com diferentes tipos de estresses que podem perturbar a organização da parede celular, impedindo a lise celular e a morte. A biossíntese da parede celular em fungos é controlada pela CWIP, que é uma cascata de transdução de sinal que amplifica o próximo sinal e medeia as respostas metabólicas *downstream* para manter a homeostase da parede celular [36]. A CWIP é regulada com precisão e, em *S. cerevisiae*, começa com a ativação do circuito Pkc1-Mpk1 e culmina com a ativação do fator de transcrição Rlm1 [204]. Este evento causa a ativação transcricional de vários genes da biossíntese da parede celular [55, 205]. Em *A. fumigatus*, a integridade da parede celular também depende do módulo da cascata MAPK da CWIP [30, 35, 40]. Recentemente, também foi mostrado que a função de PkcA em *A. fumigatus* é importante para a fosforilação e ativação de MpkA [42]. Para entender como *A. fumigatus* conecta o sinal derivado de dano da parede celular aos efetores de células *downstream*, foi identificado e caracterizado o homólogo putativo de *A. fumigatus* RLM1, *rlmA*, e descobriu-se a sua função na sinalização celular e na virulência. O mutante de deleção de *rlmA* exibe crescimento radial reduzido e alongamento de hifas retardado a diferentes temperaturas. Esses fenótipos indicam defeitos na CWIP de maneira semelhante aos relatados para outros mutantes da CWIP [23, 30, 40, 42, 51]. De fato, o mutante $\Delta rlmA$ incorpora fenótipos que são característicos da perturbação da parede celular, incluindo susceptibilidade aumentada aos agentes perturbadores da parede celular, como CR, CFW, e inibidores da $\beta(1,3)$ glucana sintase e quitina sintase (caspofungina/anidulafungina e nikomicina Z, respectivamente) e cafeína. A sensibilidade ao CR, CFW e à cafeína pode ser restaurada em meio contendo o estabilizador osmótico D-sorbitol, conforme relatado em outros mutantes de genes da CWIP de *A. fumigatus* [23, 40, 42, 206].

O mutante $\Delta rlmA$ também apresentou resistência prejudicada aos agentes estressantes de RE DTT, BFA e TM. O mutante *pkcA*^{G579R} de *A. fumigatus* também apresentou tolerância alterada a esses agentes e um

acúmulo desequilibrado do transcrito *spliced* de *hacA* (induzido) [42]. Esses dados suportam a ideia de que a biogênese da parede celular, que ocorre durante o estresse da parede celular, é acompanhada pela ativação da UPR [42, 207].

Ao considerar a gama de agentes perturbadores da parede celular testados aqui, esses resultados sugerem que a ausência de *rlmA* leva a alterações na estrutura e/ou organização da parede celular, provavelmente interferindo em todas as principais moléculas de polissacáridos que compõem a parede celular de *A. fumigatus*. No entanto, não se pode inferir se as frações álcali-insolúveis e álcali-solúveis da parede celular são alteradas quantitativamente neste mutante, neste momento. Contudo, a análise indireta dos teores de quitina e $\beta(1,3)$ glucana em conídios germinantes de $\Delta rlmA$ por meio da coloração com CFW e dectina-1 apresentou maior detecção de $\beta(1,3)$ glucana e quitina. Além disso, houve aumento na produção de protoplastos quando as hifas foram submetidas a digestão enzimática e redução na formação de biofilmes no mutante nulo. De fato, a sensibilidade aos agentes perturbadores da parede celular e sua composição são mal correlacionadas em alguns casos. Por exemplo, a supressão de *Rlm1* em *C. albicans* na linhagem $\Delta/\Delta RLM1$ resultou em um aumento significativo do conteúdo de quitina e uma redução do conteúdo de mananas [208]. Por outro lado, a composição da parede celular de *A. nidulans* no mutante $\Delta mpkA$ foi comparável à da linhagem selvagem, embora o mutante $\Delta mpkA$ tenha mostrado crescimento reduzido e aumento da sensibilidade a micafungim [209]. Esses resultados ilustram ainda o fato de que é fundamental estudar a função dos genes relacionados à parede celular nos fungos. As mudanças dramáticas às quais a célula está sujeita quando um determinado gene está faltando são o resultado de uma perturbação global concomitante em diferentes caminhos de sinalização celular que são afetados reciprocamente, o que explica o fenótipo final. Esta ideia é suportada por vários trabalhos, que indicam que a ausência completa de uma fração de carboidrato ainda leva a células viáveis [39, 210, 211]. Explicações adicionais para este resultado podem ser obtidas a partir das análises genéticas dos genes da CWIP. Surpreendentemente, os fenótipos observados para os mutantes $\Delta rlmA$ e $pkcA^{G579R}$ foram mais brandos do que os

fenótipos da linhagem $\Delta mpkA$ em relação à morfologia da colônia e ao estresse da parede celular causado por CR ou CFW. Propõem-se neste trabalho que *pkcA*, *mpkA* e *rlmA* sejam epistáticos na CWIP para a recuperação do estresse da parede celular e que a CWIP em *A. fumigatus* se assemelha à de *S. cerevisiae*. No entanto, os dados das análises de *microarray* juntamente com o que foi demonstrado por Dirr, Echtenacher [35], Valiante, Jain [40] levam à conclusão de que o módulo MAPK da CWIP pode realizar uma gama mais ampla de múltiplos papéis e interações dentro da célula que resultam nos graves defeitos de crescimento vegetativo encontrados nesses mutantes de *A. fumigatus* [35, 40]. Alguns papéis do gene *mpkA* em *A. fumigatus*, além dos que ele desempenha na via CWIP, foram previamente exibidos e explorados experimentalmente, o que apoia esta hipótese [27, 40]. De fato, a interação cruzada que ocorre entre a CWIP e outras cascatas de sinalização foi descrita como funcionando sob diferentes condições de estresse, como estresse de parede celular e osmótico [212-214]. Em *A. fumigatus*, a função coordenada da CWIP e as vias de HOG (*High osmolarity glycerol*) foram recentemente demonstradas durante a adaptação ao estresse causado por caspofungina [183]. Além disso, as contribuições das MAP quinases MpkC e Saka para a CWIP foram investigadas pela determinação da fosforilação de MpkA durante o estresse induzido por CR. Os resultados indicaram que a fosforilação de MpkA depende da função de MpkC e HogA [138]. Outra explicação para os fenótipos associados à parede celular do mutante $\Delta rlmA$ é que estes foram intermediários em relação aos observados na linhagem $\Delta mpkA$, levando a crer que há mais de um fator de transcrição participando da ativação dos genes relacionados à parede celular, um pressuposto que é suportado pelos resultados mostrados na figura 17. Portanto, RlmA não poderia ser o único alvo de MpkA em *A. fumigatus*. Resultados semelhantes foram observados em *C. glabrata* [215].

Embora outros fatores de transcrição não identificados possam participar na ativação de efetores para sintetizar a parede celular, a conexão entre o módulo de MAP quinase Bck1-Mkk2-MpkA e o fator de transcrição RlmA *downstream* reflete-se na fosforilação reduzida de MpkA no mutante $\Delta rlmA$ após a exposição ao CR. Os dados demonstrados sugerem que RlmA regula

positivamente a fosforilação de MpkA. Pode-se especular que, sob uma perda da função de *rlmA*, a CWIP canônica opera de forma defeituosa e outras cascatas de sinalização podem ser ativadas de forma compensatória para manter a viabilidade celular. Como observado anteriormente, as diferenças nas composições de carboidratos da parede celular de *A. fumigatus* e outros organismos fúngicos modelos ou patógenos fúngicos podem explicar as diferenças na ativação de efetores de parede celular [42]. Consequentemente, quando as células são estressadas por danos na parede celular, a CWIP não está atuando exclusivamente na manutenção da parede celular em *A. fumigatus*. Observou-se que alguns genes (*fksA*, *gel4*, *chsA*, *chsC* e *chsG*) perderam a ativação da transcrição nos mutantes $\Delta rlmA$ e $\Delta mpkA$, porém para os genes *agsC*, *chsF* e *csmB*, essa perda ocorre apenas na deleção de *rlmA*. Curiosamente, também houve menor expressão de *agsC* e *chsF* na linhagem mutante *pkcA*^{G579R} [42]. As análises de *microarray* juntamente com as análises de ChIP-qPCR demonstraram que RlmA regula além dos genes relacionados a composição e manutenção da parede celular já conhecidos em alguns organismos fúngicos, outros genes como Afu3g05580, *gsfA*, *gel4* e *gel5*. Mostrando que o papel de RlmA em *A. fumigatus* pode ser bem mais amplo do que o já descrito para outras espécies. Outras análises de perfil de transcrição global da linhagem mutante $\Delta rlmA$ podem ser valiosas para identificar fatores de transcrição adicionais que estão envolvidos na regulação da integridade da parede celular e uma experimentação adicional pode indicar se estes são ativados por MpkA.

Os resultados demonstrados neste capítulo indicam que a inativação defeituosa da CWIP no mutante $\Delta rlmA$ está associada à perda da virulência em modelo murino neutropênico de aspergilose pulmonar invasiva. Além disso, o crescimento do mutante $\Delta rlmA$ em explantes de pulmão de ratos também é prejudicado. Em *C. neoformans*, um estudo do perfil funcional sistemático de todos os fatores de transcrição indicou que a maioria dos fenótipos estudados para o mutante $\Delta RLM1$ era comparável à linhagem selvagem, incluindo parâmetros de estresse da parede celular e virulência, que não foram atenuados [216]. Em contraste, o mutante de deleção de *RLM1* em *C. albicans* mostrou atenuação da virulência [208]. A cepa mutante $\Delta rlmA$ também foi

capaz de estimular a secreção de TNF- α por BMDMs, que é um dos principais mediadores inflamatórios que responde às hifas fúngicas. Isso pode ser explicado pela exposição aumentada de $\beta(1,3)$ glucana no mutante $\Delta rlmA$, que é um estimulador potente da liberação de TNF- α [10, 217, 218]. As modificações vistas nos carboidratos da parede celular e nas proteínas no mutante $\Delta rlmA$ também podem contribuir para o aumento do índice de fagocitose por BMDMs que foi observado neste trabalho.

Em conclusão, a análise de um mutante nulo genético de *rlmA* em *A. fumigatus* sugere fortemente que esse gene faz parte do armamento celular que é necessário para a manutenção da integridade da parede celular. Além disso, mostrou-se que *rlmA* está envolvido na tolerância ao dano oxidativo. A perda de função de RlmA afeta diretamente a virulência deste patógeno fúngico. Por conseguinte, uma melhor compreensão dos mecanismos globais que regem o controle da biogênese da parede celular que emerge da CWIP de *A. fumigatus* é de suma importância e pode ter impactos no estabelecimento de novas estratégias de descoberta de drogas visando outros componentes envolvidos no reforço de parede celular.

Módulo 4.2 A CWIP está relacionada ao desenvolvimento e à produção de metabólitos secundários em *A. fumigatus*

Manuscrito em preparação: RlmA and SebA transcription factors control the production of the conidia-borne secondary metabolite fumiquinazoline C in *Aspergillus fumigatus*

4.2.1 O mutante $\Delta rlmA$ apresenta reduzida conidiação e alterada expressão gênica dos principais reguladores do desenvolvimento assexuado em *A. fumigatus*

Durantes os testes fenotípicos iniciais da linhagem $\Delta rlmA$ foi possível observar redução da produção de esporos assexuados e também um fenótipo *fluffy*, ou seja, a conidiação reduzida e a produção de hifas aéreas. Este fenótipo foi mais evidente a 30 °C no mutante em relação à linhagem selvagem (figura 32B). Para verificar se havia realmente uma redução da conidiação da linhagem $\Delta rlmA$, os conídios foram quantificados e, de fato, a produção de conídios no mutante $\Delta rlmA$ foi reduzida consideravelmente em comparação com as linhagens selvagem e complementante (figura 32A) a 30 °C, indicando que *rlmA* é necessário para os níveis normais de conidiação em *A. fumigatus*. Este mesmo resultado de menor conidiação foi também observado para a linhagem $\Delta rlmA$ obtida por outro grupo [182].

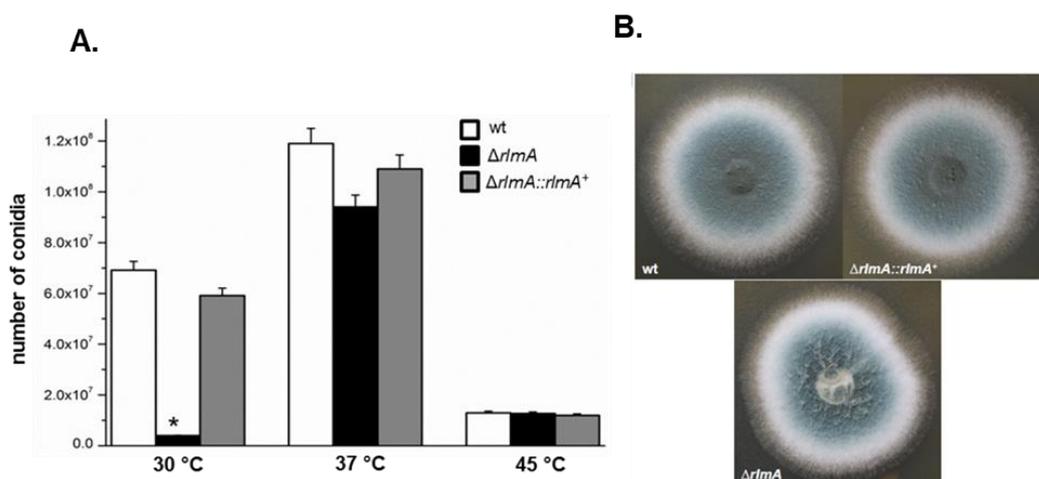


Figura 32: O mutante $\Delta rlmA$ apresenta fenótipo *fluffy* e formação de conídios inferior à linhagem selvagem a 30 °C. (A) 1×10^5 conídios de *A. fumigatus* das linhagens selvagem, $\Delta rlmA$ e $\Delta rlmA::rlmA^+$ foram inoculados em meio YG sólido e incubados durante 5 dias a 30 °C, 37 °C e 45 °C. O número de conídios foi avaliado por amostragem de quatro fragmentos de ágar de 0,5 cm² aleatoriamente distribuídos em cerca de um quarto do diâmetro das colônias de cada cepa. Os conídios foram recolhidos em 0,01 % de tween 20 e contados utilizando câmara de Neubauer. Os resultados são a média \pm desvio padrão de quatro repetições (* $p \leq 0,01$). **(B)** O crescimento radial das linhagens selvagem, $\Delta rlmA$ e $\Delta rlmA::rlmA^+$ foi realizado em meio sólido completo a 30 °C. 1×10^5 conídios de cada linhagem foram inoculados no centro da placa contendo o meio sólido YG, as placas foram incubadas durante 3 dias e posteriormente fotografadas.

Por conseguinte, observou-se o mesmo defeito de redução na esporulação assexuada durante a indução de desenvolvimento assexuado sincronizado tanto a 30 °C quanto a 37 °C, representado pela diminuição de cor verde no micélio que indica o acúmulo de conídios (figura 33A-B). No entanto, o fenótipo de defeito de conidiação é um evento não diretamente relacionado com o programa de desenvolvimento de conídios no mutante $\Delta rlmA$, uma vez que não foram observadas anomalias nas estruturas dos conidióforos quando microcultivos do fungo foram analisados por microscopia ótica sob coloração de lactofenol azul algodão (dados não mostrados).

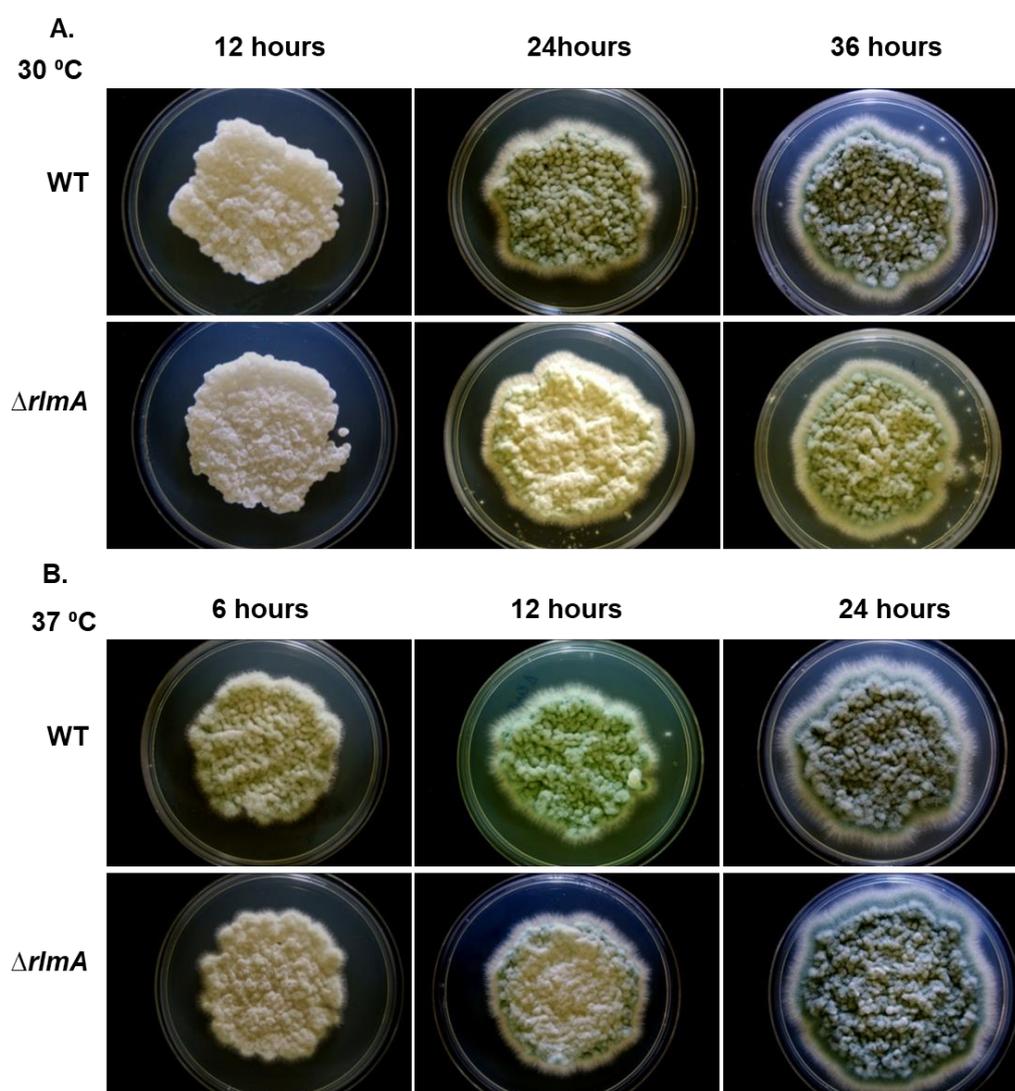


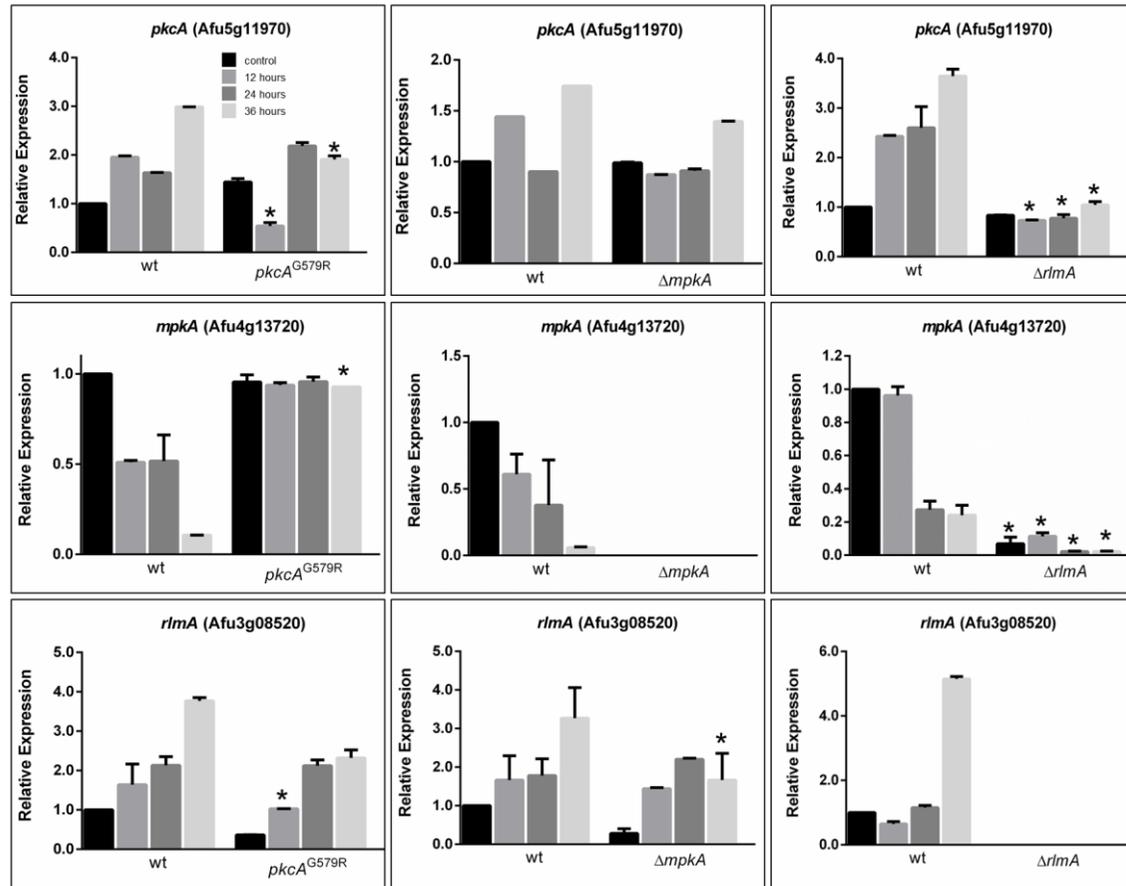
Figura 33: Indução sincronizada de desenvolvimento assexuado para *A. fumigatus* na linhagem selvagem e mutante $\Delta rlmA$ a 30 °C (A) e 37 °C (B). O tempo (horas) indica o crescimento em cada temperatura após transferência do micélio que foi formado em cultura submersa de meio líquido (tempo zero) para o meio sólido.

Os fenótipos observados sugerem que os eventos que regulam o início do desenvolvimento assexuado poderiam ser prejudicados ou atrasados no mutante nulo do fator de transcrição da CWIP *RlmA* em *A. fumigatus*.

Com o propósito de verificar se outros genes da CWIP, como *pkcA* e *mpkA* [29, 30], estariam também relacionados ao atraso do desenvolvimento assexuado em *A. fumigatus*, visto que já foi relatado que a deleção de *mpkA* provocou uma alteração na conidiação de *A. fumigatus* [30], decidiu-se analisar se estaria ocorrendo a alteração dos níveis de mRNA dos genes que compõem a CWIP de *A. fumigatus* durante o desenvolvimento assexuado. As análises da expressão dos genes da CWIP durante o desenvolvimento assexuado de *A. fumigatus* foram realizadas na linhagem selvagem, nos mutantes nulos da CWIP $\Delta mpkA$ e $\Delta rlmA$, e no mutante de ponto *pkcA*^{G579R}, já que PkcA é essencial em *A. fumigatus* [29]. Para esta análise, as linhagens foram crescidas por 16 horas em meio completo líquido YG, após os micélios provenientes de cada linhagem foram filtrados e dispersos em placa de Petri contendo meio completo sólido YG. As linhagens foram incubadas em estufa a 30 °C por 12, 24 e 36 horas e a 37 °C por 6, 12 e 24 horas. Após cada tempo de incubação, as amostras foram removidas da placa de Petri e congeladas em nitrogênio líquido para posterior extração do RNA.

Observou-se um aumento no acúmulo de mRNA de *rlmA* e *pkcA* na linhagem selvagem durante o desenvolvimento assexuado a 30 °C e 37 °C (figura 34A-B), indicando que a conidiação é acompanhada por um aumento na expressão de *pkcA* e *rlmA*. Esta indução foi reduzida nos mutantes $\Delta rlmA$ e *pkcA*^{G579R} nas mesmas condições de desenvolvimento assexuado (figura 34A-B). Este resultado levou à conclusão de que *pkcA* e *rlmA* podem ser possíveis reguladores do desenvolvimento assexuado em *A. fumigatus*. Curiosamente não foi observada a indução de *mpkA* durante o desenvolvimento assexuado na linhagem selvagem em *A. fumigatus*, e apenas os níveis de mRNA de *rlmA* durante 36 horas a 30 °C e durante 6 horas a 24 °C sofreram redução durante o desenvolvimento assexuado na linhagem $\Delta mpkA$ quando comparada com a linhagem selvagem nas mesmas condições (figura 34A-B).

A.



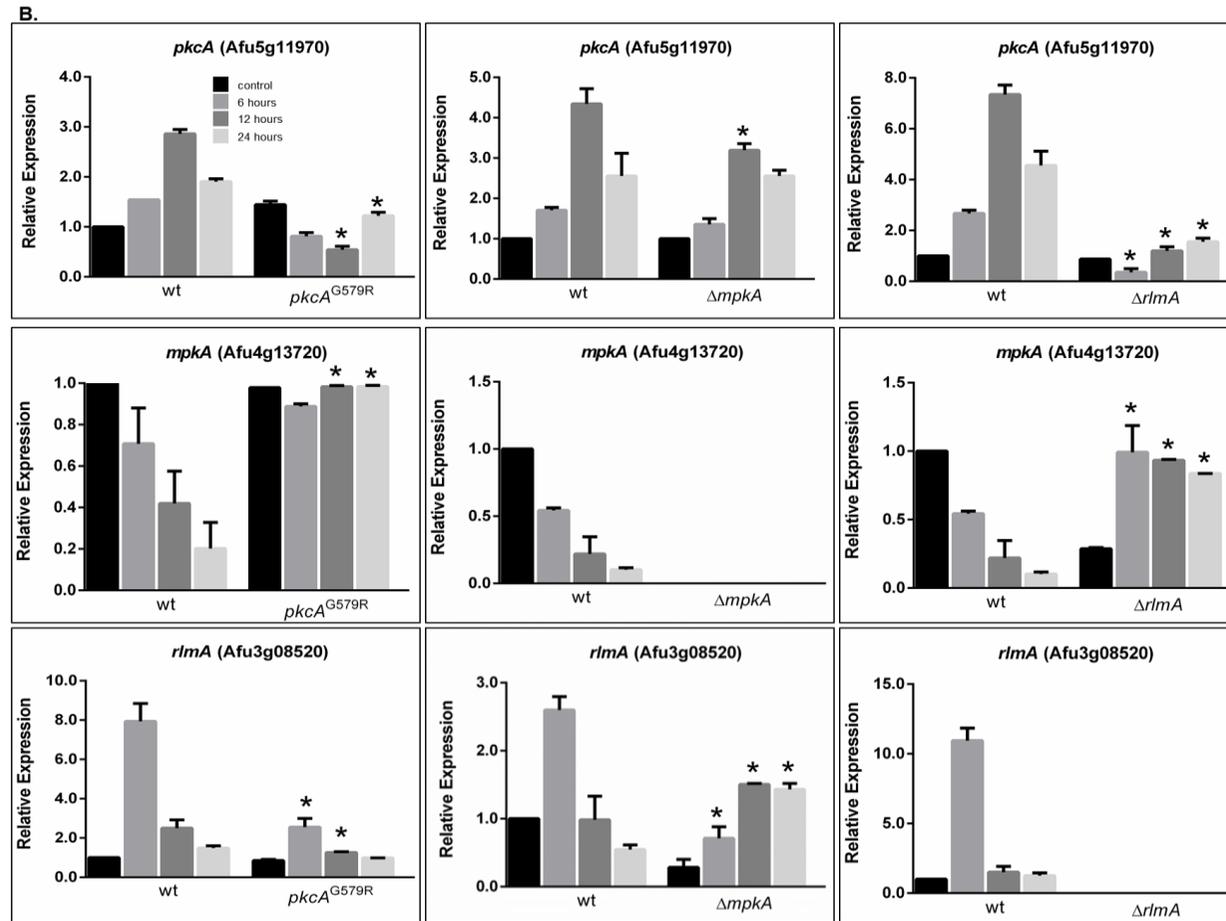


Figura 34: Os genes da CWIP *pkcA* e *rlmA* são induzidos durante o desenvolvimento assexuado sincronizado em *A. fumigatus* a 30 e a 37 °C. (A-B) O RNA total foi isolado da indução de desenvolvimento assexuada sincronizada para a linhagem selvagem e mutantes $\Delta rlmA$, $\Delta mpkA$ e *pkcA*^{G579R} de *A. fumigatus*, estes foram tratados com DNase e transcritos reversamente para serem usados na RT-qPCR. O número de vezes de aumento em cada linhagem representa a abundância de mRNA normalizada em relação à linhagem selvagem no ponto de tempo 0 da indução de desenvolvimento assexuado sincronizada. *p ≤ 0,05.

Como não foi observada indução nos níveis de mRNA de *mpkA* durante o desenvolvimento assexuado na linhagem selvagem de *A. fumigatus*, e o mutante $\Delta mpkA$, demonstra defeitos relacionados à esporulação [30], decidiu-se investigar o perfil de fosforilação de MpkA durante o desenvolvimento assexuado e a efetiva participação da CWIP durante esse estágio de crescimento da célula. Assim, as mesmas amostras da indução utilizadas nas análises de RT-qPCR (figura 34A-B) foram utilizadas para a extração de proteínas e *Western blot*. Os resultados mostram que a conidiação de *A. fumigatus* é acompanhada de um aumento dos valores de fosforilação de MpkA (figura 35A-B) tanto a 30 °C quanto a 37 °C na linhagem selvagem (figura 35A-B, respectivamente), confirmando que a CWIP é induzida em *A. fumigatus* durante o desenvolvimento assexuado. Em contraste, a fosforilação de MpkA foi mantida em níveis baixos no mutante *pkcA*^{G579R} e quase totalmente ausente no mutante $\Delta rlmA$ durante o desenvolvimento assexuado (figura 35A-B). Estes resultados, juntamente com os resultados de RT-qPCR observados na figura 34, sugerem que a CWIP é uma possível via reguladora do desenvolvimento assexuado em *A. fumigatus*, e que a fosforilação de MpkA é um passo essencial para esta regulação.

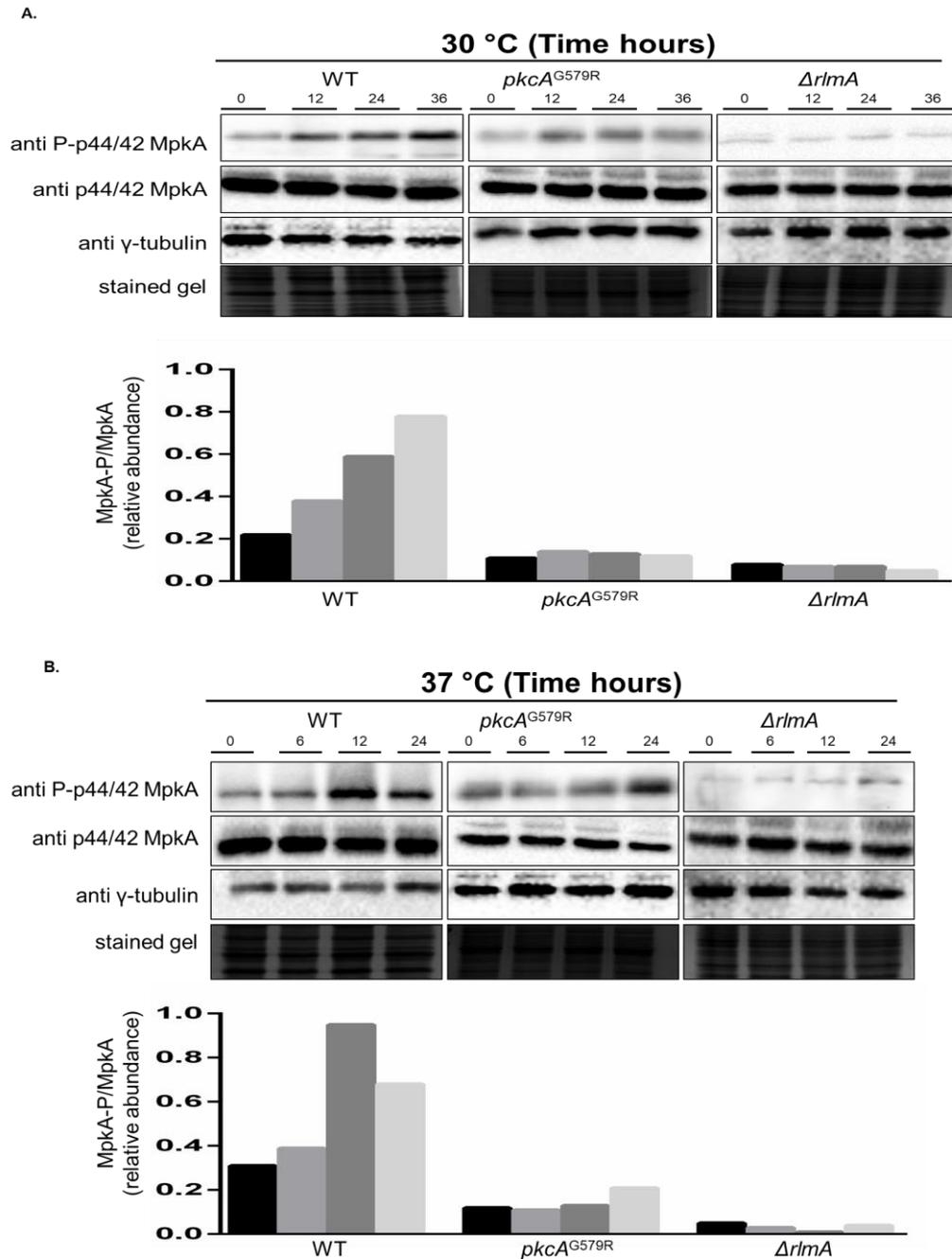


Figura 35: A fosforilação da MAP quinase MpkA é induzida durante o desenvolvimento assexuado sincronizado em *A. fumigatus* a 30 °C e a 37 °C. As linhagens foram crescidas por 16 horas em meio completo líquido YG, e após foram filtradas, o micélio foi disperso em placa de Petri contendo meio completo sólido YG e as linhagens foram incubadas em estufa a 30 °C por 12, 24 e 36 horas e a 37 °C por 6, 12 e 24 horas. Após cada tempo de incubação, as amostras foram removidas da placa de Petri e congeladas em nitrogênio líquido. As proteínas foram extraídas e quantificadas (A-B). As proteínas foram transferidas para a membrana de PVDF, bloqueadas com leite 5 % e marcadas com o anticorpo anti P-p44/42 MAPK e anti p44/42 MAPK (Cell Signaling Technologies). Como controle de carregamento foi utilizado o gel de SDS-PAGE 12 % corado com *coomassie blue* (Sigma Aldrich) e o anticorpo anti γ -tubulin (Santa Cruz Biotechnology). O resultado de *Western blot* foi quantificado utilizando o software ImageJ®.

Devido aos resultados observados, que levam a crer que possivelmente a CWIP estaria atuando na regulação dos eventos de síntese e remodelamento da parede celular durante o desenvolvimento assexuado em *A. fumigatus*, subsequentemente examinou-se nos mutantes da CWIP $\Delta rlmA$, $\Delta mpkA$ e $pkcA^{G579R}$ e na linhagem selvagem os níveis de mRNA dos fatores de transcrição *brlA*, *abaA* e *wetA*, que são genes reguladores que participam da via central que controla a conidiação em *Aspergillus ssp.* [3]. Como previsto, na linhagem selvagem, os níveis de mRNA de *brlA*, *abaA* e *wetA* aumentaram durante o desenvolvimento assexuado em ambas as temperaturas testadas. A expressão destes reguladores atingiu o pico após 36 horas do início do desenvolvimento assexuado a 30 °C. Em contraste, o acúmulo de mRNA para *brlA*, *abaA* e *wetA* reduziu consideravelmente nas linhagens mutantes da CWIP $pkcA^{G579R}$, $\Delta rlmA$ e $\Delta mpkA$ nesta temperatura (figura 36A, APÊNDICE D, figura D1A). A 37 °C, o pico de expressão de *brlA* e *abaA* ocorreu 6 horas após o início do desenvolvimento assexuado, enquanto o pico de *wetA* ocorreu apenas após 12 horas de indução assexuada. Do mesmo modo, a expressão destes genes também foi reduzida de forma significativa nas linhagens mutantes da CWIP $pkcA^{G579R}$, $\Delta rlmA$, a 37 °C (figura 36B, APÊNDICE D, figura D1B). Estes resultados sugerem que a perfeita ativação da CWIP é necessária para a temporização apropriada e expressão de *brlA*, *abaA* e *wetA*, levando à conidiação e ao desenvolvimento normal de *A. fumigatus*. Dessa forma, os resultados de menor condição nas linhagens $\Delta mpkA$ e $\Delta rlmA$, portanto, podem ser derivados deste desbalanço na expressão temporal dos reguladores *brlA*, *abaA* e *wetA*.

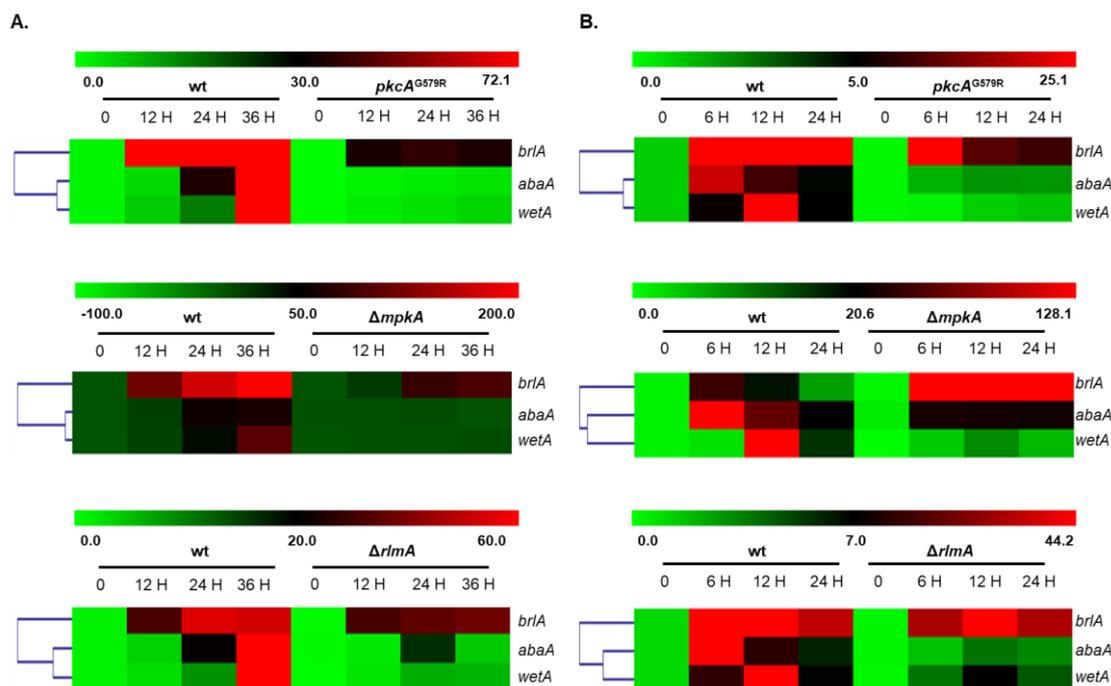


Figura 36: As linhagens mutantes da CWIP $pkcA^{G579R}$, $\Delta mpkA$ e $\Delta rlmA$ reduziram a expressão de mRNA de *briA*, *abaA* e *wetA* durante o desenvolvimento assexuado sincronizado em *A. fumigatus* a 30 °C e a 37 °C. (A-B) O RNA total foi isolado a partir da indução de desenvolvimento assexuado sincronizado para a linhagem selvagem e mutantes $pkcA^{G579R}$, $\Delta mpkA$ e $\Delta rlmA$ de *A. fumigatus*, estes foram tratados com DNase, transcritos reversamente para serem usados na RT-qPCR. Os valores foram transformados em \log_2 e submetidos a um algoritmo de agrupamento hierárquico (distância Euclidiana) usando o software TMEV (disponível em <http://www.tm4.org/mev.html>). O esquema de cores foi usado para designar genes que foram regulados negativamente (verde) ou regulados positivamente (vermelho).

Como já foi demonstrado no módulo 4.1 deste trabalho, RlmA é um importante fator de transcrição responsável pela regulação da CWIP, sendo assim, a análise da função de *rlmA* através da identificação de seus alvos transcricionais relacionados ao desenvolvimento em *A. fumigatus* é imprescindível para esclarecer se este é um efeito direto ou indireto de RlmA.

Iniciando os estudos dos possíveis alvos de RlmA durante o desenvolvimento assexuado em *A. fumigatus*, uma análise *in silico* foi realizada usando o preditor MEME [180] e a ferramenta de comparação de *motifs* TOM-TOM [181], para a identificação dos genes que apresentam o domínio de ligação de *rlmA* identificado anteriormente em *A. niger* o qual mostrou-se conservado também em *A. fumigatus* TA(A/T)4TAG [58, 182]. A partir dessa análise, alguns genes que continham o domínio de ligação predito de RlmA (RLM Box) foram escolhidos de acordo com a sua função e possível relação com o desenvolvimento assexuado em *Aspergillus ssp.* e também em outros fungos filamentosos. Para estes genes selecionados foram desenhados

oligonucleotídeos direcionados para a análise por CHIP-qPCR da sua região promotora. Os genes escolhidos, assim como as sequências do domínio de ligação de RlmA na região promotora encontrado em cada gene estão listados na tabela 12. A localização do RLM Box na região promotora destes genes está esquematizada na figura 37A.

Tabela 12: Genes relacionados ao desenvolvimento de *A. fumigatus* selecionados para a análise por CHIP-qPCR do fator de transcrição RlmA.

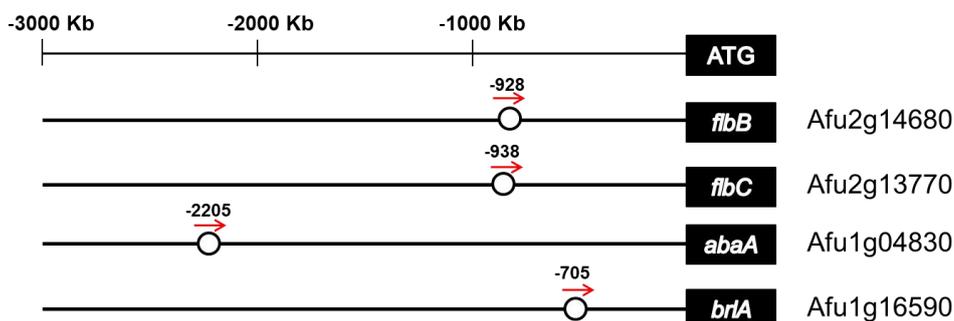
Gene	Sequência do RLM Box na região promotora
Afu2g14680 (<i>flbB</i>)	TTAAAAATAA
Afu2g13770 (<i>flbC</i>)	CTATAATTAA
Afu1g04830 (<i>abaA</i>)	ATATTTATAG
Afu1g16590 (<i>brlA</i>)	ATAAAAATAA

Os ensaios de CHIP-qPCR foram realizados conforme Ries, Rocha [183] com modificações, conforme descrito na seção 3.13.33.1 em materiais e métodos. Para indução a linhagem *rlmA::gfp* e a linhagem selvagem de *A. fumigatus* foram cultivadas por 16 horas em meio completo líquido YG, e após foram filtradas para a separação do micélio. O micélio obtido foi disperso em placa de Petri contendo meio completo sólido YG, e as linhagens foram incubadas em estufa a 37 °C por 6, 12 e 24 horas. O lisado foi imunoprecipitado, e por meio da realização de qPCR quantificou-se o enriquecimento das sequências de DNA preditas como alvos *in vivo* de RlmA nesta condição experimental. Como controle negativo foi utilizado um oligonucleotídeo que se liga a uma sequência exônica no gene *PrxB* (figura 37B).

As análises de CHIP-qPCR demonstraram que RlmA se liga aos promotores dos genes dos fatores de transcrição reguladores do desenvolvimento assexuado em *A. fumigatus* *FlbB* e *FlbC*. Mutantes nulos destes fatores de transcrição possuem fenótipo *fluffy*, e estes fatores de transcrição se ligam a *brlA* durante o desenvolvimento assexuado em *A. nidulans* e atuam regulando a expressão gênica de toda a cascata de conidiação [219]. O fator de transcrição RlmA também se ligou às regiões promotoras dos genes *abaA* e *brlA*. *BrlA* é um ativador chave para a iniciação do desenvolvimento em *Aspergillus ssp.* [68, 69] e *AbaA* é um regulador chave para a diferenciação e formação de fiáides em *Aspergillus ssp.* [70, 72]. Interessantemente, não foram

encontrados *motifs* de ligação para RlmA na região promotora do último gene da via de conidição, isto é, *wetA*.

A.



B.

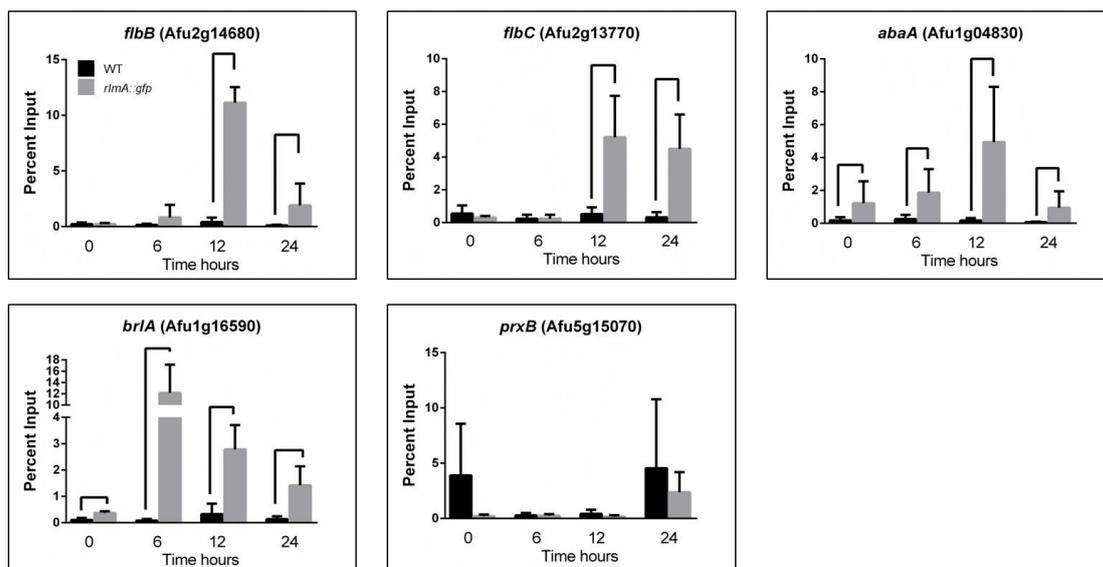


Figura 37: O fator de transcrição RlmA se liga *in vivo* na região promotora dos genes *fibB*, *fibC*, *abaA* e *brlA* durante o desenvolvimento assexuado em *A. fumigatus*. (A) Localização dos *motifs* de ligação de RlmA na região promotora dos genes testados. (B) Ensaios de ChIP-qPCR da linhagem selvagem e da linhagem *rlmA::gfp*. Conídios de cada linhagem foram cultivadas por 16 horas em meio YG, e após foram filtrados, o micélio foi disperso em placa de Petri contendo meio completo sólido YG, e as linhagens foram incubadas em estufa a 37 °C por 6, 12 e 24 horas. Os resultados demonstram a ligação de RlmA à região promotora dos genes testados ($p \leq 0,05$, $n = 3$). Como controle negativo foi utilizado um oligonucleotídeo localizado em uma região exônica do gene PrxB.

Estes resultados são evidências de que a CWIP é essencial para orquestrar a biossíntese e a remodelação da parede celular durante as dramáticas mudanças morfológicas que ocorrem durante o desenvolvimento de fungos, incluindo a formação do conidióforo e suas estruturas relacionadas, como vesícula e fiáldes.

4.2.2 Os mutantes da CWIP $\Delta rlmA$, $pkcA^{G579R}$ e $\Delta mpkA$ apresentam produção reduzida dos metabólitos secundários FqC e gliotoxina de *A. fumigatus*

A produção de metabólitos secundários tem sido associada a mudanças do programa desenvolvimental em fungos filamentosos [75]. Desta forma, alguns estudos sugerem que reguladores da síntese de metabólitos secundários e do desenvolvimento fúngico, conjuntamente permitem que fungos filamentosos adotem estilos de vida mais "complexos" através da produção de uma diversidade muito maior de metabólitos secundários [75-77].

Além disso, a CWIP compreende um importante centro de controle para a produção de metabólitos secundários, incluindo gliotoxina, piomelanina, pseurotina A e penicilina em *A. nidulans* e *A. fumigatus* [27, 40, 182, 220]. Sabendo-se que RlmA é o fator de transcrição da CWIP em *A. fumigatus*, ou seja, atua na mesma via que $pkcA$ e $mpkA$ (figura 24), este também pode ser um dos fatores de transcrição responsáveis pela transcrição de genes relacionados à produção de metabólitos secundários como a gliotoxina ou outras moléculas cuja dependência da CWIP ainda não foi evidenciada em *A. fumigatus*.

Gliotoxina é uma toxina fúngica epidithiodioxopiperazine (ETP) que desempenha um papel importante na virulência de *A. fumigatus* por meio da modulação da resposta imune e indução da apoptose em diferentes tipos de células, sendo inclusive detectada *in vivo* no sítio de infecção em mamíferos [79, 221]. Curiosamente, a produção de gliotoxina na linhagem $\Delta rlmA$ foi completamente abolida em comparação com a linhagem selvagem, uma vez que não há detecção deste metabólito nas condições testadas (figura 38). A gliotoxina também foi quantificada nas linhagens $pkcA^{G579R}$, $\Delta mpkA$ e nos duplos mutantes $\Delta rlmA \Delta mpkA$ e $\Delta rlmA pkcA^{G579R}$ e, assim como na linhagem $\Delta rlmA$, a produção de gliotoxina não foi detectada (dados não mostrados). Estes resultados indicam fortemente que assim como MpkA [27], RlmA e PkcA também desempenham um papel na produção de gliotoxina em *A. fumigatus* indicando que este fenótipo é dependente da CWIP e não somente da MAP quinase MpkA.

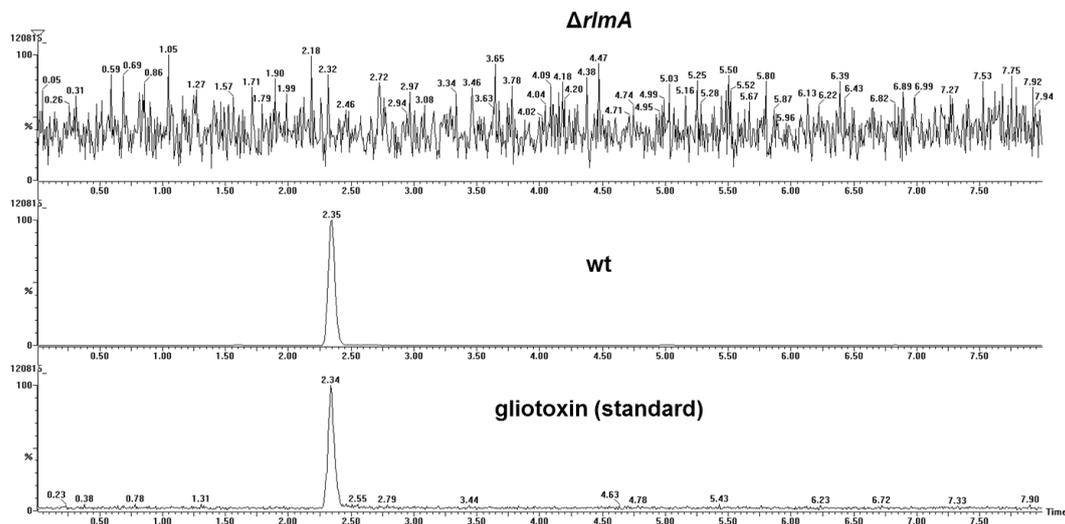


Figura 38: A linhagem mutante $\Delta rlmA$ não produz gliotoxina. As linhagem selvagem e mutante $\Delta rlmA$ foram cultivadas durante 7 dias a 28 °C em meio líquido Czapek-Dox, e os sobrenadantes das culturas foram analisados por UPLC-MS/MS. A gliotoxina foi detectada no modo de ionização por electrospray negativo e a aquisição foi realizada em múltiplas reações de modo de monitorização (MRM) do $[M-H]^-$ o íon foi monitorizado a m/z 325,1 como o íon precursor, com um fragmento m/z 243,2 como o íon do produto.

A ausência de produção de gliotoxina no mutante $\Delta rlmA$ serviu como prova de princípio do envolvimento da via na produção de metabólitos secundários. Assim, para obter uma visão mais ampla sobre os metabólitos secundários que poderiam ter a produção influenciada pela CWIP, realizou-se um *screening* para identificação química e análise de metabólitos secundários de *A. fumigatus* tendo como base um cultivo de pequena escala de colônias da linhagem selvagem e dos mutantes da CWIP em meio sólido [222]. A comparação dos perfis cromatográficos de HPLC-UV (cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a luz ultravioleta) da linhagem selvagem e dos mutantes $pkcA^{G579R}$, $\Delta mpkA$ e $\Delta rlmA$ indicou uma diminuição considerável na detecção de um metabólito secundário, com um tempo de retenção de 13,3 minutos (figura 39A). Esta molécula foi identificada por espectrometria de massa de alta resolução (HRMS) como FqC, determinada pelo seu íon molecular m/z 444,1657 (figura 39 B-D).

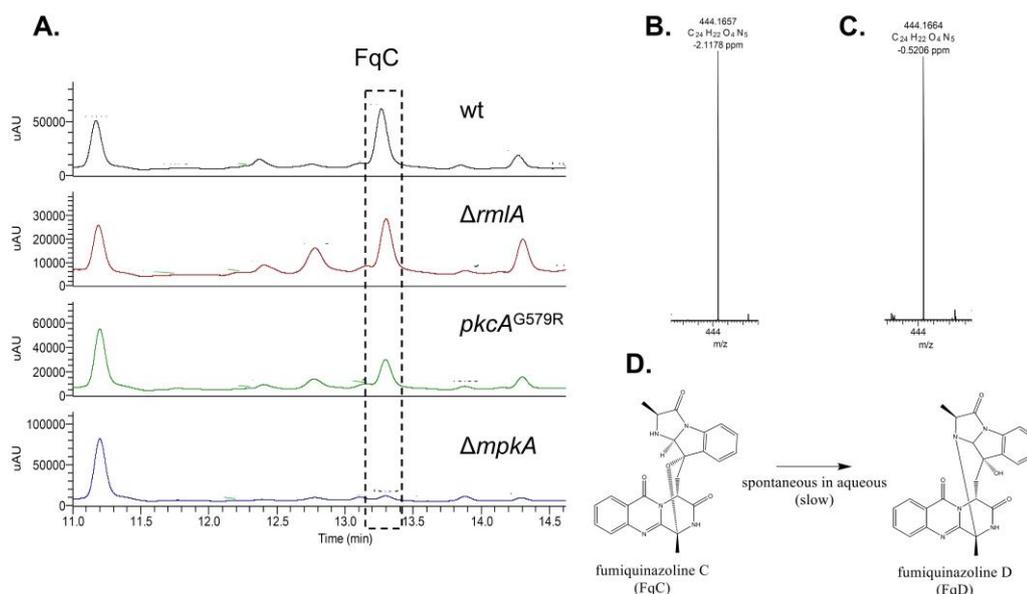


Figura 39: Mutantes de CWIP possuem redução na produção de FqC. (A) Perfil de FqC por HPLC-UV na linhagem selvagem e mutantes da CWIP (254 nm). **(B)** Espectro de massa de alta resolução da FqC. **(C)** Espectro de massa de alta resolução da FqD. **(D)** As estruturas químicas das FqC e FqD e conversão espontânea de FqC para FqD em solução aquosa.

FqC foi obtida após o aumento da escala de fermentação e adicionalmente purificada e caracterizada por ressonância magnética nuclear (RMN), comparada com a literatura e usada como padrão analítico para quantificar a concentração de FqC e FqD nos conídios dos mutantes simples e duplos da CWIP. Isto porque durante o aumento de escala de isolamento de FqC, foi possível também isolar FqD, que é congênero direto da FqC gerado no meio não enzimático por meio de uma reação espontânea em solução aquosa [87]. FqD ocorre como resultado da ciclização intramolecular de FqC pelo ataque nucleofílico da amina secundária da porção imidazolidinona na posição C3 do anel quinazolinona dando origem a uma ponte de 8 membros. FqD também foi identificado por HRMS (m/z 444,1664, (figura 39C-D), caracterizada por RMN e quantificada nos mutantes simples e duplos da CWIP. Os dados de RMN são mostrados no APÊNDICE E.

Os resultados de quantificação apresentam uma diminuição significativa nos níveis de FqC (figura 40B) nas linhagens mutantes *pkcA*^{G579R}, $\Delta rlmA$ e $\Delta rlmA$ *pkcA*^{G579R} de cerca de 24,7 %, 27,9 % e 61,3 %, respectivamente, em comparação com a linhagem selvagem (* $p \leq 0,001$). Além disso, a concentração de FqC foi de 10,5 e 20,6 vezes mais baixa nas linhagens mutantes $\Delta mpkA$ e $\Delta mpkA$ $\Delta rlmA$, respectivamente, em comparação com a linhagem selvagem (figura 40B). O teor de FqC na linhagem $\Delta mpkA$ também foi significativamente reduzido em comparação com as linhagens *pkcA*^{G579R}, $\Delta rlmA$ e $\Delta rlmA$ *pkcA*^{G579R}. Quanto à FqD, houve também uma diminuição na concentração deste metabolito secundário, que foi cerca de 2,50, 1,68 e 1,59 vezes maior na linhagem selvagem em relação aos mutantes *pkcA*^{G579R}, $\Delta rlmA$ e $\Delta mpkA$, respectivamente. Curiosamente a linhagem $\Delta mpkA$ acumulou mais FqD do que as outras linhagens mutantes (figura 40A), porém por se tratar de uma reação espontânea de FqC, não se pode estabelecer qualquer correlação de sua obtenção e a CWIP.

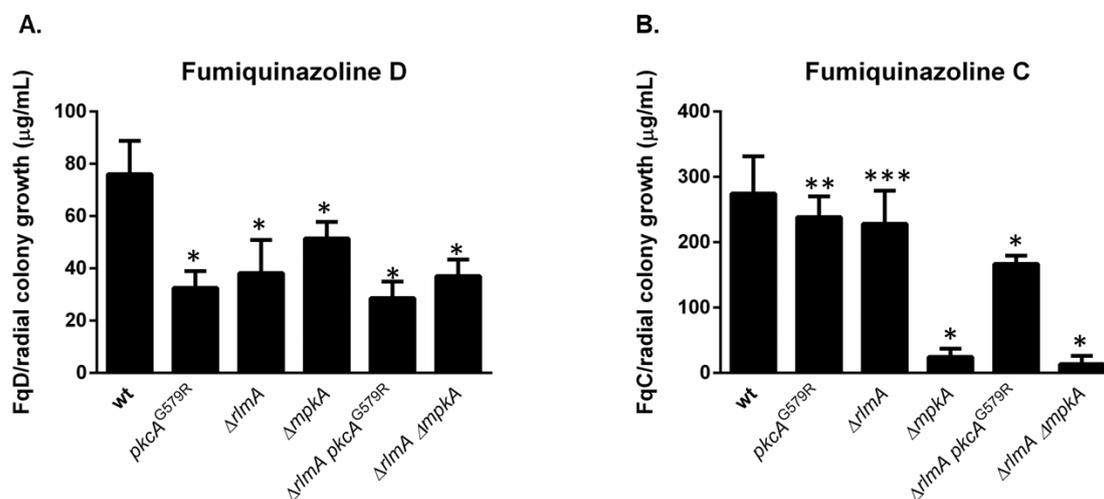


Figura 40: Quantificação de FqC e FqD nas linhagens mutantes da CWIP. (A-B) FqC e FqD foram quantificadas nas linhagens mutantes e selvagem por HPLC-MS/MS. FqC e FqD foram obtidas, purificadas, e validadas por RMN e posteriormente foram usadas como padrões. O gráfico representa os valores médios dos resultados a partir de duas replicatas biológica e cinco repetições técnicas com erro padrão. As diferenças estatísticas foram observadas utilizando ANOVA seguida por Student-Newman Keuls como teste post hoc. Significativamente diferente da linhagem selvagem (* $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,05$).

As Fqs F, A, C e D (FqF, FqA, FqC e FqD) são produzidas nesta sequência pelo *cluster* Fq em *A. fumigatus*. A organização do *cluster* Fq foi anteriormente relatada [87] (figura 5) com base em abordagens genéticas e bioquímicas [89, 90]. As fumiquinazolininas são construídas através da síntese

não ribossomal por peptídeo sintase (NRPS) [91]. Resumidamente, o cluster Fq contém quatro genes que codificam as enzimas de biossíntese (*fmqA-D*) e um gene predito como transportador do cluster (*fmqE*) (figura 5). O gene trimodular NRPS *fmqA* é necessário para a produção de todos os metabólitos Fq em *A. fumigatus*, uma vez que este condensa o ácido antranílico, o L-triptofano e a L-alanina, na presença de ATP, para formar FqF. A inativação de *fmqA* através de um mutante nulo (Δ *fmqA*) gera um mutante deficiente para todas as fumiquinazolininas [87]. FqB é uma mono-oxigenase dependente de FAD, responsável pela oxidação de FqF, que, em seguida, sofre atuação pela NRPS monomodular, *fmqC*, para formar FqA. O gene *fmqD* codifica uma oxidoredutase também dependente de FAD, que é o último passo enzimático da via de conversão de FqA para FqC. FqD é gerado a partir de FqC por uma reação espontânea não enzimática em solução aquosa, como mencionado anteriormente (figura 39D) [87].

Para avaliar adicionalmente o impacto regulador da CWIP na produção de FqC, a análise dos níveis de mRNA dos genes do cluster Fq (*fmqA-E*) foi realizada utilizando a técnica de RT-qPCR, comparando a linhagem selvagem e os mutantes nulos da CWIP Δ *mpkA* e Δ *rlmA* durante os estágios de desenvolvimento dos conidióforos a 37 °C e 30 °C, já que conforme mencionado anteriormente as Fqs são metabólitos secundários que se acumulam exclusivamente nos conídios [87]. Nestes estágios de desenvolvimento, ambos os mutantes Δ *mpkA* e Δ *rlmA* apresentam um desenvolvimento assexuado retardado (dados não mostrados e figura 33, respectivamente).

Em geral, a expressão de todos os genes do cluster de produção de Fq foi induzida durante a conidiogênese. Em claro contraste, a expressão dos genes do cluster foi notavelmente sub-regulada na linhagem Δ *rlmA* em ambas as temperaturas testadas de 37 °C ou 30 °C (figura 41A-B). A expressão do gene *fmqA*, que codifica a enzima passo limitante da produção de Fqs, foi consideravelmente maior na linhagem selvagem após 24 horas de indução do desenvolvimento assexuado a 37 °C e após a indução de desenvolvimento assexuado de 24 horas a 30 °C. *FmqD* é a oxidoredutase que converte FqA para FqC. A abundância de mRNA de *fmqD* após 24 horas de indução do

desenvolvimento assexuado a 30 °C teve um grande aumento na linhagem selvagem em relação ao ponto de tempo zero, e após a indução do desenvolvimento assexuado por 24 horas a 37 °C observou-se um aumento maior ainda na linhagem selvagem em relação ao ponto de tempo zero. Em contraste, esta indução de mRNA de *fmqD* foi muito menor nas linhagens mutantes $\Delta rlmA$ e $\Delta mpkA$ em ambas as temperaturas de desenvolvimento assexuado testadas (figura 41A-B, APÊNDICE F A-B, figura F1A-B). Curiosamente, o mutante $\Delta mpkA$ apresentou uma maior expressão do gene *fmqC* a 30 °C, porém não a 37 °C (figura 41A-B, APÊNDICE F A-B, figura F1A-B). Embora também reduzida nos mutantes $\Delta rlmA$ e $\Delta mpkA$, a abundância de mRNA do transportador MFS no cluster (*fmqE*) foi a mesma em ambas as temperaturas de indução desenvolvimental realizadas, 30 °C ou 37 °C (figura 41A-B, APÊNDICE F A-B, figura F1A-B). Este resultado pode ser suportado por observações anteriores de que a perda de *fmqE* não teve impacto sobre a biossíntese de Fqs [87].

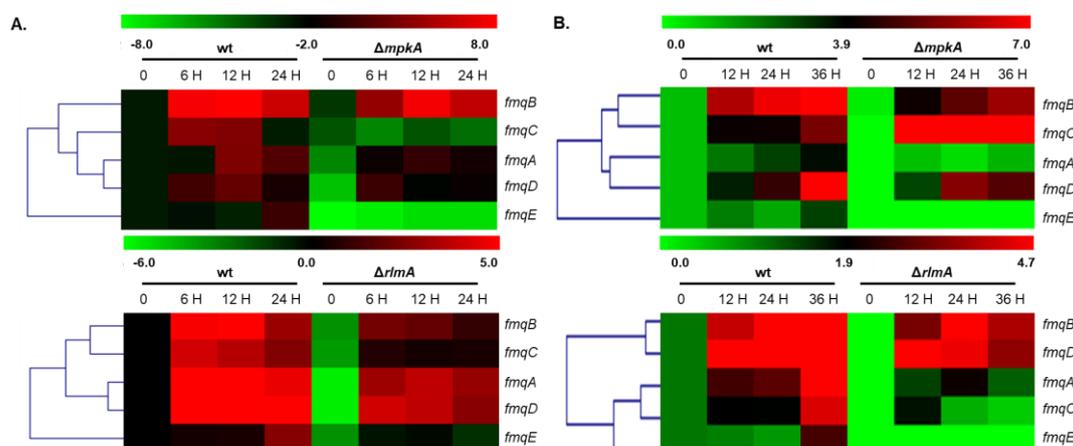


Figura 41: Análise da resposta transcripcional de genes relacionados à síntese de Fq na linhagem selvagem e mutantes $\Delta mpkA$ e $\Delta rlmA$ durante o desenvolvimento assexuado a 37 °C (A) e a 30 °C (B). O RNA total foi isolado da indução de desenvolvimento assexuado sincronizado para a linhagem selvagem e mutantes $\Delta mpkA$ e $\Delta rlmA$ de *A. fumigatus*, estes foram tratados com DNase, transcritos reversamente para ser usado na RT-qPCR em tempo real. Os valores foram transformados em log₂ e submetidos a um algoritmo de agrupamento hierárquico (distância Euclidiana) usando o software TMEV (disponível em <http://www.tm4.org/mev.html>). O esquema de cores foi usado para designar genes que foram regulados negativamente (verde) ou regulados positivamente (vermelho).

FqC é um dos cinco principais compostos isolados a partir de extratos de conídios de *A. fumigatus* e a perda do fator de transcrição específico de esporulação, BrlA, impede a produção de FqA e FqC [87, 88]. Portanto, a menor produção de FqC na linhagem $\Delta rlmA$ e nos outros mutantes CWIP

(figura 40) pode ser devido a: (i) uma regulação direta ou indireta dos genes que sintetizam Fq (*fmqA-E*) por PkcA, MpkA ou RlmA e/ou (ii) à expressão de *brlA* prejudicada, o que foi observado durante o desenvolvimento assexuado na linhagem mutante $\Delta rlmA$, visto que RlmA se liga à região promotora de *brlA* durante o desenvolvimento em *A. fumigatus* (figura 37B).

Para responder a esta questão, uma análise *in silico* foi realizada para a identificação dos genes responsáveis pela biossíntese de Fqs que apresentam o domínio de ligação de *rlmA* [58, 145]. A partir dessa análise foi possível observar que os genes *fmqA-B-C-D* possuem o domínio de ligação MADS-box na sua região promotora. Da mesma forma como descrito para os reguladores desenvolvimentais estudados acima foram desenhados oligonucleotídeos direcionados para a análise da ligação de RlmA à região promotora destes genes identificados, para que por meio da técnica de ChIP-qPCR, fosse possível determinar se a redução da síntese de FqC-D é um efeito direto ou indireto do fator de transcrição RlmA. As sequências das regiões promotoras do genes do *cluster* contendo o domínio de ligação a RlmA estão listados na tabela 13, e a localização destes domínios na região promotora de cada gene é mostrada na figura 42A. Neste experimento, foram utilizadas as mesmas amostras utilizadas para os ensaios de ChIP-qPCR dos genes relacionados ao desenvolvimento de *A. fumigatus* (figura 40).

Os resultados desse experimento de ChIP-qPCR demonstraram que RlmA também é capaz de se ligar nos *motifs* RLM box contidos nos promotores dos genes que compõem o *cluster* biossintético de Fqs *fmqA-B-C-D* (figura 42B). Estes dados em conjunto com os dados de RT-qPCR em tempo real mostrados acima (figura 41) levam à conclusão de que há uma regulação direta dos genes que sintetizam Fq (*fmqA-E*) por RlmA, ou seja, pela própria CWIP. Assim, este fator de transcrição além de ser responsável pela regulação de genes envolvidos na biossíntese e manutenção da parede celular (figura 24 e 26, módulo 1) e no desenvolvimento assexuado (figura 37), é também um dos elementos responsáveis pela regulação da biossíntese de Fq em *A. fumigatus*.

Tabela 13: Genes relacionados à biossíntese de Fq em *A. fumigatus* selecionados para a análise por ChIP-qPCR do fator de transcrição RImA.

Gene	Sequência do RLM Box na região promotora
Afu6g12080 (<i>fmqA</i>)	TTATTTATAC
Afu6g12060 (<i>fmqB</i>)	CTAATAATAC
Afu6g12050 (<i>fmqC</i>)	CTAAAAATAT
Afu6g12070 (<i>fmqD</i>)	GTATTATTAG

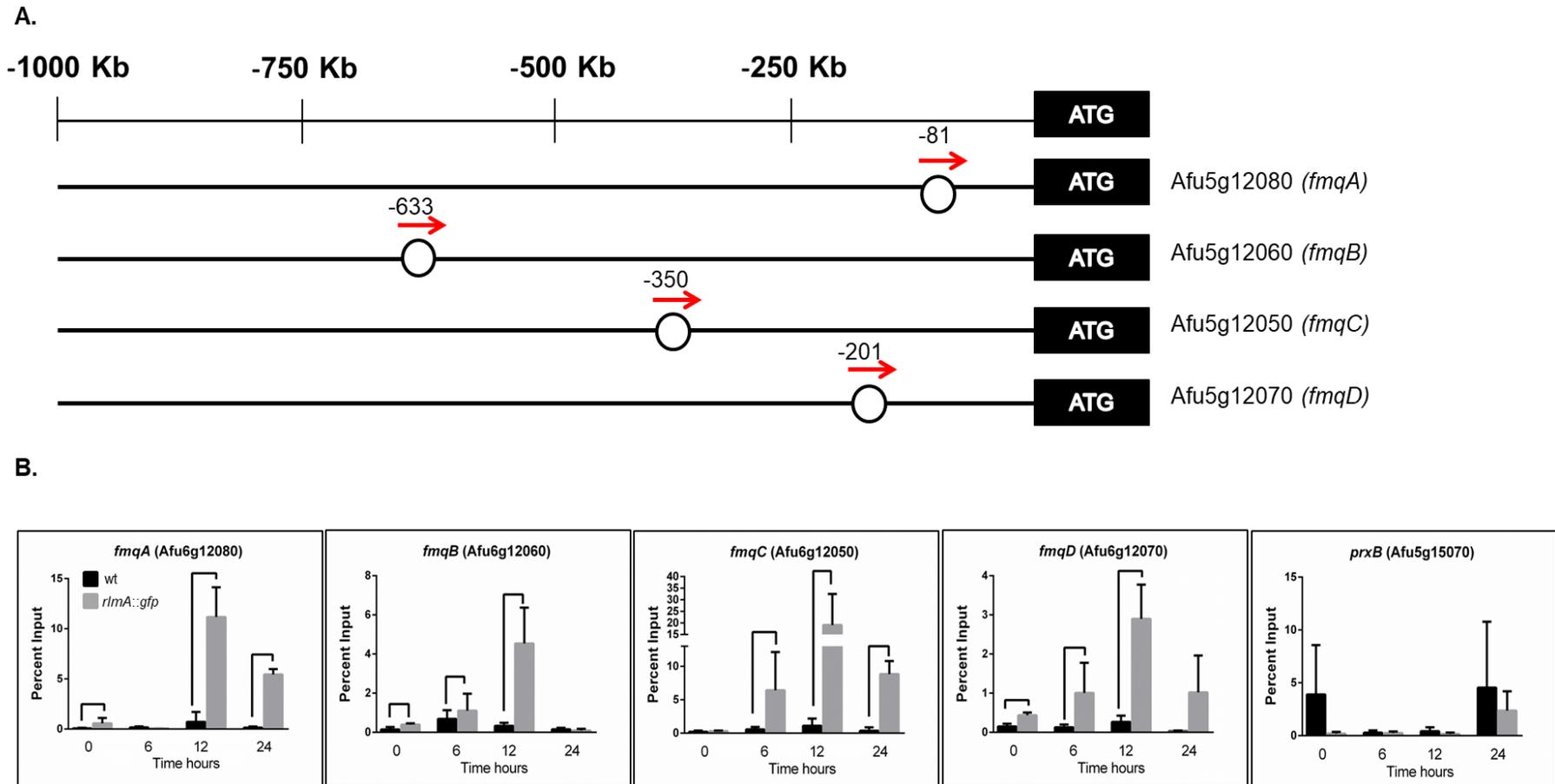


Figura 42: ChIP-qPCR dos genes *fmqA*, *fmqB*, *fmqC* e *fmqD* nas linhagens selvagem e *rlmA::gfp* durante o desenvolvimento assexuado a 37 °C em *A. fumigatus*. (A) Localização do domínio de ligação à RlmA na região promotora dos genes do cluster Fq. (B) Para as análises de ChIP-qPCR as linhagens *rlmA::gfp* e selvagem foram cultivadas por 16 horas em meio completo líquido YG, e após filtradas. O micélio foi disperso em placa de Petri contendo meio completo sólido YG e as linhagens foram incubadas em estufa a 37 °C por 6, 12 e 24 horas e preparadas para a imunoprecipitação de cromatina. Os resultados demonstram a ligação de RlmA à região promotora dos genes testados. Como controle negativo foi utilizado um oligonucleotídeo localizado em uma região exônica do gene PrxB. ($p \leq 0,05$ $n = 3$).

4.2.3 O fator de transcrição de *A. fumigatus* SebA regula a síntese de FqC em *A. fumigatus*

Com o objetivo de entender se outros estresses celulares poderiam influenciar a produção de FqC ou se apenas a CWIP seria suficiente para o controle da produção deste metabólito secundário, realizou-se um *screening* adicional objetivando-se encontrar genes que também influenciassem o acúmulo de FqC. Para este *screening* foi utilizada uma coleção de mutantes nulos de *A. fumigatus* disponível no laboratório cujos genes estão envolvidos em diferentes aspectos da fisiologia celular como por exemplo aqueles responsivos a estresse de temperatura, estresse oxidativo, proteínas quinases e fosfatases, ou posicionados em diferentes vias de transdução de sinal, como a via SakA^{HOG1}, Ca⁺²/calcineurina, diferentes fatores de transcrição, entre outros. Ao todo foram utilizadas cerca de 50 linhagens mutantes no *screening*. Alguns dos resultados para algumas das linhagens mutantes testadas estão mostradas na figura 43A. Os resultados surpreendentemente mostraram que a deleção do fator de transcrição do tipo *zinc finger* C2H2 SebA leva ao aumento da produção de FqC em cerca de 4,5 vezes em relação à linhagem selvagem, indicando, portanto, que esse fator de transcrição é um regulador negativo da síntese de FqC (figura 43A-B).

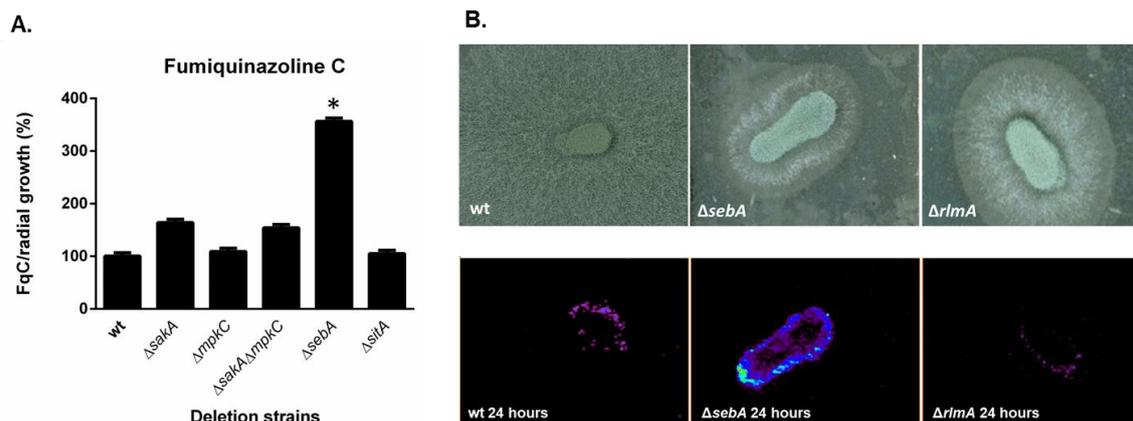


Figura 43: Quantificação de FqC nas linhagens mutantes representativas do screening para identificar reguladores da síntese desse metabólito secundário. (A) O acúmulo de FqC nas linhagens mutantes para as proteínas quinases $\Delta sakA^{HOG1}$ e $\Delta mpkC^{HOG1}$, para o fator de transcrição $\Delta sebA$ e para a fosfatase $\Delta sitA^{SIT4}$ estão mostrados. FqC foi quantificada nas linhagens mutantes e na linhagem selvagem por HPLC-MS/MS, conforme descrito anteriormente. O gráfico representa os valores médios dos resultados a partir de três replicatas biológicas e cinco repetições técnicas com erro padrão, em porcentagem, sendo a produção de FqC da linhagem selvagem foi considerada com 100 %, e a produção de FqC pelas linhagens mutantes calculadas em porcentagem em relação a produção da linhagem selvagem. As diferenças estatísticas foram observadas utilizando ANOVA seguida por Student-Newman Keuls como teste *post hoc*. *Significativamente diferente da linhagem selvagem (* $p \leq 0,001$). **(B)** Imagens de espectrometria de massas geradas pela técnica *Ambient Mass Spectrometry Imaging on Agar Culture* obtidas por fonte de ionização DESI [157]. Este experimento gera uma imagem de localização espacial do acúmulo da molécula de interesse a partir da busca pelo íon característico, no caso para FqC m/z 444,1657. Os resultados comprovam a menor produção de FqC no mutante $\Delta rlmA$ e o maior acúmulo de FqC nos conídios da linhagem $\Delta sebA$.

O fator de transcrição de *A. fumigatus* SebA já foi parcialmente caracterizado em *A. fumigatus*. Este desempenha um papel complexo, contribuindo para várias vias de tolerância a diferentes estresses, principalmente o estresse oxidativo e térmico além do crescimento sob condições nutricionais precárias [137]. Em *N. crassa*, SEB-1 regula o metabolismo da reserva de carboidratos de glicogênio e trealose sob estresse provocado pelo aumento da temperatura, o que sugere uma interconexão entre o controle do metabolismo e esta condição ambiental [223]. Em *Trichoderma atroviride*, seb1 foi também associado à tolerância ao estresse osmótico [224, 225]. Porém, apesar de já caracterizado em alguns fungos filamentosos, dentre eles *A. fumigatus* [137], não há nenhum relato da função deste fator de transcrição na regulação da produção de metabólitos secundários.

Para avaliar em mais detalhes o impacto do fator de transcrição SebA na produção de FqC, a análise da expressão dos genes do *cluster* Fq (*fmqA-E*) foi realizada utilizando a técnica de RT-qPCR, comparando a linhagem selvagem

e o mutante nulo $\Delta sebA$ durante os estágios de desenvolvimento dos conidióforos e a maturação de ambos a 37 °C e 30 °C (figura 44 A-B, APÊNDICE G, figura G1A-B). O desenho experimental foi o mesmo realizado para a linhagem selvagem e as linhagens mutantes da CWIP $\Delta mpkA$ e $\Delta rlmA$ (figura 41). Nestes estágios de desenvolvimento, o mutante $\Delta sebA$ não apresentou qualquer diferença do desenvolvimento ou conidiação em relação à linhagem selvagem de *A. fumigatus* (dados não mostrados).

A expressão de todos os genes do cluster Fq também foi induzida durante a conidiogênese da linhagem $\Delta sebA$, o que era esperado, uma vez conforme mencionado anteriormente as Fqs são metabolitos secundários presentes nos conídios de *A. fumigatus*. Os níveis de mRNA de *fmqC* foram notavelmente maiores na linhagem $\Delta sebA$ em ambas as temperaturas testadas, 30 °C ou 37 °C (figura 44A-B, APÊNDICE G, figura G1A-B). A expressão do gene *fmqA*, foi consideravelmente maior no mutante $\Delta sebA$ em relação ao observado na linhagem selvagem após 36 horas de indução do desenvolvimento assexuado a 30 °C e após a indução de desenvolvimento assexuado por 24 horas a 37 °C (figura 44A-B, APÊNDICE G, figura G1A-B). *fmqD*, que é a oxirredutase que converte FqA para FqC, teve um aumento dos níveis de mRNA cerca 3,5 vezes na linhagem mutante $\Delta sebA$ em relação à linhagem selvagem durante todo o desenvolvimento assexuado a 37 °C (figura 44B, APÊNDICE G).

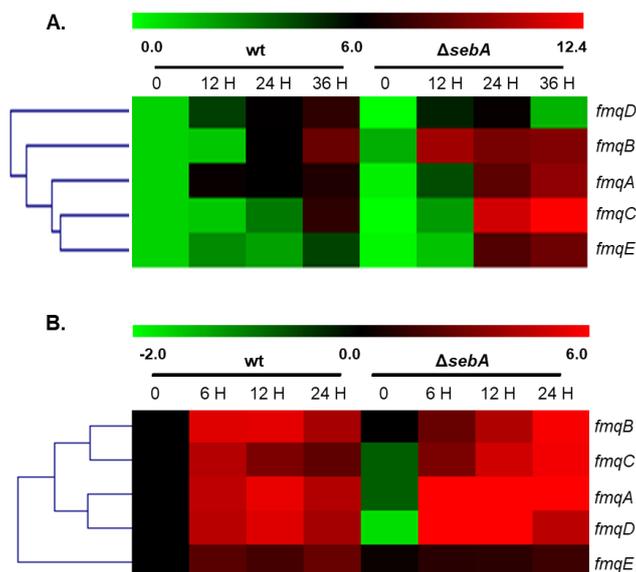


Figura 44: Análise da resposta transcricional de genes do *cluster* de síntese de Fqs na linhagem selvagem e mutante $\Delta sebA$ durante o desenvolvimento assexuado a 30 °C (A) e a 37 °C (B). O RNA total foi isolado da indução de desenvolvimento assexuado sincronizado para a linhagem selvagem e mutante $\Delta sebA$ de *A. fumigatus*, foi tratado com DNase, transcrito reversamente para ser usado na RT-qPCR em tempo real. Os valores foram transformados em \log_2 e submetidos a um algoritmo de agrupamento hierárquico (distância Euclidiana) usando o software TMEV (disponível em <http://www.tm4.org/mev.html>). O esquema de cores foi usado para designar genes que foram regulados negativamente (verde) ou regulados positivamente (vermelho).

Coletivamente, os dados sugerem que o fator de transcrição SebA regula negativamente a expressão dos genes do *cluster* biossintético da produção de FqC em *A. fumigatus*.

Para determinar se o fator de transcrição SebA seria um regulador negativo direto da biossíntese de Fq em *A. fumigatus*, semelhante ao que foi feito para buscar domínios MADS-box nos genes responsáveis pela biossíntese de Fqs, buscou-se identificar sítios de ligação preditos para o fator de transcrição SebA nas regiões promotoras dos genes do *cluster* *fmq* da síntese de Fqs. Recentemente, o domínio de ligação do fator de transcrição Seb-1 de *N. crassa* (AGGGG) denominado motivo STRE (*stress response element*) foi caracterizado e validado *in vivo* por CHIP-qPCR e *in vitro* por ensaio de mobilidade em gel (EMSA) [223]. Em *S. cerevisiae*, STRE é um *motif* também presente em promotores de genes regulados por diferentes tipos de estresses e, é reconhecido pelos fatores de transcrição Msn2/4 [226].

Dessa forma, como esse *motif* de ligação STRE não foi ainda validado em *A. fumigatus*, utilizamos a sequência consenso de *N. crassa* e *S. cerevisiae*

como fonte de informação para a busca de STRE nas regiões promotoras dos genes *fmq* com o intuito de estabelecer uma ligação direta entre o fator de transcrição SebA e a síntese de FqC em *A. fumigatus*. A busca dos *motifs* de ligação nas regiões promotoras desses genes mostrou que *fmqA-B-C-D-E* possuem regiões STRE em seus promotores. Assim, conforme descrito anteriormente, foram desenhados oligonucleotídeos direcionados para a região promotora destes genes para investigar a ligação de SebA aos *motifs* STRE identificados *in silico* pela técnica de ChIP-qPCR. Além disso, um domínio STRE foi também localizado na região promotora -2.502 pb do gene *rlmA*, o qual foi também incluído na análise. Os genes selecionados, assim como as sequências da região promotora de SebA encontrada em cada gene estão listados na tabela 14, e a localização deste *motif* na região promotora de cada gene exibida na figura 45A.

Tabela 14: Genes relacionados à biossíntese de Fq em *A. fumigatus* selecionados para a análise por ChIP-qPCR do fator de transcrição SebA.

Gene	Sequência do STRE na região promotora
Afu6g12080 (<i>fmqA</i>)	AAGGGG
Afu6g12080 (<i>fmqA</i>)	GAGGGG
Afu6g12060 (<i>fmqB</i>)	AAGGGG
Afu6g12060 (<i>fmqB</i>)	GAGGGG
Afu6g12060 (<i>fmqB</i>)	ACGGGG
Afu6g12060 (<i>fmqB</i>)	AAGGGG
Afu6g12050 (<i>fmqC</i>)	CAGGGG
Afu6g12050 (<i>fmqC</i>)	CAGGGG
Afu6g12070 (<i>fmqD</i>)	CGGGGG
Afu6g12070 (<i>fmqD</i>)	AAGGGG
Afu6g12040 (<i>fmqE</i>)	TAGGGG
Afu6g12040 (<i>fmqE</i>)	CTGGGG
Afu3g08520 (<i>rlmA</i>)	CAGGGG

Para as análises de ChIP-qPCR do fator de transcrição SebA, utilizou-se a linhagem *sebA::gfp* [137] e a linhagem selvagem de *A. fumigatus*. O procedimento utilizado foi o mesmo descrito para a linhagem *rlmA::gfp* neste capítulo (figura 42), e como controle do experimento utilizou-se uma região exônica do gene *prxB* (Afu5g15070).

As análises de ChIP-qPCR demonstraram que SebA se liga a todos os *motifs* STRE dos promotores dos genes que compõem o *cluster* biossintético de Fqs *fmqA-B-C-D-E* (figura 45B). Estes dados em conjunto com os dados de

RT-qPCR levam à conclusão de que há uma regulação direta dos genes que sintetizam Fq (*fmqA-E*) por SebA. Devido ao aumento da produção de FqC observado no mutante SebA, sugere-se que este é um regulador negativo da biossíntese de Fq, ou seja, quando ativo SebA se liga aos genes do *cluster* da Fq impedindo a transcrição dos genes relacionados à biossíntese deste composto em *A. fumigatus*. Curiosamente, SebA também é capaz de se ligar ao STRE encontrado na região promotora de RImA, indicando que o fator de transcrição SebA também regula este fator de transcrição.

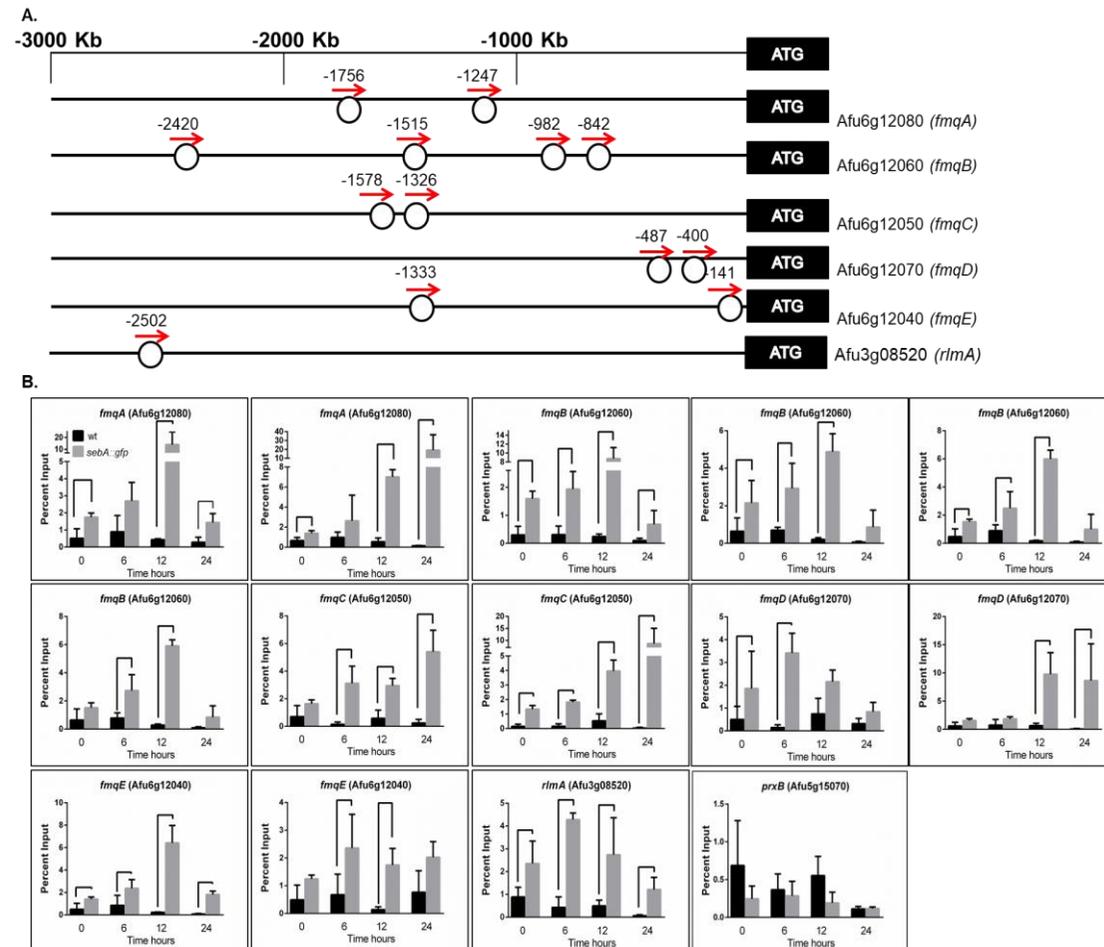


Figura 45: CHIP-qPCR dos genes *fmqA*, *fmqB*, *fmqC* e *fmqD* nas linhagens selvagem e *sebA::gfp* durante o desenvolvimento assexuado a 37 °C em *A. fumigatus*. (A) Localização do domínio STRE na região promotora dos genes do cluster *fmq*. (B) Para as análises de CHIP-qPCR, as linhagens *sebA::gfp* e selvagem foram cultivadas por 16 horas em meio completo líquido YG, foram filtradas, o micélio foi disperso em placa de Petri contendo meio completo sólido YG, e as linhagens foram incubadas em estufa a 37 °C por 6, 12 e 24 horas e preparadas para a imunoprecipitação de cromatina. Os resultados demonstram a ligação de SebA à região promotora dos genes testados. Para genes com dois ou mais *motifs* de ligação de SebA na região promotora, os gráficos são apresentados de acordo com a proximidade da ORF. Como controle negativo foi utilizado um oligonucleotídeo localizado em uma região exônica do gene PrxB. ($p \leq 0,05$ $n = 3$).

4.2.4 A FqC é um metabólito secundário envolvido na virulência de *A. fumigatus* em diferentes hospedeiros

Os resultados acima descritos sugerem que a produção de FqC em *A. fumigatus* é diretamente influenciada pelos fatores de transcrição RlmA e SebA, e que a sinalização via CWIP também impacta na quantidade de FqC sintetizada. Entretanto, não há nenhuma informação sobre a possível atividade biológica de FqC sobre diferentes tipos celulares e qual a importância dessa molécula dentro do repertório químico de *A. fumigatus*. Uma das questões óbvias associadas a essas informações obtidas sobre como a síntese de FqC é regulada é: FqC está envolvida na virulência desse fungo? Ela pode ser encontrada no sítio de infecção do hospedeiro mamífero, e causando nesse local algum efeito biológico que justifique a colonização? Diante disso, decidi-se investigar os efeitos biológicos dessa molécula e sua relação com a CWIP e o fator de transcrição SebA.

Como uma abordagem inicial buscou-se entender se a FqC tem algum efeito tóxico sobre a própria célula de *A. fumigatus*. Isso porque é conhecido que para o caso de alguns metabólitos secundários como a gliotoxina, que tem relevante papel na virulência desse fungo [86], um dos genes do cluster de produção (*gliT*) codifica uma enzima *Gliotoxin sulfhydryl oxidase* que leva a detoxificação da gliotoxina tornando-a inócua ao fungo [86].

Os resultados indicam que o crescimento das linhagens mutantes da CWIP foi inibido por FqC. Um dado interessante é que o mutante $\Delta mpkA$, que foi o que obteve a menor quantificação da FqC exibiu os níveis mais elevados de sensibilidade para este metabólito secundário (figura 46A). Em conjunto, estes resultados sugerem que *pkcA*, *mpkA* e *rlmA* são importantes para a produção e resistência à FqC em *A. fumigatus*. Por outro lado, o mutante SebA que é um super produtor de FqC mostrou-se mais resistente a este metabólito secundário (figura 46B). A CIM da FqC observada na linhagem selvagem foi de 100 $\mu\text{g/mL}$, na linhagem mutante $\Delta sebA$ este foi de 150 $\mu\text{g/mL}$, e a linhagem complementante $\Delta sebA::\Delta sebA^+$, na qual o gene *sebA* foi reinserido, apresentou o CIM igual ao da linhagem selvagem de *A. fumigatus*.

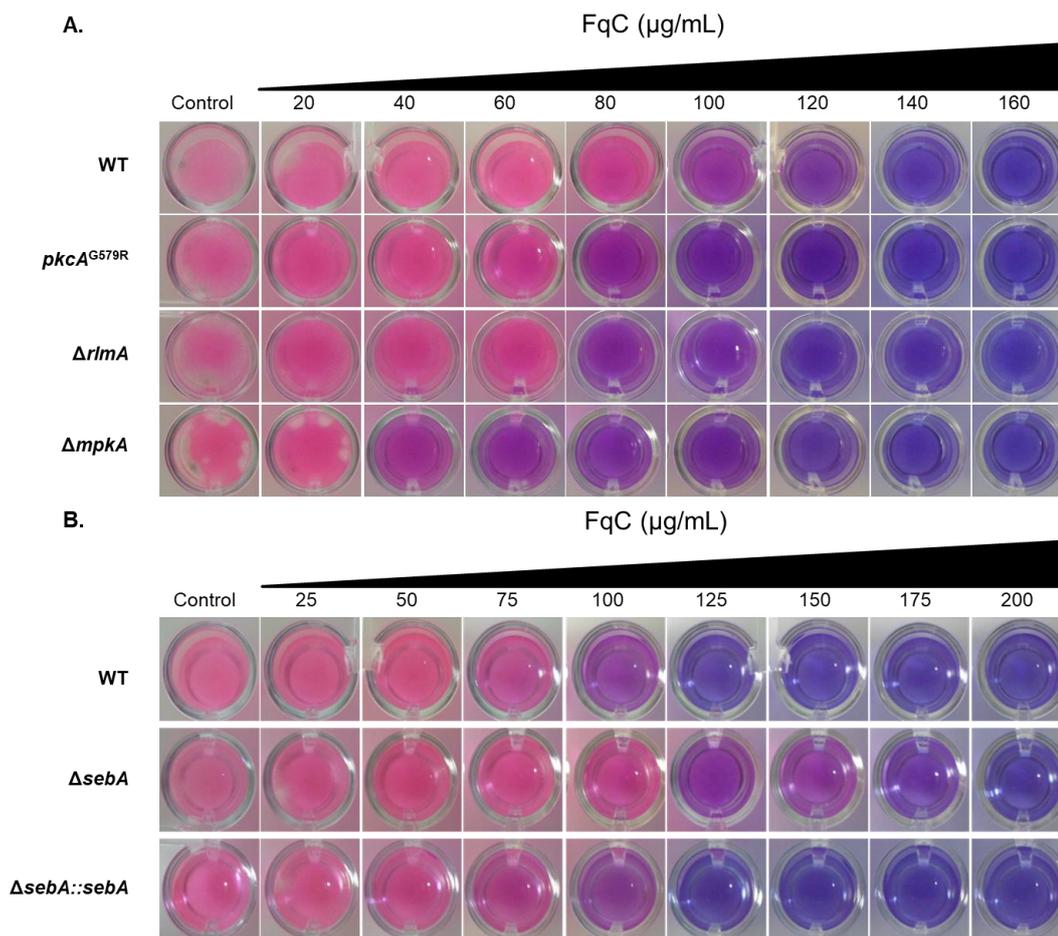


Figura 46: Mutantes da CWIP de *A. fumigatus* são mais sensíveis à FqC (A), enquanto a deleção de *SebA* é mais tolerante (B). 1×10^3 conídios da linhagem selvagem, linhagens mutantes da CWIP, Δ *sebA* e Δ *sebA::sebA*⁺ foram cultivados em MM líquido suplementado com diferentes concentrações de FqC durante 24 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 FqC demonstrou ser potencialmente tóxica para *A. fumigatus*. Com o intuito de verificar se este metabólito secundário também teria um impacto sobre a resposta imune em células do hospedeiro, foram utilizados macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs) de camundongos C57BL/6 para medir os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 liberadas por estas células após co-incubação com a FqC e FqD. BMDMs co-cultivadas com FqC apresentaram uma produção de TNF- α cerca de 4 vezes maior em relação ao controle positivo (LPS), e 2 vezes mais em relação à FqD (* $p \leq 0,01$; figura 47A). Um resultado semelhante foi observado na produção da IL-6, pois BMDMs co-cultivadas com FqC apresentaram cerca de 4 vezes de aumento na produção de IL-6 em relação à cultura de célula não induzida, e 3 vezes mais

em relação à FqD ($*p \leq 0,01$; figura 47B), sendo que não houve indução significativa de IL-6 nas células incubadas com FqD (figura 47B).

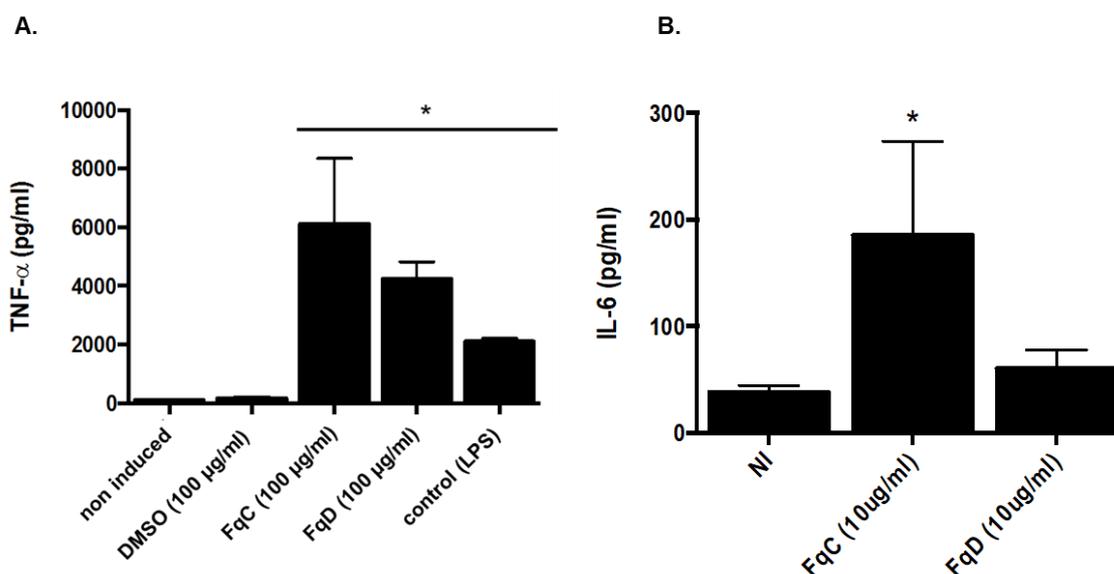


Figura 47: Secreção de TNF- α (A) e IL-6 (B) a partir de BMDMs após incubação com FqC e FqD. Os níveis de TNF- α e IL-6 foram quantificados por ELISA a partir do sobrenadante da cultura após 18 horas de infecção em BMDMs. Os dados mostram os valores médios \pm desvio padrão ($*p \leq 0,01$). LPS: lipopolissacárido (controle positivo).

Devido ao fato de FqC ter potencialmente um impacto sobre a resposta imune no hospedeiro, o passo seguinte foi verificar a citotoxicidade dessas moléculas para as células do hospedeiro. Da mesma forma, FqC e FqD foram incubadas com BMDMs e a sobrevivência das células foi avaliada por ensaio de citotoxicidade medido por MTT. Os resultados indicaram que FqC e FqD não levaram a morte celular de forma estatisticamente significativa em relação ao controle com o veículo utilizado (DMSO), exceto para a FqD na maior concentração empregada (100 μ g/mL) (figura 48A). Para as outras concentrações utilizadas a citotoxicidade foi estimada em torno de 30 % apenas. Por outro lado observou-se que de alguma forma FqC interfere com a estabilidade da membrana de macrófagos já que houve acentuada formação de poros na membrana plasmática das células, a qual é dose dependente da concentração de FqC aplicada na incubação. Na concentração de 100 μ g/mL observou-se um aumento de 60 % na formação de poros na membrana plasmática (figura 48B).

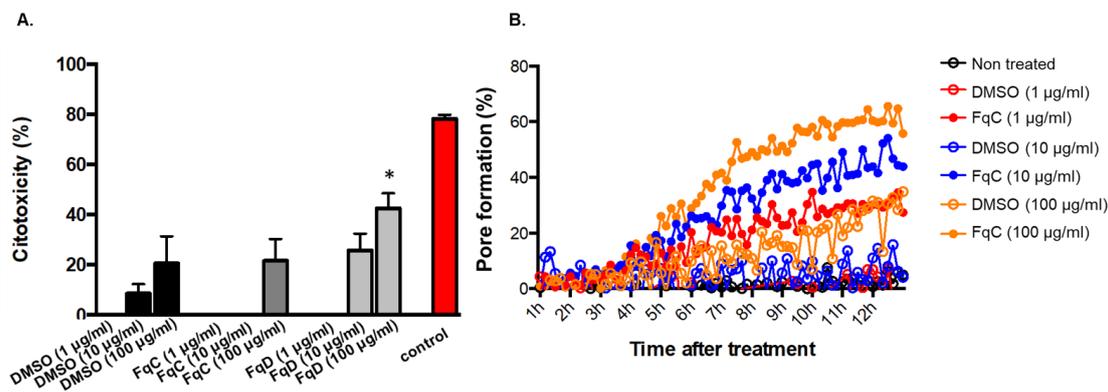


Figura 48: FqC e FqD apresentam efeitos citotóxicos limitados, mas influenciam a formação de poros em BMDMs de camundongos. (A) Avaliação da toxicidade em BMDMs de camundongos após 18 horas de estímulo com FqC e FqD (* $p \leq 0,01$). **(B)** Avaliação da formação de poros na membrana plasmática de BMDMs de camundongos após 12 horas de estímulo com FqC. A porcentagem refere-se ao controle positivo (Triton X-100).

Embora tenha sido possível identificar que FqC e FqD estimulam o sistema imune de células BMDMs, ainda não é possível atribuir um papel desse metabólito secundário no sítio de infecção *in vivo*. Um dado importante sobre o mutante $\Delta sebA$ é que este embora seja um super produtor de FqC, ele tem sua virulência atenuada em modelo murino de aspergilose pulmonar invasiva [137]. Esse dado sugere que talvez essa molécula não esteja presente no sítio de infecção do hospedeiro mamífero, o que é esperado já que a FqC acumula especificamente nos conídios (figura 43B) [87]. Diante dessas observações, especulou-se que possivelmente a função de FqC e possivelmente FqD esteja mais relacionada ao ambiente saprofítico que *A. fumigatus* vive de forma ubíqua (solo e matéria em decomposição), onde deve competir com outros organismos para sobrevivência e aquisição de nutrientes. Assim, como continuação dos estudos do papel da FqC em *A. fumigatus*, também utilizou-se a ameba de vida livre de solo *Dictyostelium discoideum* a qual é um modelo para estudo de relação entre microrganismos habitantes do solo que vivem em co-ocorrência com esta ameba [148]. Assim a relação da interação fagocítica de *D. discoideum* com os conídios das linhagens mutantes da CWIP e $\Delta sebA$ que possuem alteração na produção de FqC em relação à linhagem selvagem de *A. fumigatus* foi avaliada e comparada com o perfil fagocítico obtido para as mesmas linhagens utilizando o modelo de BMDMs empregado nos ensaios anteriores. Curiosamente, os conídios da linhagem $\Delta sebA$ foram significativamente menos fagocitados por *D. discoideum*, e o oposto ocorreu

quando os conídios dos mutantes da via CWIP foram testados, pois os mutantes $\Delta rlmA$ e $\Delta mpkA$ da CWIP foram fagocitados 2,5 e 3 vezes mais que os da linhagem $\Delta sebA$, respectivamente (figura 49A). Devido à grande redução da fagocitose da linhagem $\Delta sebA$ por *D. discoideum*, realizou-se uma cinética da fagocitose desta linhagem em relação à linhagem selvagem de *A. fumigatus* e à linhagem complementante $\Delta sebA::sebA$, e foi possível observar uma redução de cerca de 50 % da fagocitose por *D. discoideum* na linhagem $\Delta sebA$ em relação à taxa de fagocitose das linhagens selvagem e complementante $\Delta sebA::sebA^+$ (figura 49B). Os resultados do índice de fagocitose por BMDMs, foram os mesmos que os observados para *D. dyscoideum*, isto é, maior fagocitose de conídios de $\Delta mpkA$ e menor em conídios do mutante $\Delta sebA$, novamente evidenciando a relação entre FqC e a fagocitose de conídios desse fungo nos dois modelos celulares usados (figura 49C). O mutante $\Delta rlmA$ é também menos fagocitado por BMDMs, conforme mostrado na figura 31C, módulo 1. A linhagem $\Delta sebA$ produz 4 vezes mais FqC que a linhagem selvagem de *A. fumigatus*; logo, estes resultados em conjunto sugerem que FqC pode servir como um composto de defesa contra outros microrganismos ou predadores do solo.

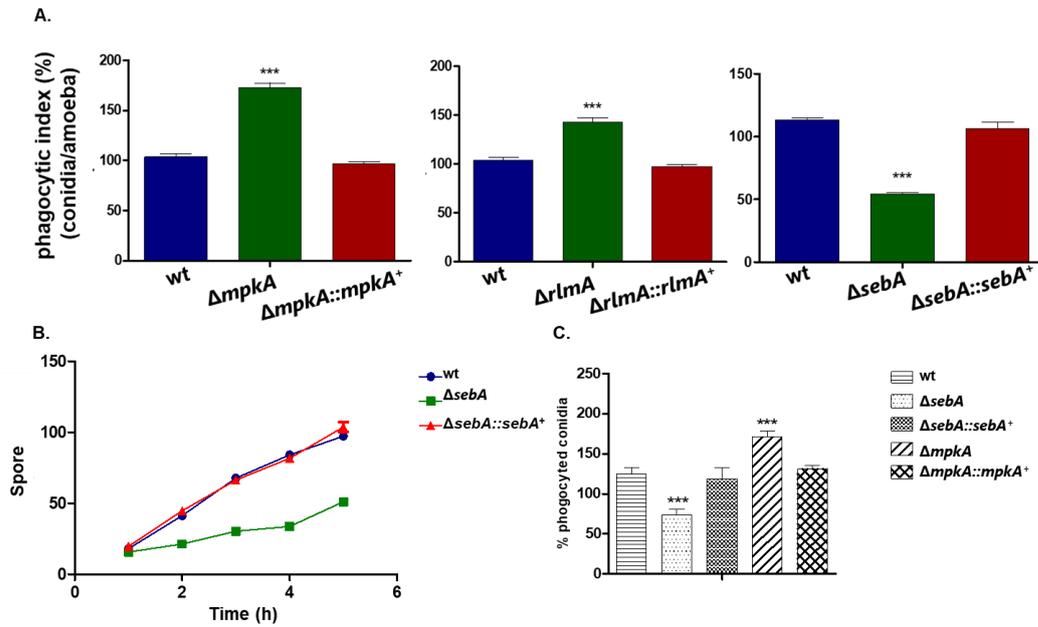


Figura 49: Análise dos índices de fagocitose de conídios por *D. discoideum* e BMDMs. (A) A linhagem selvagem de *A. fumigatus*, e as linhagens mutantes $\Delta rlmA$, $\Delta mpkA$ e $\Delta sebA$ e as respectivas linhagens complementantes foram co-incubadas com células de *D. discoideum* a 22 °C durante 5 horas, após a incubação 50 células de *D. discoideum* foram contadas por análise de fagocitose de conídios (***) ($p \leq 0,005$). **(B)** Para a realização da cinética de fagocitose dos conídios da linhagem selvagem, $\Delta sebA$ e $\Delta sebA::sebA^+$ por *D. discoideum*, as cepas foram co-incubadas com células de *D. discoideum* e a cada 2 horas de incubação 50 células de *D. discoideum* foram contadas por análise de fagocitose de conídios. **(C)** O índice de fagocitose por BMDMs na linhagem $\Delta sebA$ é menor que o observado na linhagem selvagem e mutante $\Delta mpkA$ (***) ($p \leq 0,005$).

4.2.5 Discussão

A CWIP tem uma importante conexão com a produção de metabólitos secundários em *A. fumigatus*. MpkA é conhecido por desempenhar um papel na produção de gliotoxina, piomelanina e sideróforos [27, 40]. Aqui, a produção de gliotoxina não foi detectada em ambos os mutantes $\Delta rlmA$ e $pkcA^{G579R}$, bem como em seus respectivos duplos mutantes, indicando que o sinal regulatório do circuito PkcA-MpkA-RlmA é importante para a produção de gliotoxina, e não apenas MpkA, linhagem cujos defeitos fenotípicos e de crescimento vegetativo são mais acentuados. Curiosamente, ao usar uma abordagem de triagem global que comparou o perfil de síntese do metabólito secundário do mutante $\Delta rlmA$ e da linhagem selvagem de *A. fumigatus*, também descobriu-se que a produção de FqC foi significativamente reduzida no mutante $\Delta rlmA$. Análises adicionais também mostraram um menor teor de FqC nas linhagens mutantes $\Delta mpkA$ e $pkcA^{G579R}$. A redução de FqC foi novamente mais evidente na linhagem mutante $\Delta mpkA$, indicando mais uma vez que MpkA é o principal componente da via CWIP que liga a integridade da parede celular à produção de metabólitos secundários em *A. fumigatus*. Notavelmente, a concentração de FqC mais baixa no mutante $\Delta rlmA$ é acompanhada pela redução dos níveis de mRNA dos quatro genes que codificam as enzimas da via biossintética de Fq (*fmqA-D*), o que sugere que RlmA possa ser um regulador da biossíntese de Fq em *A. fumigatus*. As análises de CHIP-qPCR demonstraram que RlmA se liga aos genes que compõem o cluster biossintético de Fqs *fmqA-B-C-D*, sugerindo que há uma regulação direta dos genes que sintetizam Fq (*fmqA-E*) por RlmA, ou seja, a CWIP, que culmina no fator de transcrição RlmA, além de ser responsável pela regulação de genes envolvidos na biossíntese e manutenção da parede celular é também responsável pela regulação da biossíntese de Fq em *A. fumigatus*.

Fq é um metabólito secundário derivado de conídios [88], e a via que controla a conidiação é altamente conservada em *A. fumigatus* [67, 68]. Esta via contém os três genes que são elementos chave, BrlA, AbaA e WetA, responsáveis por coordenar a conidiação, a expressão específica de genes, e determinar a ordem da ativação de genes durante a formação e a maturação de conidióforos [67]. Entre os metabólitos secundários que podem ser

produzidos por *A. fumigatus*, alguns não foram detectados nos conídios da linhagem $\Delta brlA$, o que indica a dependência ao BrIA de genes envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários [88]. Lim, Ames [87] mostraram que BrIA é necessário para a síntese de FqC e FqA em *A. fumigatus*, pois a linhagem $\Delta brlA$ produz somente FqF, o primeiro congênero da via de biossíntese da Fq. Curiosamente, a análise da linhagem $\Delta rlmA$ revelou fenótipos relacionados a defeitos de desenvolvimento assexuado, especialmente a 30 °C, condição na qual a conidiação é severamente afetada e nota-se o fenótipo *fluffy*. Além disso, RlmA se liga aos promotores dos genes dos fatores de transcrição reguladores do desenvolvimento assexuado em *A. fumigatus*, FlbB e FlbC, cujos respectivos mutantes nulos $\Delta flbB$ e $\Delta flbC$ apresentam um fenótipo *fluffy* [219].

O defeito de conidiação observado na linhagem $\Delta rlmA$ também foi evidente durante a indução de desenvolvimento assexuado sincronizado a 30 °C e 37 °C e, como esperado, foi acompanhado pela menor expressão de *brlA*, *abaA* e *wetA*. Conseqüentemente, pode-se ligar a menor produção de FqC nos conídios da linhagem $\Delta rlmA$ à redução da expressão de *brlA*. Em *A. nidulans*, a redução da expressão de *brlA* na linhagem mutante $\Delta rlmA$ também foi relatada em culturas líquidas na presença do estresse de parede celular induzido por CR [61]. A expressão de *rlmA* é significativamente induzida durante o desenvolvimento assexuado em *A. fumigatus*, indicando que esse fator de transcrição é importante para a conidiação. Uma explicação para esta observação que pode unir o desenvolvimento assexuado e as deficiências de CWI deste mutante é o fato de que a parede celular pode sofrer uma remodelação dramática durante o desenvolvimento assexuado para permitir que novos morfotipos emergjam do micélio, como os conidióforos e suas estruturas associadas, resultando finalmente nos conídios produzidos por *A. fumigatus*.

O fator de transcrição de *A. fumigatus* *SebA* já está caracterizado em diversos organismos, como *T. atroviride* [224, 225], *C. albicans* [227], *N. crassa* [223] e também em *A. fumigatus* [137], onde este demonstrou estar envolvido na resposta ao choque térmico, ao estresse oxidativo e ao crescimento em condições precárias de nutrientes, contribuindo para a modulação da transcrição e regulação de vários genes envolvidos no estresse oxidativo e na adaptação ao

choque térmico. Neste trabalho, relatou-se pela primeira vez o papel de SebA na produção de metabólitos secundários, demonstrando que este fator de transcrição regula a biossíntese da FqC em *A. fumigatus*, e também que o mutante nulo deste fator de transcrição possui maior resistência a este composto em relação à resistência observada na linhagem selvagem de *A. fumigatus*.

A gliotoxina é a principal toxina produzida por *A. fumigatus* [79], um dos genes que compõem o *cluster* de biossíntese deste metabólito, o *gliT*, é necessário para a proteção do fungo à gliotoxina, o crescimento do mutante $\Delta brlA$ com níveis reduzidos de GliT foi gravemente prejudicado pela gliotoxina exógena [83]. Os mutantes da CWIP que produzem menor quantidade de FqC também apresentaram uma maior tolerância a este composto em relação a linhagem selvagem de *A. fumigatus*. Estes resultados sugerem que assim como no *cluster* de biossíntese da gliotoxina, pode haver algum gene que codifique uma proteína responsável por mecanismos de detoxificação para FqC, portanto pode-se neste momento supor que este mecanismo deve estar parcialmente inativado nos mutantes da CWIP.

Notavelmente, a maior produção de FqC no mutante $\Delta sebA$ é acompanhada pelo aumento dos níveis de mRNA dos quatro genes que codificam as enzimas da via biossintética de Fqs (*fmqA-D*). As análises de ChIP-qPCR demonstraram que SebA se liga a todos os genes que compõem o *cluster* biossintético de Fqs *fmqA-B-C-D-E*, o que demonstra uma regulação direta dos genes que sintetizam Fq (*fmqA-E*) por SebA. Os dados aqui demonstrados permitem hipotetizar que a relação entre SebA e a produção de FqC se correlaciona na observação do fato de que SebA é um regulador chave de resposta ao estresse em todos os organismos fúngicos onde ele foi estudado. SebA parece ser um regulador negativo da síntese de FqC, mas isso parece ocorrer em condições de “não estresse” onde a célula talvez requeira menos atitudes para a sua sobrevivência ou esteja em locais com menor competição por nutrientes. A perda de função de SebA em *A. fumigatus* alerta a célula que a tolerância a diferentes tipos de estresses (como por exemplo, oxidativo, térmico e nutricional) está defectiva e isso leva a respostas coordenadas que ativam vias diferentes para a sobrevivência. Neste contexto, a ativação da via de biossíntese de FqC pode ser uma dessas atitudes, o que

explica o papel regulatório negativo de SebA sobre o *cluster fmq*. A favor dessa explicação está o fato de que claramente a produção de FqC é regulada por diferentes vias de sinalização e diferentes fatores de transcrição já que o *cluster fmq*, curiosamente não tem um fator de transcrição próprio [87]. Neste trabalho identificamos dois deles, isto é, SebA e RImA, com base nos resultados apresentados, este trabalho propõem um modelo da regulação de Fqs por estes dois fatores de transcrição (figura 50). Além disso ainda considerando o papel de FqC no nicho saprofítico de *A. fumigatus*, estudos de sequenciamento de RNA mostraram que mais de 13 *clusters* envolvidos na síntese de metabólitos secundários em *A. fumigatus* são menos expressos a 37° C do que a 30 °C, incluindo as moléculas de melanina conidial (DHN melanina), fumiclavina, endocrocina, tripacidina, fumipirrol, gliotoxina, fumiquinazolina, fumitremorgina, fumigalina e pseurotina [228, 229]. As Fqs são metabólitos secundários bem caracterizados em *A. fumigatus* e compreendem uma família de alcaloides citotóxicos relacionados sequencialmente, que são metabólitos produzidos por *A. fumigatus* [87]. Aqui, demonstrou-se que a FqC pareceu ser potencialmente tóxica para *A. fumigatus* e apresenta um impacto sobre a resposta imune no hospedeiro levando ao aumento da produção de TNF- α e IL-6, além do aumento da formação de poros na membrana plasmática.

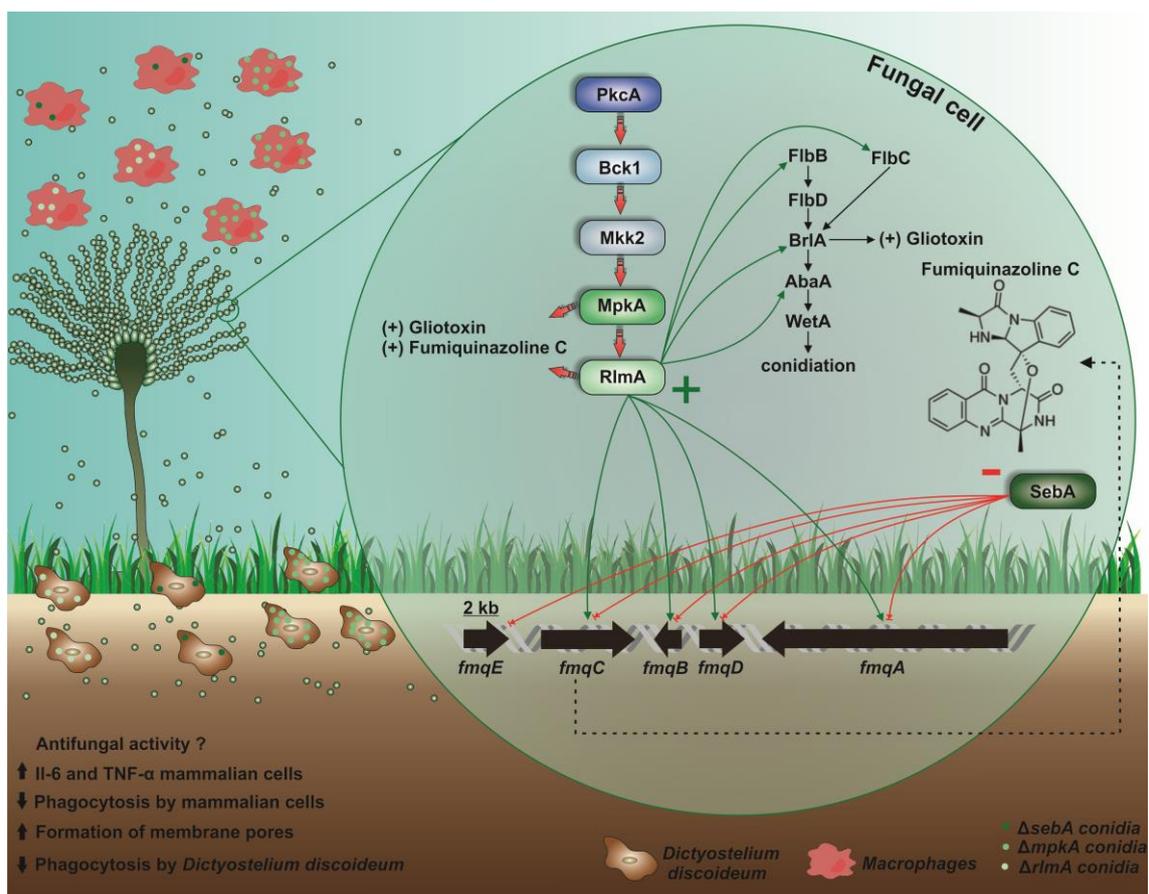


Figura 50: Esquema proposto como modelo de regulação transcricional do desenvolvimento assexuado, biossíntese das Fqs e gliotoxina em *A. fumigatus*, assim como o papel da FqC na virulência de *A. fumigatus* em diferentes hospedeiros.

Embora os mutantes nulos de ambos os fatores de transcrição *rlmA* e *sebA* demonstraram ausência de virulência em modelo murino e também o aumento da fagocitose por BMDMs, aqui demonstramos que os conídios da linhagem Δ *sebA* foram significativamente menos fagocitados por *D. discoideum* e o oposto ocorreu quando os conídios dos mutantes da via CWIP foram testados, sugerindo novamente que FqC pode servir como um composto de defesa contra outros microrganismos ou predadores do solo (figura 50).

Em conclusão, a análise de um mutante nulo Δ *rlmA* em *A. fumigatus* sugere que *rlmA* está ligado ao desenvolvimento vegetativo e à produção de metabólitos secundários. Estes resultados são evidências de que a CWIP é essencial para orquestrar a biossíntese e a remodelação da parede celular durante as dramáticas mudanças morfológicas que ocorrem durante o desenvolvimento fúngico. E o fator de transcrição RlmA é um elemento chave deste processo, pois este se liga à região promotora de genes indispensáveis para o desenvolvimento assexuado de *A. fumigatus*. A análise da produção de

metabólitos secundários do mutante nulo genético de *A. fumigatus sebA* estabeleceu a primeira relação entre este fator de transcrição e a produção de metabólitos secundários em *A. fumigatus*. Além disto, também se demonstrou que a FqC, um importante metabólito produzido por *A. fumigatus*, e embora não tenha sido detectada no pulmão de camundongos (dados não mostrados) após a infecção por *A. fumigatus*, está envolvida na virulência de *A. fumigatus* em diferentes hospedeiros.

Módulo 4.3 A CWIP é uma das vias responsáveis pela termotolerância em *A. fumigatus*, uma importante característica para a virulência deste patógeno

Rocha et. al, 2017, Current Proteomics (aceito para publicação). The Regulatory Function of the Molecular Chaperone Hsp90 in the Cell Wall Integrity of Pathogenic Fungi.

Manuscrito referente aos resultados em fase de preparação.

4.3.1 Os mutantes da CWIP $\Delta rlmA$, $pkcA^{G579R}$ e $\Delta mpkA$ possuem redução da termotolerância, uma importante característica para a virulência de *A. fumigatus*

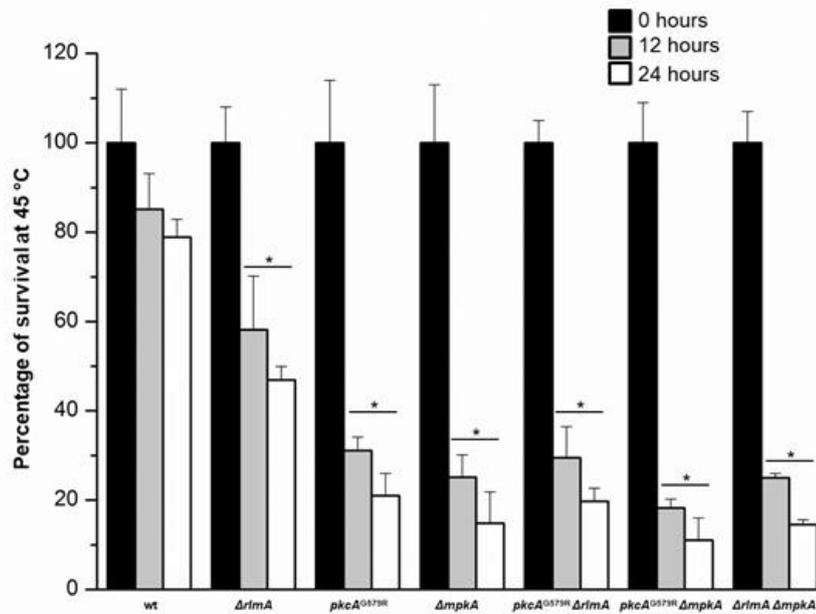
A termotolerância é um traço genético importante para a virulência em *A. fumigatus* durante a infecção a qual também habilita esse fungo a sobreviver em condições de temperatura superiores a 50 °C no seu nicho saprofítico. Esta é uma característica poligênica e a abordagem mais direta para identificar genes envolvidos neste programa genético é a identificação de vias de sinalização relacionadas à adaptação térmica [41]. As mudanças fisiológicas e a adaptação ao hospedeiro em fungos patogênicos ocorrem em resposta aos sinais ambientais do hospedeiro e alguns deles podem ser conduzidos pelo circuito Hsf1-Hsp90 para suportar a persistência do fungo dentro do hospedeiro [113]. Um dos mecanismos regulatórios mais bem conhecidos que opera durante o estresse térmico que é ajustado e concomitantemente governa a função de Hsp90 é a atividade do fator de transcrição Hsf1 para se adaptar ao aumento de temperatura e outros processos relacionados. Após o choque térmico, a quantidade expressa da proteína Hsp90 na célula torna-se menos disponível para se ligar ao Hsf1 o que habilita a transcrição de Hsf1, uma vez que este fator de transcrição é uma proteína cliente de Hsp90, bem conhecida em diferentes organismos, incluindo *C. albicans* [113] e *S. cerevisiae* [106]. Assim, a transcrição aumentada de Hsf1 faz parte do sistema que ativa vias de resposta para a manutenção da homeostase celular durante o choque térmico.

A perturbação do circuito auto regulatório Hsf1-Hsp90 afeta seriamente as respostas ao choque térmico, além da integridade da parede celular, virulência e outros processos celulares em muitos organismos fúngicos. O exame minucioso do impacto da rede de interação de Hsp90 de *C. albicans* sob diversas condições estressantes indicou que a adaptação térmica depende de vias de sinalização chave, incluindo a CWIP [93], que é ativada não somente durante o estresse da parede celular, mas também durante o choque térmico [93], evidenciando portanto que a manutenção da integridade da parede celular depende de elementos regulatórios de sinalização celular da resposta ao choque térmico e vice-versa. A análise transcricional do mutante

$\Delta rlmA$ durante o estresse de parede celular provocado por CR identificou que o fator de transcrição HsfA, homólogo de Hsf1 em *A. fumigatus*, foi menos expresso no mutante nulo de RlmA ($\Delta rlmA$) durante a indução com CR (Fabri J.H.T.M, e colaboradores – dados não publicados), e em testes iniciais de caracterização fenotípica observou-se que a redução do crescimento radial da linhagem $\Delta rlmA$ está relacionada ao aumento da temperatura a qual essa linhagem é exposta. O mesmo foi observado na linhagem mutante $pkcA^{G579R}$ [42] e nos duplos mutantes da CWIP $\Delta rlmA \Delta mpkA$, $pkcA^{G579R} \Delta mpkA$ e $\Delta rlmA pkcA^{G579R}$, sendo que estes também possuem ausência de esporulação quando expostos a 45 °C (figura 17). Desta forma, observa-se que a CWIP de *A. fumigatus* pode estar relacionada à tolerância ao choque térmico.

Determinar a viabilidade dos conídios quando expostos ao choque térmico é um passo essencial para estabelecer a relação dos genes da CWIP com a termotolerância. Para este experimento, as linhagens selvagem e mutantes da CWIP foram expostas ao estresse térmico nas temperaturas de 45 °C e 50 °C e, após a exposição, os conídios foram inoculados em meio sólido YG a 37 °C e a viabilidade destes foi determinada através da contagem de CFU. Como controle foi utilizada a linhagem que não sofreu estresse térmico, isto é, crescida a 30 °C. Esta análise permitiu observar que todas as linhagens mutantes de genes da CWIP apresentaram uma redução significativa da viabilidade dos conídios em relação à linhagem selvagem após 24 horas de exposição a ambas as temperaturas, de forma que na linhagem $\Delta rlmA$ essa redução foi de 32 % a 45 °C e de 43 % a 50 °C, a linhagem $\Delta mpkA$ obteve uma redução de 64 % a 45 °C e de 78 % a 50 °C e a linhagem $pkcA^{G579R}$ obteve uma redução de 57 % a 45 °C e de 61 % a 50 °C. As linhagens duplos mutantes tiveram porcentagem de redução de sobrevivência semelhante aos simples parentais com exceção da linhagem $pkcA^{G579R} \Delta mpkA$ que apresentou uma redução de 62 % a 45 °C e de 89 % a 50 °C (figura 51 A-B). Esta queda da viabilidade dos conídios é um forte indicativo da relação de CWIP de *A. fumigatus* com a tolerância ao choque térmico. Estes dados também reforçam a interação epistática entre os componentes da CWIP, conforme já apontado no módulo 1 (figura 18).

A.



B.

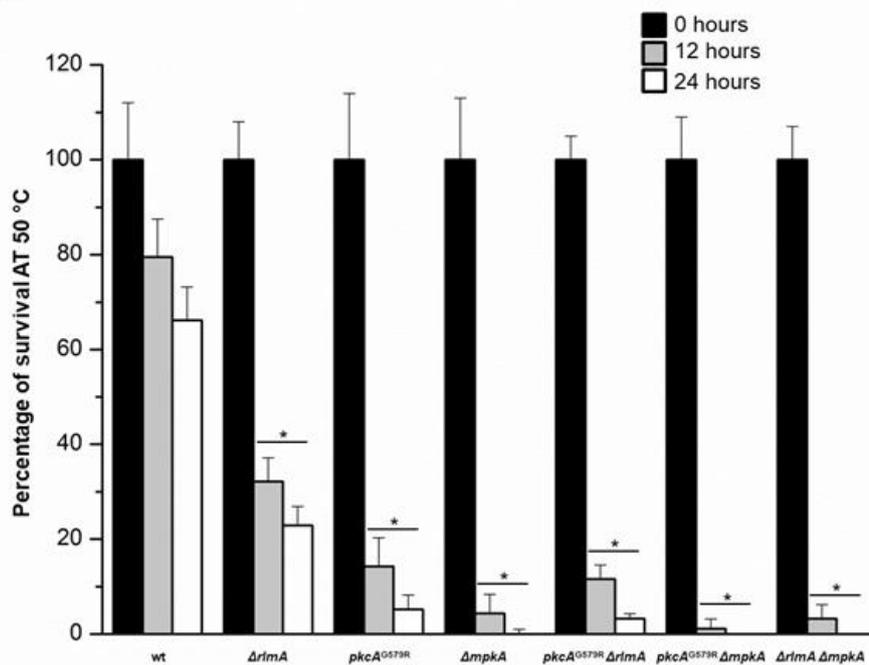


Figura 51: Genes da CWIP de *A. fumigatus* estão relacionados à resistência ao choque térmico. 200 conídios de cada linhagem foram expostos às temperaturas de 45 °C e 50 °C por 12 e 24 horas em placas de Petri contendo meio completo sólido YG. Após os tempos de exposição determinados, as placas foram incubadas a 37 °C para a recuperação por 24 horas. A porcentagem de colônias viáveis foi obtida em relação ao controle não exposto ao choque térmico na linhagem selvagem e mutante. * $p \leq 0,05$, $n=4$.

Em *S. cerevisiae* a MAP quinase Mpk1 (homólogo de MpkA em *A. fumigatus*) [30] é um componente essencial da CWIP, sendo também uma proteína cliente da chaperona molecular Hsp90 [102]. Nos dados de sobrevivência apresentados (figura 51A-B), foi possível observar que a deleção de *mpkA* leva à menor sobrevivência em relação à linhagem selvagem e até mesmo em relação às outras linhagens mutantes da CWIP (*pkcA*^{G579R} e Δ *rlmA* (*p ≤ 0,005). Desta forma, torna-se interessante investigar o efeito da fosforilação de MpkA sob estas condições nas linhagens mutantes *pkcA*^{G579R} e Δ *rlmA* e também na linhagem selvagem de *A. fumigatus*. Estes dados podem definir qual a contribuição da CWIP durante a adaptação ao choque térmico.

Para verificar a fosforilação de MpkA na resposta ao choque térmico em *A. fumigatus*, as linhagens foram cultivadas durante 24 horas em meio mínimo a 30 °C. Posteriormente, os micélios foram transferidos para um novo meio de cultura previamente termostaticado a 37 °C ou a 48 °C e as culturas foram incubadas por 0, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120 e 240 minutos nestas temperaturas sob agitação. Para a detecção da fração fosforilada e total de MpkA utilizou-se respectivamente os anticorpos anti P-p44/42-MAPK e anti-p44/42-MAPK (Cell Signaling Technologies). Adicionalmente, como controle experimental, foi utilizado o anticorpo anti γ -tubulin (γ N-20; Santa Cruz Biotechnology). O resultado de *Western blot* foi quantificado utilizando o software ImageJ[®] (figura 52A-C, 52 A-C).

Foi possível observar que a fosforilação da proteína MpkA foi mantida em níveis basais durante o experimento a 37 °C, o mesmo ocorreu com o mutante Δ *rlmA* porém com aumentos de fosforilação observados nos tempos de exposição de 60, 90 e 120 minutos (figura 52A-C). Porém, na linhagem mutante *pkcA*^{G579R}, é notável o aumento da fosforilação de MpkA, que permanece até o maior tempo de exposição observado (figura 52B).

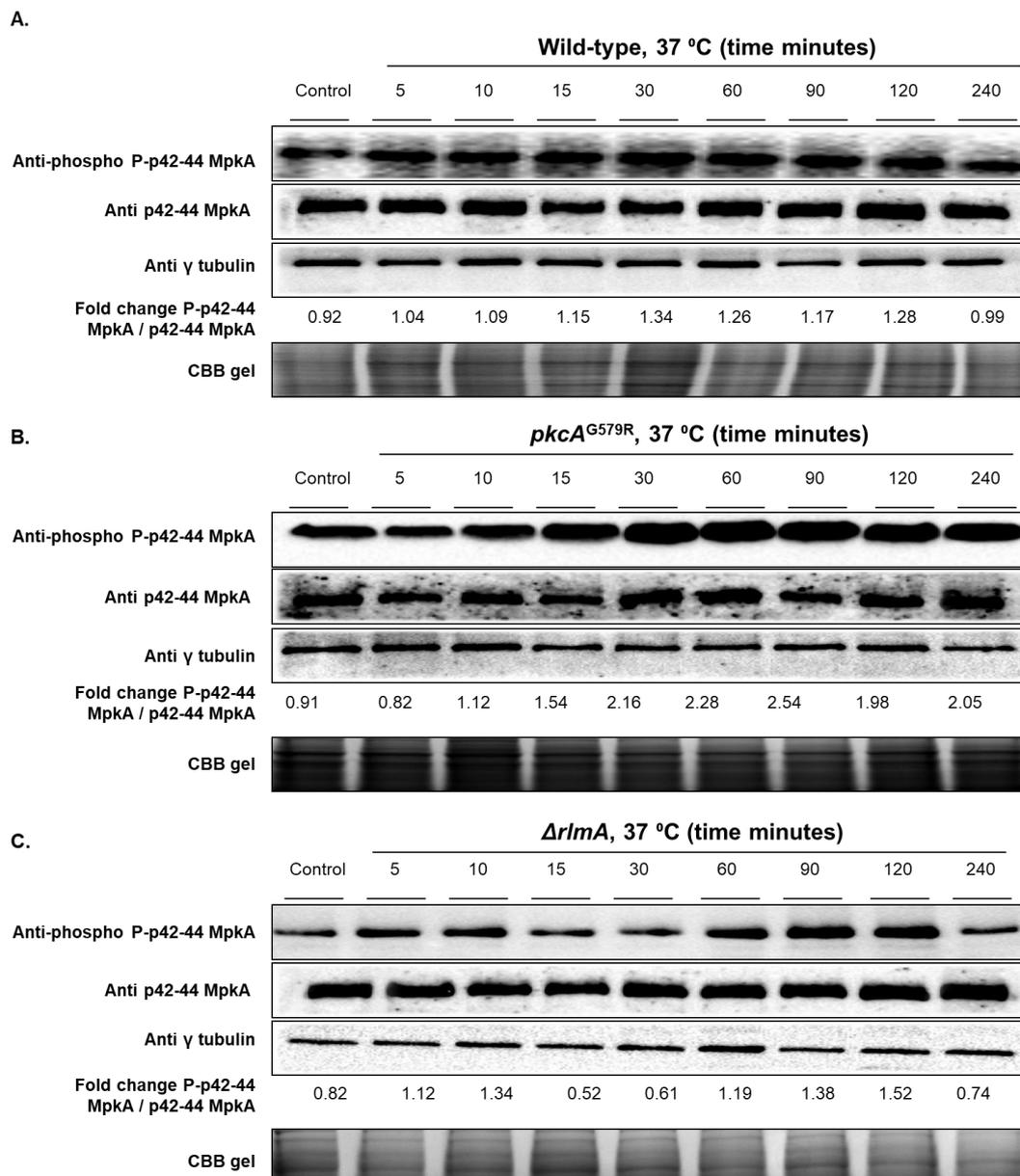


Figura 52: A perda da função de *pkcA* aumenta a fosforilação da MAP quinase MpkA na presença do estresse térmico a 37 °C. As linhagens foram cultivadas durante 24 horas em meio mínimo a 30 °C. Posteriormente o micélio foi transferido para um novo meio de cultura termostabilizado a 37 °C e as culturas foram incubadas pelos tempos mostrados a 37 °C sob agitação. Para a detecção da fração total de MpkA utilizou-se um anticorpo anti P44/42-MAPK (Cell Signaling Technologies), para a detecção da fração fosforilada de MpkA utilizou-se um anticorpo anti P-p44/42-MAPK (Cell Signaling Technologies) e como controle de carregamento utilizou-se o anticorpo anti γ tubulin (Santa Cruz Biotechnology). O resultado do *Western blot* foi quantificado utilizando o software ImageJ® e os valores mostrados abaixo na figura indicam os valores relativos do sinal.

Nos mesmos experimentos de choque térmico realizados a 48 °C, a proteína MpkA foi rapidamente fosforilada na linhagem selvagem (entre 10 e 15 minutos de exposição a 48 °C), seguida de grande queda dos níveis de fosforilação até 240 minutos de exposição (figura 53A). Na linhagem Δ *rlmA* observa-se um pico de indução da fosforilação de MpkA após 10 minutos de

exposição a 48 °C, porém estes valores reduzem até tornarem-se indetectáveis após 240 minutos de exposição (figura 53C). Já na linhagem *pkcA*^{G579R} observou-se que a exposição à temperatura de 48 °C leva a ausência total de detecção da fosforilação de MpkA, mesmo em curto tempo de exposição (5 minutos) (figura 53B). Como mostrado na figura 51A-B, a linhagem *pkcA*^{G579R} apresenta uma redução significativa de sobrevivência após exposição à temperatura em relação a linhagem $\Delta rlmA$. Estes dados em conjunto sugerem que a fosforilação de MpkA é um importante passo para a termotolerância em *A. fumigatus*, especialmente a temperaturas mais elevadas (48 °C).

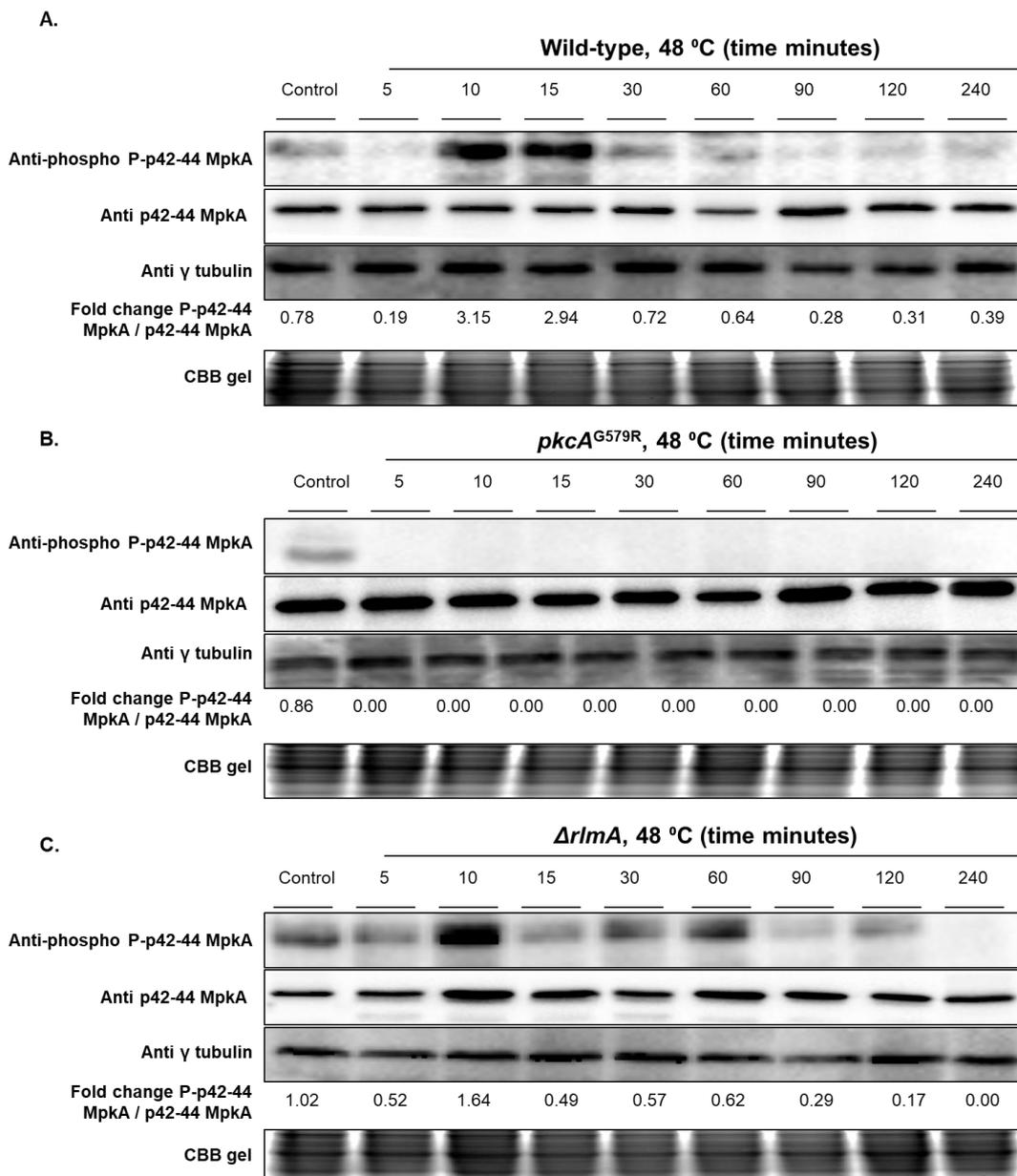


Figura 53: A deleção de *rlmA* e a perda da função de *pkcA* reduzem a fosforilação da MAP quinase MpkA na presença do estresse térmico a 48 °C. As linhagens foram cultivadas durante 24 horas em meio mínimo a 30 °C. Posteriormente, o micélio foi transferido para um novo meio de cultura termostatzado a 48 °C e as culturas foram incubadas pelos tempos mostrados a 48 °C sob agitação. Para a detecção da fração total de MpkA utilizou-se um anticorpo anti p44/42 MAPK (Cell Signaling Technologies), para a detecção da fração fosforilada de MpkA utilizou-se um anticorpo anti P-p44/42 MAPK (Cell Signaling Technologies) e como controle de carregamento utilizou-se o anticorpo anti γ tubulin (Santa Cruz Biotechnology). O resultado do *Western blot* foi quantificado utilizando o software ImageJ®, e os valores mostrados abaixo na figura indicam os valores relativos do sinal.

A fim de se compreender as bases transcricionais da termotolerância defectiva nos mutantes *pkcA*^{G579R}, Δ *mpkA* e Δ *rlmA*, vários homólogos reconhecidos como responsáveis pela resposta ao choque térmico em *S. cerevisiae*, e também os genes que compõem a CWIP *pkcA*, *mpkA* e *rlmA* tiveram os níveis

de mRNA avaliados na linhagem selvagem de *A. fumigatus* e nos mutantes da CWIP *pkcA^{G579R}*, $\Delta mpkA$ e $\Delta rlmA$ durante o choque térmico a 37 °C e 48 °C. Os genes responsáveis pela resposta ao choque térmico escolhidos para a análise da expressão gênica nestas linhagens foram o fator de transcrição *hsf1* (Afu5g01900), as chaperonas moleculares *hsp30* (Afu6g06470), *hsp90* (Afu5g04170) e *hsp70* (Afu1g07440), *hscA* (Afu8g03930), uma chaperona membro da família da Hsp70, e o gene da proteína de choque térmico mitocondrial *ssc1* (Afu2g09960), que possivelmente é uma Hsp70 mitocondrial.

Os genes que compõem a CWIP testados apresentaram aumento dos níveis de mRNA na linhagem selvagem de *A. fumigatus* após o choque térmico a 37 °C e a 48 °C (figura 54-55), indicando que PkcA, MpkA e RlmA podem estar envolvidas na ativação de proteínas *downstream* relacionadas à termotolerância em *A. fumigatus*. Em contraste, observou-se um comportamento oposto nos mutantes da CWIP, isto é, todos os genes tiveram menor expressão ou repressão dos níveis de mRNA nas linhagens mutantes da CWIP *pkcA^{G579R}*, $\Delta mpkA$ e $\Delta rlmA$, com exceção dos transcritos de *mpkA* na linhagem *pkcA^{G579R}* quando esta foi exposta a 37 °C, o que é compatível com o que foi observado nos experimentos de *Western blot* de análise da fosforilação de MpkA (figura 52).

Os genes responsáveis pela resposta ao choque térmico escolhidos para a análise da expressão gênica foram induzidos na linhagem selvagem de *A. fumigatus* em pelo menos um ponto do choque térmico a 37 °C ou a 48 °C. E assim como os genes que compõem a CWIP, os genes responsáveis pela resposta ao choque térmico tiveram uma grande redução dos níveis de transcritos nas linhagens mutantes da CWIP (figura 54-55).

Tomados em conjunto, esses resultados indicam a participação de *pkcA*, *mpkA* e *rlmA* na modulação transcricional de diversos genes envolvidos na resistência ao choque térmico em *A. fumigatus*, sugerindo que a CWIP além de possuir um importante papel na manutenção da parede celular em *A. fumigatus*, também possui um importante papel na termotolerância neste patógeno.

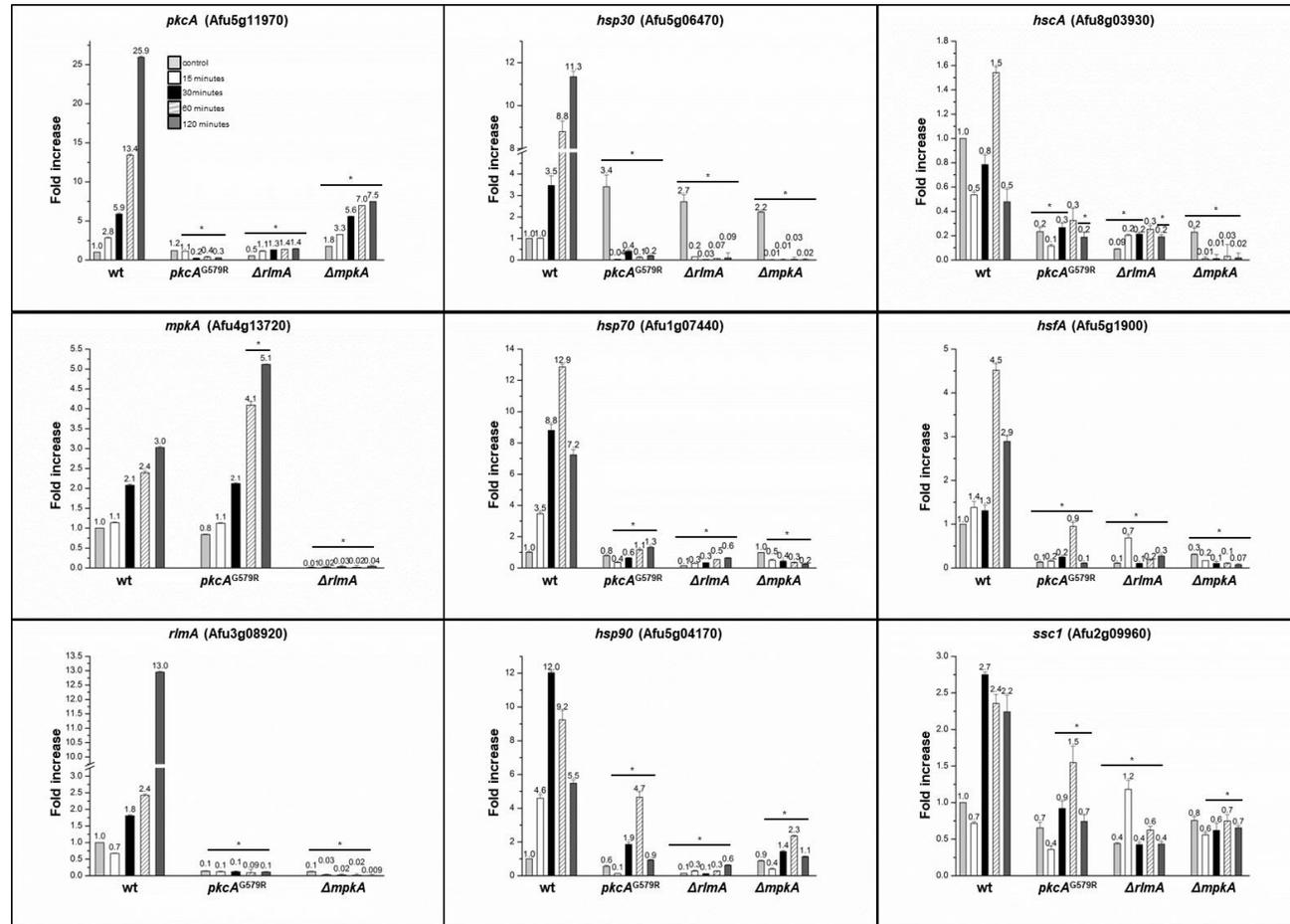


Figura 54: Análise transcricional dos genes envolvidos no choque térmico de *A. fumigatus* a 37 °C. As linhagens foram cultivadas durante 24 horas em meio mínimo a 30 °C. As culturas foram incubadas por 0, 15, 30, 60 e 120 minutos a 37 °C. O RNA total foi extraído, tratado com DNase turbo (Ambion®) e as transcrições reversas foram realizadas para a obtenção do cDNA que foi usado como molde nas reações de RT-qPCR. O gene da tubulina (*tubA*) foi usado como normalizador dessas reações e a quantificação relativa foi obtida comparando-se a expressão das linhagens mutantes em relação à linhagem selvagem sem exposição ao choque térmico. (*p < 0,05; n=3).

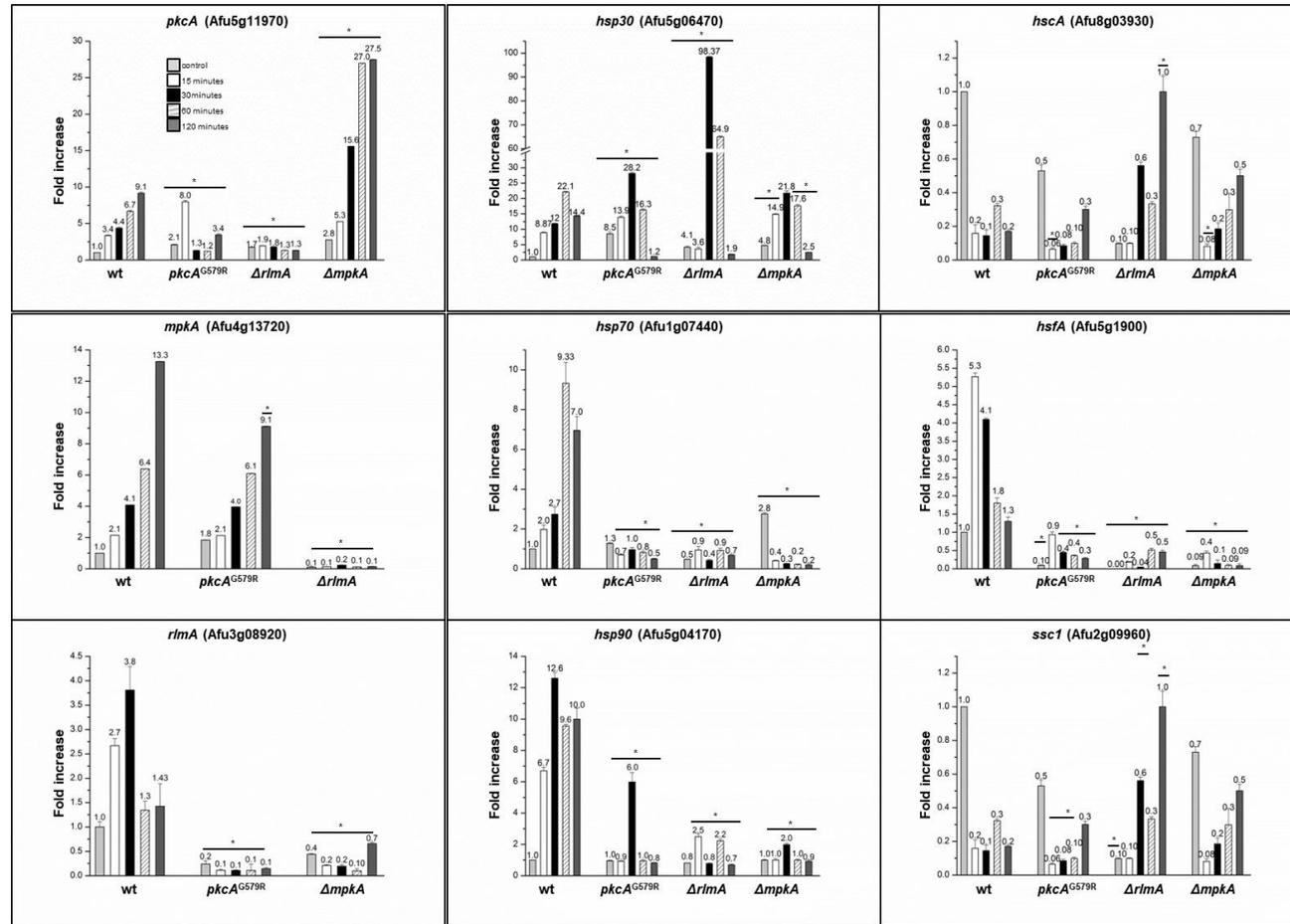


Figura 55: Análise transcricional dos genes envolvidos no choque térmico de *A. fumigatus* a 48 °C. As linhagens foram cultivadas durante 24 horas em meio mínimo a 30 °C. As culturas foram incubadas por 0, 15, 30, 60 e 120 minutos, a 48 °C. O RNA total foi extraído, tratado com DNase turbo (Ambion®) e as transcrições reversas foram realizadas para a obtenção do cDNA que foi usado como molde nas reações de RT-qPCR. O gene da tubulina (*tubA*) foi usado como normalizador dessas reações e a quantificação relativa foi obtida comparando-se a expressão das linhagens mutantes em relação à linhagem selvagem sem exposição ao choque térmico. (* $p < 0,05$; $n=3$).

4.3.2 Análises da interação da CWIP de *A. fumigatus* com a chaperona molecular Hsp90

De fato, o estresse da parede celular é uma das ocorrências mais prejudiciais na célula fúngica e é uma consequência da interrupção ou comprometimento da estrutura da parede celular. Em fungos incluindo *A. fumigatus*, a função da HSP Hsp90 foi diretamente ligada à manutenção da parede celular, cooperando em mecanismos de compensação de estresse, ditados por diferentes cascatas de sinalização ativadas quando a célula é desafiada com diferentes tipos de estresse na parede celular, como os causados pela terapia antifúngica [115, 230, 231]. Essas cascatas de sinalização além da CWIP incluem a via Ca^{+2} /calcineurina e HOG [116]. Por exemplo, a proteína Hsp90 migra do citosol e se acumula na parede celular ou nas pontas de hifas recentemente formadas sob o estresse da parede celular causado por caspofungina [115]. Nesses locais, Hsp90 modula a atividade da via de sinalização da MAP quinase que favorece a manutenção da integridade da parede celular e/ou a adaptação em longo prazo ao choque térmico [115, 117, 230, 231].

Os inibidores farmacológicos clássicos da Hsp90, geldanamicina e radicicol, ligam-se no sítio de ligação do ATP no domínio amino-terminal da proteína Hsp90 inibindo sua função [232]. Em *S. cerevisiae* e *C. albicans* a inibição de Hsp90 culmina na ativação defeituosa da CWIP [102, 112]. Com o intuito averiguar se Hsp90 estaria também relacionada à ativação defeituosa da CWIP em *A. fumigatus*, avaliou-se a susceptibilidade da linhagem selvagem e das linhagens simples e duplos mutantes da CWIP frente aos inibidores de Hsp90 radicicol e geldanamicina. Foi possível observar que todas as linhagens mutantes da CWIP testadas apresentaram maior sensibilidade a estes inibidores, sendo que as linhagens mutantes *pkcA*^{G579R} e $\Delta mpkA$ apresentaram novamente maior sensibilidade em relação a linhagem mutante $\Delta rlmA$, e curiosamente o duplo mutante *pkcA*^{G579R} $\Delta mpkA$ apresentou maior sensibilidade que os simples mutantes parentais e também que os outros duplos mutantes testados. Este resultado é um indício de que MpkA e PkcA podem estar interagindo sinergisticamente com Hsp90 em resposta ao choque térmico em *A. fumigatus* (figura 56A-B).

Para facilitar a observação da CIM utilizou-se o indicador *Alamar blue*TM Cell Viability Reagent (Thermo Fisher Scientific), um indicador fluorescente/colorimétrico com a propriedade redox. A forma oxidada é azul (não fluorescente/célula não viável) e a forma reduzida é rósea (fluorescente/célula viável).

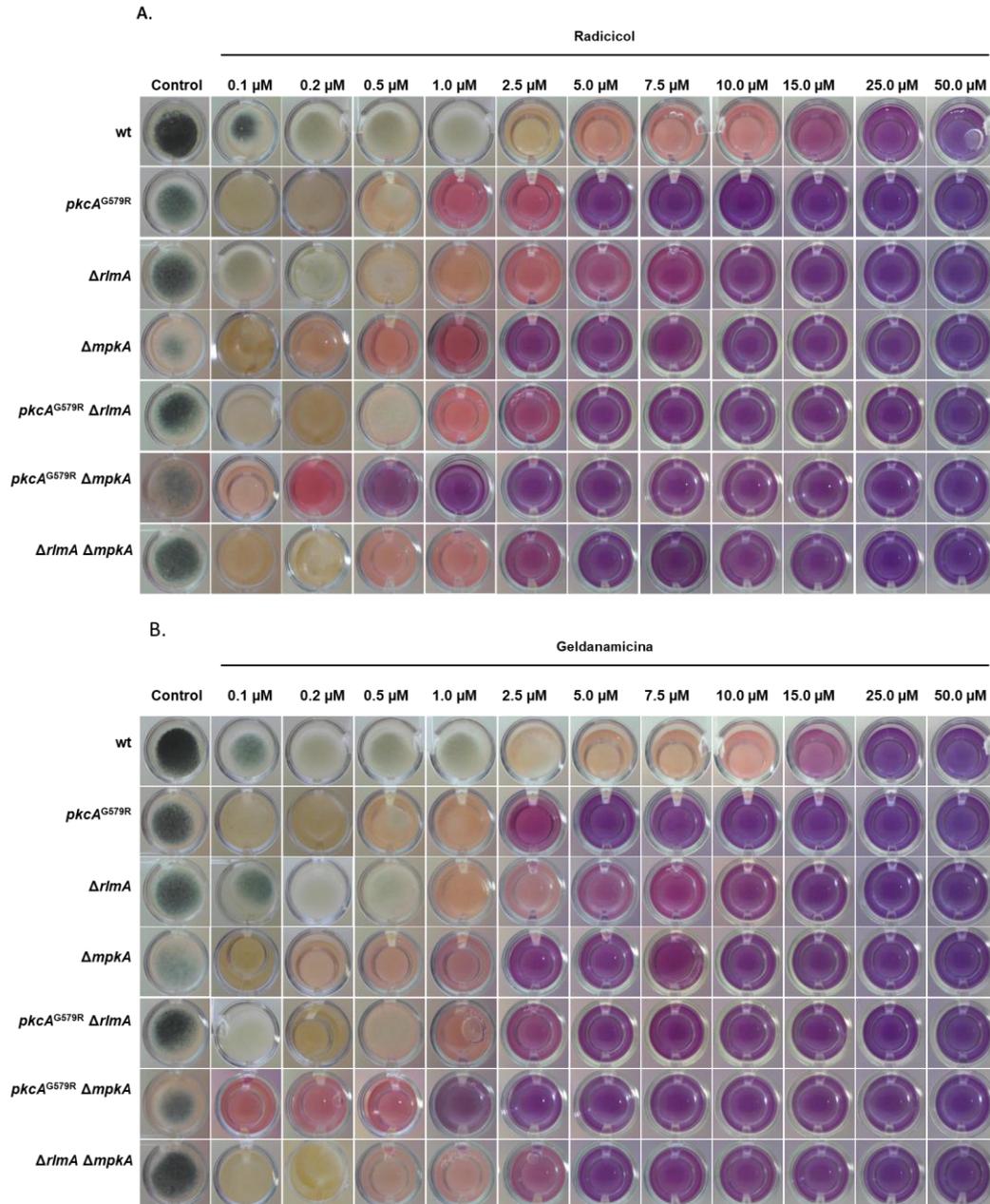


Figura 56: Mutantes da CWIP de *A. fumigatus* são mais sensíveis à drogas inibidoras de Hsp90. (A-B) 1×10^3 conídios da linhagem selvagem e linhagens mutantes da CWIP foram cultivados em MM líquido suplementado com diferentes concentrações de radicalol e geldanamicina durante 48 horas a 37 °C. A inibição do crescimento foi inspecionada visualmente por meio do indicador *Alamar blue*TM adicionado na concentração de 10 % a cada poço.

O choque térmico tem como principal consequência nos diversos organismos a exigência à manutenção do *fold*ing das proteínas, a qual é mediada pela proteção promovida por chaperonas e co-chaperonas moleculares que exercem sua função em proteínas clientes. Essa associação da Hsp90 permite a função correta das proteínas clientes levando à ativação de

vias envolvidas na integridade da parede celular, organização do citoesqueleto, transporte molecular e vesicular, geração de energia, defesa contra o estresse oxidativo e transdução de sinal [41]. Ainda não são conhecidos quais os mecanismos de interação entre Hsp90 e suas proteínas clientes uma vez que não há um domínio de interação típico tanto na Hsp90 quanto para a sua clientela. Com isso a ligação entre esta chaperona molecular e sua proteína cliente é específica caso a caso.

Os testes de sensibilidade aos inibidores de Hsp90 sugerem uma possível interação entre as proteínas de CWIP de *A. fumigatus* com a chaperona molecular Hsp90. Verificar a interação entre Hsp90 com PkcA, RlmA e MpkA de *A. fumigatus* seria um passo importante para entender o mecanismo de resistência ao choque térmico neste organismo, bem como a possível correlação da CWIP com a termotolerância de *A. fumigatus*. Com isso buscou-se avançar no conhecimento de como se processa a CWIP e possíveis alvos para atenuação da virulência neste patógeno.

Como primeira abordagem para avaliar o que estaria ocorrendo com a proteína Hsp90 em *A. fumigatus* durante o estresse de temperatura, e se os níveis proteicos de Hsp90 estariam alterados nos mutantes da CWIP, a linhagem selvagem e as linhagens mutantes de *A. fumigatus* *pkcA*^{G579R}, Δ *rlmA* e Δ *mpkA* foram cultivadas durante 24 horas em meio mínimo a 30 °C. Posteriormente os micélios foram transferidos para um novo meio de cultura termostaticado a 37 °C ou a 48 °C e as culturas foram incubadas por 0, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120 e 240 minutos, a 37 °C ou 48 °C sob agitação, no mesmo desenho experimental utilizado anteriormente (figuras 52-53). Para a detecção da Hsp90 utilizou-se o anticorpo anti Hsp90 de *A. fumigatus* (este trabalho) e, como controle de carregamento, utilizou-se o anticorpo anti γ tubulin (γ N-20; Santa Cruz Biotechnology). Os resultados de *Western blot* foram quantificados utilizando o software ImageJ[®].

Nos experimentos realizados a 37 °C foi possível observar que a proteína Hsp90 não altera significativamente a sua expressão na linhagem selvagem de *A. fumigatus*, assim como no mutante Δ *rlmA* (figura 57). Porém nas linhagens mutantes da CWIP *pkcA*^{G579R} e Δ *mpkA* (figura 57), há um

aumento da expressão de Hsp90, sendo que em ambas as linhagens esta resposta retorna ao nível basal após 240 minutos de exposição a 37 °C.

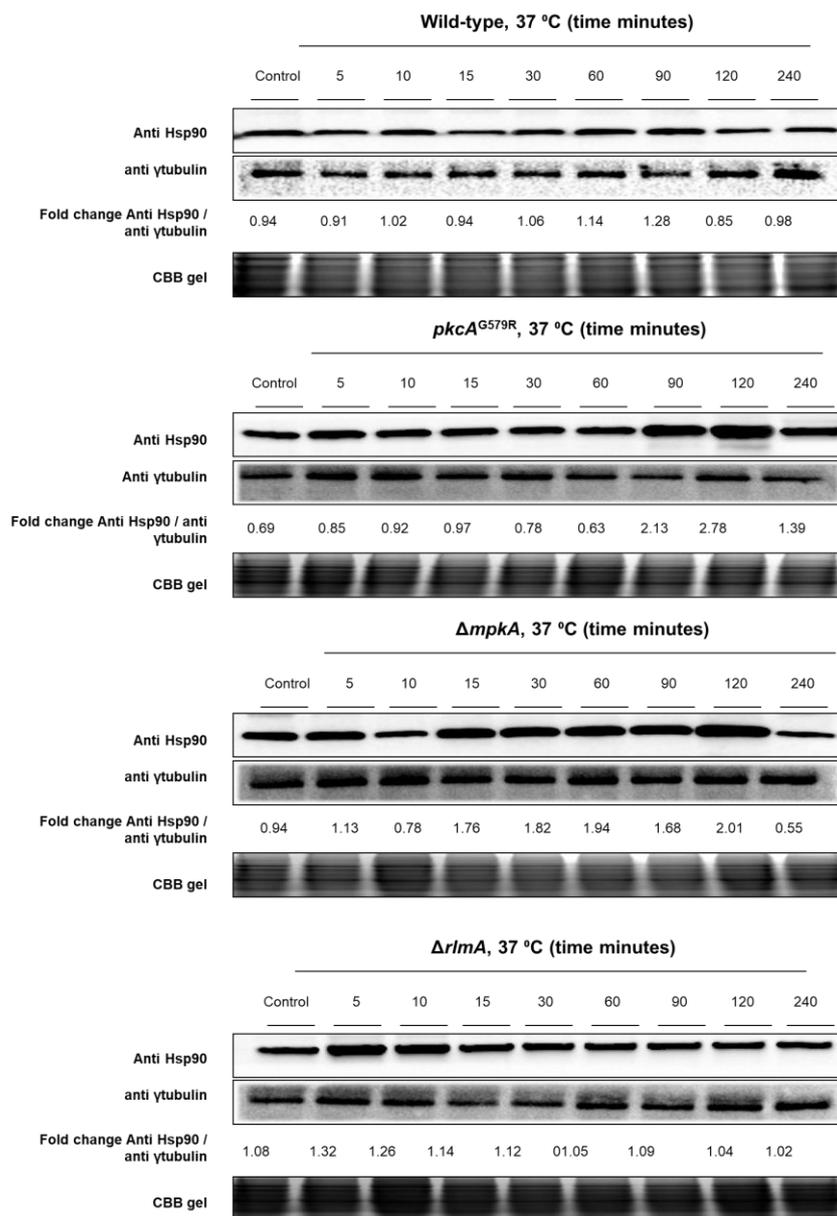


Figura 57: Análise da expressão da proteína Hsp90 durante o estresse térmico a 37 °C na linhagem selvagem e nas linhagens mutantes da CWIP de *A. fumigatus*. As linhagens foram cultivadas durante 24 horas em meio mínimo a 30 °C. Posteriormente o micélio foi transferido para um novo meio de cultura termostatzado a 37 °C e as culturas foram incubadas pelos tempos mostrados a 37 °C sob agitação. Para a detecção da Hsp90 utilizou-se um anticorpo policlonal anti Hsp90 de *A. fumigatus* (este trabalho) e como controle de carregamento utilizou-se o anticorpo anti γ tubulin (γ N-20; Santa Cruz Biotechnology). O resultado do *Western blot* foi quantificado utilizando o software ImageJ®. Os valores mostrados abaixo na figura indicam os valores relativos do sinal.

Nos experimentos realizados a 48 °C foi possível observar que a proteína Hsp90 possui um pequeno aumento da sua expressão na linhagem

selvagem de *A. fumigatus*, assim como no mutante $\Delta rlmA$ (figura 58). Porém nas linhagens mutantes da CWIP $pkcA^{G579R}$ e $\Delta mpkA$ (figura 58), há um grande aumento da expressão de Hsp90 que chega a cerca de 2,8 vezes para $\Delta mpkA$ sustentando-se alta após 240 minutos de exposição e 1,8 vezes no mutante $pkcA^{G579R}$, que caem para próximo dos valores basais após 240 minutos de exposição a 48 °C. A não alteração da abundância de Hsp90 em relação à linhagem selvagem observada no mutante $\Delta rlmA$ leva à conclusão de que possivelmente há outro fator de transcrição atuando simultaneamente a RlmA responsável pela resposta ao choque térmico na CWIP em *A. fumigatus*.

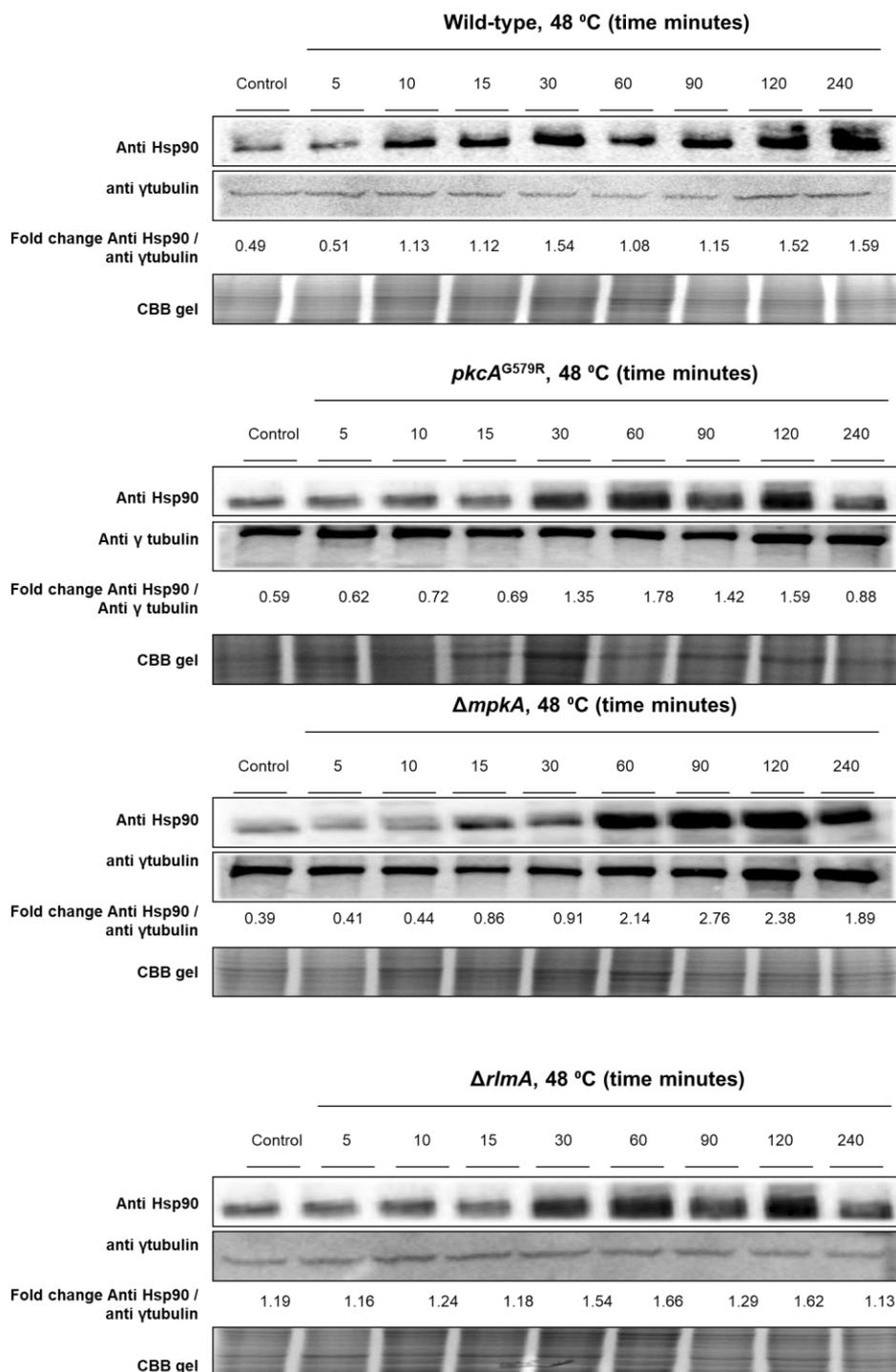


Figura 58: Análise da expressão da proteína Hsp90 durante o estresse térmico a 48 °C na linhagem selvagem e nas linhagens mutantes da CWIP de *A. fumigatus*. As linhagens foram cultivadas durante 24 horas em meio mínimo a 30 °C. Posteriormente o micélio foi transferido para um novo meio de cultura termostatzado a 48 °C e as culturas foram incubadas pelos tempos mostrados a 48 °C sob agitação. Para a detecção da Hsp90 utilizou-se um anticorpo policlonal anti Hsp90 de *A. fumigatus* (este trabalho) e como controle de carregamento utilizou-se o anticorpo anti γ tubulin (γ N-20; Santa Cruz Biotechnology). O resultado de *Western blot* foi quantificado utilizando o software ImageJ[®]. Os valores mostrados abaixo na figura indicam os valores relativos do sinal.

Em *A. fumigatus*, a perda de função de um mutante condicional de Hsp90 (*niiA::hsp90*) afetou a síntese de β glucana na parede celular, a conidiação, a germinação e o crescimento da hifa [110], porém este mecanismo ainda não é esclarecido. Em *S. cerevisiae*, foi demonstrado que Slf2 (Mpk1) é uma proteína cliente de HSP90, e o domínio C terminal de Hsf1 (o fator de transcrição principal que regula a expressão de genes relacionados à termotolerância) influencia a ativação da via Pkc1-MAPK, sendo que a alteração na ativação desta via interfere na função do fator de transcrição Rlm1, o ortólogo de RlmA [102].

Diante dos dados obtidos, que sugerem que há uma interação entre PkcA, MpkA, RlmA e Hsp90 (figura 56), juntamente aos resultados de *Western blot* que demonstraram uma modulação diferencial da Hsp90 nos mutantes da CWIP (figura 57-58), torna-se importante esclarecer se há uma interação destas proteínas em *A. fumigatus*, para entender o mecanismo de resistência ao choque térmico neste organismo, bem como a possível correlação de genes relacionados à termotolerância e a CWIP que culmina na função do fator de transcrição RlmA.

Para verificar a interação *in vivo* entre Hsp90 e PkcA de *A. fumigatus* foi construída uma linhagem na qual o gene *pkcA* foi fusionado de maneira C-terminal ao epítipo 3xHA. Assim, esta linhagem mantém o promotor endógeno, sendo substituído apenas o alelo *pkcA* da linhagem selvagem de *A. fumigatus* (figura 59). Com ela, pode-se fazer a imunoprecipitação de PkcA utilizando um anticorpo anti HA (Sigma Aldrich, H3663). Para a construção do cassete de substituição gênica utilizou-se a técnica de recombinação *in vivo* em *S. cerevisiae* dos fragmentos independentes no plasmídeo pRS426. O fragmento linker 3xHA *pyrG* foi amplificado a partir do plasmídeo pOB430, este plasmídeo contém o gene *pyrG* que confere prototrofia para uridina e uracila. Posteriormente, este cassete foi amplificado por PCR utilizando os oligonucleotídeos da extremidade 5' e 3', este produto de PCR foi purificado e posteriormente transformado na linhagem \DeltaakuB^{KU80} [136] de *A. fumigatus* (figura 59A). As linhagens candidatas a transformantes de *A. fumigatus* tiveram seu DNA genômico extraído e foram testadas através da técnica de PCR para a triagem dos transformantes (figura 59B).

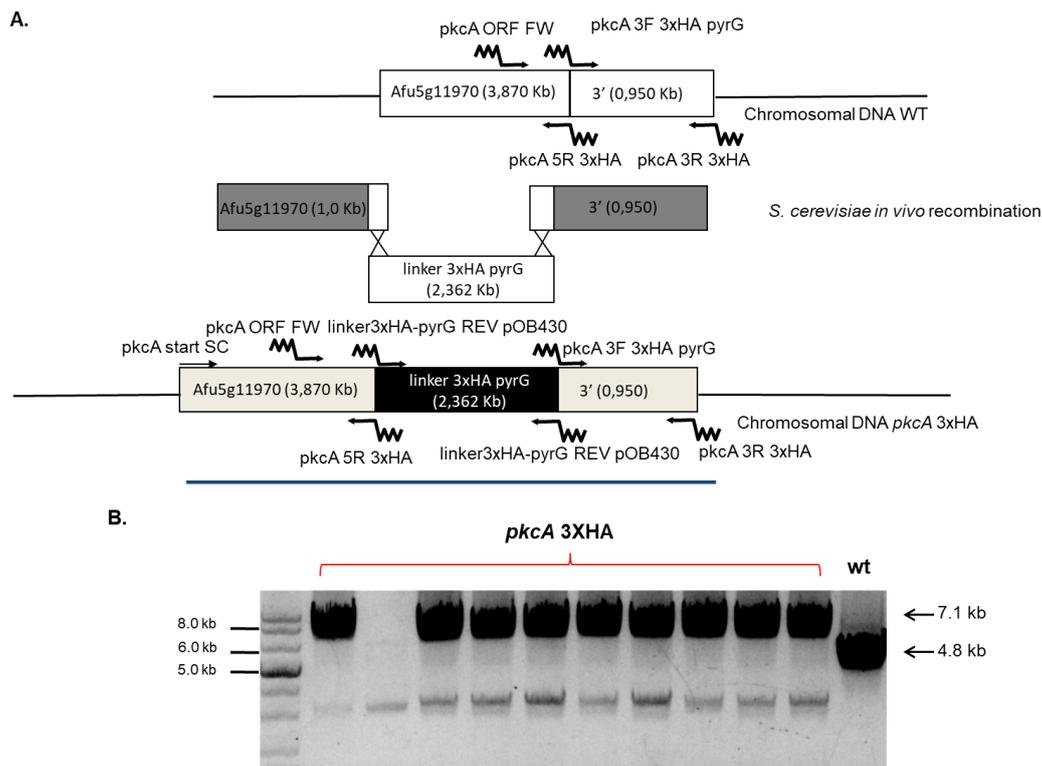


Figura 59: Geração do mutante *pkcA* 3xHA. (A) A estratégia de substituição genética para o gene *pkcA*. O gene *pyrG* fusionado ao epítipo HA (3x) foi utilizado como marcador de seleção. Os nomes dos oligonucleotídeos e os locais de ligação são indicados por setas (ver tabela 3 para as sequências de oligonucleotídeos). O cassete de deleção foi construído por recombinação *in vivo* em *S. cerevisiae*. (B) A construção da linhagem *pkcA* 3xHA foi confirmada em transformantes monoconidiais por PCR utilizando os oligonucleotídeos *pkcA*startSC/*pkcA*3R 3xHA, e o tamanho do *amplicon* esperado está demonstrado em azul na figura A.

Em *C. albicans*, a inibição de Pkc1 teve um impacto semelhante à inibição de Hsp90 na resistência a azóis neste organismo. Hsp90 regula a sinalização de PKC, fornecendo um novo mecanismo através do qual Hsp90 regula as respostas ao estresse da membrana induzido pelos azóis [114]. Além disso, por meio do ensaio de duplo híbrido de levedura, foi possível observar que Pkc1 interage geneticamente com Hsp90 em *C. albicans* durante o estresse de temperatura a 41 °C [116], porém essa interação física ainda não foi validada. E apesar de já ter sido demonstrado que Hsp90 é requerida para a integridade da parede celular em *A. fumigatus*, ainda não foi estabelecida se esta chaperona interage fisicamente com as proteínas da CWIP neste organismo [110]. Diante disso, torna-se indispensável estabelecer as relações da Hsp90 de *A. fumigatus* com a CWIP. A co-imunoprecipitação (Co-IP) é um procedimento largamente utilizado para analisar a interação física entre

proteínas. A primeira abordagem por Co-IP para verificar se PkcA estaria interagindo com Hsp90 foi realizada durante o estresse de temperatura. Para isto, a linhagem selvagem parental que não continha o epítipo 3xHA (controle negativo) e a linhagem *pkcA* 3xHA foram expostas ao choque térmico a 37 °C e a 48 °C por 15 minutos (condição na qual a proteína Hsp90 é induzida na linhagem selvagem (figura 57 e 58 respectivamente)). Para a IP, o anticorpo anti HA foi acoplado a *Dynabeads Protein A*[®]. Após a imunoprecipitação, as proteínas foram submetidas à análise de *Western blot* onde foi possível observar que PkcA de *A. fumigatus* interage com Hsp90 já na ausência de estresse de temperatura, e esta interação se mantém durante o estresse de temperatura a 37 °C, e se torna ainda maior no estresse de temperatura a 48 °C (figura 60). Esses resultados indicam de forma inédita que a associação de PkcA com Hsp90 é constitutiva em *A. fumigatus*.

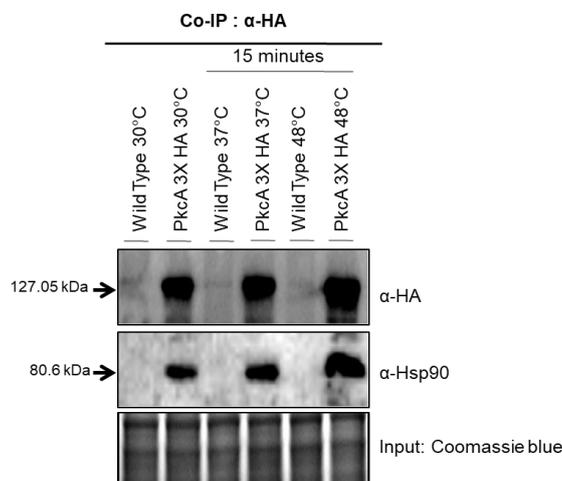


Figura 60: A proteína apical da CWIP PkcA interage com Hsp90 durante o choque térmico em *A. fumigatus*. A linhagem selvagem de *A. fumigatus* e a linhagem *pkcA* 3xHA foram cultivadas durante 24 horas em meio mínimo a 30 °C. Posteriormente o micélio foi transferido para um novo meio de cultura termostaticado a 37 °C e a 48 °C, e as culturas foram incubadas por 15 minutos, sob agitação. Para a imunoprecipitação das linhagens utilizou-se a resina *Dynabeads protein A*[®] (Thermo Fisher Scientific, 10001D) ligada ao anticorpo anti HA (Sigma Aldrich, H3663). Após a imunoprecipitação, as proteínas foram eluídas utilizando-se o tampão de *Laemmli*. Para o *Western blot* utilizaram-se 20 μ L da proteína eluída. Para a detecção de PkcA e validação da imunoprecipitação utilizou-se um anticorpo anti HA (Sigma Aldrich, H3663). Para a detecção de Hsp90 utilizou-se um anticorpo policlonal anti Hsp90 (este trabalho) que reconhece a proteína Hsp90 de *A. fumigatus*, e como controle de carregamento utilizou-se o gel SDS-PAGE corado com *coomassie blue* de extratos das proteínas totais antes da imunoprecipitação.

Conforme já descrito anteriormente, Hsp90 é requerida para a manutenção da integridade da parede celular em *A. fumigatus* [110], portanto,

torna-se indispensável verificar se a interação observada neste trabalho durante o estresse de temperatura entre PkcA e Hsp90 também ocorre durante o estresse de parede celular. Para isto a linhagem selvagem parental que não continha o epítipo HA (controle negativo), e a linhagem *pkcA* 3×HA foram expostas ao estresse de parede celular causado por CR durante 30 minutos com diferentes concentrações deste agente indutor: 10 µg/mL; 100 µg/mL e 300 µg/mL. Estas condições foram selecionadas, pois, através de análises de *Western blot*, foi possível verificar uma indução da proteína Hsp90 na linhagem selvagem de *A. fumigatus* nestas condições (Fabri J.H.T.M, e colaboradores – dados não publicados). A imunoprecipitação foi realizada conforme já descrito acima, e foi possível observar que PkcA de *A. fumigatus*, além de interagir com Hsp90 durante o estresse de temperatura, interage com a Hsp90 também durante o estresse de parede celular provocado por CR (figura 61).

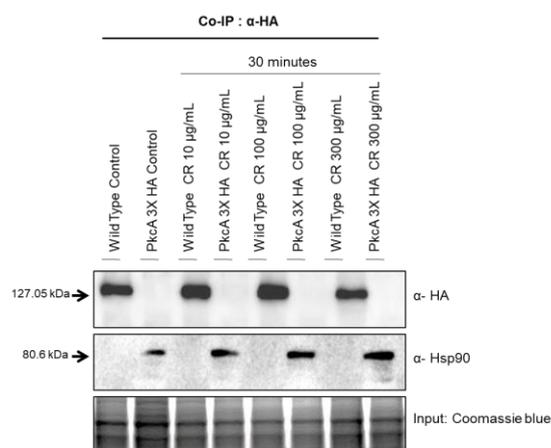


Figura 61: A proteína apical da CWIP PkcA interage com Hsp90 durante o estresse de parede celular provocado por CR em *A. fumigatus*. A linhagem selvagem de *A. fumigatus* e a linhagem *pkcA* 3×HA foram cultivadas durante 16 horas em meio completo YG a 37 °C. Na sequência, 10, 100 ou 300 µg/mL de CR foram adicionados às culturas. Estas foram incubadas por 30 minutos, na presença do agente indutor sob agitação. Para a imunoprecipitação das linhagens utilizou-se a resina *Dynabeads protein A*[®] (Thermo Fisher Scientific, 10001D) ligada ao anticorpo anti HA (Sigma Aldrich, H3663). Após a imunoprecipitação, as proteínas foram eluídas utilizando-se o tampão de *Laemmli*. Para o *Western blot* utilizaram-se 20 µL das proteínas eluídas. Para a detecção de PkcA e validação da imunoprecipitação utilizou-se um anticorpo anti HA (Sigma Aldrich, H3663). Para a detecção da Hsp90 utilizou-se um anticorpo policlonal anti Hsp90 (este trabalho) que reconhece a proteína Hsp90 de *A. fumigatus*, e como controle de carregamento utilizou-se o gel SDS-PAGE corado com *coomassie blue* de extratos das proteínas totais antes da imunoprecipitação.

A proteína de *C. albicans* Mkc1 (o homólogo de Mpk1 de *S. cerevisiae* e MpkA de *A. fumigatus*), interage geneticamente com Hsp90 em *C. albicans* durante o estresse de temperatura a 41 °C [116], e por meio de análises

bioquímicas observou-se que Hsp90 estabiliza Mkc1 independente do seu estado de ativação [114]. Entretanto, ainda não foi estabelecida nenhuma interação da chaperona Hsp90 com a proteína MpkA em *A. fumigatus*, e o duplo mutante *pkcA*^{G579R} Δ *mpkA* apresentou maior sensibilidade que os respectivos simples mutantes parentais da CWIP testados frente a inibidores de Hsp90 (figura 56), fato que representa um indício de que MpkA e PkcA podem estar interagindo simultaneamente com Hsp90 em *A. fumigatus*. Para verificar se estaria ocorrendo esta interação, a linhagem selvagem parental que não continha o epítipo 3xHA (controle negativo), e a linhagem *mpkA* 3xHA foram expostas ao estresse de parede celular causado por CR nas mesmas condições que a linhagem *pkcA* 3xHA do experimento anterior. Os resultados mostraram que assim como observado para PkcA, MpkA interagiu com Hsp90 durante o estresse de parede celular causado por CR, e também de forma constitutiva (figura 62).

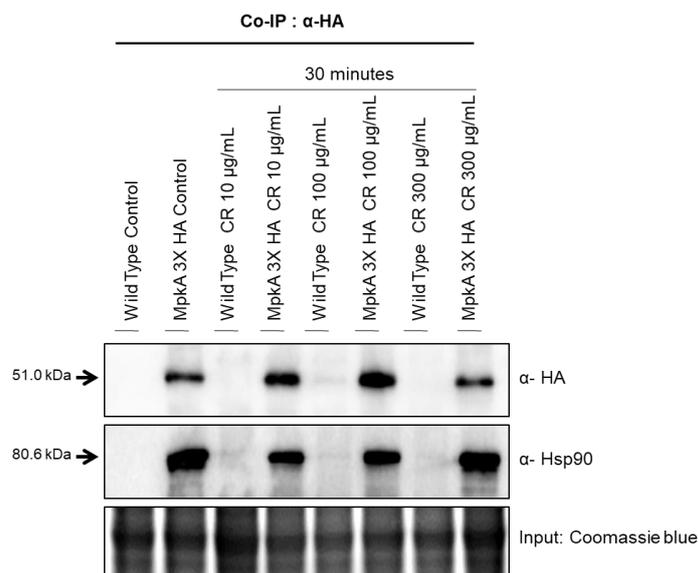


Figura 62: A MAP quinase MpkA da CWIP interage com Hsp90 durante o estresse de parede celular provocado por CR em *A. fumigatus*. A linhagem selvagem de *A. fumigatus* e a linhagem *mpkA* 3XHA foram cultivadas durante 16 horas em meio completo YG a 37 °C. Na sequência, 10, 100 ou 300 μ g/mL de CR foram adicionados às culturas. Estas foram incubadas por 30 minutos, na presença do agente indutor sob agitação. Para a imunoprecipitação das linhagens utilizou-se a resina *Dynabeads protein A*[®] (Thermo Fisher Scientific, 10001D) fusionada ao anticorpo anti HA (Sigma Aldrich, H3663). Após a imunoprecipitação, as proteínas foram eluídas utilizando-se o tampão de *Laemmli*. Para o *Western blot* utilizaram-se 20 μ L das proteínas eluídas. Para a detecção de PkcA e validação da imunoprecipitação utilizou-se um anticorpo anti HA (Sigma Aldrich, H3663). Para a detecção da Hsp90 utilizou-se um anticorpo anti Hsp90 (este trabalho) que reconhece a proteína Hsp90 de *A. fumigatus*, e como controle de carregamento utilizou-se o gel SDS-PAGE corado com *coomassie blue* de extratos das proteínas totais antes da imunoprecipitação.

Os nossos resultados indicam que os elementos *upstream* da CWIP PkcA e MpkA são clientes de Hsp90, porém não é conhecido este fato para o fator de transcrição da via Rlm1, mesmo em *S. cerevisiae* ou em *C. albicans*. Porém os dados mostraram que o mutante $\Delta rlmA$ possui uma redução na termotolerância (figura 51), um aumento da sensibilidade a inibidores da Hsp90 testados (figura 56), e, além disso, apresenta uma redução do nível proteico de Hsp90 durante o estresse de temperatura a 48 °C (figura 58). Estabelecer se há uma interação deste fator de transcrição com a chaperona molecular Hsp90 é um passo importante para elucidação do papel da CWIP na resposta ao choque térmico em *A. fumigatus*, além do que permite estabelecer o papel da chaperona molecular Hsp90 na resposta ao estresse de parede celular em *A. fumigatus*.

Para verificar a interação *in vivo* entre Hsp90 e RlmA de *A. fumigatus* foi construída uma linhagem na qual o gene *rlmA* foi fusionado ao epítipo 3xFLAG. Nesta linhagem manteve-se o promotor endógeno substituindo o alelo *rlmA* da linhagem selvagem de *A. fumigatus* (figura 63), e utilizando esta linhagem foi possível imunoprecipitar RlmA utilizando um anticorpo anti FLAG (Sigma Aldrich, F1804). Para a construção do cassete de substituição gênica utilizou-se a técnica de recombinação *in vivo* em *S. cerevisiae* dos fragmentos independentes no plasmídeo pRS426. Posteriormente este cassete foi amplificado por PCR utilizando os oligonucleotídeos da extremidade 5' e 3', este produto de PCR foi purificado e posteriormente transformado na linhagem $\Delta akuB^{KU80}$ [136] de *A. fumigatus* (figura 63A). As linhagens candidatas a transformantes de *A. fumigatus* tiveram seu DNA genômico extraído e foram testadas através da técnica de PCR para a triagem dos transformantes (figura 63B).

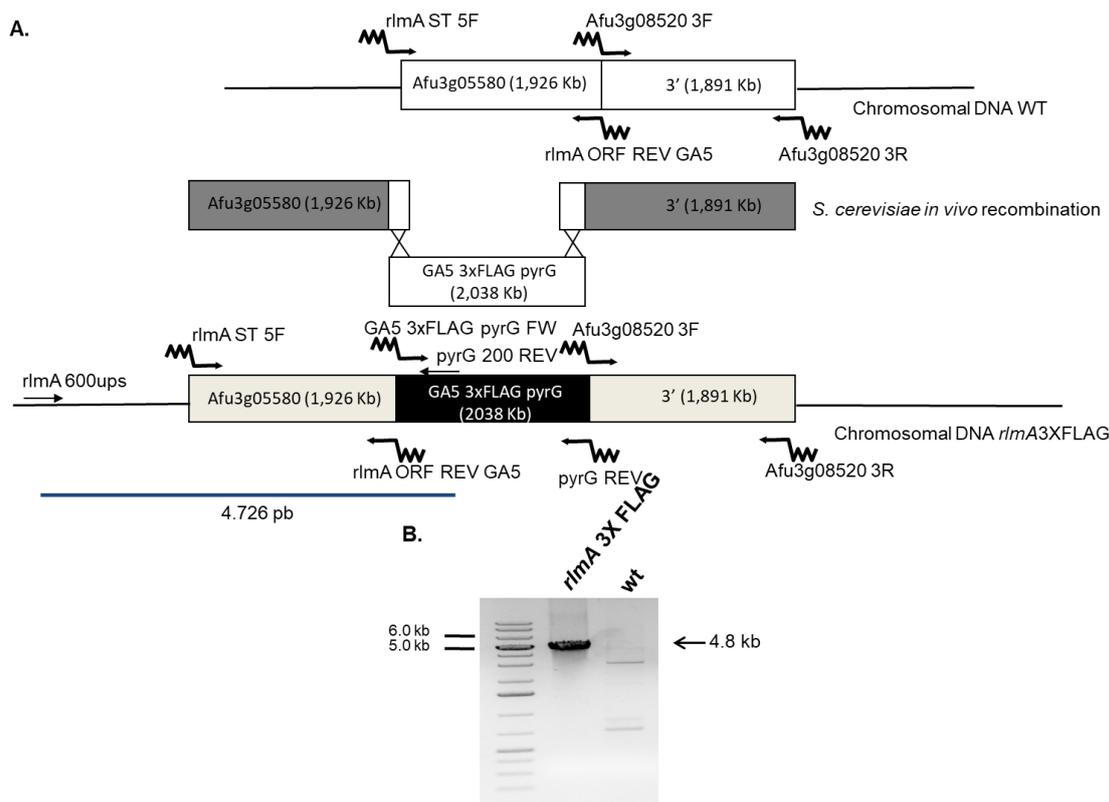


Figura 63: Geração do mutante *rlmA* 3xFLAG. (A) A estratégia de substituição genética para o gene *rlmA*. O gene *pyrG* fusionado ao epítipo 3xFLAG foi utilizado como marcador de seleção. Os nomes dos oligonucleotídeos e os locais de ligação são indicados por setas (ver tabela 3 para as sequências de oligonucleotídeos). O cassete de deleção foi construído por recombinação *in vivo* em *S. cerevisiae*. (B) A construção da linhagem *rlmA* 3xFLAG foi confirmada em transformantes monoconidiais por PCR utilizando os oligonucleotídeos *rlmA*600ups/*pyrG*200REV, e o tamanho do amplicon esperado está demonstrado em azul na figura A e indicado pela seta.

A primeira abordagem por Co-IP para verificar se RlmA estaria interagindo com Hsp90 foi realizada durante o estresse de temperatura. Para isto, a linhagem selvagem parental que não continha o epítipo FLAG (controle negativo) e a linhagem *rlmA* 3xFLAG foram expostas ao choque térmico a 37 °C e a 48 °C por 15 minutos (condição na qual a proteína Hsp90 é induzida na linhagem selvagem - figura 57 e 58, respectivamente). A imunoprecipitação foi realizada utilizando a resina *Anti-Flag M2 Affinity Gel* (Sigma Aldrich, A2220), e por meio da análise de *Western blot* utilizando o anticorpo anti Hsp90 (este trabalho) observou-se que RlmA de *A. fumigatus* interage com Hsp90 constitutivamente na ausência de estresse de temperatura. Porém há um maior sinal de interação entre RlmA e Hsp90 durante o estresse de temperatura a 37 °C e a 48 °C (figura 64). Anteriormente (modulo 1, figura 18) demonstramos que a MAP quinase MpkA e o fator de transcrição RlmA interagem geneticamente

evidenciando que RlmA é o fator de transcrição, ou pelo menos um dos fatores de transcrição associados à CWIP. A partir do ensaio de Co-IP descrito na figura 64, buscamos validar essa interação entre MpkA e RlmA e para isso utilizamos o anticorpo anti P-p44/42 MpkA que reconhece MpkA fosforilada em *A. fumigatus* [138]. Os resultados indicam que a interação entre essas duas proteínas ocorre quando a célula foi exposta ao aumento de temperatura a 37 °C e 48 °C, mas não nas condições controle do experimento (30 °C) já que nenhum sinal foi detectado (figura 64 painel inferior).

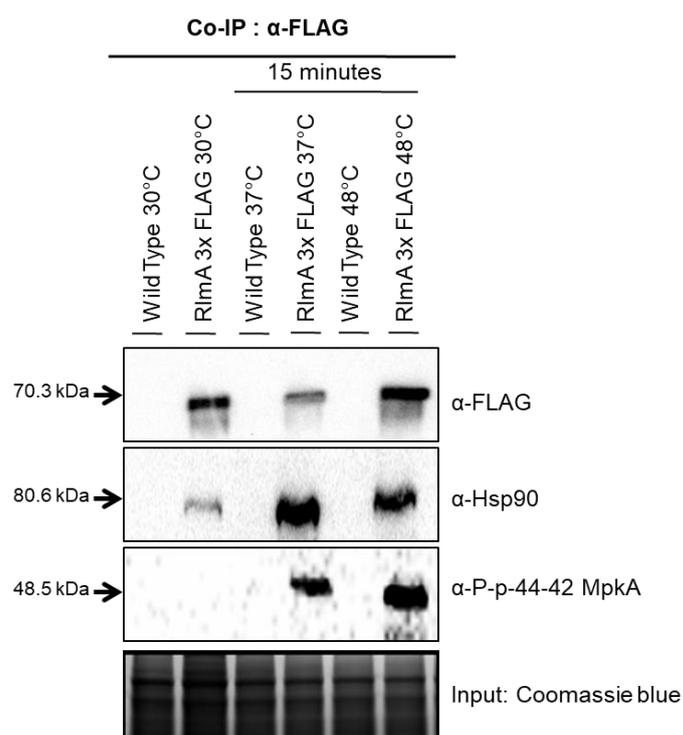


Figura 64: O fator de transcrição da CWIP RlmA interage com a Hsp90 e com a MAP quinase MpkA fosforilada durante o choque térmico em *A. fumigatus*. A linhagem selvagem de *A. fumigatus* e a linhagem *rlmA* 3xFLAG foram cultivadas durante 24 horas em meio mínimo a 30 °C. Posteriormente o micélio foi transferido para um novo meio de cultura termostaticado a 37 °C e a 48 °C e as culturas foram incubadas por 15 minutos, sob agitação. Para a imunoprecipitação das linhagens utilizou-se a resina *Anti-Flag M2 Affinity Gel*. Após a imunoprecipitação as proteínas foram eluídas utilizando-se o tampão de *Laemmli*. Para o *Western blot* utilizaram-se 20 μ L das proteínas eluídas. Para a detecção de RlmA e validação da imunoprecipitação utilizou-se um anticorpo anti FLAG (Sigma Aldrich, F1804). Para a detecção da Hsp90 utilizou-se um anticorpo anti Hsp90 (este trabalho) que reconhece a proteína Hsp90 de *A. fumigatus*. Para a detecção da fração fosforilada de MpkA utilizou-se um anticorpo anti P-p44/42-MAPK (Cell Signaling Technologies), e como controle de carregamento utilizou-se o gel SDS-PAGE corado com *coomassie blue* de extratos das proteínas totais antes da imunoprecipitação.

Com o intuito de verificar se a interação observada neste trabalho durante o estresse de temperatura entre RlmA e Hsp90 também ocorre durante

o estresse de parede celular, a linhagem selvagem parental que não continha o epítipo 3×FLAG (controle negativo) e a linhagem *rlmA* 3×FLAG foram expostas ao estresse de parede celular causado por CR nas mesmas condições descritas anteriormente. A imunoprecipitação foi realizada conforme descrito acima, e observou-se que RImA de *A. fumigatus* também interage com Hsp90 e com a fração fosforilada de MpkA durante o estresse de parede celular induzido por CR (figura 65).

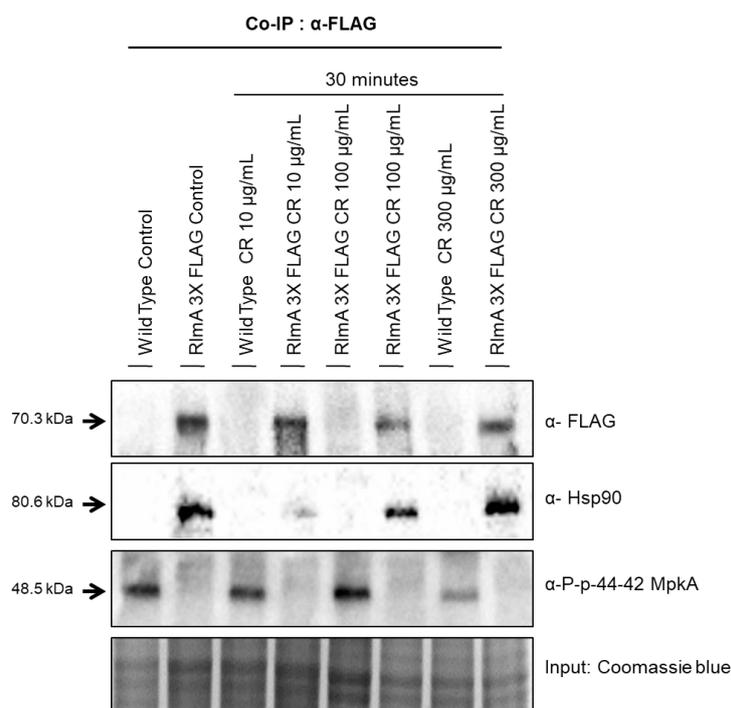


Figura 65: O fator de transcrição da CWIP RImA interage com a MAP quinase MpkA fosforilada e Hsp90 durante o estresse de parede celular provocado por CR em *A. fumigatus*. A linhagem selvagem de *A. fumigatus* e a linhagem *rlmA* 3×FLAG foram cultivadas durante 16 horas em meio completo YG a 37 °C, na sequência, 10, 100 ou 300 µg/mL de CR foram adicionados às culturas. Estas foram incubadas por 30 minutos na presença do agente indutor sob agitação. Para a imunoprecipitação das linhagens utilizou-se a resina *Anti-Flag M2 Affinity Gel*. Após a imunoprecipitação as proteínas foram eluídas utilizando-se o tampão de *Laemmli*. Para o *Western blot* utilizaram-se 20 µL das proteínas eluídas. Para a detecção de RImA e validação da imunoprecipitação utilizou-se um anticorpo anti FLAG (Sigma Aldrich, F1804). Para a detecção da Hsp90 utilizou-se um anticorpo anti Hsp90 (este trabalho) que reconhece a proteína Hsp90 de *A. fumigatus*. Para a detecção da fração fosforilada de MpkA utilizou-se um anticorpo anti P-p44/42 MAPK (Cell Signaling Technologies), e como controle de carregamento utilizou-se o gel SDS-PAGE corado com *coomassie blue* de extratos das proteínas totais antes da imunoprecipitação.

Os dados de Co-IP em conjunto demonstram que Hsp90 tem um importante papel na CWIP de *A. fumigatus* durante o estresse de temperatura e de parede celular. Esta chaperona molecular de fato interage com as principais

proteínas que compõem a CWIP. Um dos mecanismos para esclarecer a natureza desta interação se dá por meio do estudo direto das proteínas que compõem a CWIP e da chaperona molecular Hsp90. Sobretudo, os resultados de interação obtidos entre RImA e Hsp90 ainda necessitam de validação. Uma vez que MpkA também interage com Hsp90 (figura 62), a interação entre RImA e Hsp90 pode ser indireta e ter sido aqui detectada pela presença de um eventual complexo Hsp90-MpkA-RImA. Experimentos de duplo híbrido de levedura estão sendo realizados no laboratório para validar a interação direta entre Hsp90 e RImA (dados não apresentados).

4.3.3 Clonagem e expressão das proteínas recombinantes de *A. fumigatus* Hsp90, PkcA⁴⁰⁹⁻¹¹⁰⁶, PkcA^{G579R409-1106} e MpkA

As ORFS que codificam os genes *pkcA* (Afu5g11970), *mpkA* (Afu4g13720), *rlmA* (Afu3g08520) e *hsp90* (Afu5g04170) de *A. fumigatus* já estão descritas na literatura [29, 30, 110, 233] e todas as sequências de cDNA destes genes já encontram-se depositadas no *Aspergillus Genome Database* (<http://www.aspgd.org/>). Estas sequências foram utilizadas para amplificação e posterior clonagem do cDNA, para a expressão das proteínas recombinantes PkcA⁴⁰⁹⁻¹¹¹⁶, PkcA^{409-1116G5794R}, MpkA, RImA e Hsp90.

Para a clonagem do cDNA completo do gene que codifica a proteína Hsp90 de *A. fumigatus*, o respectivo cDNA foi amplificado por RT-PCR utilizando oligonucleotídeos que continham além da sequência para a amplificação do cDNA, sítios de restrição da enzima *Bam*HI para posterior clonagem (tabela 4). O cDNA obtido foi clonado utilizando o kit de recombinação Gibson assembly[®] Master Mix (New England Biolabs) no plasmídeo pET-15b digerido com *Bam*HI, e posteriormente transformado na linhagem da bactéria *E. coli* DH5 α para multiplicação e manutenção dos vetores plasmidiais. Colônias transformantes tiveram o DNA plasmidial extraído e foram posteriormente validadas por PCR (figura 66A). O plasmídeo que continha o clone positivo foi sequenciado, e foi possível verificar a ausência de mutações no cDNA clonado (dados não mostrados).

O cDNA truncado do gene *pkcA* não pode ser amplificado por RT-PCR, mesmo após inúmeras tentativas mal sucedidas de amplificação da região deste gene. A porção do gene escolhida para ser clonada e expressa compreende um região C-terminal do gene compreendida entre os resíduos 409 até 1106, que é o último resíduo do polipeptídeo. A sequência de cDNA correspondente aos nucleotídeos 1225 a 3321 para PkcA⁴⁰⁹⁻¹¹¹⁶ foi sintetizada sob demanda, sequenciada e clonada no vetor pUC19 (*Epoch Life Science*, SUA). Este plasmídeo denominado pUC19-*pkcA*(409-1116) foi utilizado como molde nas reações de obtenção do cDNA para a clonagem no vetor de expressão pET-15b. Para a amplificação dessa sequência de cDNA foram utilizados os oligonucleotídeos distais *pkcA* pET-15b FW e *pkcA* pET-15b REV (figura 66 C), que continham sítio da enzima *Bam*HI para posterior clonagem no vetor de expressão pET-15b.

Conforme foi demonstrado por Rocha, Godoy [29], o sítio mutado na linhagem *pkcA*^{G579R} (PkcA Gly579Ala) fez com que esta se tornasse mais sensível ao estresse de parede celular. Além disso, neste trabalho, foi observada a redução da sobrevivência desta linhagem quando exposta ao choque térmico (figura 51 A-B), e o aumento da sensibilidade aos inibidores de Hsp90 radicicol e geldanamicina (figura 56A-B), demonstrando assim que este resíduo de PkcA localizado no domínio regulatório C1B de PkcA [220] pode estar diretamente relacionado à atividade catalítica de PkcA em resposta ao estresse de parede celular e de temperatura. Para a obtenção da sequência do cDNA que continha a mutação G579R, dois fragmentos independentes foram amplificados utilizando o oligonucleotídeo que continha a mutação pontual *pkcA* GC FW que hibridiza na posição 2044 do cDNA do gene *pkcA* de *A. fumigatus* [42], e o oligonucleotídeo *pkcA* pET-15b REV, gerando um fragmento de 1641 Kb que continha homologia para o fragmento restante da sequência de clonagem que foi amplificada utilizando os oligonucleotídeos *pkcA* pET-15b FW e *pkcA* 2033REV, gerando um fragmento de 0,470 Kb (figura 66D). Os fragmentos independentes foram fusionados por uma nova PCR (figura 66E) utilizando os oligonucleotídeos distais *pkcA* pET-15b FW e *pkcA* pET-15b REV, que são os mesmos oligonucleotídeos que foram utilizados para amplificar a sequência selvagem do gene *pkcA* (tabela 4).

Ambos os cDNAs *pkcA*⁴⁰⁹⁻¹¹¹⁶ e *pkcA*^{409-1116G579R} foram clonados no plasmídeo de expressão pET-15b utilizando o kit de recombinação Gibson assembly[®] Master Mix (New England Biolabs), e posteriormente transformados na linhagem da bactéria *E. coli* DH5 α para multiplicação e manutenção dos vetores plasmidiais. Colônias transformantes das linhagens pET-15b-*pkcA*(409-1116) e pET-15b-*pkcA*(409-1116)^{G579R} tiveram o DNA plasmidial extraído e foram validadas por PCR (figura 66C-F). Posteriormente os plasmídeos positivos de cada construção foram sequenciados para validação das sequências (dados não mostrados).

Para a clonagem do cDNA completo que codifica a proteína MpkA de *A. fumigatus*, assim como foi feito para a proteína Hsp90, o cDNA que codifica *mpkA* foi amplificado por RT-PCR utilizando os oligonucleotídeos *mpkA* pET-15B FW e *mpkA* pET-15b REV (tabela 4), que continham, além da sequência para a amplificação do cDNA, sítios de restrição da enzima *Bam*HI para posterior clonagem. O cDNA obtido foi clonado no plasmídeo pET-15b digerido com *Bam*HI utilizando o kit de recombinação Gibson assembly[®] Master Mix (New England Biolabs), e após a ligação estes foram transformados na linhagem da bactéria *E. coli* DH5 α para multiplicação e manutenção dos vetores plasmidiais. Colônias transformantes tiveram o DNA plasmidial extraído e foram validadas por PCR (figura 66B). Posteriormente os plasmídeos positivos foram sequenciados para verificar a ausência de mutações no cDNA clonado (dados não mostrados).

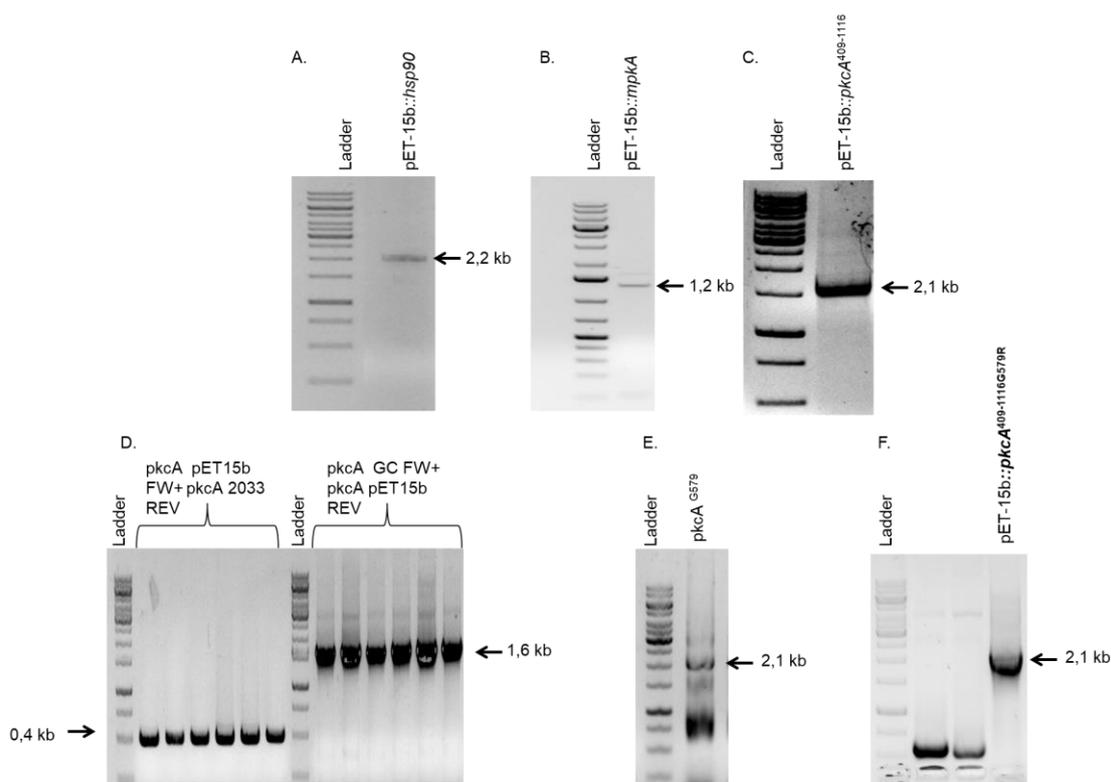


Figura 66: Validação da clonagem dos cDNAs dos genes *hsp90*, *mpkA*, *pkcA*⁴⁰⁹⁻¹¹¹⁶ e *pkcA*^{409-1116G579R} de *A. fumigatus* no plasmídeo pET-15b. (A) Validação da clonagem do cDNA de *hsp90* de *A. fumigatus* no plasmídeo pET-15b. (B) Validação da clonagem do cDNA de *mpkA* de *A. fumigatus* no plasmídeo pET-15b. (C) Validação da clonagem do cDNA da porção C-terminal do gene *pkcA* de *A. fumigatus* no plasmídeo pET-15b. (D) Amplificação dos fragmentos independentes da porção C-terminal do cDNA de *pkcA* de *A. fumigatus* para a obtenção da mutação G579R. (E) PCR de fusão dos fragmentos independentes do cDNA de *pkcA* para obtenção do cDNA da porção C-terminal de *pkcA* que contém a mutação G579R. (F) Validação da clonagem do cDNA da porção C-terminal do gene *pkcA*^{G579R} de *A. fumigatus* no plasmídeo pET-15b.

Para a expressão das proteínas recombinantes de interesse foi utilizada a linhagem de *E. coli* Roseta™ (DE3). Os clones obtidos para cada um dos genes de interesse foram transformados nessa linhagem e os transformantes obtidos foram submetidos a diferentes condições indutoras da expressão proteica em pequena escala inicialmente.

A proteína recombinante Hsp90 foi expressa na sua fração solúvel (figura 67A) a 18 °C. Já as proteínas PkcA e PkcA^{G579R} foram expressas apenas na fração insolúvel mesmo após todos os testes de variação de condições de indução da expressão (figura 67 B-C e dados não mostrados). A clonagem dos cDNAs em outros plasmídeos de expressão, assim como a transformação em outras linhagens de *E. coli* foram realizadas, porém não foi

possível a obtenção desta proteína na fração solúvel em todos os casos (dados não mostrados).

A proteína MpkA por outro lado foi expressa tanto na fração solúvel como na fração insolúvel (figura 67D) a 18 °C.

As sequências dos aminoácidos das quatro proteínas obtidas nesse trabalho (Hsp90, PkcA⁴⁰⁹⁻¹¹¹⁶, PkcA^{409-1116G579R} e MpkA) encontram-se nos APÊNDICES H, I, J e K, e as condições de expressão das proteínas recombinantes obtidas, bem como algumas de suas propriedades físico-químicas estão sumarizadas na tabela 15.

A proteína RImA não foi expressa em nenhuma das condições testadas neste trabalho utilizando o plasmídeo pET-15b e pET-28a e por isso foi excluída dos experimentos subsequentes (dados não mostrados).

Tabela 15: Propriedades físico-químicas e condições de expressão das proteínas estudadas neste trabalho.

Proteínas	$\epsilon 280nm (M^{-1} cm^{-1})^*$	MM (kDa)*	Número de aminoácidos	Condições de expressão
Hsp90	57300	83,17	729	18 °C, IPTG 0,1 mM, 20 horas
MpkA	46340	51,00	447	18 °C, IPTG 0,1 mM, 20 horas
PkcA ⁴⁰⁹⁻¹¹¹⁶	74355	80,91	722	37 °C, IPTG 0,1 mM, 4 horas
PkcA ^{409-1116G579R}	74355	81,01	722	37 °C, IPTG 0,1 mM, 4 horas

*parâmetros físico-químicas estimados pela ferramenta ProtParam (www.expasy.org), incluindo a cauda de histidina.

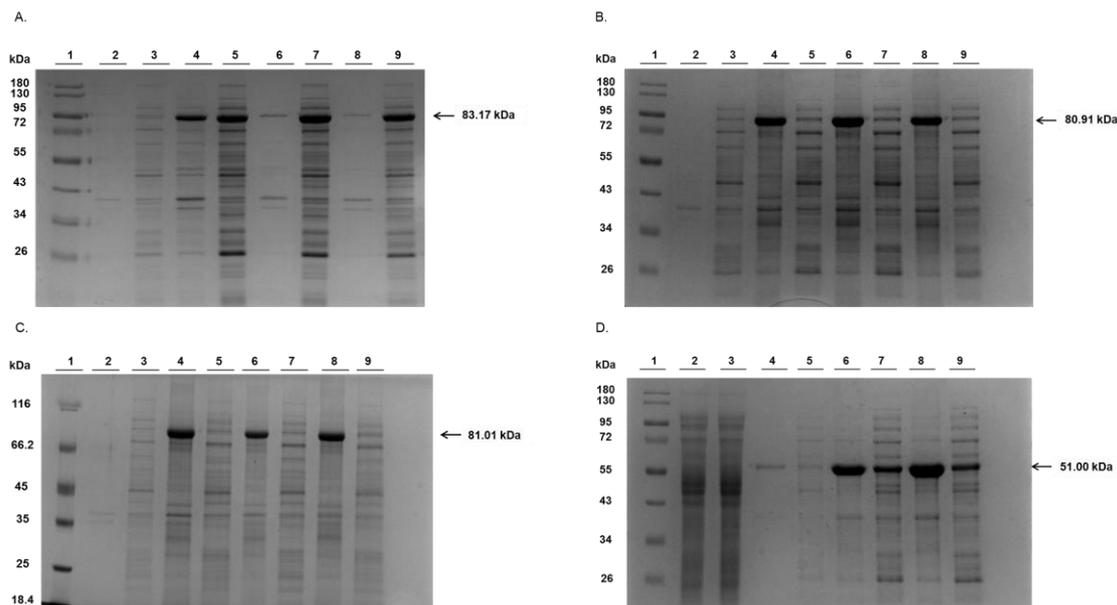


Figura 67: Análise da expressão em pequena escala das proteínas recombinantes obtidas. (A) Hsp90 (B) PkcA⁴⁰⁹⁻¹¹¹⁶ (C) PkcA^{409-1116G579R} (D) MpkA. A linhagem de *E. coli* Roseta™ (DE3) foi transformada com os vetores pET-15b clonados com o cDNA para a expressão de cada uma das proteínas recombinantes apresentadas, as linhagens foram cultivadas a 37 °C a 180 rpm em 50 mL de LB líquido contendo 100 µg/mL de ampicilina e 34 µg/mL cloranfenicol até uma DO_{600nm} entre 0,6 e 0,8. A seguir, foram retirados 5 mL da cultura (controle não induzido) e no restante da cultura foi acrescido IPTG para uma concentração final de 0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM para indução da expressão proteica. Em seguida as linhagens foram cultivadas a 18 °C por 20 horas, 30 °C por 6 horas e 37 °C por 4 horas. Como controle do experimento foi utilizado o plasmídeo pET-15b que não continha a sequência do cDNA que codifica as proteínas testadas clonado (induzido nas mesmas condições das proteínas recombinantes testadas) (dados não mostrados) e o plasmídeo pET-15b que continha o clone da proteína testada não induzido. Após o tempo de indução da expressão proteica, 5 mL das amostras foram centrifugados a 5000 rpm por 30 minutos e o sedimento foi ressuspenso em 5 mL do tampão de lise contendo 30 µg/mL de lisozima, seguido de 30 minutos de incubação em banho de gelo. Após, as amostras foram lisadas por pulsos com auxílio do sonificador por 2 minutos (pulsos de 6 segundos com intervalos de 59,9 segundos). Em seguida, o lisado foi centrifugado a 12000 rpm, por 30 minutos. O sedimento foi ressuspenso em 5 mL do tampão de lise. Aliquotas do sedimento ressuspenso (fração insolúvel) e do sobrenadante (fração solúvel) foram aplicadas no gel de SDS-PAGE 12 %, no qual foi possível observar a expressão das proteínas recombinantes testadas na fração solúvel e/ou na fração insolúvel (poços 4, 5, 6, 7, 8 e 9, indicados pela seta). No gel apresentado acima temos em 1- Marcador de peso molecular; 2- Plasmídeo pET-15b contendo o cDNA não induzido (fração insolúvel); 3- Plasmídeo pET-15b contendo o cDNA não induzido (fração solúvel); 4- Plasmídeo pET-15b-Proteínas testadas induzidas a 18 °C por 20 horas com 0,1 mM de IPTG (fração insolúvel); 5- Plasmídeo pET-15b- Proteínas testadas induzidas a 18 °C por 20 horas com 0,1 mM de IPTG (fração solúvel); 6- Plasmídeo pET-15b- Proteínas testadas induzidas a 18 °C por 20 horas com 0,5 mM de IPTG (fração insolúvel); 7- Plasmídeo pET-15b- Proteínas testadas induzidas a 18 °C por 20 horas com 0,5 mM de IPTG (fração solúvel); 8- Plasmídeo pET-15b- Proteínas testadas induzidas a 18 °C por 20 horas com 1 mM de IPTG (fração insolúvel); 9- Plasmídeo pET-15b- Proteínas testadas induzidas a 18 °C por 20 horas com 1 mM de IPTG (fração solúvel).

4.3.4 Estudos bioquímicos e funcionais das proteínas Hsp90, PkcA⁴⁰⁹⁻¹¹⁰⁶ e MpkA

As proteínas recombinantes obtidas foram inicialmente utilizadas para estudos de caracterização bioquímica inicial e também como ferramenta adicional para a validação das interações da Hsp90 com as proteínas da CWIP obtidas nos experimentos de Co-IP (seção 4.3.2, figuras 60, 61, 62).

4.3.4.1 Análise *in vitro* da interação da proteína recombinante Hsp90 com as proteínas recombinantes da CWIP

Como foi demonstrado na seção anterior por meio de ensaios de Co-IP *in vivo*, há uma interação das principais proteínas que compõem a CWIP de *A. fumigatus*, PkcA, MpkA e RlmA, com a chaperona molecular Hsp90 (figuras 60, 61, 62, 65 e 64).

O estudo de interações proteína-proteína é essencial para entender a função de uma proteína em um organismo. Uma variedade de ensaios bioquímicos e genéticos para detectar a interação proteína-proteína foram desenvolvidos, podendo ser estes estudos realizados *in vivo* ou *in vitro* [156]. Sabendo que a validação da interação física proteína-proteína por técnicas distintas pode trazer maior confiabilidade aos dados, utilizamos neste trabalho a técnica de far WB.

A técnica de far WB é uma das técnicas utilizadas para verificar a interação de proteínas *in vitro* através do uso de proteínas recombinantes expressas. A vantagem desta técnica é que ela permite a análise da interação proteína-proteína quando umas das proteínas recombinantes não foi expressa na sua forma solúvel [156]. A detecção da interação proteína-proteína nesta técnica ocorre quando uma proteína “isca” de interesse é submetida a um SDS-PAGE. O material é posteriormente transferido para a membrana de PVDF como num *Western blot*, onde poderá interagir com uma proteína “presa” solúvel em solução. A detecção da interação ocorre com um anticorpo anti proteína “presa”, que será portanto detectada através do sinal obtido na região da membrana que corresponde ao tamanho molecular da proteína “isca” [156, 234].

Durante a preparação do SDS-PAGE, as proteínas são reduzidas e desnaturadas através do tratamento com o tampão de *Laemmli*. Devido à interação entre as proteínas depender da sua estrutura secundária ou terciária é necessário o *refolding* da proteína “isca” (geralmente insolúvel) para que ocorra esta interação. Na técnica de far WB, este *refolding* é realizado diretamente na membrana de PVDF utilizando concentrações decrescentes de guanidina HCl, e desta forma a proteína “isca” retorna à sua estrutura secundária ou terciária mesmo após a desnaturação durante a corrida do gel SDS-PAGE [156].

Devido ao fato de as proteínas PkcA⁴⁰⁹⁻¹¹¹⁶ e PkcA^{409-1116G579R} não terem sido expressas na forma solúvel a técnica far WB foi a única que permitiu a verificação da interação destas proteínas com a Hsp90 de *A. fumigatus*, e também permitiu verificar se a interação detectada *in vivo* também estaria ocorrendo *in vitro*, ou seja, se estas proteínas da CWIP estariam interagindo com a Hsp90 independente da condição biológica testada. Foi possível verificar que a proteína recombinante PkcA⁴⁰⁹⁻¹¹¹⁶, assim como no experimento *in vivo*, interagiu com a Hsp90 (figura 68A), porém quando esta proteína possui a mutação G579R não foi possível detectar a interação com a proteína Hsp90 com o uso da técnica de far WB (figura 68B), sugerindo que este domínio da proteína PkcA de *A. fumigatus* onde está a mutação G579R é necessário para a interação com a proteína Hsp90. Assim pode-se sugerir que o aumento da susceptibilidade ao estresse de temperatura observado no mutante *pkcA*^{G579R} se deve em parte ao comprometimento da interação de PkcA com a Hsp90 a qual é constitutiva, conforme mostrado nas figuras 60 e 61. Além disso, como a proteína PkcA⁴⁰⁹⁻¹¹⁰⁶ é uma forma truncada contendo os 628 resíduos C-terminal da proteína, pode-se inferir que esta porção da proteína é suficiente para propiciar a ligação com Hsp90. Entretanto, não se pode descartar que parte da região de interação Hsp90/PkcA possa envolver os resíduos da porção N-terminal (1 a 608) não presentes na PkcA recombinante aqui empregada. A construção da linhagem PkcA^{409-1119G579R} 3xHA está em andamento para validar a perda de interação com Hsp90 neste mutante de ponto *in vivo*.

Da mesma forma que observado *in vivo*, a proteína recombinante MpkA interagiu também com a proteína recombinante Hsp90 de *A. fumigatus* (figura 68C), Neste caso, em que MpkA foi expressa na forma solúvel e insolúvel, a interação foi detectada em ambas as frações.

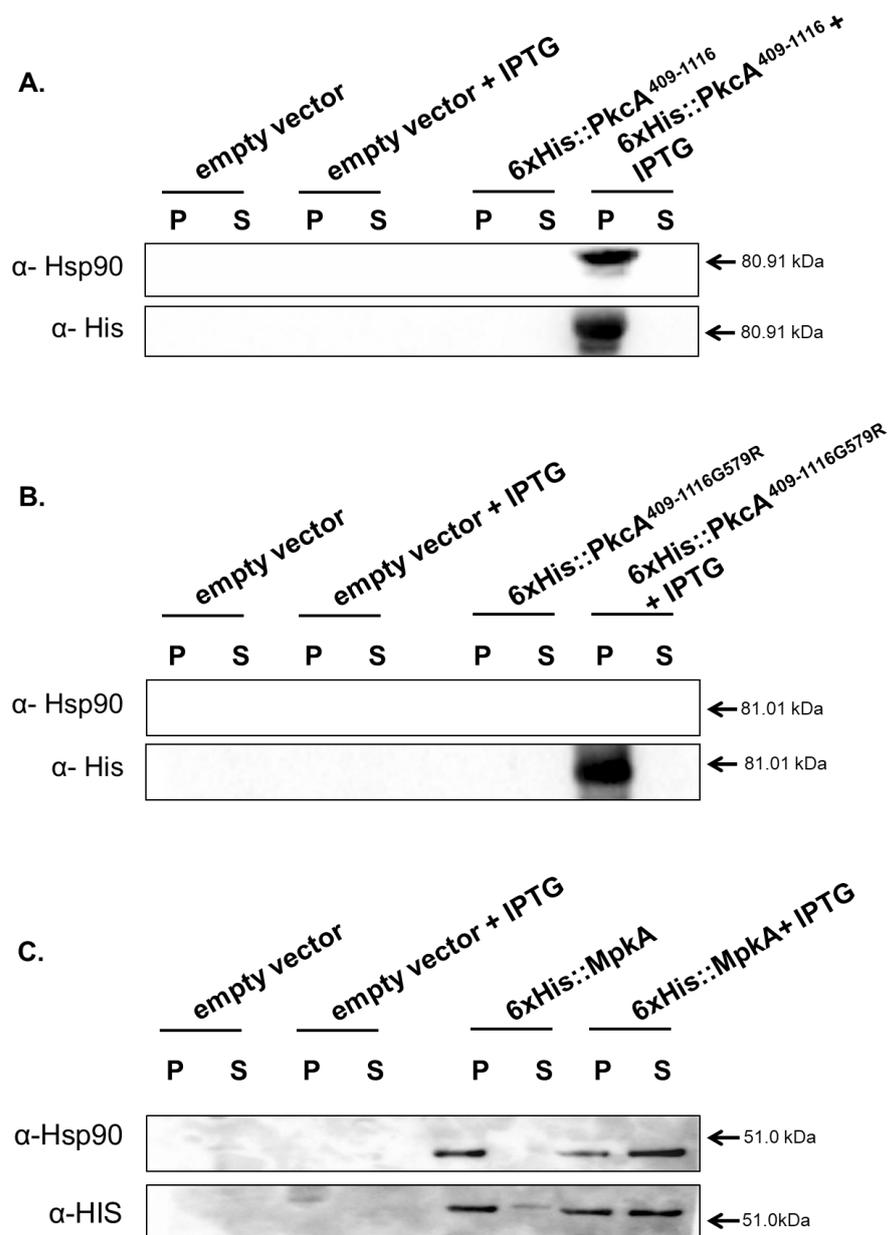


Figura 68: Detecção da interação proteína-proteína entre (A) Pkca⁴⁰⁹⁻¹¹¹⁶ (B) Pkca^{409-1116G579R} e (C) MpkA com a proteína Hsp90 de *A. fumigatus*. As proteínas “isca” foram separadas por SDS-PAGE, e posteriormente transferidas para a membrana de PVDF, a membrana foi submetida ao processo de desnaturação e renaturação, bloqueada e posteriormente incubada com 50 μM da proteína “presa” Hsp90 solúvel purificada no tampão de ligação (seção 3.8.27.2). A interação foi detectada utilizando o anticorpo policlonal anti Hsp90 de *A. fumigatus* (este trabalho). Como controle foi utilizado o plasmídeo pET-15b vazio, não induzido e induzido com IPTG. E também o plasmídeo pET-15b clonado com a proteína a ser testada não induzido. P = pellet, S= sobrenadante. Observe que há autoindução da expressão de MpkA no meio LB na ausência de IPTG.

4.3.4.2 Estudos estruturais e bioquímicos da proteína Hsp90 de *A. fumigatus*

Como demonstrado na figura 67A, a proteína Hsp90 foi expressa em sua forma solúvel em quantidade que permitiu que os ensaios para a sua caracterização biofísica fossem realizados. Estes ensaios permitiram comparar a Hsp90 de *A. fumigatus* com as de outros organismos já caracterizados, e assim observar características que possam ser específicas da Hsp90 de *A. fumigatus*.

Para que se obtivesse uma proteína pura, sem presença de contaminantes, após a cromatografia de afinidade realizada em coluna de Níquel Hi-trap, foi realizada uma segunda cromatografia de gel filtração (Size Exclusion Chromatography, SEC) (figura 69). O emprego desta técnica mostrou-se capaz de separar a fração correspondente à proteína Hsp90 em fração distinta daquelas dos contaminantes e do imidazol. A eliminação do excesso de imidazol comumente presente após a cromatografia de afinidade permitiu que a proteína de interesse fosse utilizada diretamente nas etapas de caracterização sem a necessidade de empregar a diálise para sua remoção, o que foi muito benéfico em termos de estabilidade proteica.

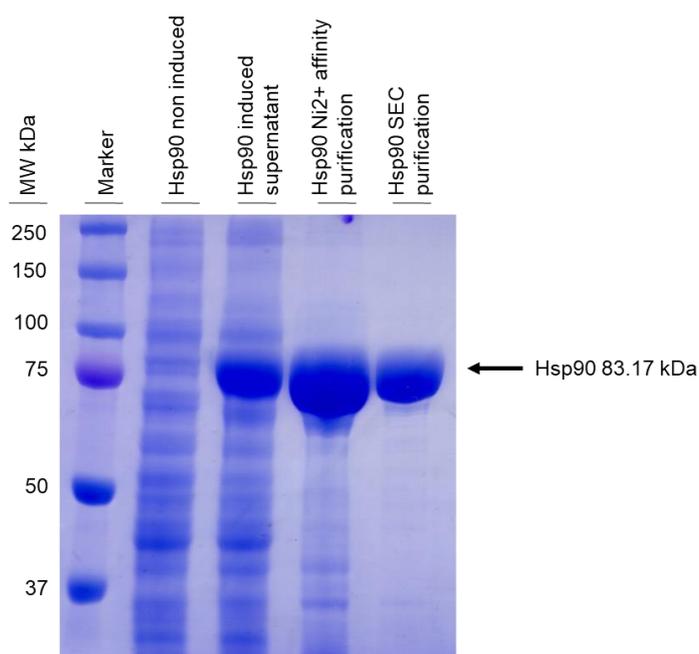


Figura 69: Gel de purificação da proteína recombinante Hsp90 de *A. fumigatus* por cromatografia de afinidade em resina de níquel e cromatografia de exclusão molecular. Gel SDS-PAGE 15 % contendo a proteína recombinante Hsp90 expressa e purificada com His-tag. Pureza final > 95 % (análise em gel corado com *Coomassie Brilliant Blue*).

O processo de purificação da proteína Hsp90, juntamente com a sua estabilidade, permitiu a síntese de um anticorpo anti Hsp90, que serviu como ferramenta para a avaliação do papel da parede celular na tolerância ao choque térmico em *A. fumigatus*, auxiliando nas investigações da relação das proteínas da parede celular com Hsp90 neste patógeno. Este anticorpo foi padronizado e já utilizado em dados demonstrados nas figuras 57, 58, 60, 61, 62, 64, 65, 68 deste trabalho.

O primeiro ensaio de caracterização da Hsp90 de *A. fumigatus* realizado foi a gel filtração analítica (aSEC). Esta técnica permitiu que por meio do perfil de eluição da Hsp90 fosse determinada a sua massa molecular aparente que foi de $436,51 \pm 3,4$ kDa, bem como o seu razão friccional ($1,81 \pm 0,08$) e raio de Stokes ($71,44 \pm 0,54$ Å) (figura 70A-B). O perfil de eluição da proteína foi comparado com o perfil de eluição dos padrões empregados, que foram: apoferritina (480 kDa), γ -globulina (160 kDa), albumina de soro bovino (BSA 67 kDa), anidrase carbônica (30 kDa) e citocromo C (12,3 kDa). Por ser uma proteína com predição de estrutura alongada (figura 70A), o cálculo de massa molecular aparente obtido através desta técnica diferiu da massa molecular teórica proporcionada pelo software Protein Parameters Tools (www.bo.expasy.org/tools/protparam.html) obtida através da sequência dos aminoácidos. Os resultados obtidos indicam que a Hsp90 de *A. fumigatus* é um oligômero assimétrico em solução, resultado semelhante ao observado para a Hsp90 de *Leishmania brasilienses* [235].

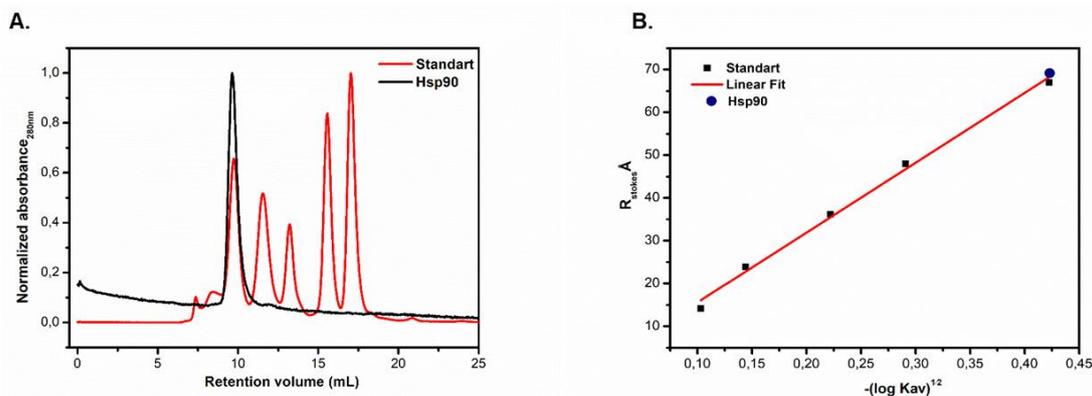


Figura 70: Cromatografia de exclusão molecular analítica da proteína recombinante Hsp90. (A) O padrão de proteínas usado continha as proteínas apoferritina (480 kDa), γ -globulina (160 kDa), albumina de soro bovino (BSA 67 kDa), anidrase carbônica (30 kDa) e citocromo c (12,3 kDa). A cromatografia foi feita com a coluna Superdex 200 GL 10/300 (GE HealthCare), utilizando o equipamento AKTA Purifier (GE HealthCare). (B) Cálculo do Raio de Stokes (R_s). Os cálculos foram feitos a partir dos dados obtidos na cromatografia de exclusão molecular analítica em relação aos volumes de eluição das proteínas-padrão e das proteínas em estudo.

Como primeiros ensaios para abordagem dos estudos estruturais da Hsp90 de *A. fumigatus*, utilizou-se a técnica de dicroísmo circular (CD), que permite a caracterização da estrutura secundária da proteína, e a técnica de fluorescência intrínseca do triptofano, que permite verificar a estrutura terciária da proteína. Estas técnicas permitiram verificar se a proteína recombinante Hsp90 foi obtida enovelada e também a caracterização dos elementos estruturais da Hsp90 de *A. fumigatus*. Estes ensaios foram realizados em tampão HEPES 40 mM pH 7,5, condição cuja estabilidade da proteína foi preservada.

O espectro de CD mostrou que a Hsp90 de *A. fumigatus* foi obtida com elementos de estrutura secundária do tipo hélice α caracterizada por dois mínimos pronunciados em torno de 222 e 207 nm, e um máximo positivo em torno de 192 nm, e folha β caracterizada por um máximo positivo em torno de 195 e um mínimo em 216 nm (figura 71). A deconvolução dos espectros foi realizada utilizando o programa CDNN *Secondary Structure Analysis* 2.1, que indicou o predomínio de estrutura secundária tipo hélice α (tabela 16).

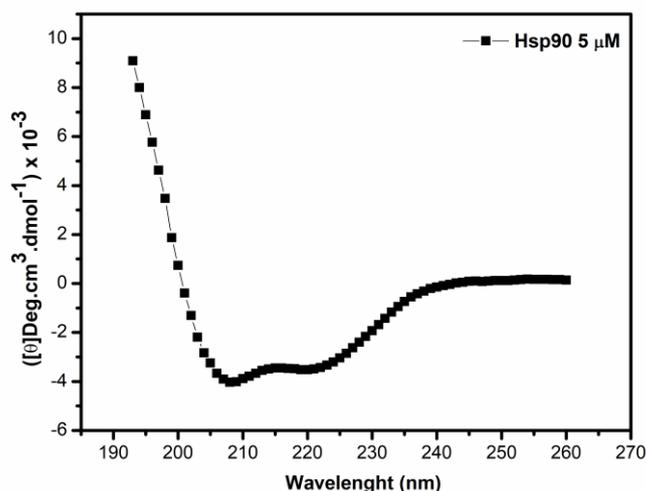


Figura 71: Espectros de CD da proteína recombinante Hsp90. A concentração de proteína usada nos ensaios foi de 5 μM . Os dados foram coletados em tampão HEPES 40 mM pH 7,5.

Tabela 16: Propriedades estruturais da Hsp90 de *A. fumigatus*. Deconvolução dos espectros de dicroísmo circular da Hsp90 de *A. fumigatus*. A deconvolução do espectro foi realizada utilizando o programa CDNN *Secondary Structure Analysis 2.1*.

Property Hsp90 10 μM	%
α - helix	33.7
B-sheet	34.8
Randon coil	29.9

O ambiente dos cinco resíduos de triptofano presentes na sequência de aminoácidos da estrutura primária da Hsp90 de *A. fumigatus* (APÊNDICE H) foi utilizado como sonda de estrutura terciária local nos experimentos de emissão de fluorescência visando complementar e confirmar os experimentos de CD quanto à integridade estrutural e à estabilidade da proteína no tampão utilizado. Para este ensaio foi utilizada a proteína íntegra, e após a medida de emissão do triptofano e tirosina (348 e 303 nm respectivamente), a mesma foi desnaturada (linha em vermelho no gráfico). Em condição não desnaturante, a proteína Hsp90 apresentou valores de $\lambda_{\text{máx}}$ menores que os observados em condições desnaturantes, indicando que os triptofanos presentes nesta proteína se localizam em ambientes completamente ou parcialmente protegidos do solvente. (figura 72). Os dados de fluorescência obtidos em

conjunto com os dados de CD demonstram que a Hsp90 de *A. fumigatus* foi obtida enovelada.

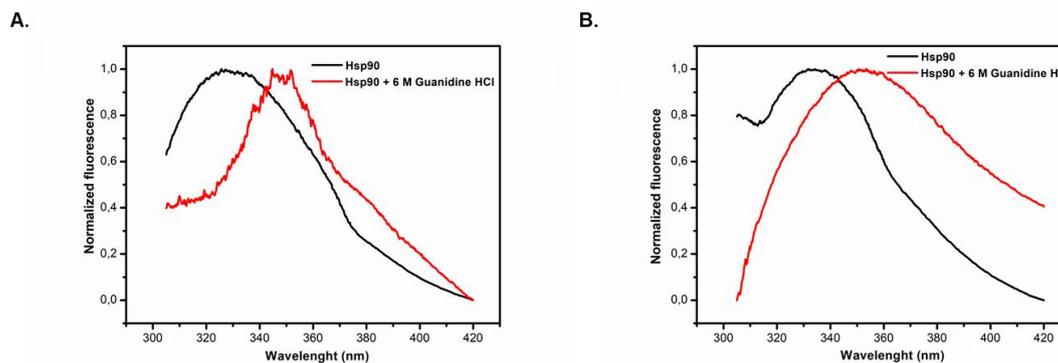


Figura 72: Espectros de fluorescência da proteína Hsp90 nos comprimentos de onda de excitação de 280 e 295 nm. Os experimentos foram feitos com 5 μM de Hsp90, em tampão HEPES 40 mM pH 7,5.

Já é conhecido que as proteínas Hsp90 possuem atividade chaperona sendo capazes de interagir com proteínas clientes em condições de estresse, prevenindo a agregação proteica e mantendo-as em um estado enovelado e funcional [235]. A atividade chaperona da Hsp90 de *A. fumigatus* foi medida pela prevenção da agregação proteica da proteína cliente malato desidrogenase (MDH) por espalhamento de luz a 320 nm em função do tempo. Neste teste, 1,0 μM de proteína cliente MDH foi submetido a um estresse térmico a 42 °C, na presença de concentrações crescentes da Hsp90 de *A. fumigatus* (0,1 - 5 μM). Nessa temperatura empregada já foi relatado que a Hsp90 não sofre perturbações em sua estrutura [235].

A agregação da Hsp90 foi monitorada em todas as concentrações testadas, e também foi monitorada a agregação da proteína cliente (MDH), considerada como 100 % de agregação. Estes dados foram utilizados como controles desse experimento. Os resultados apresentados na figura 73A-B indicam que a Hsp90 de *A. fumigatus* foi capaz de prevenir a agregação da MDH e não agregou quando submetida ao estresse térmico.

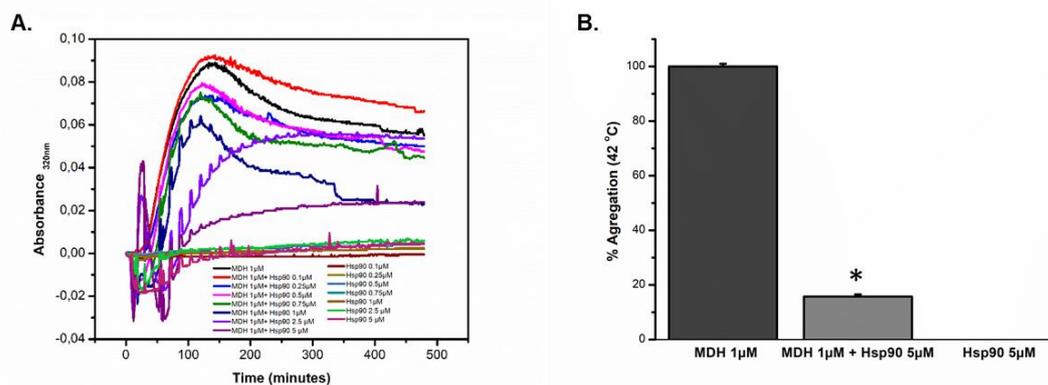


Figura 73: Análise da atividade chaperona da Hsp90 de *A. fumigatus*. (A) Perfis cinéticos de agregação da malato desidrogenase (MDH) e Hsp90 de *A. fumigatus*. (B) Porcentagens de agregação da MDH calculada na presença de 5 μM da Hsp90 de *A. fumigatus*. Os valores de agregação foram calculados considerando a agregação máxima da MDH como 100 %. $n=2$ $p < 0,001$.

O domínio N-terminal da Hsp90 contém o sítio de ligação ao ATP que é essencial para a função chaperona, este domínio é conservado em todas as espécies. Após a ligação ao ATP, Hsp90 é dimerizada e exibe um estado fechado em que as regiões N-terminais estão intimamente associadas à hidrólise de ATP, direcionando ao *fold*ing ou estabilização das proteínas clientes [120]. Portanto a capacidade de ligação ao ATP da Hsp90 está diretamente relacionada à sua atividade chaperona.

Com o intuito averiguar se a Hsp90 de *A. fumigatus* mantinha a sua atividade ATPásica conservada, realizou-se a análise termodinâmica da interação entre a Hsp90 de *A. fumigatus* e o ATP e ADP por meio da técnica de calorimetria de titulação isotérmica (ITC). A Hsp90 de *A. fumigatus* recombinante foi titulada com as moléculas de ATP e ADP (figura 74), resultando na interação com ATP com $K_d = 179 \pm 0.4 \mu\text{M}$ e estequiometria de 3 moléculas de ATP para 1 dímero de Hsp90. A interação apresentou $\Delta H_{\text{app}} = -3497.33 \pm 1127 \text{ cal mol}^{-1}$ e $\Delta S_{\text{app}} = -14.4 \pm 2 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, portanto entalpicamente dirigida, e entropicamente desfavorável. Os resultados obtidos na interação com ADP demonstraram $K_d = 123.48 \pm 0.1 \mu\text{M}$ e estequiometria de 1.6 moléculas de ADP para 1 dímero de Hsp90. A interação apresentou $\Delta H_{\text{app}} = -11553.33 \pm 680 \text{ cal mol}^{-1}$ e $\Delta S_{\text{app}} = -34 \pm 2 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, portanto entalpicamente dirigida, e entropicamente desfavorável.

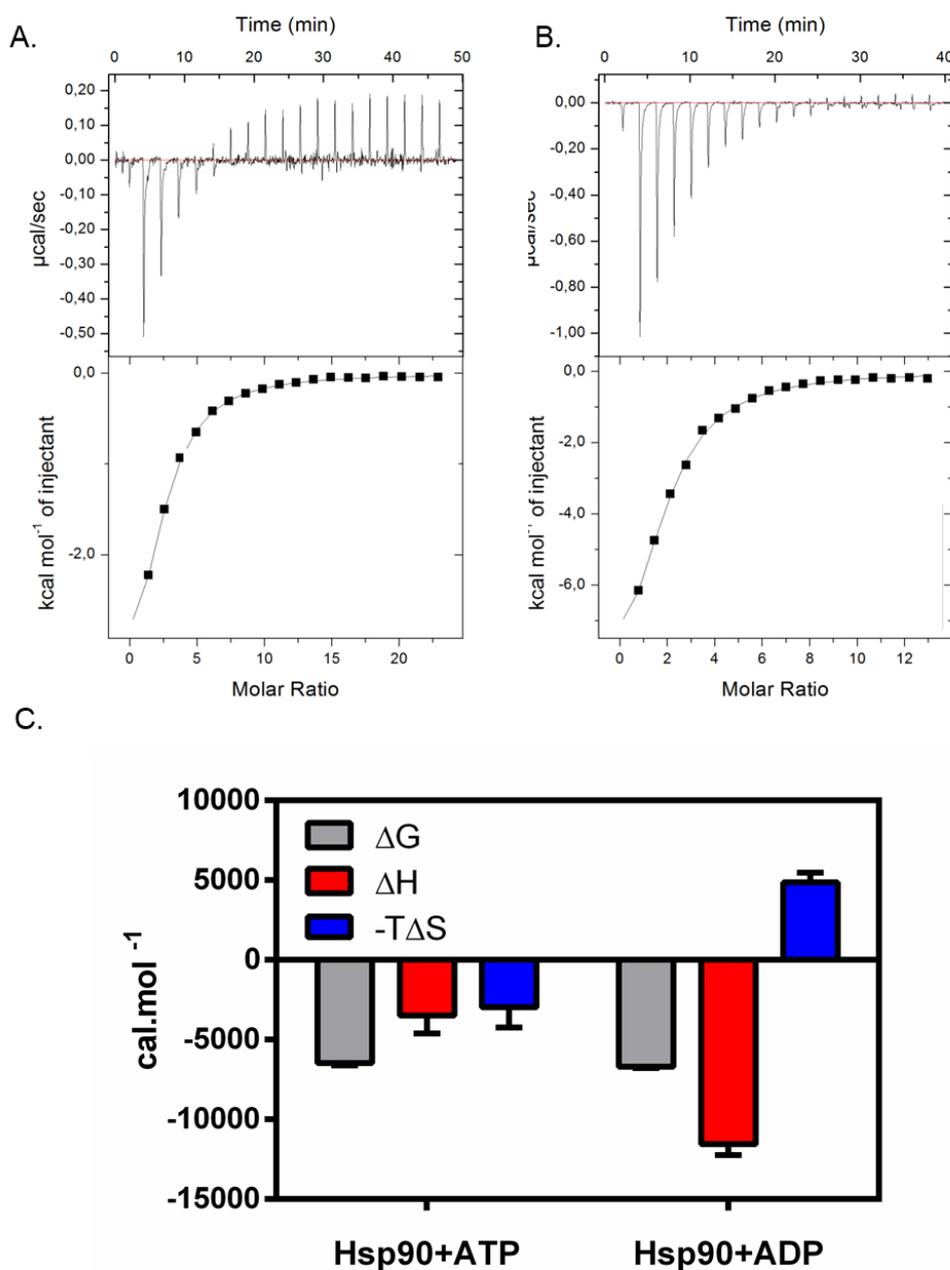


Figura 74: Interação da Hsp90 de *A. fumigatus* com ATP e ADP por calorimetria de titulação isotérmica. (A) Termograma da interação entre a Hsp90 de *A. fumigatus* e ATP a 25 °C. **(B)** Termograma da interação entre a Hsp90 de *A. fumigatus* e ADP a 25 °C. **(C)** Variação dos parâmetros termodinâmicos (ΔH , $T\Delta S$ e ΔG).

4.3.5 Estudos estruturais da proteína MpkA de *A. fumigatus*

Como demonstrado na figura 67D, a proteína MpkA foi expressa em sua forma solúvel em quantidade que permitiu que os ensaios para a sua caracterização biofísica fossem realizados. Para a obtenção da proteína pura, sem presença de contaminantes, após a cromatografia de afinidade realizada

em coluna de Níquel Hi-trap, foi realizada uma SEC (figura 75). O emprego desta técnica mostrou-se eficiente para separar a fração correspondente à proteína MpkA em fração distinta daquelas dos contaminantes e do imidazol, o que permitiu que a proteína MpkA fosse utilizada diretamente nas etapas de caracterização sem a necessidade de se empregar a diálise para sua remoção, o que foi benéfico em termos de estabilidade proteica.

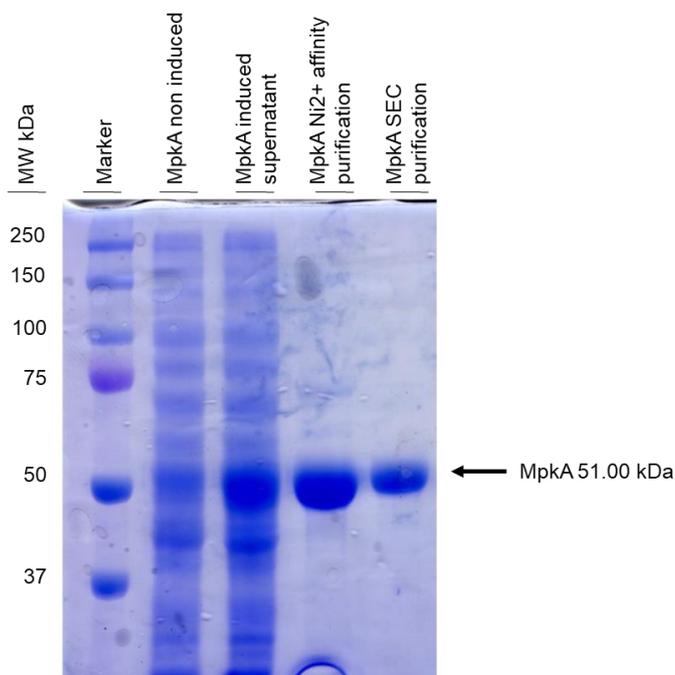


Figura 75: Gel de purificação da proteína recombinante MpkA de *A. fumigatus* por cromatografia de afinidade em resina de níquel e cromatografia de exclusão molecular. Gel SDS-PAGE 15 % contendo a proteína recombinante MpkA expressa e purificada com His-tag. Pureza final > 95 % (análise em gel corado com *Coomassie Brilliant Blue*).

O primeiro ensaio de caracterização da MpkA de *A. fumigatus* realizado foi a aSEC. Esta técnica permitiu, através do perfil de eluição da MpkA, a determinação da sua massa molecular aparente que foi de $66,19 \pm 1,18$ kDa, o razão friccional ($1,28 \pm 0,11$) e raio de Stokes ($31.95 \pm 0,31$ Å) (figura 76A-B). O perfil de eluição da proteína foi comparado com o perfil de eluição dos padrões empregados, que foram: apoferritina (480 kDa), γ -globulina (160 kDa), albumina de soro bovino (BSA 67 kDa), anidrase carbônica (30 kDa) e citocromo C (12,3 kDa). Os dados obtidos indicam que esta proteína é um monômero, com predição de estrutura levemente alongada (figura 76A), de forma que o cálculo de massa molecular aparente obtido através desta técnica diferiu da massa molecular teórica proporcionada pelo software Protein

Parameters Tools (www.bo.expasy.org/tools/protparam.html) obtida através da sequência dos aminoácidos.

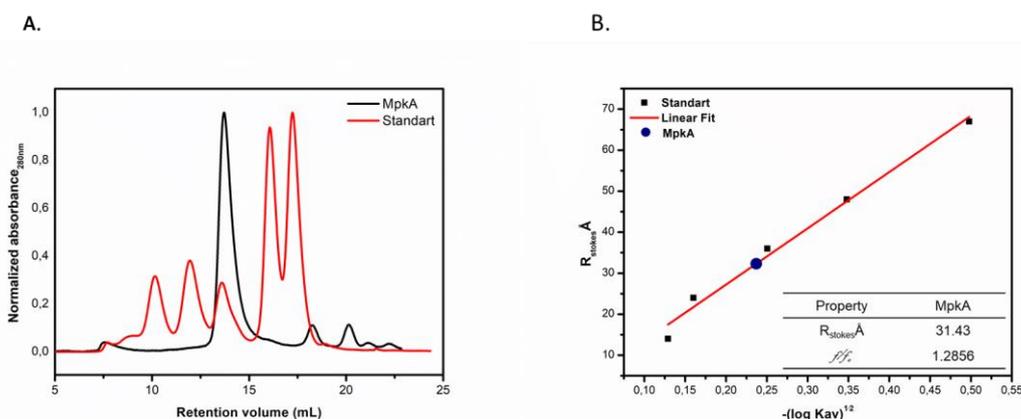


Figura 76: Cromatografia de exclusão molecular analítica da proteína recombinante MpkA. (A) O padrão de proteínas usado continha as proteínas apoferritina (480 kDa), γ -globulina (160 kDa), albumina de soro bovino (BSA 67 kDa), anidrase carbônica (30 kDa) e citocromo c (12,3 kDa). A cromatografia foi feita com a coluna Superdex 200 GL 10/300 (GE HealthCare), utilizando o equipamento AKTA Purifier (GE HealthCare). (B) Cálculo do raio de Stokes (R_s). Os cálculos foram feitos a partir dos dados obtidos na cromatografia de exclusão molecular analítica em relação aos volumes de eluição das proteínas padrão e das proteínas em estudo.

Para a caracterização dos elementos estruturais da MpkA de *A. fumigatus* utilizou-se a técnica de CD. Estes ensaios foram realizados em tampão A utilizado na lise e purificação da MpkA (seção 3.8.9.2.2), única condição cuja estabilidade da proteína foi preservada. O espectro de CD mostrou que a MpkA de *A. fumigatus* foi obtida com elementos de estrutura secundária do tipo hélice α caracterizada por dois mínimos pronunciados em torno de 222 e 207 nm, e um máximo positivo em torno de 192 nm, e folha β caracterizada por um máximo positivo em torno de 195 e um mínimo em 216 nm (figura 77), o que é similar à MpkA de humanos já caracterizada [236].

A deconvolução dos espectros, que foi realizada utilizando o programa CDNN *Secondary Structure Analysis 2.1*, indicou o predomínio de estrutura secundária tipo folha β , e não houve variação da predição da estrutura secundária da proteína independente da concentração utilizada nas análises de CD (tabela 17).

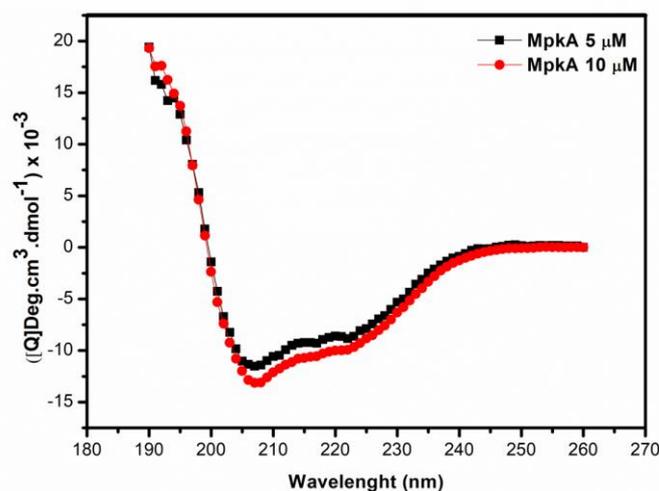


Figura 77: Espectros de CD da proteína recombinante MpkA. A concentração de proteína usada nos ensaios foi de 5 μM e 10 μM . Os dados foram coletados em tampão A utilizado na lise e purificação da MpkA.

Tabela 17: Propriedades estruturais da MpkA de *A. fumigatus*. Deconvolução dos espectros de dicroísmo circular da MpkA de *A. fumigatus*. A deconvolução do espectro foi realizada utilizando o programa CDNN *Secondary Structure Analysis 2.1*.

Property MpkA 5 μM	%	Property MpkA 10 μM	%
α - helix	27.3	α - helix	29.1
B-sheet	32.5	B-sheet	32.1
Randon coil	40.3	Randon coil	38.8

Os quatro resíduos de triptofano presentes na sequência de aminoácidos da estrutura primária da MpkA de *A. fumigatus* (APÊNDICE K) foram utilizados como sondas de estrutura terciária local nos experimentos de emissão fluorescência visando complementar os dados referentes à integridade estrutural e à estabilidade da proteína no tampão utilizado. Para este ensaio foi utilizada a proteína íntegra e, após a medida de emissão do triptofano e tirosina (348 e 303 nm respectivamente), a mesma foi desnaturada (linha em vermelho do gráfico). Em condição não desnaturante, a proteína MpkA apresentou valores de $\lambda_{\text{máx}}$ menores que os observados em condições desnaturante, indicando que os triptofanos presentes nesta proteína se localizam em ambientes completamente ou parcialmente protegidos do solvente (figura 78). Os dados de fluorescência obtidos em conjunto com os dados de CD mostraram que a MpkA de *A. fumigatus* foi obtida enovelada e permanece estável no tampão utilizado.

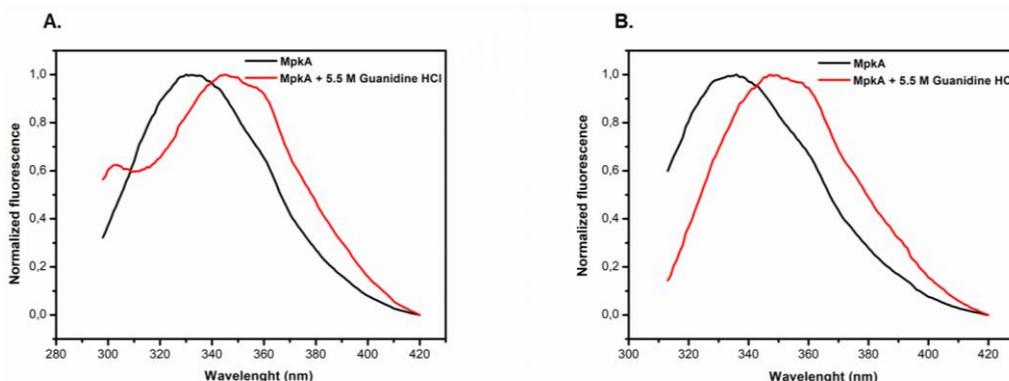


Figura 78: Espectros de fluorescência da proteína Hsp90 nos comprimentos de onda de excitação de 280 e 295 nm. Os experimentos foram feitos com 5 μ M da proteína. Os dados foram coletados em tampão A utilizado na lise e purificação da MpkA.

Com o objetivo de compreender a organização estrutural da MpkA de *A. fumigatus*, foram realizados ensaios de estabilidade térmica e química desta proteína. A estabilidade química da MpkA foi monitorada por fluorescência intrínseca do triptofano em concentrações crescentes de guanidina HCl. A curva de desenovelamento da MpkA de *A. fumigatus* apresentou uma única transição com $C_m = 2.6345 \text{ M} \pm 0.1$ de guanidina HCl (figura 79). Sugerindo que a proteína MpkA se desenovela completamente como um único domínio na presença da guanidina HCl.

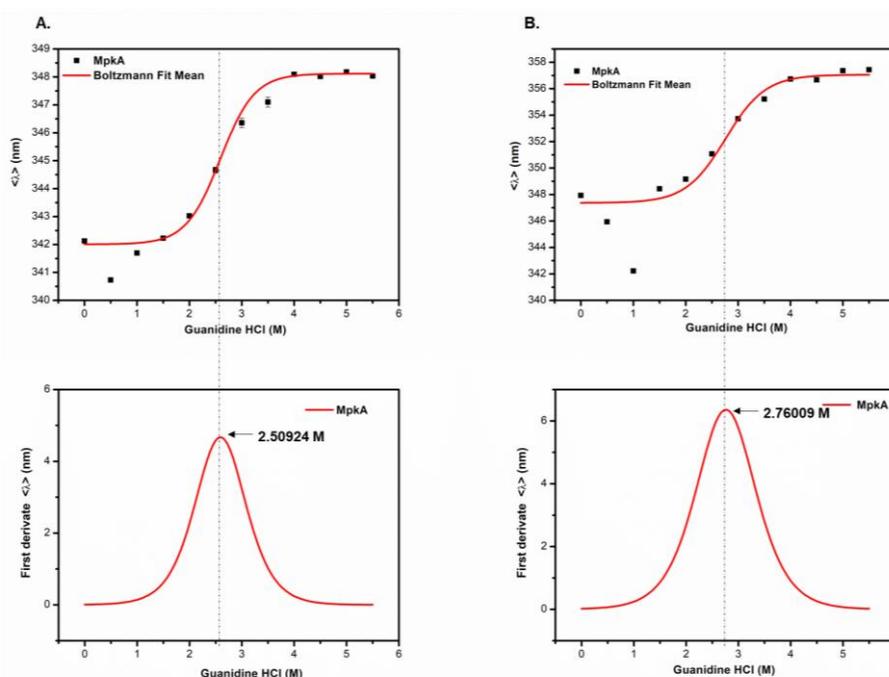


Figura 79: Espectros de fluorescência da proteína Hsp90 nos comprimentos de onda de excitação de 280 nm (A) e 295 nm (B) na presença de diferentes concentrações de guanidina. Os experimentos foram feitos com 5 μ M da proteína. Os dados foram coletados em tampão A utilizado na lise e purificação da MpkA.

A estabilidade térmica da MpkA foi monitorada após aquecimento de 5 μM da proteína de 15 $^{\circ}\text{C}$ até 90 $^{\circ}\text{C}$, com a taxa de aquecimento de 1 $^{\circ}\text{C}$ por minuto, sendo as mudanças causadas por esse estresse monitoradas por CD no comprimento de onda de 220 nm. Este ensaio permitiu verificar que o aquecimento não causou alteração na estrutura secundária da MpkA (figura 80 A).

Outro ensaio para verificar a estabilidade térmica da MpkA foi o ensaio de agregação a 42 $^{\circ}\text{C}$. Este foi realizado com concentrações crescentes da proteína MpkA, expostas por 2 horas à temperatura de 42 $^{\circ}\text{C}$ e monitoradas pela absorvância a 320 nm. Foi possível verificar que a proteína MpkA apesar de não perder a sua estrutura secundária quando submetida a elevadas temperaturas, possui uma alta taxa de agregação quando exposta a 42 $^{\circ}\text{C}$ (figura 80B).

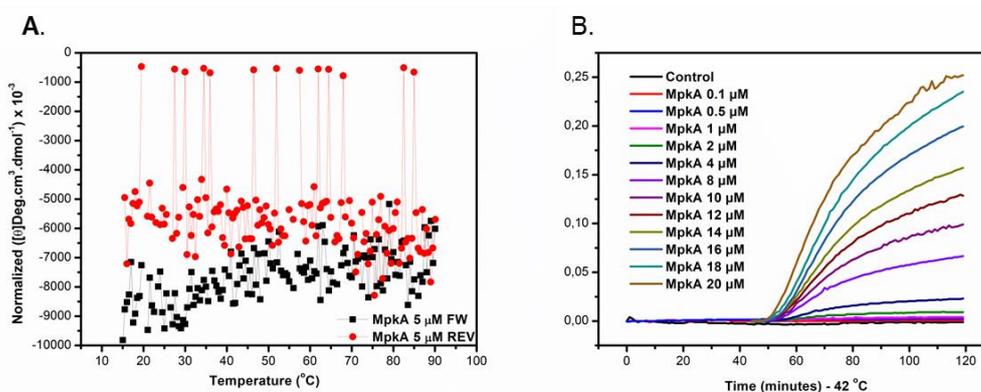


Figura 80: Ensaio de estabilidade térmica da MpkA de *A. fumigatus*. (A) Desenvolvimento térmico da proteína MpkA de *A. fumigatus* monitorado pelo sinal de CD a 220 nm. (B) Ensaio de agregação da proteína MpkA a 42 $^{\circ}\text{C}$ monitorado pela absorvância a 320 nm.

Conforme demonstrado na figura 80B, a proteína MpkA de *A. fumigatus* teve a sua agregação induzida pela temperatura. Como foi demonstrado com dados deste trabalho, MpkA de *A. fumigatus* interagiu *in vivo* (figura 62) e *in vitro* (figura 68) com Hsp90, e através do teste de prevenção da agregação da MDH foi possível observar que a Hsp90 de *A. fumigatus* possui atividade chaperona (figura 73). Desta forma, decidiu-se verificar se a Hsp90 possui atividade chaperona especificamente sobre a proteína MpkA, o que seria uma evidência adicional da interação dessas duas proteínas. Os resultados mostraram que a Hsp90 possui atividade chaperona sobre a proteína quinase MpkA, pois ela foi capaz de prevenir a agregação da MpkA mesmo em baixas proporções (razão MpkA::Hsp90 de 2:1) e a prevenção da agregação foi

proporcional ao aumento da razão de Hsp90 em relação à MpkA, chegando a uma prevenção de 70 % da MpkA na razão MpkA::Hsp90 1:5 (figura 81 A-B). Este resultado reitera a interação entre Hsp90 e MpkA observada nas análises de imunoprecipitação e far WB.

A análise da prevenção da agregação da MpkA foi feita por espalhamento de luz a 320 nm durante 4 horas a 42 °C utilizando 10 µM de MpkA, incubada com 1 µM, 2,5 µM, 5 µM, 7,5 µM, 10 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM e 50 µM de Hsp90. A agregação da proteína Hsp90 foi monitorada e foi possível observar a ausência de agregação em todas as concentrações testadas (figura 81A-B). Como controle do experimento foi utilizada a proteína BSA que foi incubada juntamente com a proteína MpkA nas mesmas concentrações que a Hsp90, onde foi possível observar que a BSA não preveniu a agregação da proteína MpkA (APÊNDICE L, figura L1).

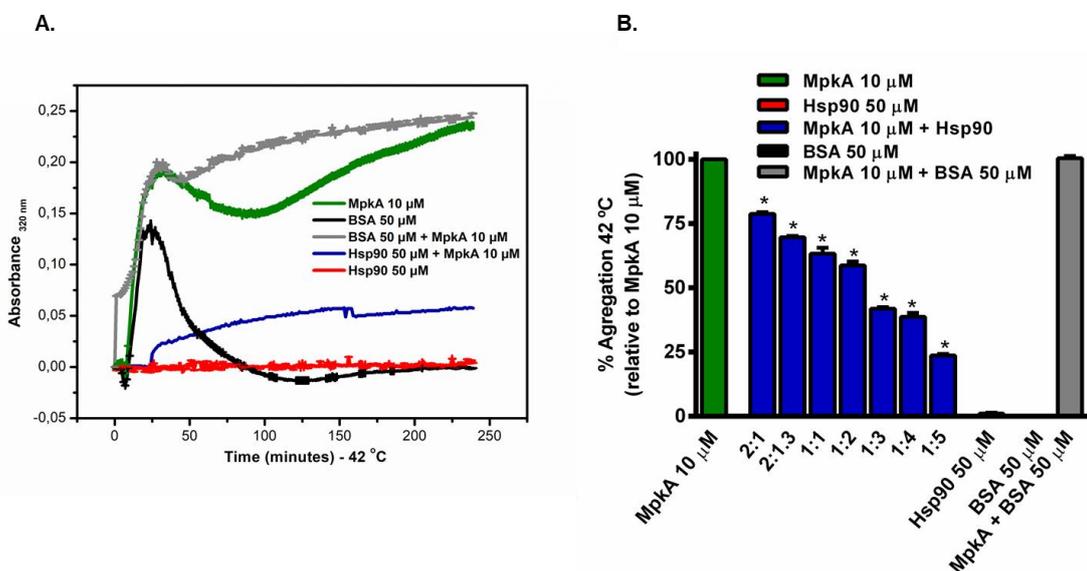


Figura 81: Atividade chaperona Hsp90 de *A. fumigatus* com a proteína MpkA de *A. fumigatus*. (A) A análise da prevenção da agregação da MpkA (10 µM) pela Hsp90 (50 µM) foi feita por espalhamento de luz a 320 nm durante 4 horas a 42 °C. (B) Porcentagens de agregação da MpkA 10 µM calculadas na presença de, 5 µM (2:1), 7,5 µM (2:1.3), 10 µM (1:1), 20 µM (1:2), 30 µM (1:3), 40 µM (1:4) e 50 µM (1:5) de Hsp90. Os valores de agregação foram calculados considerando a agregação máxima da MpkA como 100 %.

4.4 Discussão

A infecção por *A. fumigatus* começa com a inalação de conídios, que em indivíduos imunocomprometidos resulta no estabelecimento de conídios no pulmão, germinação e invasão do tecido pulmonar circundante. Levando em conta o ambiente do hospedeiro, a germinação e crescimento conidial requer a ativação da detecção de nutrientes, absorção e aquisição de nutrientes e vias biossintéticas, essenciais para a patogênese do *A. fumigatus* [237]. Embora a aspergilose pulmonar invasiva possa ser atribuída a uma combinação do estado imunológico do paciente e às características biológicas do fungo, acredita-se que algumas características fisiológicas de *A. fumigatus* permitem que ele seja um patógeno oportunista eficiente [17]. Entre essas características, sua capacidade de sobreviver a altas temperaturas é essencial para a patogenicidade, pois ele tolera temperaturas maiores que 50 °C e sua temperatura ideal de crescimento é de cerca de 37 °C [238]. Por isso, é plausível que os mecanismos de termotolerância envolvam a expressão de genes de resistência ao estresse que, ao mesmo tempo, conferem propriedades únicas de virulência ao fungo [239]. A CWIP é uma das vias que está relacionada à termotolerância em diversos organismos fúngicos. Em *S. cerevisiae*, a ativação defeituosa da proteína quinase Slt2 (ortólogo de MpkA em *A. fumigatus*) leva à redução ou mesmo à não expressão de genes relacionados a integridade da parede celular em temperaturas mais elevadas e, portanto, a uma parede celular enfraquecida a elevadas temperaturas [102]. O reforço da integridade da parede celular requerido durante o crescimento em altas temperaturas se dá principalmente através da estimulação da via Pkc1-MAPK, embora a resposta geral ao estresse dirigida por Msn2/4 e uma resposta da via Ca²⁺/calcineurina mediada por Crz1 também estejam envolvidas [45, 240, 241]. Em *C. albicans*, a cascata MAPK é um mediador chave da célula dependente de Pkc1 que desempenha um papel dominante na resposta ao choque térmico, pois a redução da expressão de Hsp90 resulta na desestabilização da MAP quinase Mck1, bloqueando a sinalização de PkC1 [114]. Aqui, também foi possível observar a relação da CWIP de *A. fumigatus* com a resposta ao choque térmico. Todas as linhagens simples ou duplo mutantes de genes da

CWIP apresentaram uma redução significativa do crescimento radial em relação à linhagem selvagem de *A. fumigatus*, além de uma redução significativa da viabilidade após 24 horas de exposição a 45 °C e a 50 °C. Estes resultados são acompanhados da redução significativa da fosforilação da MAP quinase MpkA nas linhagens $\Delta rlmA$ e $pkcA^{G579R}$ após o choque térmico a 48 °C, e além disso, análises da expressão dos genes que compõem a CWIP PkcA, MpkA e RlmA, apresentaram aumento dos níveis de mRNA na linhagem selvagem de *A. fumigatus* após o choque térmico a 37 °C e a 48 °C. Em contraste, observou-se um comportamento oposto nos mutantes da CWIP. Além disso, os genes responsáveis pela resposta ao choque térmico escolhidos para a análise da expressão gênica foram induzidos na linhagem selvagem de *A. fumigatus*, porém nos mutantes da CWIP estes mesmos genes tiveram uma grande redução dos níveis de transcritos.

Nos fungos, a função de Hsp90 foi diretamente ligada à manutenção da parede celular ao cooperar nos mecanismos de compensação do estresse, ditados por diferentes cascatas de sinalização ativadas quando a célula é desafiada com diferentes tipos de estresse da parede celular, como os causados pela terapia antifúngica [110-112]. Em *C. neoformans*, Hsp90 migra do citosol e se acumula na parede celular após o choque térmico [242], e o mesmo ocorre em *A. fumigatus*, porém na presença do estresse de parede celular [110]. Após o choque térmico, o fator de transcrição Hsf1 livre induz a transcrição de *hsp90 de novo* levando a uma maior produção de Hsp90. Um circuito regulatório automático através do qual Hsf1 ativa a expressão de Hsp90 é um evento chave da adaptação ao choque térmico em fungos, enquanto o excesso de Hsp90 interage e regula negativamente a quantidade de Hsf1 [112, 113]. A interrupção no circuito auto regulatório Hsf1-Hsp90 afeta seriamente as respostas ao choque térmico, termotolerância, integridade da parede celular, virulência e outros processos celulares em muitas espécies de fungos [112]. Embora as proteínas que participam da CWIP não sejam essenciais para a ativação do fator de transcrição Hsf1, mutações em qualquer um dos genes que codificam proteínas relacionadas com a CWIP aumentam a sensibilidade ao estresse por temperatura ou a inibidores farmacológicos de Hsp90 [29, 112, 114]. Neste trabalho, a perda de função de PkcA, MpkA e

RlmA em *A. fumigatus* causou diminuição da tolerância aos inibidores de Hsp90, como radicicol e geldanamicina. Este resultado vem acompanhado de um aumento da expressão proteica de Hsp90 durante o choque térmico nos mutantes da CWIP *pkcA*^{G579R}, Δ *mpkA* e Δ *rlmA*, estabelecendo uma relação entre as proteínas da CWIP e o circuito regulatório Hsf1-Hsp90 em *A. fumigatus*, ou seja, o fator de transcrição Hsf1 atua na CWIP, aumentando a transcrição de Hsp90 quando há comprometimento na ativação desta via para a manutenção de sua funcionalidade. Da mesma forma, a perturbação da função de Hsp90 por depleção genética afeta a integridade da parede celular e causa maior sensibilidade a uma grande quantidade de agentes prejudiciais à parede celular [110]. Assim, este efeito pode ser derivado da falta de estabilização de suas proteínas clientes residentes na CWIP, PkcA, MpkA e talvez RlmA, conforme mostram nossos dados de interação física.

Em uma ampla análise de interações de Hsp90 em *S. cerevisiae*, observou-se que esta interage fisicamente com Slt2 (homólogo de MpkA em *A. fumigatus*) [243]. As proteínas Mkc1 (o homólogo de Mpk1 de levedura e de MpkA de *A. fumigatus*) e Pkc1 interagem geneticamente com Hsp90 em *C. albicans* durante o estresse de temperatura a 41 °C [116]. Além disso, a Hsp90 também interage geneticamente com dois componentes da CWIP (Mkc1 e Mkk2) durante o estresse causado pela tunicamicina [116]. Aqui, observou-se que PkcA e MpkA, assim como em *S. cerevisiae* e *C. albicans*, interagem com a Hsp90 em *A. fumigatus*, sendo que pela primeira vez foi demonstrada a atividade chaperona de prevenção da agregação da proteína MpkA pela interação com a Hsp90 em um organismo fúngico. A interação observada entre PkcA e MpkA com a Hsp90 na presença do estresse de parede celular e choque térmico, e adicionalmente por meio das análises de interação entre proteínas recombinantes permitiu observar que estas proteínas interagem independente do estado biológico da célula fúngica, e que a mutação G579R no domínio regulatório de *A. fumigatus* [29] é um possível sítio de interação da Hsp90 com a PkcA, de forma que esta interação não foi detectada na proteína recombinante que possuía esta mutação.

Pela primeira vez foi demonstrada a interação do fator de transcrição da CWIP RlmA com a Hsp90. Esta interação se deu na presença do choque

térmico e estresse de parede celular, sendo que há um aumento desta interação na presença do estresse de temperatura. Porém, devido ao fato de RlmA interagir com MpkA, não é possível afirmar se esta interação é um efeito direto de RlmA. Os resultados de interação com a chaperona molecular Hsp90 foram agrupados em um esquema (figura 82) com o objetivo de mostrar a relação entre *pkcA*, *mpkA*, e *rlmA* e a resposta ao choque térmico em *A. fumigatus*, bem como o papel da Hsp90 na CWIP. Este cenário em *A. fumigatus* reforça que Hsp90 é um alvo atraente para a inibição do crescimento de fungos através do uso de monoterapia ou terapia combinada com antifúngicos, principalmente as equinocandinas, as quais inibem a enzima $\beta(1,3)$ glucana síntase, causando estresse de parede celular [21].

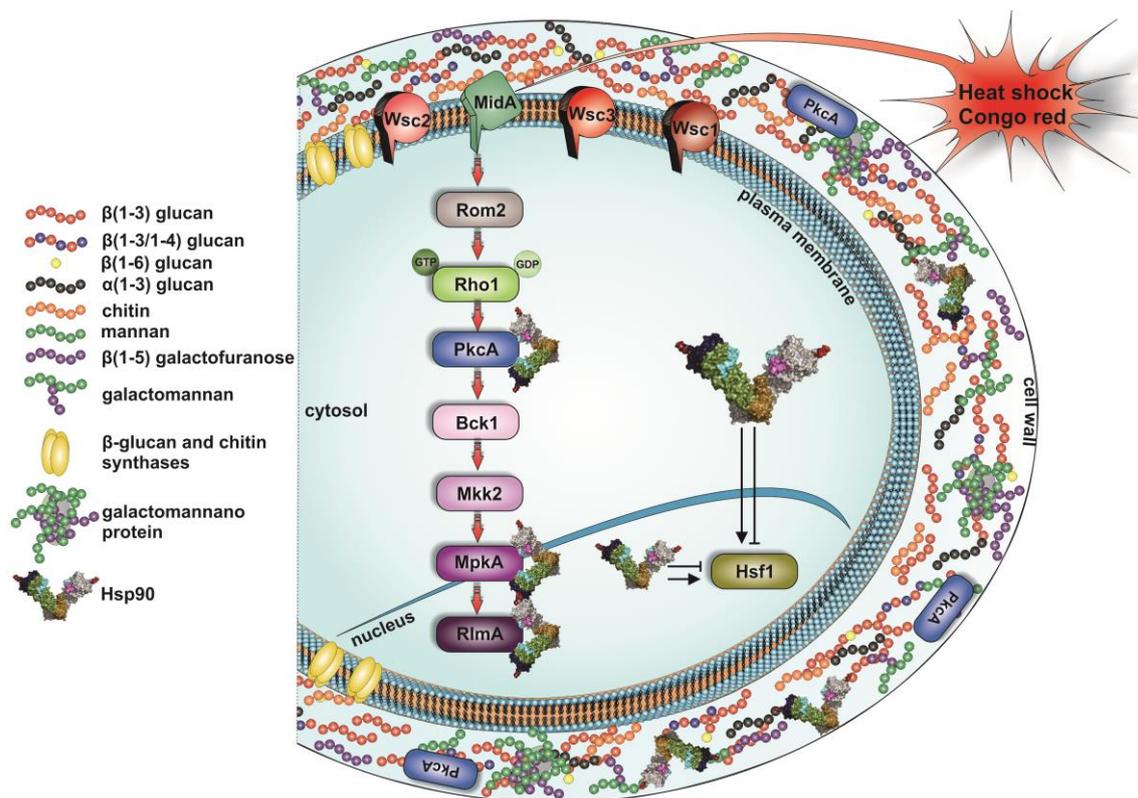


Figura 82: As proteínas PkcA, MpkA e RlmA da CWIP interagem com Hsp90 durante o estresse de temperatura e parede celular em *A. fumigatus*. Esquema demonstrando a relação entre PkcA, MpkA, RlmA e Hsp90 na resposta ao choque térmico e estresse de parede celular causado por CR em *A. fumigatus*, bem como o papel da Hsp90 na CWIP. Hsp90 está localizada no citoplasma em condições basais e responde ao choque térmico e ao estresse da parede celular. Sob o estresse por calor, Hsp90 migra para o núcleo para ativar a transcrição ou se acumula na parede celular. A função concomitante da CWIP pode ser observada pela localização constitutiva de PkcA na ponta das hifas e nas áreas de ramificação e septo, como descrito previamente por Rocha et. al., 2017 (aceito para publicação). Estrutura da parede celular baseada em Abad, Fernandez-Molina [17].

Os espectros de CD e as análises de fluorescência do triptofano mostraram que a proteína Hsp90 foi produzida enovelada, e que os triptofanos presentes na estrutura da Hsp90 estão em sua estrutura interna. A Hsp90 de *A. fumigatus* assim como a Hsp90 de *S. cerevisiae*, *Leishmania brasilienses* e de humano são constituídas tanto por hélices α quanto por folhas β [235, 244-246]. Como observado na Hsp90 de *L. brasilienses* [235], o perfil de eluição da Hsp90 de *A. fumigatus* é condizente com o de um oligômero, provavelmente um dímero assimétrico. Além disso, a Hsp90 de *A. fumigatus* apresentou atividade chaperona na proteína MDH na ausência de ATP, sugerindo que este não é essencial para a atividade chaperona da Hsp90 de *A. fumigatus*, e o mesmo foi observado em *L. brasilienses*, em ensaios de atividade chaperona com a proteína citrato sintase, um outro cliente conhecido de Hsp90 [235].

A Hsp90 de *A. fumigatus* apresentou uma alta afinidade para o ATP (KD = 179 μ M), três vezes maior que a descrita em *C. neoformans* (KD = 497,05 μ M) [242], 1,5 vezes menor que a observada em *L. brasilienses* (KD = 120 μ M) [235], e similar ao reportado *Plasmodium falciparium* (KD = 168 μ M) [247]. A afinidade observada para o ADP (KD = 123 μ M) foi levemente maior que a observada em *L. brasilienses* (KD = 160 μ M) [235], portanto a Hsp90 de *A. fumigatus*, possui maior afinidade ao ADP que ao ATP. Este trabalho apresentou o primeiro estudo estrutural da Hsp90 em organismos fúngicos patogênicos, e salvo o trabalho apresentado por Chatterjee and Tatu [242] que demonstrou apenas a atividade ATPásica desta proteína em *C. neoformans*, este também é o primeiro a caracterizar bioquimicamente a Hsp90 em fungos patogênicos.

Os espectros de CD e as análises de fluorescência do triptofano mostraram que a proteína MpkA foi produzida na sua forma enovelada, e que os 4 triptofanos presentes na estrutura desta proteína estão parcialmente protegidos do solvente. A MpkA de *A. fumigatus* assim como a MpkA de *S. cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana* e humana, as quais apresentaram respectivamente 50 %, 52 % e 51 % [248] de identidade com a MpkA de *A. fumigatus*, são monômeros alongados e com estrutura secundária tipo hélice α e folha β [249-251]. Este estudo também permitiu verificar que MpkA de *A. fumigatus* possui estabilidade térmica da sua estrutura secundária, e que a

proteína MpkA se desenrola completamente como um único domínio na presença da guanidina HCl. Apesar desta proteína possuir estabilidade térmica quanto à sua estrutura secundária, ela formou agregados em elevada temperatura, o que permitiu as análises da atividade chaperona da Hsp90, a qual fortemente previniu tal agregação.

Em conclusão, estes resultados são evidências de que a CWIP participa ativamente da regulação da termotolerância em *A. fumigatus*, e a atividade chaperona da Hsp90 é essencial para a manutenção desta via em resposta ao choque térmico e também ao estresse de parede celular, visto que as principais proteínas que compõem esta via, PkcA, MpkA e possivelmente o fator de associado RlmA, interagem com esta chaperona molecular. A caracterização das estruturas das proteínas desta via, bem como da Hsp90 serão um passo essencial para desvendar como se dá esta interação.

5.0 Conclusões

5.0 Conclusões

Uma caracterização detalhada do fator de transcrição da CWIP foi realizada nesta tese, demonstrando o papel de RlmA na manutenção da integridade da parede celular, tolerância ao dano oxidativo, desenvolvimento assexuado e virulência de *A. fumigatus*. Foi demonstrado também o papel dos fatores de transcrição RlmA e SebA na biossíntese da FqC, um importante metabólito secundário produzido pelos conídios de *A. fumigatus*. Adicionalmente foi demonstrado o papel da CWIP na regulação da termotolerância em *A. fumigatus*, e a interação dos principais componentes desta via PkcA, MpkA e RlmA, com a Hsp90, uma importante chaperona envolvida na termotolerância em patógenos fúngicos. Para melhor entendimento de como a CWIP interage com esta chaperona, as proteínas Hsp90 e MpkA de *A. fumigatus* foram caracterizadas. Os mais relevantes progressos obtidos nesta tese levam as seguintes conclusões:

- RlmA possui um amplo papel na manutenção da integridade da parede celular de *A. fumigatus* e a deleção deste fator de transcrição leva à redução do crescimento vegetativo, das taxas de germinação, aumento da sensibilidade a agentes antifúngicos, e defeitos relacionados à manutenção e integridade da parede celular.
- RlmA age em conjunto com PkcA e MpkA na via CWIP. Como consequência, a perda de função de *rlmA* leva a alterações na expressão de genes que codificam proteínas relacionadas com a parede celular. RlmA regula positivamente a fosforilação de MpkA e é induzido tanto ao nível proteico como transcricional durante o estresse da parede celular.
- A inativação defeituosa da CWIP no mutante $\Delta rlmA$ está associada à perda da virulência em modelo murino neutropênico de aspergilose pulmonar invasiva e a linhagem mutante $\Delta rlmA$.

- RImA em *A. fumigatus* afeta a capacidade do fungo para lidar com dano oxidativo, afetando a transcrição de genes relacionados à resposta ao estresse oxidativo.
- A CWIP atua na regulação do desenvolvimento assexuado em *A. fumigatus*, e a sua perfeita ativação é necessária para a conidiação e o desenvolvimento normal de *A. fumigatus*, além disso RImA regula a transcrição dos reguladores do desenvolvimento assexuado em *A. fumigatus*, *flbB* e *flbC*, e também *abaA* e *brlA*, genes chave para o desenvolvimento em *A. fumigatus*.
- A CWIP, que culmina no fator de transcrição RImA é responsável pela regulação da biossíntese de Fq em *A. fumigatus*, e RImA regula a transcrição dos genes que compõem os *cluster* biossintético de Fqs *fmqA-B-C-D*, regulando positivamente a biossíntese da FqC em *A. fumigatus*.
- O fator de transcrição SebA é responsável pela regulação da biossíntese de Fq em *A. fumigatus*; este regula a transcrição dos genes que compõem os *cluster* biossintético de Fqs *fmqA-B-C-D-E*, regulando negativamente a biossíntese da FqC em *A. fumigatus*.
- A FqC demonstrou ser potencialmente tóxica para *A. fumigatus* e possui um impacto sobre a resposta imune no hospedeiro, pois foi capaz de estimular a BMDMs para aumentar a secreção de TNF- α e IL-6, além de induzir a formação de poros em BMDMs. Adicionalmente esta também pode servir como um composto de defesa contra outros microrganismos ou predadores do solo.
- A perda da função parcial de *pkcA* ou a perda total da função de *mpkA* e *rlmA* promovem uma menor resistência ao estresse de temperatura e interferem na expressão de genes de choque térmico.

- A perda da função de PkcA, MpkA e RimA em *A. fumigatus* causou diminuição da tolerância aos inibidores de Hsp90 o que foi comprovado pela interação física entre a Hsp90 e PkcA⁴⁰⁹⁻¹¹¹⁶ ou MpkA.
- A proteína Hsp90 foi produzida enovelada, na forma de um oligômero, provavelmente um dímero assimétrico, com elementos de estrutura secundária do tipo hélice α e folha β , e, além disso, a Hsp90 de *A. fumigatus* apresentou atividade chaperona em clientes clássicos como a proteína MDH, e a capacidade de ligação a ATP e ADP, assim como observado nas Hsp90s de outros organismos.
- A proteína MpkA foi produzida na sua forma enovelada como monômero, com elementos de estrutura secundária do tipo hélice α e folha β ; além disso essa proteína possui uma alta estabilidade térmica da sua estrutura secundária, porém forma agregados quando exposta a elevadas temperaturas. A Hsp90 é capaz de impedir esta agregação *in vitro*.

6.0 Referências bibliográficas

6.0 Referências bibliográficas

1. Kwon-Chung, K.J. and J.A. Sugi, *Aspergillus fumigatus--what makes the species a ubiquitous human fungal pathogen?* PLoS Pathog, 2013. **9**(12): p. e1003743.
2. Latge, J.P., *Aspergillus fumigatus and aspergillosis*. Clin Microbiol Rev, 1999. **12**(2): p. 310-50.
3. Chazalet, V., et al., *Molecular typing of environmental and patient isolates of Aspergillus fumigatus from various hospital settings*. J Clin Microbiol, 1998. **36**(6): p. 1494-500.
4. Hospenthal, D.R., K.J. Kwon-Chung, and J.E. Bennett, *Concentrations of airborne Aspergillus compared to the incidence of invasive aspergillosis: lack of correlation*. Med Mycol, 1998. **36**(3): p. 165-8.
5. Rhodes, J.C., et al., *Identification of genes of Aspergillus fumigatus up-regulated during growth on endothelial cells*. Med Mycol, 2001. **39**(3): p. 253-60.
6. Heinekamp, T., et al., *Interference of Aspergillus fumigatus with the immune response*. Semin Immunopathol, 2015. **37**(2): p. 141-52.
7. Palousova, D., et al., *[Invasive fungal infections in immunocompromised patients with focus on aspergillosis and its causative agents]*. Klin Mikrobiol Infekc Lek, 2012. **18**(4): p. 96-101.
8. Balloy, V., et al., *Differences in patterns of infection and inflammation for corticosteroid treatment and chemotherapy in experimental invasive pulmonary aspergillosis*. Infect Immun, 2005. **73**(1): p. 494-503.
9. Gersuk, G.M., et al., *Dectin-1 and TLRs permit macrophages to distinguish between different Aspergillus fumigatus cellular states*. J Immunol, 2006. **176**(6): p. 3717-24.
10. Steele, C., et al., *The beta-glucan receptor dectin-1 recognizes specific morphologies of Aspergillus fumigatus*. PLoS Pathog, 2005. **1**(4): p. e42.
11. Kennedy, A.D., et al., *Dectin-1 promotes fungicidal activity of human neutrophils*. Eur J Immunol, 2007. **37**(2): p. 467-78.
12. Verwer, P.E., et al., *Reshuffling of Aspergillus fumigatus cell wall components chitin and beta-glucan under the influence of caspofungin or nikkomycin Z alone or in combination*. Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(3): p. 1595-8.
13. Park, S.J. and B. Mehrad, *Innate immunity to Aspergillus species*. Clin Microbiol Rev, 2009. **22**(4): p. 535-51.
14. Denning, M.F., *Epidermal keratinocytes: regulation of multiple cell phenotypes by multiple protein kinase C isoforms*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(7): p. 1141-6.
15. Rippon, J.W., et al., *Disseminated cutaneous and peritoneal hyalohyphomycosis caused by Fusarium species: three cases and review of the literature*. Mycopathologia, 1988. **101**(2): p. 105-11.
16. Casadevall, A. and L.A. Pirofski, *Immunoglobulins in defense, pathogenesis, and therapy of fungal diseases*. Cell Host Microbe, 2012. **11**(5): p. 447-56.
17. Abad, A., et al., *What makes Aspergillus fumigatus a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis*. Rev Iberoam Micol, 2010. **27**(4): p. 155-82.
18. Steinbach, W.J., et al., *Clinical epidemiology of 960 patients with invasive aspergillosis from the PATH Alliance registry*. J Infect, 2012. **65**(5): p. 453-64.
19. Kousha, M., R. Tadi, and A.O. Soubani, *Pulmonary aspergillosis: a clinical review*. Eur Respir Rev, 2011. **20**(121): p. 156-74.
20. Herbrecht, R., et al., *Risk stratification for invasive aspergillosis in immunocompromised patients*. Ann N Y Acad Sci, 2012. **1272**: p. 23-30.
21. Perlin, D.S., *Current perspectives on echinocandin class drugs*. Future Microbiol, 2011. **6**(4): p. 441-57.
22. Paiva, J.A., et al., *Drivers and Impact of Antifungal Therapy in Critically Ill Patients with Aspergillus-Positive Respiratory Tract Cultures*. Int J Antimicrob Agents, 2017.
23. Dichtl, K., et al., *Deciphering cell wall integrity signalling in Aspergillus fumigatus: identification and functional characterization of cell wall stress sensors and relevant Rho GTPases*. Mol Microbiol, 2012. **83**(3): p. 506-19.
24. Beauvais, A. and J.P. Latge, *Membrane and cell wall targets in Aspergillus fumigatus*. Drug Resist Updat, 2001. **4**(1): p. 38-49.
25. Bom, V.L., et al., *Aspergillus fumigatus sitA phosphatase homologue is important for adhesion, cell wall integrity, biofilm formation and virulence*. Eukaryot Cell, 2015.

26. Gastebois, A., et al., *Aspergillus fumigatus*: cell wall polysaccharides, their biosynthesis and organization. *Future Microbiol*, 2009. **4**(5): p. 583-95.
27. Jain, R., et al., *The MAP kinase MpkA controls cell wall integrity, oxidative stress response, gliotoxin production and iron adaptation in Aspergillus fumigatus*. *Mol Microbiol*, 2011. **82**(1): p. 39-53.
28. Malavazi, I., G.H. Goldman, and N.A. Brown, *The importance of connections between the cell wall integrity pathway and the unfolded protein response in filamentous fungi*. *Brief Funct Genomics*, 2014.
29. Rocha, M.C., et al., *The Aspergillus fumigatus pkcA G579R 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*, 2015. **10**(8): p. e0135195.
30. Valiante, V., et al., *The mitogen-activated protein kinase MpkA of Aspergillus fumigatus regulates cell wall signaling and oxidative stress response*. *Fungal Genet Biol*, 2008. **45**(5): p. 618-27.
31. Valiante, V., et al., *The Aspergillus fumigatus cell wall integrity signaling pathway: drug target, compensatory pathways, and virulence*. *Front Microbiol*, 2015. **6**: p. 325.
32. Dichtl, K., S. Samantaray, and J. Wagener, *Cell wall integrity signalling in human pathogenic fungi*. *Cell Microbiol*, 2016. **18**(9): p. 1228-38.
33. Bernard, M. and J.P. Latge, *Aspergillus fumigatus cell wall: composition and biosynthesis*. *Med Mycol*, 2001. **39 Suppl 1**: p. 9-17.
34. Latge, J.P., A. Beauvais, and G. Chamilos, *The Cell Wall of the Human Fungal Pathogen Aspergillus fumigatus: Biosynthesis, Organization, Immune Response, and Virulence*. *Annu Rev Microbiol*, 2017.
35. Dirr, F., et al., *AfMkk2 is required for cell wall integrity signaling, adhesion, and full virulence of the human pathogen Aspergillus fumigatus*. *Int J Med Microbiol*, 2010. **300**(7): p. 496-502.
36. Levin, D.E., *Regulation of cell wall biogenesis in Saccharomyces cerevisiae: the cell wall integrity signaling pathway*. *Genetics*, 2011. **189**(4): p. 1145-75.
37. Piccirillo, S., et al., *Cell Differentiation and Spatial Organization in Yeast Colonies: Role of Cell-Wall Integrity Pathway*. *Genetics*, 2015. **201**(4): p. 1427-38.
38. Dichtl, K., et al., *Farnesol misplaces tip-localized Rho proteins and inhibits cell wall integrity signalling in Aspergillus fumigatus*. *Mol Microbiol*, 2010. **76**(5): p. 1191-204.
39. Dichtl, K., et al., *Aspergillus fumigatus devoid of cell wall beta-1,3-glucan is viable, massively sheds galactomannan and is killed by septum formation inhibitors*. *Mol Microbiol*, 2015. **95**(3): p. 458-71.
40. Valiante, V., et al., *The MpkA MAP kinase module regulates cell wall integrity signaling and pyomelanin formation in Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol*, 2009. **46**(12): p. 909-18.
41. Albrecht, D., et al., *Integrative analysis of the heat shock response in Aspergillus fumigatus*. *BMC Genomics*, 2010. **11**: p. 32.
42. Rocha, M.C., et al., *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*, 2015. **10**(8): p. e0135195.
43. Kamada, Y., et al., *The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of Saccharomyces cerevisiae mediates a novel aspect of the heat shock response*. *Genes Dev*, 1995. **9**(13): p. 1559-71.
44. Kock, C., Y.F. Dufrene, and J.J. Heinisch, *Up against the wall: is yeast cell wall integrity ensured by mechanosensing in plasma membrane microdomains?* *Appl Environ Microbiol*, 2015. **81**(3): p. 806-11.
45. Lee, K.S. and D.E. Levin, *Dominant mutations in a gene encoding a putative protein kinase (BCK1) bypass the requirement for a Saccharomyces cerevisiae protein kinase C homolog*. *Mol Cell Biol*, 1992. **12**(1): p. 172-82.
46. Hohmann, S., *Osmotic adaptation in yeast--control of the yeast osmolyte system*. *Int Rev Cytol*, 2002. **215**: p. 149-87.
47. Dague, E., et al., *An atomic force microscopy analysis of yeast mutants defective in cell wall architecture*. *Yeast*, 2010. **27**(8): p. 673-84.
48. Fujioka, T., et al., *MpkA-Dependent and -independent cell wall integrity signaling in Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell*, 2007. **6**(8): p. 1497-510.

49. Bermejo, C., et al., *Characterization of sensor-specific stress response by transcriptional profiling of wsc1 and mid2 deletion strains and chimeric sensors in Saccharomyces cerevisiae*. OMICS, 2010. **14**(6): p. 679-88.
50. Richthammer, C., et al., *RHO1 and RHO2 share partially overlapping functions in the regulation of cell wall integrity and hyphal polarity in Neurospora crassa*. Mol Microbiol, 2012. **85**(4): p. 716-33.
51. Samantaray, S., et al., *Role of the guanine nucleotide exchange factor Rom2 in cell wall integrity maintenance of Aspergillus fumigatus*. Eukaryot Cell, 2013. **12**(2): p. 288-98.
52. Kwon, M.J., et al., *Functional characterization of Rho GTPases in Aspergillus niger uncovers conserved and diverged roles of Rho proteins within filamentous fungi*. Mol Microbiol, 2011. **79**(5): p. 1151-67.
53. Schmitz, H.P. and J.J. Heinisch, *Evolution, biochemistry and genetics of protein kinase C in fungi*. Curr Genet, 2003. **43**(4): p. 245-54.
54. Colabardini, A.C., et al., *Protein kinase C overexpression suppresses calcineurin-associated defects in Aspergillus nidulans and is involved in mitochondrial function*. PLoS One, 2014. **9**(8): p. e104792.
55. Jung, U.S. and D.E. Levin, *Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway*. Mol Microbiol, 1999. **34**(5): p. 1049-57.
56. Levin, D.E., *Cell wall integrity signaling in Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Mol Biol Rev, 2005. **69**(2): p. 262-91.
57. Schwarz-Sommer, Z., et al., *Genetic Control of Flower Development by Homeotic Genes in Antirrhinum majus*. Science, 1990. **250**(4983): p. 931-6.
58. Dodou, E. and R. Treisman, *The Saccharomyces cerevisiae MADS-box transcription factor Rlm1 is a target for the Mpk1 mitogen-activated protein kinase pathway*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(4): p. 1848-59.
59. Watanabe, Y., K. Irie, and K. Matsumoto, *Yeast RLM1 encodes a serum response factor-like protein that may function downstream of the Mpk1 (Slf2) mitogen-activated protein kinase pathway*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(10): p. 5740-9.
60. Garcia, R., et al., *The global transcriptional response to transient cell wall damage in Saccharomyces cerevisiae and its regulation by the cell integrity signaling pathway*. J Biol Chem, 2004. **279**(15): p. 15183-95.
61. Kovacs, Z., et al., *Effect of cell wall integrity stress and RlmA transcription factor on asexual development and autolysis in Aspergillus nidulans*. Fungal Genet Biol, 2013. **54**: p. 1-14.
62. Timberlake, W.E., *Temporal and spatial controls of Aspergillus development*. Curr Opin Genet Dev, 1991. **1**(3): p. 351-7.
63. Mirabito, P.M., T.H. Adams, and W.E. Timberlake, *Interactions of three sequentially expressed genes control temporal and spatial specificity in Aspergillus development*. Cell, 1989. **57**(5): p. 859-68.
64. Etxebeeste, O., et al., *Basic-zipper-type transcription factor FlbB controls asexual development in Aspergillus nidulans*. Eukaryot Cell, 2008. **7**(1): p. 38-48.
65. Li, N., et al., *Involvement of an SRF-MADS protein McmA in regulation of extracellular enzyme production and asexual/sexual development in Aspergillus nidulans*. Biosci Biotechnol Biochem, 2016. **80**(9): p. 1820-8.
66. Park, B.C., Y.H. Park, and H.M. Park, *Activation of chsC transcription by AbaA during asexual development of Aspergillus nidulans*. FEMS Microbiol Lett, 2003. **220**(2): p. 241-6.
67. Yu, J.H., *Regulation of Development in Aspergillus nidulans and Aspergillus fumigatus*. Mycobiology, 2010. **38**(4): p. 229-37.
68. Alkhayyat, F., S. Chang Kim, and J.H. Yu, *Genetic control of asexual development in aspergillus fumigatus*. Adv Appl Microbiol, 2015. **90**: p. 93-107.
69. Mah, J.H. and J.H. Yu, *Upstream and downstream regulation of asexual development in Aspergillus fumigatus*. Eukaryot Cell, 2006. **5**(10): p. 1585-95.
70. Tao, L. and J.H. Yu, *AbaA and WetA govern distinct stages of Aspergillus fumigatus development*. Microbiology, 2011. **157**(Pt 2): p. 313-26.
71. Twumasi-Boateng, K., et al., *Transcriptional profiling identifies a role for BrlA in the response to nitrogen depletion and for StuA in the regulation of secondary metabolite clusters in Aspergillus fumigatus*. Eukaryot Cell, 2009. **8**(1): p. 104-15.
72. Sewall, T.C., C.W. Mims, and W.E. Timberlake, *abaA controls phialide differentiation in Aspergillus nidulans*. Plant Cell, 1990. **2**(8): p. 731-9.

73. Andrianopoulos, A. and W.E. Timberlake, *ATTS, a new and conserved DNA binding domain*. *Plant Cell*, 1991. **3**(8): p. 747-8.
74. Ni, M. and J.H. Yu, *A novel regulator couples sporogenesis and trehalose biogenesis in Aspergillus nidulans*. *PLoS One*, 2007. **2**(10): p. e970.
75. Calvo, A.M., et al., *Relationship between secondary metabolism and fungal development*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2002. **66**(3): p. 447-59, table of contents.
76. Calvo, A.M., *The VeA regulatory system and its role in morphological and chemical development in fungi*. *Fungal Genet Biol*, 2008. **45**(7): p. 1053-61.
77. Roze, L.V., A. Chanda, and J.E. Linz, *Compartmentalization and molecular traffic in secondary metabolism: a new understanding of established cellular processes*. *Fungal Genet Biol*, 2011. **48**(1): p. 35-48.
78. Muller, S., et al., *Comparison of transcriptome technologies in the pathogenic fungus Aspergillus fumigatus reveals novel insights into the genome and MpkA dependent gene expression*. *BMC Genomics*, 2012. **13**: p. 519.
79. Sugui, J.A., et al., *Gliotoxin is a virulence factor of Aspergillus fumigatus: gliP deletion attenuates virulence in mice immunosuppressed with hydrocortisone*. *Eukaryot Cell*, 2007. **6**(9): p. 1562-9.
80. Stanzani, M., et al., *Aspergillus fumigatus suppresses the human cellular immune response via gliotoxin-mediated apoptosis of monocytes*. *Blood*, 2005. **105**(6): p. 2258-65.
81. Lewis, R.E., et al., *Frequency and species distribution of gliotoxin-producing Aspergillus isolates recovered from patients at a tertiary-care cancer center*. *J Clin Microbiol*, 2005. **43**(12): p. 6120-2.
82. Richard, J.L., T.J. Dvorak, and P.F. Ross, *Natural occurrence of gliotoxin in turkeys infected with Aspergillus fumigatus, Fresenius*. *Mycopathologia*, 1996. **134**(3): p. 167-70.
83. Shin, K.S., Y.H. Kim, and J.H. Yu, *Proteomic analyses reveal the key roles of BrlA and AbaA in biogenesis of gliotoxin in Aspergillus fumigatus*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015. **463**(3): p. 428-33.
84. Gardiner, D.M. and B.J. Howlett, *Bioinformatic and expression analysis of the putative gliotoxin biosynthetic gene cluster of Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol Lett*, 2005. **248**(2): p. 241-8.
85. Scharf, D.H., et al., *Transannular disulfide formation in gliotoxin biosynthesis and its role in self-resistance of the human pathogen Aspergillus fumigatus*. *J Am Chem Soc*, 2010. **132**(29): p. 10136-41.
86. Schrettl, M., et al., *Self-protection against gliotoxin--a component of the gliotoxin biosynthetic cluster, GliT, completely protects Aspergillus fumigatus against exogenous gliotoxin*. *PLoS Pathog*, 2010. **6**(6): p. e1000952.
87. Lim, F.Y., et al., *Co-ordination between BrlA regulation and secretion of the oxidoreductase FmqD directs selective accumulation of fumiquinazoline C to conidial tissues in Aspergillus fumigatus*. *Cell Microbiol*, 2014. **16**(8): p. 1267-83.
88. Gauthier, T., et al., *Trypacidin, a spore-borne toxin from Aspergillus fumigatus, is cytotoxic to lung cells*. *PLoS One*, 2012. **7**(2): p. e29906.
89. Ames, B.D., X. Liu, and C.T. Walsh, *Enzymatic processing of fumiquinazoline F: a tandem oxidative-acylation strategy for the generation of multicyclic scaffolds in fungal indole alkaloid biosynthesis*. *Biochemistry*, 2010. **49**(39): p. 8564-76.
90. Ames, B.D., et al., *Complexity generation in fungal peptidyl alkaloid biosynthesis: oxidation of fumiquinazoline A to the heptacyclic hemiaminal fumiquinazoline C by the flavoenzyme Af12070 from Aspergillus fumigatus*. *Biochemistry*, 2011. **50**(40): p. 8756-69.
91. Ames, B.D. and C.T. Walsh, *Anthranilate-activating modules from fungal nonribosomal peptide assembly lines*. *Biochemistry*, 2010. **49**(15): p. 3351-65.
92. Cowen, L.E., *Hsp90 orchestrates stress response signaling governing fungal drug resistance*. *PLoS Pathog*, 2009. **5**(8): p. e1000471.
93. Cowen, L.E., *The fungal Achilles' heel: targeting Hsp90 to cripple fungal pathogens*. *Curr Opin Microbiol*, 2013. **16**(4): p. 377-84.
94. Panaretou, B., et al., *The Hsp90 of Candida albicans can confer Hsp90 functions in Saccharomyces cerevisiae: a potential model for the processes that generate immunogenic fragments of this molecular chaperone in C. albicans infections*. *Microbiology*, 1999. **145** (Pt 12): p. 3455-63.

95. Klinkert, B. and F. Narberhaus, *Microbial thermosensors*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(16): p. 2661-76.
96. Maresca, B. and G.S. Kobayashi, *Dimorphism in Histoplasma capsulatum: a model for the study of cell differentiation in pathogenic fungi*. Microbiol Rev, 1989. **53**(2): p. 186-209.
97. Taborda, C.P., et al., *Melanin as a virulence factor of Paracoccidioides brasiliensis and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview*. Mycopathologia, 2008. **165**(4-5): p. 331-9.
98. Noble, S.M., et al., *Systematic screens of a Candida albicans homozygous deletion library decouple morphogenetic switching and pathogenicity*. Nat Genet, 2010. **42**(7): p. 590-8.
99. Araujo, R. and A.G. Rodrigues, *Variability of germinative potential among pathogenic species of Aspergillus*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(9): p. 4335-7.
100. Sugiyama, K., et al., *Role of glutathione in heat-shock-induced cell death of Saccharomyces cerevisiae*. Biochem J, 2000. **352 Pt 1**: p. 71-8.
101. Nicholls, S., et al., *Activation of the heat shock transcription factor Hsf1 is essential for the full virulence of the fungal pathogen Candida albicans*. Fungal Genet Biol, 2011. **48**(3): p. 297-305.
102. Truman, A.W., et al., *In the yeast heat shock response, Hsf1-directed induction of Hsp90 facilitates the activation of the Slt2 (Mpk1) mitogen-activated protein kinase required for cell integrity*. Eukaryot Cell, 2007. **6**(4): p. 744-52.
103. Chen, Y.L., et al., *Convergent Evolution of Calcineurin Pathway Roles in Thermotolerance and Virulence in Candida glabrata*. G3 (Bethesda), 2012. **2**(6): p. 675-91.
104. Leach, M.D., et al., *Fungal Hsp90: a biological transistor that tunes cellular outputs to thermal inputs*. Nat Rev Microbiol, 2012. **10**(10): p. 693-704.
105. Kregel, K.C., *Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance*. J Appl Physiol (1985), 2002. **92**(5): p. 2177-86.
106. Tiwari, S., R. Thakur, and J. Shankar, *Role of Heat-Shock Proteins in Cellular Function and in the Biology of Fungi*. Biotechnol Res Int, 2015. **2015**: p. 132635.
107. Gong, Y., et al., *An atlas of chaperone-protein interactions in Saccharomyces cerevisiae: implications to protein folding pathways in the cell*. Mol Syst Biol, 2009. **5**: p. 275.
108. Verghese, J., et al., *Biology of the heat shock response and protein chaperones: budding yeast (Saccharomyces cerevisiae) as a model system*. Microbiol Mol Biol Rev, 2012. **76**(2): p. 115-58.
109. Borkovich, K.A., et al., *hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures*. Mol Cell Biol, 1989. **9**(9): p. 3919-30.
110. Lamoth, F., et al., *Heat shock protein 90 is required for conidiation and cell wall integrity in Aspergillus fumigatus*. Eukaryot Cell, 2012. **11**(11): p. 1324-32.
111. Singh, S.D., et al., *Hsp90 governs echinocandin resistance in the pathogenic yeast Candida albicans via calcineurin*. PLoS Pathog, 2009. **5**(7): p. e1000532.
112. Leach, M.D., et al., *Hsp90 orchestrates transcriptional regulation by Hsf1 and cell wall remodelling by MAPK signalling during thermal adaptation in a pathogenic yeast*. PLoS Pathog, 2012. **8**(12): p. e1003069.
113. Leach, M.D., et al., *Hsf1 and Hsp90 orchestrate temperature-dependent global transcriptional remodelling and chromatin architecture in Candida albicans*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 11704.
114. LaFayette, S.L., et al., *PKC signaling regulates drug resistance of the fungal pathogen Candida albicans via circuitry comprised of Mkc1, calcineurin, and Hsp90*. PLoS Pathog, 2010. **6**(8): p. e1001069.
115. Lamoth, F., P.R. Juvvadi, and W.J. Steinbach, *Heat shock protein 90 (Hsp90): A novel antifungal target against Aspergillus fumigatus*. Crit Rev Microbiol, 2016. **42**(2): p. 310-21.
116. Diezmann, S., et al., *Mapping the Hsp90 genetic interaction network in Candida albicans reveals environmental contingency and rewired circuitry*. PLoS Genet, 2012. **8**(3): p. e1002562.

117. Lamoth, F., et al., *Antifungal activity of compounds targeting the Hsp90-calcineurin pathway against various mould species*. J Antimicrob Chemother, 2015. **70**(5): p. 1408-11.
118. Lai, B.T., et al., *Quantitation and intracellular localization of the 85K heat shock protein by using monoclonal and polyclonal antibodies*. Mol Cell Biol, 1984. **4**(12): p. 2802-10.
119. MacLean, M. and D. Picard, *Cdc37 goes beyond Hsp90 and kinases*. Cell Stress Chaperones, 2003. **8**(2): p. 114-9.
120. Wayne, N. and D.N. Bolon, *Dimerization of Hsp90 is required for in vivo function. Design and analysis of monomers and dimers*. J Biol Chem, 2007. **282**(48): p. 35386-95.
121. Verma, S., et al., *Hsp90: Friends, clients and natural foes*. Biochimie, 2016. **127**: p. 227-40.
122. Hawle, P., et al., *Cdc37p is required for stress-induced high-osmolarity glycerol and protein kinase C mitogen-activated protein kinase pathway functionality by interaction with Hog1p and Sit2p (Mpk1p)*. Eukaryot Cell, 2007. **6**(3): p. 521-32.
123. Dollins, D.E., et al., *Structures of GRP94-nucleotide complexes reveal mechanistic differences between the hsp90 chaperones*. Mol Cell, 2007. **28**(1): p. 41-56.
124. Eckl, J.M., et al., *Cdc37 (cell division cycle 37) restricts Hsp90 (heat shock protein 90) motility by interaction with N-terminal and middle domain binding sites*. J Biol Chem, 2013. **288**(22): p. 16032-42.
125. Ishiwatari-Hayasaka, H., et al., *Interaction of neuropeptide Y and Hsp90 through a novel peptide binding region*. Biochemistry, 2003. **42**(44): p. 12972-80.
126. Karagoz, G.E. and S.G. Rudiger, *Hsp90 interaction with clients*. Trends Biochem Sci, 2015. **40**(2): p. 117-25.
127. Nariai, Y., et al., *Disruption of Heat Shock Protein 90 (Hsp90)-Protein Kinase Cdelta (PKCdelta) Interaction by (-)-Maackiain Suppresses Histamine H1 Receptor Gene Transcription in HeLa Cells*. J Biol Chem, 2015. **290**(45): p. 27393-402.
128. Mollapour, M. and L. Neckers, *Post-translational modifications of Hsp90 and their contributions to chaperone regulation*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1823**(3): p. 648-55.
129. Cowen, L.E., et al., *Genetic architecture of Hsp90-dependent drug resistance*. Eukaryot Cell, 2006. **5**(12): p. 2184-8.
130. Cowen, L.E. and S. Lindquist, *Hsp90 potentiates the rapid evolution of new traits: drug resistance in diverse fungi*. Science, 2005. **309**(5744): p. 2185-9.
131. Robbins, N., M.D. Leach, and L.E. Cowen, *Lysine deacetylases Hda1 and Rpd3 regulate Hsp90 function thereby governing fungal drug resistance*. Cell Rep, 2012. **2**(4): p. 878-88.
132. Lamoth, F., et al., *Identification of a key lysine residue in heat shock protein 90 required for azole and echinocandin resistance in Aspergillus fumigatus*. Antimicrob Agents Chemother, 2014. **58**(4): p. 1889-96.
133. Mollapour, M., et al., *Threonine 22 phosphorylation attenuates Hsp90 interaction with cochaperones and affects its chaperone activity*. Mol Cell, 2011. **41**(6): p. 672-81.
134. Martinez-Ruiz, A., et al., *S-nitrosylation of Hsp90 promotes the inhibition of its ATPase and endothelial nitric oxide synthase regulatory activities*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(24): p. 8525-30.
135. Retzlaff, M., et al., *Hsp90 is regulated by a switch point in the C-terminal domain*. EMBO Rep, 2009. **10**(10): p. 1147-53.
136. da Silva Ferreira, M.E., et al., *The akuB(KU80) mutant deficient for nonhomologous end joining is a powerful tool for analyzing pathogenicity in Aspergillus fumigatus*. Eukaryot Cell, 2006. **5**(1): p. 207-11.
137. Dinamarco, T.M., et al., *Molecular characterization of the putative transcription factor SebA involved in virulence in Aspergillus fumigatus*. Eukaryot Cell, 2012. **11**(4): p. 518-31.
138. Bruder Nascimento, A.C., et al., *Mitogen activated protein kinases SakA(HOG1) and MpkC collaborate for Aspergillus fumigatus virulence*. Mol Microbiol, 2016. **100**(5): p. 841-59.
139. Hartree, E.F., *Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response*. Anal Biochem, 1972. **48**(2): p. 422-7.
140. Malavazi, I. and G.H. Goldman, *Gene disruption in Aspergillus fumigatus using a PCR-based strategy and in vivo recombination in yeast*. Methods Mol Biol, 2012. **845**: p. 99-118.

141. Chaverroche, M.K., J.M. Ghigo, and C. d'Enfert, *A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res*, 2000. **28**(22): p. E97.
142. Kubodera, T., N. Yamashita, and A. Nishimura, *Pyrimidine resistance gene (ptrA) of Aspergillus oryzae: cloning, characterization and application as a dominant selectable marker for transformation*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000. **64**(7): p. 1416-21.
143. Aimanianda, V., et al., *Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores*. *Nature*, 2009. **460**(7259): p. 1117-21.
144. Feng, X., et al., *HacA-independent functions of the ER stress sensor IreA synergize with the canonical UPR to influence virulence traits in Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog*, 2011. **7**(10): p. e1002330.
145. Damveld, R.A., et al., *The Aspergillus niger MADS-box transcription factor RlmA is required for cell wall reinforcement in response to cell wall stress*. *Mol Microbiol*, 2005. **58**(1): p. 305-19.
146. Smedsgaard, J., *Micro-scale extraction procedure for standardized screening of fungal metabolite production in cultures*. *J Chromatogr A*, 1997. **760**(2): p. 264-70.
147. Marim, F.M., et al., *A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells*. *PLoS One*, 2010. **5**(12): p. e15263.
148. Hillmann, F., et al., *Virulence determinants of the human pathogenic fungus Aspergillus fumigatus protect against soil amoeba predation*. *Environ Microbiol*, 2015. **17**(8): p. 2858-69.
149. Bustin, S.A., *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays*. *J Mol Endocrinol*, 2000. **25**(2): p. 169-93.
150. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
151. da Silva Ferreira, M.E., et al., *Transcriptome analysis of Aspergillus fumigatus exposed to voriconazole*. *Curr Genet*, 2006. **50**(1): p. 32-44.
152. Bairoch, A., et al., *The Universal Protein Resource (UniProt)*. *Nucleic Acids Res*, 2005. **33**(Database issue): p. D154-9.
153. CANTOR, C.R.S., P. R., *Biophysical Chemistry, part II: techniques for the study of biological structure and function*. 1980. 365.
154. SREERAMA, N.W., R. W. *A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism*. , A. Biochemistry, Editor.
155. Lakowicz, J.R., et al., *Anisotropy-based sensing with reference fluorophores*. *Anal Biochem*, 1999. **267**(2): p. 397-405.
156. Wu, Y., Q. Li, and X.Z. Chen, *Detecting protein-protein interactions by Far western blotting*. *Nat Protoc*, 2007. **2**(12): p. 3278-84.
157. Angolini, C.F., et al., *Direct Protocol for Ambient Mass Spectrometry Imaging on Agar Culture*. *Anal Chem*, 2015. **87**(13): p. 6925-30.
158. Osmani, S.A. and P.M. Mirabito, *The early impact of genetics on our understanding of cell cycle regulation in Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol*, 2004. **41**(4): p. 401-10.
159. Harris, S.D., et al., *Identification and characterization of genes required for hyphal morphogenesis in the filamentous fungus Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 1999. **151**(3): p. 1015-25.
160. Momany, M., et al., *Characterization of the Aspergillus nidulans septin (asp) gene family*. *Genetics*, 2001. **157**(3): p. 969-77.
161. Kuranda, K., et al., *Investigating the caffeine effects in the yeast Saccharomyces cerevisiae brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways*. *Mol Microbiol*, 2006. **61**(5): p. 1147-66.
162. Roncero, C., et al., *Isolation and characterization of Saccharomyces cerevisiae mutants resistant to Calcofluor white*. *J Bacteriol*, 1988. **170**(4): p. 1950-4.
163. Ram, A.F. and F.M. Klis, *Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor white and Congo red*. *Nat Protoc*, 2006. **1**(5): p. 2253-6.
164. Steinberg, G., et al., *Cell Biology of Hyphal Growth*. *Microbiol Spectr*, 2017. **5**(2).
165. Ganesan, L.T., et al., *In-vitro activity of nikkomycin Z alone and in combination with polyenes, triazoles or echinocandins against Aspergillus fumigatus*. *Clin Microbiol Infect*, 2004. **10**(11): p. 961-6.
166. Doonan, J.H., *Cell division in Aspergillus*. *J Cell Sci*, 1992. **103 (Pt 3)**: p. 599-611.

167. Muszkieta, L., et al., *Investigation of Aspergillus fumigatus biofilm formation by various "omics" approaches*. Front Microbiol, 2013. **4**: p. 13.
168. Fanning, S. and A.P. Mitchell, *Fungal biofilms*. PLoS Pathog, 2012. **8**(4): p. e1002585.
169. Latge, J.P., et al., *Specific molecular features in the organization and biosynthesis of the cell wall of Aspergillus fumigatus*. Med Mycol, 2005. **43 Suppl 1**: p. S15-22.
170. Carrion Sde, J., et al., *The RodA hydrophobin on Aspergillus fumigatus spores masks dectin-1- and dectin-2-dependent responses and enhances fungal survival in vivo*. J Immunol, 2013. **191**(5): p. 2581-8.
171. Girardin, H., et al., *The role of the rodlet structure on the physicochemical properties of Aspergillus conidia*. Lett Appl Microbiol, 1999. **29**(6): p. 364-9.
172. Dague, E., et al., *High-resolution cell surface dynamics of germinating Aspergillus fumigatus conidia*. Biophys J, 2008. **94**(2): p. 656-60.
173. Bom, V.L., et al., *The Aspergillus fumigatus sitA Phosphatase Homologue Is Important for Adhesion, Cell Wall Integrity, Biofilm Formation, and Virulence*. Eukaryot Cell, 2015. **14**(8): p. 728-44.
174. Mouyna, I., et al., *Glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanosyltransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall*. J Biol Chem, 2000. **275**(20): p. 14882-9.
175. Mouyna, I., et al., *Deletion of GEL2 encoding for a beta(1-3)glucanosyltransferase affects morphogenesis and virulence in Aspergillus fumigatus*. Mol Microbiol, 2005. **56**(6): p. 1675-88.
176. Gastebois, A., et al., *beta(1-3)Glucanosyltransferase Gel4p is essential for Aspergillus fumigatus*. Eukaryot Cell, 2010. **9**(8): p. 1294-8.
177. Willger, S.D., et al., *A sterol-regulatory element binding protein is required for cell polarity, hypoxia adaptation, azole drug resistance, and virulence in Aspergillus fumigatus*. PLoS Pathog, 2008. **4**(11): p. e1000200.
178. Chabane, S., et al., *Glycosylphosphatidylinositol-anchored Ecm33p influences conidial cell wall biosynthesis in Aspergillus fumigatus*. Appl Environ Microbiol, 2006. **72**(5): p. 3259-67.
179. Mouyna, I., et al., *Molecular characterization of a cell wall-associated beta(1-3)endoglucanase of Aspergillus fumigatus*. Med Mycol, 2002. **40**(5): p. 455-64.
180. Bailey, T.L., et al., *MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(Web Server issue): p. W369-73.
181. Gupta, S., et al., *Quantifying similarity between motifs*. Genome Biol, 2007. **8**(2): p. R24.
182. Valiante, V., et al., *The Aspergillus fumigatus conidial melanin production is regulated by the bifunctional bHLH DevR and MADS-box RImA transcription factors*. Mol Microbiol, 2016. **102**(2): p. 321-335.
183. Ries, L.N.A., et al., *The Aspergillus fumigatus CrzA Transcription Factor Activates Chitin Synthase Gene Expression during the Caspofungin Paradoxical Effect*. MBio, 2017. **8**(3).
184. Lagorce, A., et al., *Involvement of GFA1, which encodes glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase, in the activation of the chitin synthesis pathway in response to cell-wall defects in Saccharomyces cerevisiae*. Eur J Biochem, 2002. **269**(6): p. 1697-707.
185. Ono, N., et al., *The yeast Chs4 protein stimulates the trypsin-sensitive activity of chitin synthase 3 through an apparent protein-protein interaction*. Microbiology, 2000. **146 (Pt 2)**: p. 385-91.
186. Walsh, T.J., et al., *Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America*. Clin Infect Dis, 2008. **46**(3): p. 327-60.
187. Zygmunt, W.A., *Intracellular Loss of Potassium in Candida albicans After Exposure to Polyene Antifungal Antibiotics*. Appl Microbiol, 1966. **14**(6): p. 953-6.
188. Legrand, P., A. Vertut-Doi, and J. Bolard, *Liposomal amphotericin B bases of therapeutic index increase*. Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol, 1993. **21**(3): p. 407-13.
189. Sugita, T., et al., *Fluconazole-resistant pathogens Candida inconspicua and C. norvegensis: DNA sequence diversity of the rRNA intergenic spacer region, antifungal drug susceptibility, and extracellular enzyme production*. Microbiol Immunol, 2004. **48**(10): p. 761-6.

190. Santiago, E., et al., *Vibrational effects on the dynamic electric properties of hydrogen peroxide*. J Chem Phys, 2008. **128**(6): p. 064310.
191. Bladen, C.L., D.J. Kozlowski, and W.S. Dynan, *Effects of low-dose ionizing radiation and menadione, an inducer of oxidative stress, alone and in combination in a vertebrate embryo model*. Radiat Res, 2012. **178**(5): p. 499-503.
192. Srinivasa, K., et al., *Characterization of a putative thioredoxin peroxidase prx1 of Candida albicans*. Mol Cells, 2012. **33**(3): p. 301-7.
193. Lessing, F., et al., *The Aspergillus fumigatus transcriptional regulator AfYap1 represents the major regulator for defense against reactive oxygen intermediates but is dispensable for pathogenicity in an intranasal mouse infection model*. Eukaryot Cell, 2007. **6**(12): p. 2290-302.
194. Lambou, K., et al., *Functional analysis of the superoxide dismutase family in Aspergillus fumigatus*. Mol Microbiol, 2010. **75**(4): p. 910-23.
195. Paris, S., et al., *Catalases of Aspergillus fumigatus*. Infect Immun, 2003. **71**(6): p. 3551-62.
196. Ouyang, X., et al., *Yap1 activation by H₂O₂ or thiol-reactive chemicals elicits distinct adaptive gene responses*. Free Radic Biol Med, 2011. **50**(1): p. 1-13.
197. Warmka, J., et al., *Ptc1, a type 2C Ser/Thr phosphatase, inactivates the HOG pathway by dephosphorylating the mitogen-activated protein kinase Hog1*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(1): p. 51-60.
198. Richie, D.L., et al., *A role for the unfolded protein response (UPR) in virulence and antifungal susceptibility in Aspergillus fumigatus*. PLoS Pathog, 2009. **5**(1): p. e1000258.
199. Wimalasena, T.T., et al., *Impact of the unfolded protein response upon genome-wide expression patterns, and the role of Hac1 in the polarized growth, of Candida albicans*. Fungal Genet Biol, 2008. **45**(9): p. 1235-47.
200. Pakula, T.M., et al., *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*. J Biol Chem, 2003. **278**(45): p. 45011-20.
201. Mehrad, B., R.M. Strieter, and T.J. Standiford, *Role of TNF-alpha in pulmonary host defense in murine invasive aspergillosis*. J Immunol, 1999. **162**(3): p. 1633-40.
202. Taramelli, D., et al., *Production of cytokines by alveolar and peritoneal macrophages stimulated by Aspergillus fumigatus conidia or hyphae*. J Med Vet Mycol, 1996. **34**(1): p. 49-56.
203. Nierman, W.C., et al., *Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus Aspergillus fumigatus*. Nature, 2005. **438**(7071): p. 1151-6.
204. Watanabe, Y., et al., *Characterization of a serum response factor-like protein in Saccharomyces cerevisiae, Rlm1, which has transcriptional activity regulated by the Mpk1 (Stt2) mitogen-activated protein kinase pathway*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(5): p. 2615-23.
205. Jung, U.S., et al., *Regulation of the yeast Rlm1 transcription factor by the Mpk1 cell wall integrity MAP kinase*. Mol Microbiol, 2002. **46**(3): p. 781-9.
206. Puttikamonkul, S., et al., *Trehalose 6-phosphate phosphatase is required for cell wall integrity and fungal virulence but not trehalose biosynthesis in the human fungal pathogen Aspergillus fumigatus*. Mol Microbiol, 2010. **77**(4): p. 891-911.
207. Malavazi, I., G.H. Goldman, and N.A. Brown, *The importance of connections between the cell wall integrity pathway and the unfolded protein response in filamentous fungi*. Brief Funct Genomics, 2014. **13**(6): p. 456-70.
208. Delgado-Silva, Y., et al., *Participation of Candida albicans transcription factor RLM1 in cell wall biogenesis and virulence*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e86270.
209. Yoshimi, A., et al., *Mitogen-activated protein kinases MpkA and MpkB independently affect micafungin sensitivity in Aspergillus nidulans*. Biosci Biotechnol Biochem, 2015. **79**(5): p. 836-44.
210. Henry, C., J.P. Latge, and A. Beauvais, *alpha1,3 glucans are dispensable in Aspergillus fumigatus*. Eukaryot Cell, 2012. **11**(1): p. 26-9.
211. Klimpel, K.R. and W.E. Goldman, *Cell walls from avirulent variants of Histoplasma capsulatum lack alpha-(1,3)-glucan*. Infect Immun, 1988. **56**(11): p. 2997-3000.
212. Fuchs, B.B. and E. Mylonakis, *Our paths might cross: the role of the fungal cell wall integrity pathway in stress response and cross talk with other stress response pathways*. Eukaryot Cell, 2009. **8**(11): p. 1616-25.

213. Garcia, R., et al., *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, 2009. **284**(16): p. 10901-11.
214. Munro, C.A., et al., *The PKC, HOG and Ca²⁺ signalling pathways co-ordinately regulate chitin synthesis in Candida albicans*. Mol Microbiol, 2007. **63**(5): p. 1399-413.
215. Miyazaki, T., et al., *Role of the Slf2 mitogen-activated protein kinase pathway in cell wall integrity and virulence in Candida glabrata*. FEMS Yeast Res, 2010. **10**(3): p. 343-52.
216. Jung, K.W., et al., *Systematic functional profiling of transcription factor networks in Cryptococcus neoformans*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 6757.
217. Hohl, T.M., et al., *Aspergillus fumigatus triggers inflammatory responses by stage-specific beta-glucan display*. PLoS Pathog, 2005. **1**(3): p. e30.
218. Huang, H., et al., *Distinct patterns of dendritic cell cytokine release stimulated by fungal beta-glucans and toll-like receptor agonists*. Infect Immun, 2009. **77**(5): p. 1774-81.
219. Adams, T.H., J.K. Wieser, and J.H. Yu, *Asexual sporulation in Aspergillus nidulans*. Microbiol Mol Biol Rev, 1998. **62**(1): p. 35-54.
220. Herrmann, M., P. Sprote, and A.A. Brakhage, *Protein kinase C (PkcA) of Aspergillus nidulans is involved in penicillin production*. Appl Environ Microbiol, 2006. **72**(4): p. 2957-70.
221. Scharf, D.H., et al., *Biosynthesis and function of gliotoxin in Aspergillus fumigatus*. Appl Microbiol Biotechnol, 2012. **93**(2): p. 467-72.
222. Sanchez de Groot, N., et al., *Prediction of "hot spots" of aggregation in disease-linked polypeptides*. BMC Struct Biol, 2005. **5**: p. 18.
223. Freitas, F.Z., et al., *The SEB-1 Transcription Factor Binds to the STRE Motif in Neurospora crassa and Regulates a Variety of Cellular Processes Including the Stress Response and Reserve Carbohydrate Metabolism*. G3 (Bethesda), 2016. **6**(5): p. 1327-43.
224. Peterbauer, C.K., D. Litscher, and C.P. Kubicek, *The Trichoderma atroviride seb1 (stress response element binding) gene encodes an AGGGG-binding protein which is involved in the response to high osmolarity stress*. Mol Genet Genomics, 2002. **268**(2): p. 223-31.
225. Seidl, V., et al., *The fungal STRE-element-binding protein Seb1 is involved but not essential for glycerol dehydrogenase (gld1) gene expression and glycerol accumulation in Trichoderma atroviride during osmotic stress*. Fungal Genet Biol, 2004. **41**(12): p. 1132-40.
226. Martinez-Pastor, M.T., et al., *The Saccharomyces cerevisiae zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE)*. EMBO J, 1996. **15**(9): p. 2227-35.
227. Ramsdale, M., et al., *MNL1 regulates weak acid-induced stress responses of the fungal pathogen Candida albicans*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(10): p. 4393-403.
228. Lind, A.L., et al., *Regulation of Secondary Metabolism by the Velvet Complex Is Temperature-Responsive in Aspergillus*. G3 (Bethesda), 2016. **6**(12): p. 4023-4033.
229. Macheleidt, J., et al., *Regulation and Role of Fungal Secondary Metabolites*. Annu Rev Genet, 2016. **50**: p. 371-392.
230. Gu, X., et al., *The Hsp90 Co-chaperones Sti1, Aha1, and P23 Regulate Adaptive Responses to Antifungal Azoles*. Front Microbiol, 2016. **7**: p. 1571.
231. Lamoth, F., et al., *Hsp70 and the Cochaperone StiA (Hop) Orchestrate Hsp90-Mediated Caspofungin Tolerance in Aspergillus fumigatus*. Antimicrob Agents Chemother, 2015. **59**(8): p. 4727-33.
232. He, Y., et al., *Radical, a heat shock protein 90 inhibitor, inhibits differentiation and adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **436**(2): p. 169-74.
233. Rocha, M.C., et al., *Aspergillus fumigatus MADS-Box Transcription Factor rlmA Is Required for Regulation of the Cell Wall Integrity and Virulence*. G3 (Bethesda), 2016. **6**(9): p. 2983-3002.
234. Edmondson, D.G. and S.Y. Roth, *Identification of protein interactions by far Western analysis*. Curr Protoc Mol Biol, 2001. **Chapter 20**: p. Unit 20 6.
235. Silva, K.P., T.V. Seraphim, and J.C. Borges, *Structural and functional studies of Leishmania braziliensis Hsp90*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1834**(1): p. 351-61.

236. Blake, J.F., et al., *Discovery of (S)-1-(1-(4-Chloro-3-fluorophenyl)-2-hydroxyethyl)-4-(2-((1-methyl-1H-pyrazol-5-yl)amino)pyrimidin-4-yl)pyridin-2(1H)-one (GDC-0994), an Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 (ERK1/2) Inhibitor in Early Clinical Development*. J Med Chem, 2016. **59**(12): p. 5650-60.
237. Dagenais, T.R. and N.P. Keller, *Pathogenesis of Aspergillus fumigatus in Invasive Aspergillosis*. Clin Microbiol Rev, 2009. **22**(3): p. 447-65.
238. Krijgheld, P., et al., *Development in Aspergillus*. Stud Mycol, 2013. **74**(1): p. 1-29.
239. Bhabhra, R. and D.S. Askew, *Thermotolerance and virulence of Aspergillus fumigatus: role of the fungal nucleolus*. Med Mycol, 2005. **43 Suppl 1**: p. S87-93.
240. Lee, K.S., et al., *A yeast mitogen-activated protein kinase homolog (Mpk1p) mediates signalling by protein kinase C*. Molecular and Cellular Biology, 1993. **13**(5): p. 3067-3075.
241. Zhao, C., et al., *Temperature-induced expression of yeast FKS2 is under the dual control of protein kinase C and calcineurin*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(2): p. 1013-22.
242. Chatterjee, S. and U. Tatu, *Heat shock protein 90 localizes to the surface and augments virulence factors of Cryptococcus neoformans*. PLoS Negl Trop Dis, 2017. **11**(8): p. e0005836.
243. Zhao, R., et al., *Navigating the chaperone network: an integrative map of physical and genetic interactions mediated by the hsp90 chaperone*. Cell, 2005. **120**(5): p. 715-27.
244. Ali, M.M., et al., *Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex*. Nature, 2006. **440**(7087): p. 1013-7.
245. Qiu, Y., et al., *The crystal structure of the Hsp90 co-chaperone Cpr7 from Saccharomyces cerevisiae*. J Struct Biol, 2017. **197**(3): p. 379-387.
246. Stebbins, C.E., et al., *Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent*. Cell, 1997. **89**(2): p. 239-50.
247. Pallavi, R., et al., *Heat shock protein 90 as a drug target against protozoan infections: biochemical characterization of HSP90 from Plasmodium falciparum and Trypanosoma evansi and evaluation of its inhibitor as a candidate drug*. J Biol Chem, 2010. **285**(49): p. 37964-75.
248. Stephen F. Altschul, T.L.M., Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman, *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*. Nucleic Acids Res, 1997.
249. Ohren, J.F., et al., *Structures of human MAP kinase kinase 1 (MEK1) and MEK2 describe novel noncompetitive kinase inhibition*. Nat Struct Mol Biol, 2004. **11**(12): p. 1192-7.
250. Remenyi, A., et al., *The role of docking interactions in mediating signaling input, output, and discrimination in the yeast MAPK network*. Mol Cell, 2005. **20**(6): p. 951-62.
251. Wang, B., et al., *Analysis of crystal structure of Arabidopsis MPK6 and generation of its mutants with higher activity*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 25646.

7.0 APÊNDICES

APÊNDICE A - Fenótipos de crescimento da linhagem mutante $\Delta rlmA$ na presença de CR e CFW.

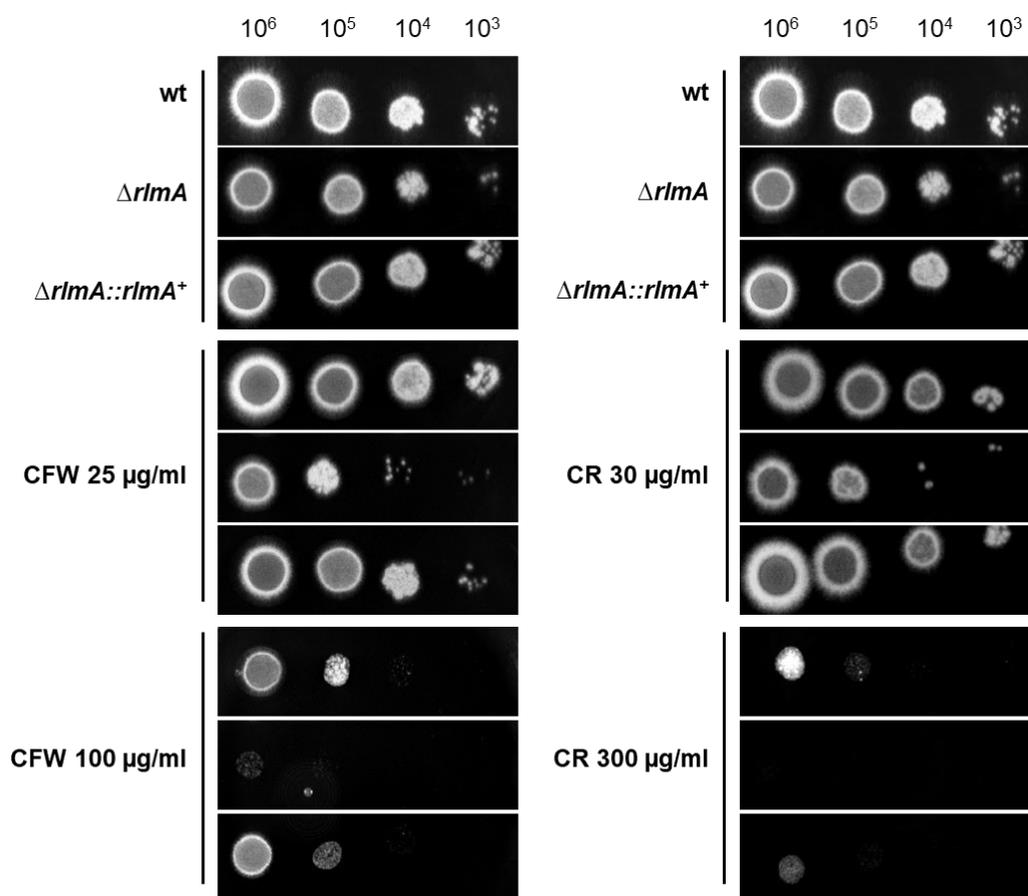
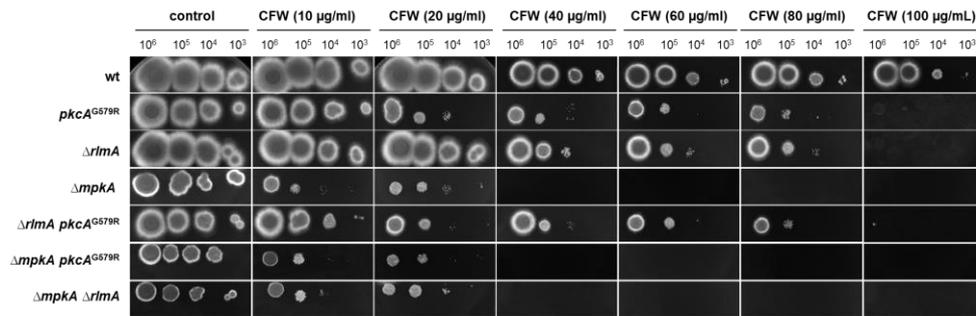


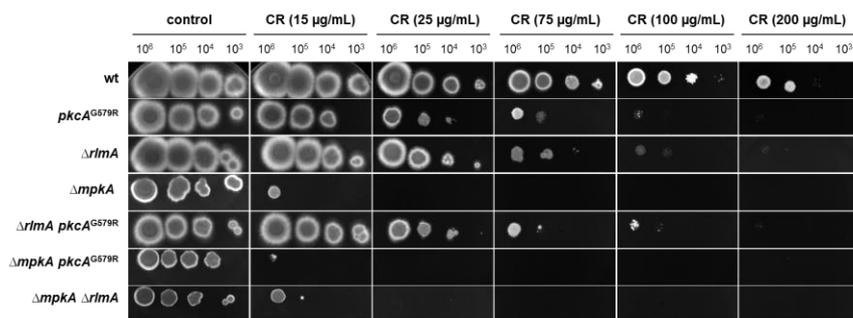
Figura A1: Fenótipos de crescimento da linhagem mutante $\Delta rlmA$ na presença de CR e CFW. O número indicado de conídios foi inoculado em meio YG sólido que foi complementado com CR e CFW. As placas foram incubadas a 24 °C por 72 horas e posteriormente fotografadas.

APÊNDICE B - Análise da interação genética dos mutantes da CWIP.

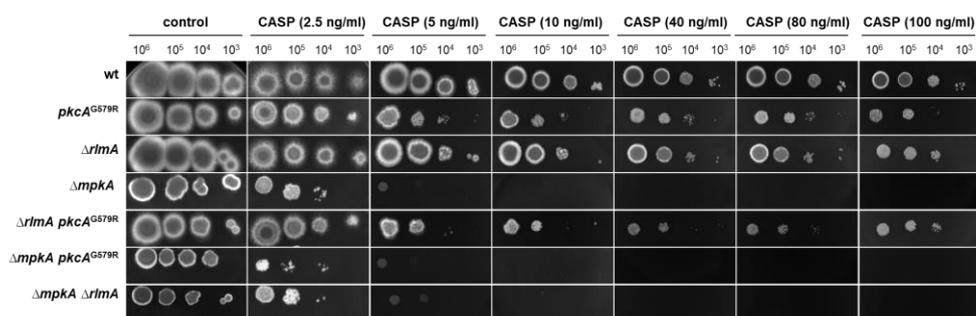
A.



B.



C.



D.

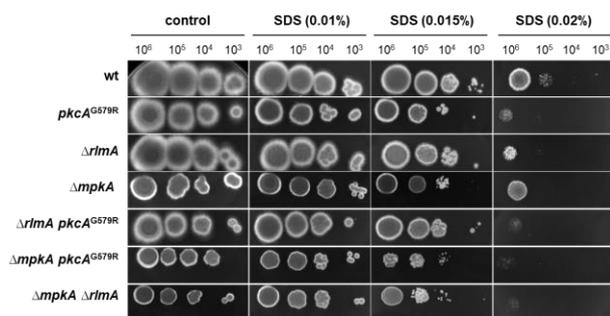
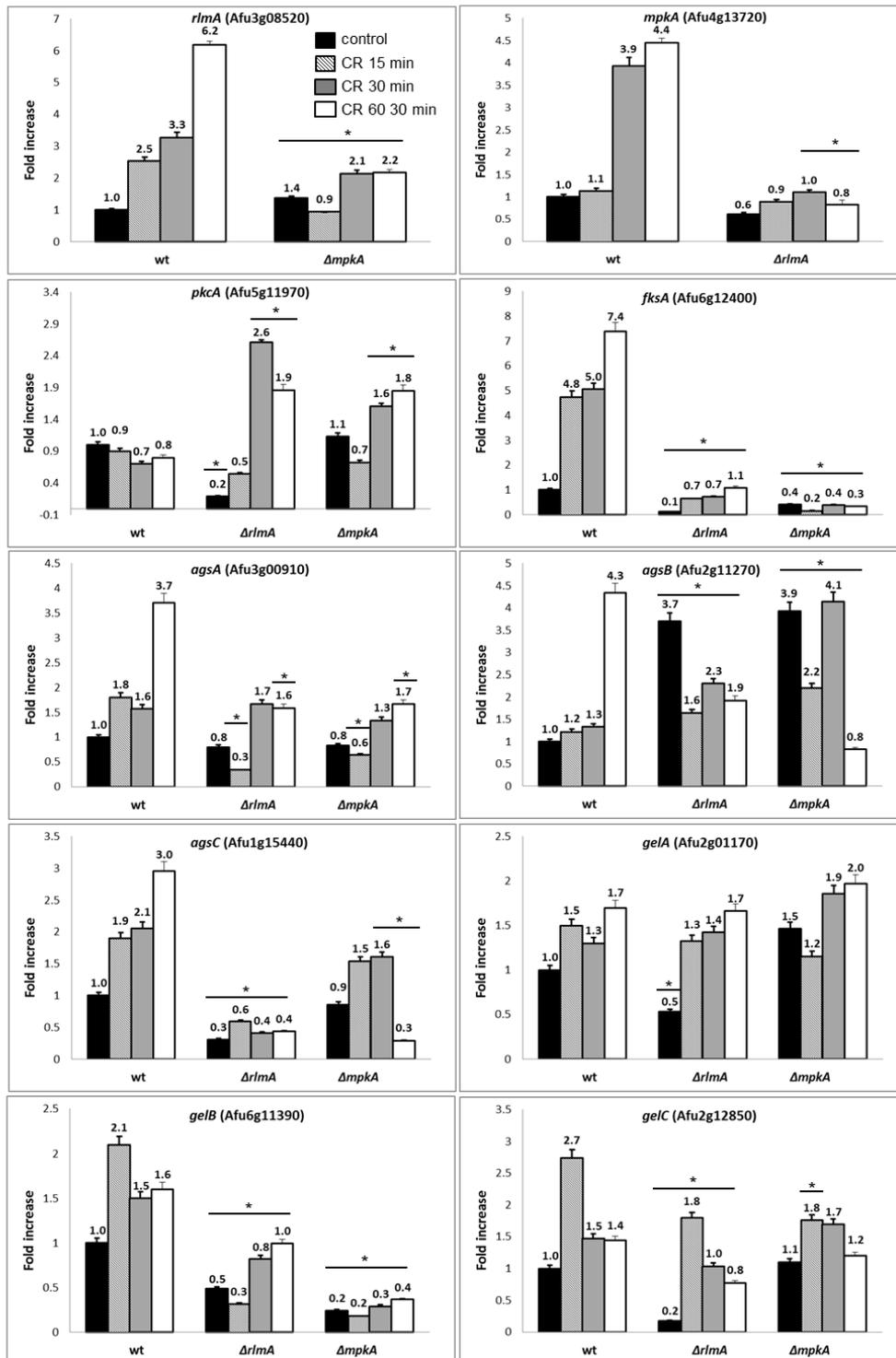


Figura B1: Análise da interação genética dos mutantes da CWIP. (A-D) *rimA*, *pkcA* e *mpkA* interagem geneticamente durante o estresse da parede celular na presença de CFW, CR, CASP e SDS.

APÊNDICE C - Análise das respostas transcricionais da linhagem selvagem e dos mutantes $\Delta rlmA$ e $\Delta mpkA$ frente ao estresse da parede celular induzido por CR.

A.



B.

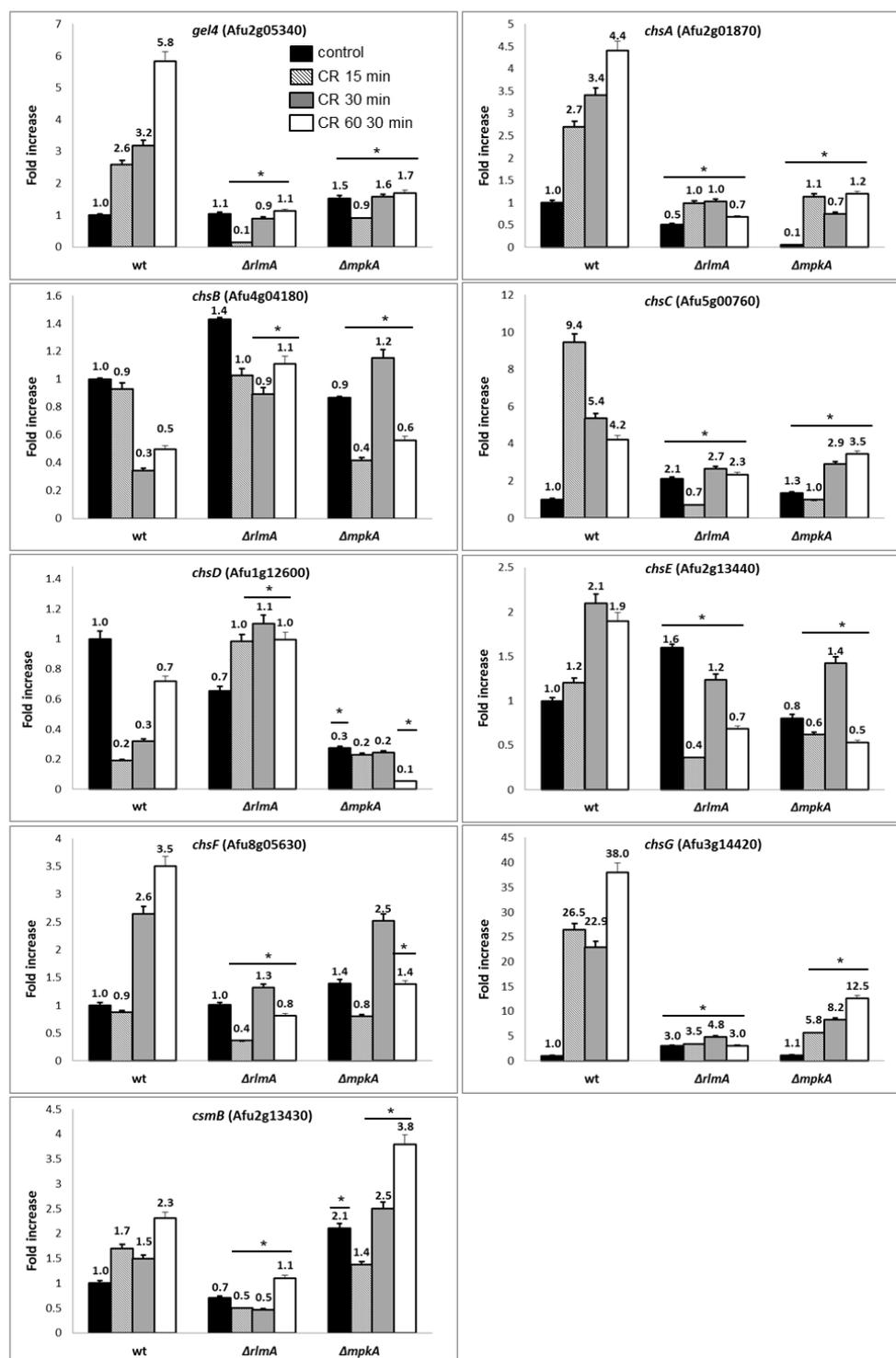


Figura C1: Análise das respostas transcricionais da linhagem selvagem e dos mutantes $\Delta rlmA$ e $\Delta mpkA$ frente ao estresse da parede celular induzido por CR. As linhagens selvagem, $\Delta rlmA$ e $\Delta mpkA$ foram cultivadas em meio líquido completo YG. Após a incubação, foi adicionado CR e as culturas foram cultivadas por 15, 30 e 60 minutos adicionais. A abundância de mRNA para cada gene foi avaliada por RT-qPCR e normalizada com β -tubulina (A-B). O *fold increase* em cada linhagem representa a abundância de mRNA normalizada em relação à linhagem selvagem no ponto de tempo 0 (isto é, antes da exposição ao CR). Os dados representam o valor médio de três repetições biológicas, cada uma repetida em duplicata na mesma corrida, Bar = Desvio padrão, * $p \leq 0,05$ (One Way ANOVA).

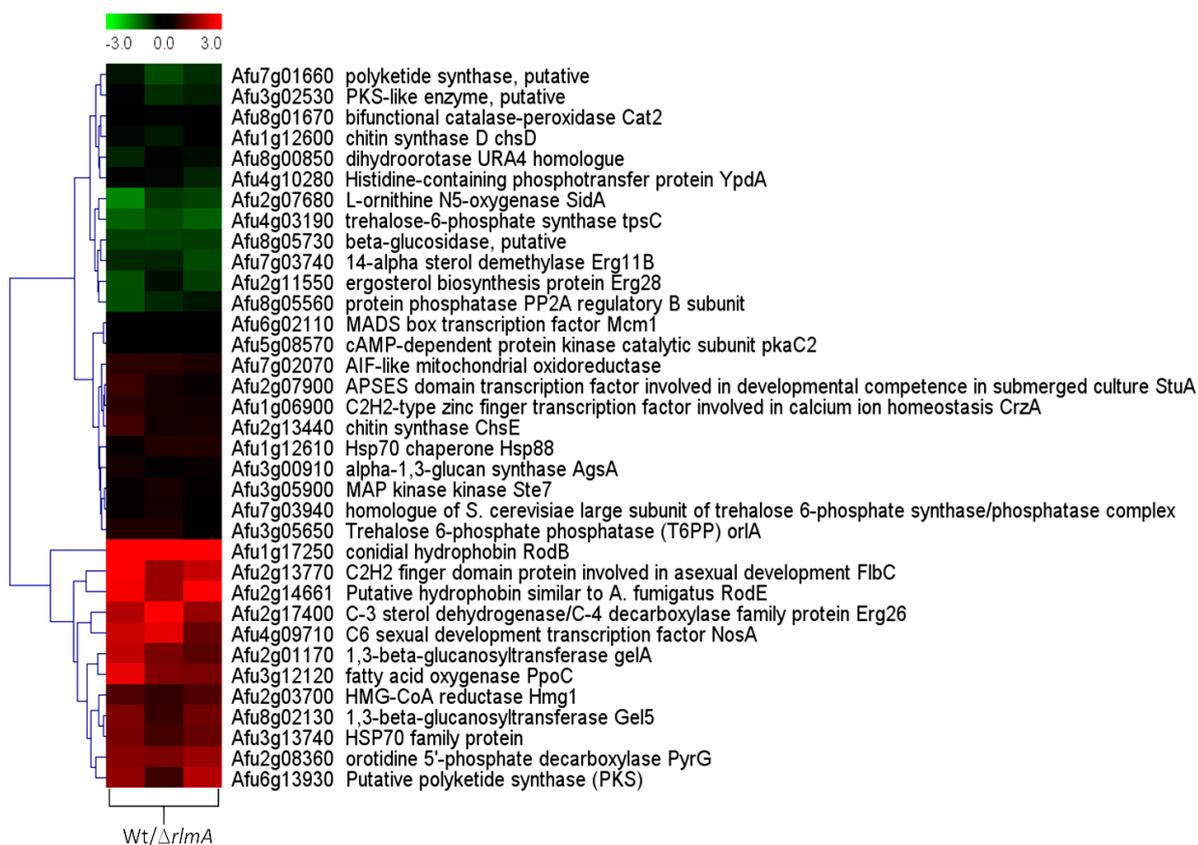
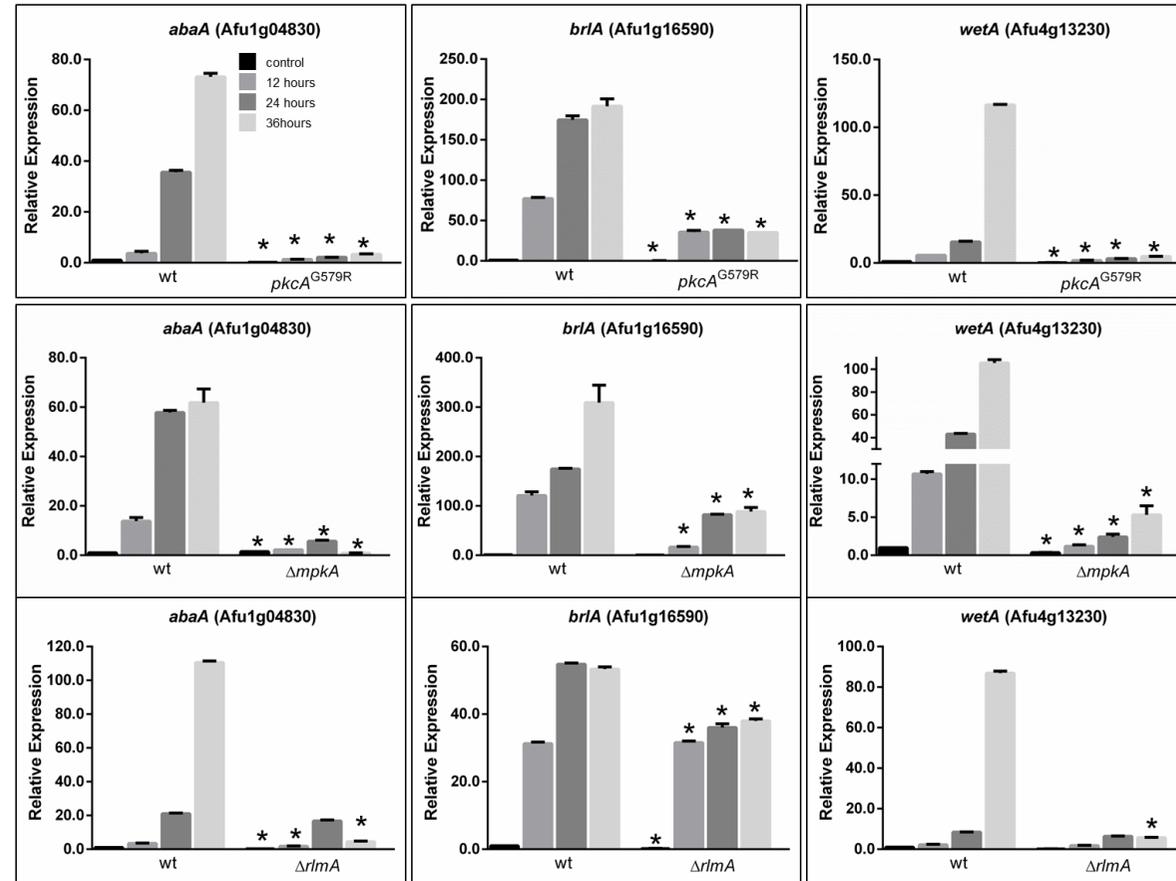


Figura C2: Heat map mostrando o padrão de expressão de genes selecionados de *A. fumigatus* identificados durante a comparação da linhagem selvagem versus $\Delta rlmA$ por microarray. As três colunas indicam as replicatas biológicas do experimento e indicam a expressão wt/ $\Delta rlmA$ na ausência de indução por CR. Os valores de expressão são mostrados em escala log₂ codificados em cores. Os resultados indicam genes diferencialmente expressos envolvidos em diferentes processos celulares como termotolerância, estresse oxidativo e biossíntese de ergosterol.

APÊNDICE D - As linhagens mutantes da CWIP *pkcA*^{G579R}, Δ *mpkA* e Δ *rlmA* reduziram a acumulação de mRNA de *brlA*, *abaA* e *wetA* durante o desenvolvimento assexuado sincronizado em *A. fumigatus* a 30 e a 37 °C.

A.



B.

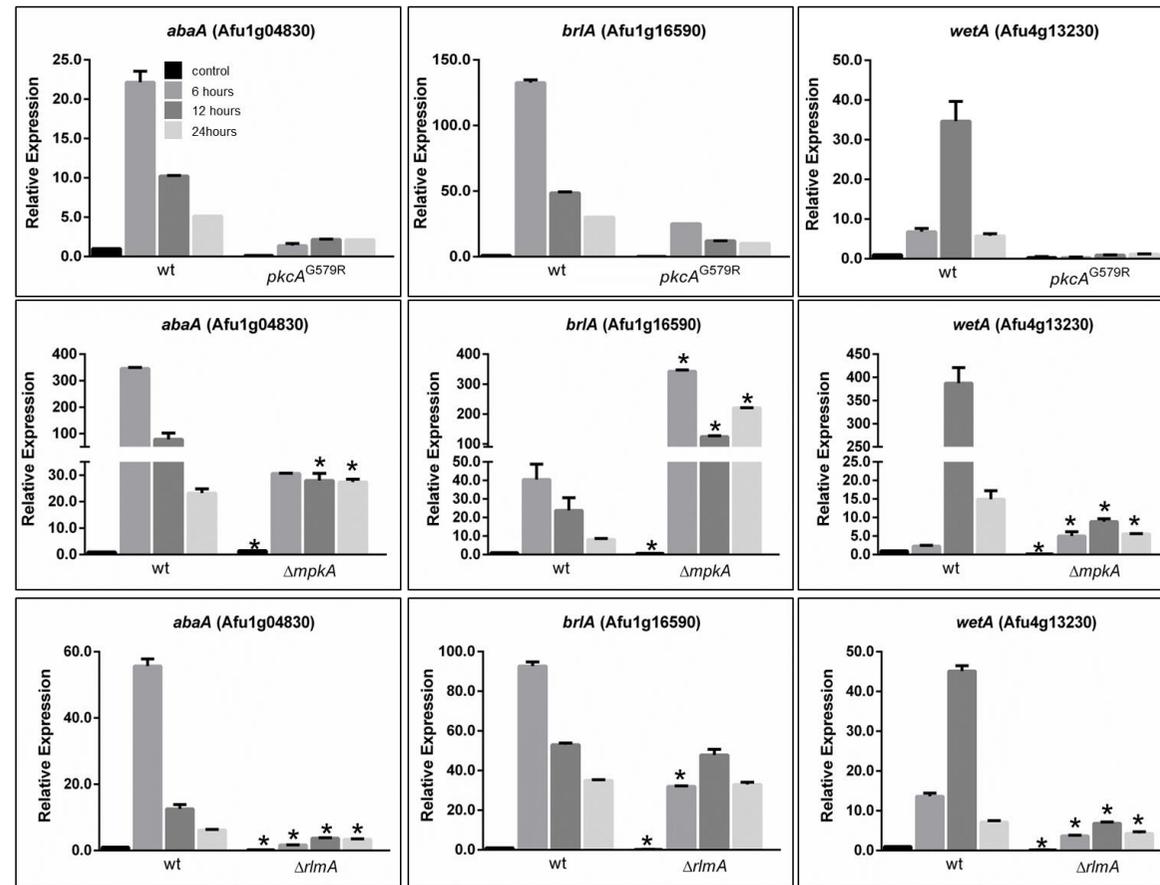


Figura D1: As linhagens mutantes da CWIP $pkcA^{G579R}$, $\Delta mpkA$ e $\Delta rlmA$ reduziram a acumulação de mRNA de $briA$, $abaA$ e $wetA$ durante o desenvolvimento assexuado sincronizado em *A. fumigatus* a 30 °C (A) e a 37 °C (B). O RNA total foi isolado da indução de desenvolvimento assexuado sincronizado para a linhagem selvagem e mutantes $pkcA^{G579R}$, $\Delta mpkA$ e $\Delta rlmA$ de *A. fumigatus*. A abundância de mRNA para cada gene foi avaliada por RT-qPCR e normalizada com β -tubulina. O *relative expression* em cada linhagem representa a abundância de mRNA normalizada em relação à linhagem selvagem no ponto de tempo 0 (isto é, antes da indução do desenvolvimento assexuado). Os dados representam o valor médio de três repetições biológicas, cada uma repetida em duplicata na mesma corrida, Bar = Desvio padrão, * $p \leq 0,05$ (One Way ANOVA).

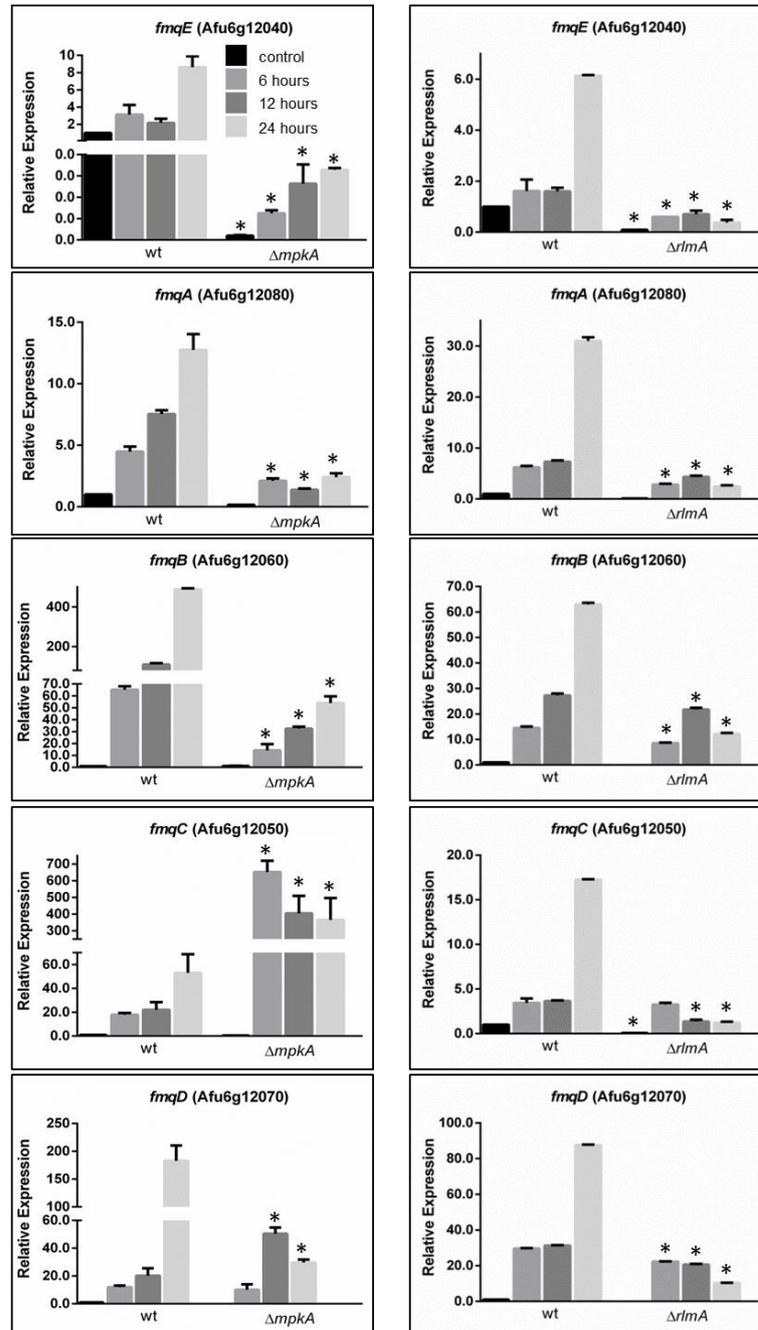
APÊNDICE E - Dados de RMN das fumiquinazolinas.

Fumiquinazolina C: ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ ppm: 8.37 (1H, dd, $J=8.0$ and 1.5 Hz, H-10); 7.86 (1H, t, $J=8.0$ Hz, H-8); 7.81 (1H, dd, $J=8.0$ and 1.5 Hz, H-7); 7.63 (1H, t, $J=8.0$ Hz, H-9); 7.46 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-24); 7.35 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-27); 7.32 (1H, t, $J=7.8$ Hz, H-25); 7.20 (1H, t, $J=7.8$ Hz, H-26); 6.72 (1H, brs, H-2); 5.74 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-14); 5.34 (1H, d, $J=7.3$ Hz, H-18); 3.76-3.65 (1H, m, H-20); 2.98 (1H, dd, $J=15.1$ and 7.4 Hz, H-15a); 2.14 (1H, d, $J=15.1$ Hz, H-15b); 2.06 (3H, s, H-16); 1.07 (3H, d, $J=6.8$ Hz, H-29); 1.03 (1H, t, $J=7.8$ Hz, H-19).

Fumiquinazolina D: ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ ppm: 8.25 (1H, dd, $J=7.8$ and 1.5 Hz, H-10); 7.80 (1H, t, $J=7.8$ Hz, H-8); 7.71 (1H, d, $J=7.8$ and 1.5 Hz, H-7); 7.54 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-9); 7.41 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-24); 7.36 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-27); 7.38-7.33 (1H, m, H-25); 7.23-7.19 (1H, m, H-26); 5.85 (1H, brs, H-2); 5.73-5.68 (1H, m, H-14); 5.35 (1H, s, H-18); 3.74-3.66 (1H, m, H-20); 3.00 (1H, dd, $J=15.2$ and 7.6 Hz, H-15a); 2.07 (1H, d, $J=15.1$ Hz, H-15b); 1.28 (3H, s, H-16); 1.19 (3H, d, $J=6.5$ Hz, H-29); 1.03 (1H, t, $J=7.7$ Hz, H-19).

APÊNDICE F - Análise da resposta transcricional de genes relacionados à síntese de Fq na linhagem selvagem e mutantes $\Delta mpkA$ e $\Delta rlmA$ durante o desenvolvimento assexuado a 30 °C e a 37 °C.

A.



B.

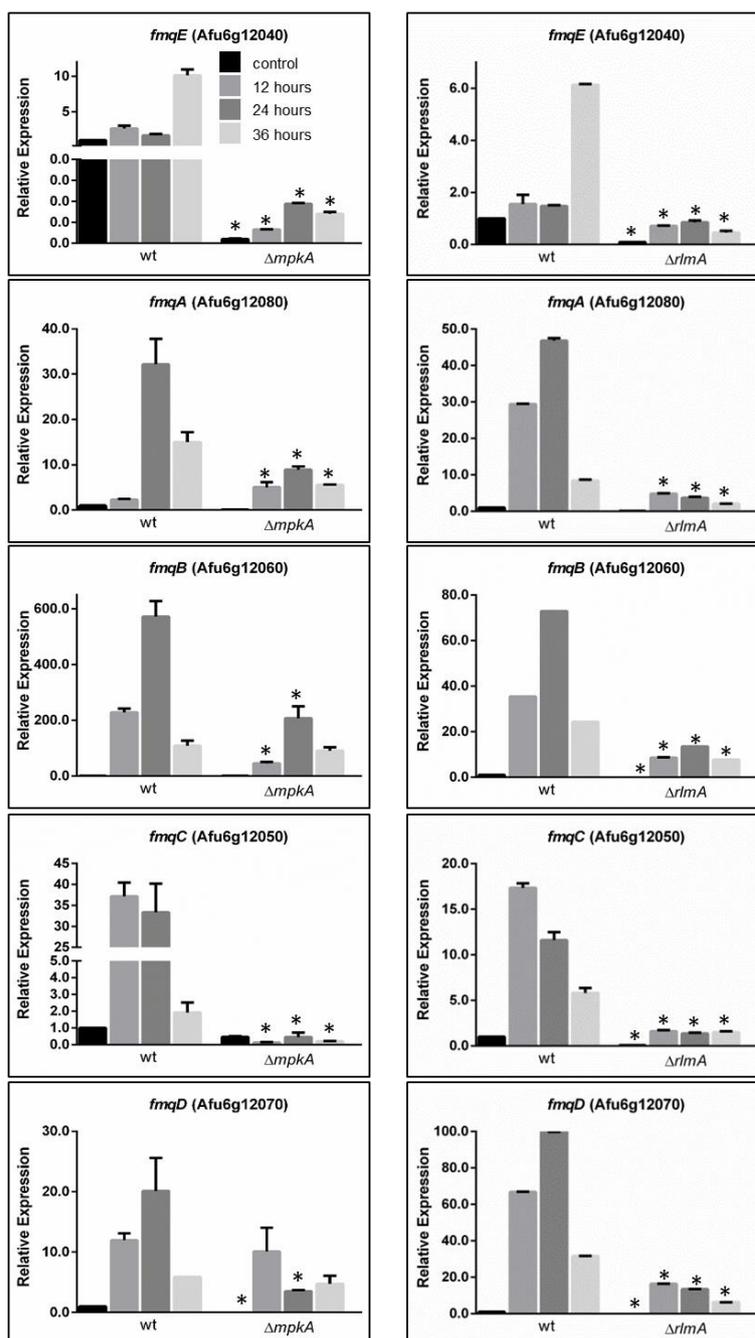


Figura F1: Análise da resposta transcricional de genes relacionados à síntese de Fq na linhagem selvagem e mutantes $\Delta mpkA$ e $\Delta rlmA$ durante o desenvolvimento assexuado a 37 °C (A) e a 30 °C (B). O RNA total foi isolado da indução de desenvolvimento assexuado sincronizado para a linhagem selvagem e mutantes, $\Delta mpkA$ e $\Delta rlmA$ de *A. fumigatus*. A abundância de mRNA para cada gene foi avaliada por RT-qPCR e normalizada com β -tubulina. O *relative expression* em cada linhagem representa a abundância de mRNA normalizada em relação à linhagem selvagem no ponto de tempo 0 (isto é, antes da indução do desenvolvimento assexuado). Os dados representam o valor médio de três repetições biológicas, cada uma repetida em duplicata na mesma corrida, Bar = Desvio padrão, * $p \leq 0,05$ (One Way ANOVA).

APÊNDICE G - Análise da resposta transcrricional de genes relacionados à síntese de Fq na linhagem selvagem e mutante $\Delta sebA$ durante o desenvolvimento assexuado a 30 °C e a 37 °C .

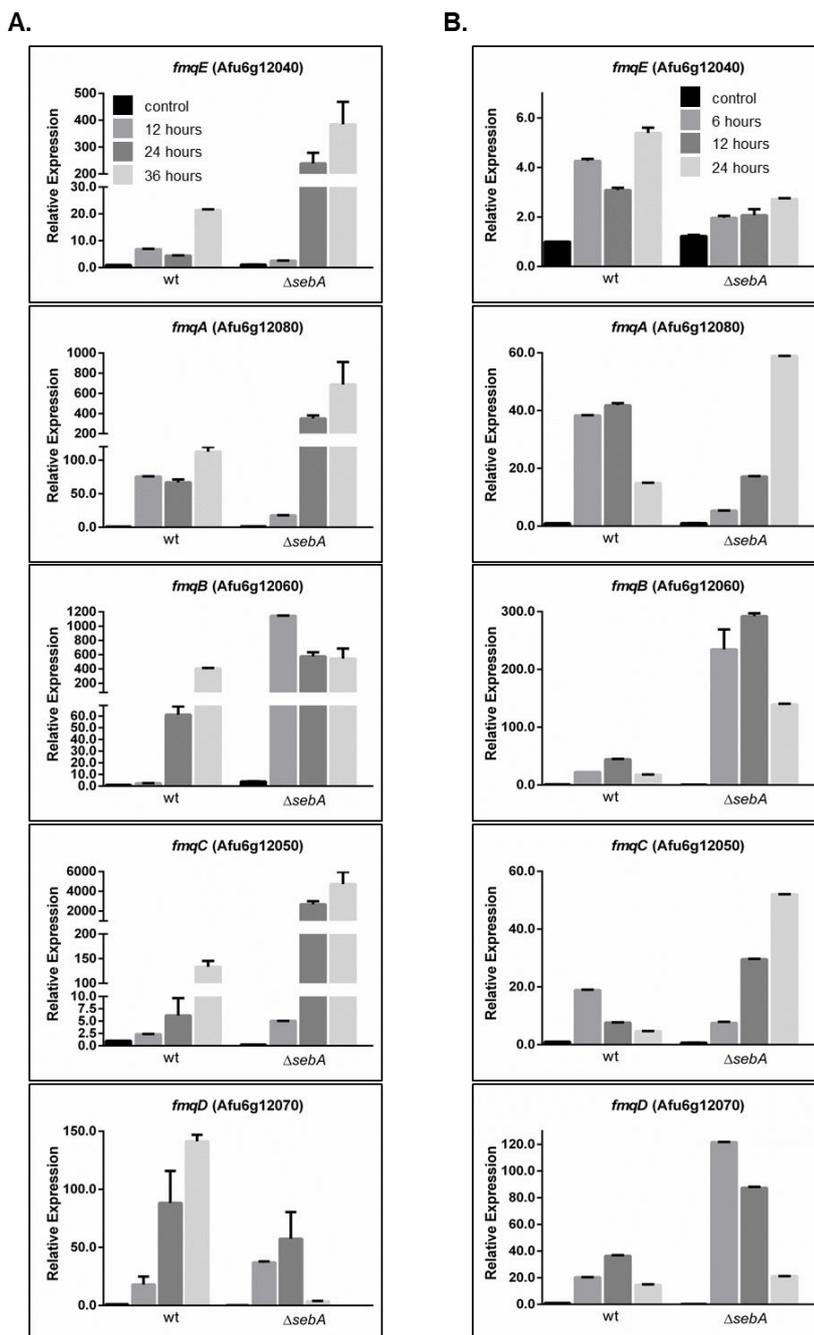


Figura G1: Análise da resposta transcrricional de genes relacionados à síntese de Fq na linhagem selvagem e mutante $\Delta sebA$ durante o desenvolvimento assexuado a 30 °C (A) e a 37 °C (B). O RNA total foi isolado da indução de desenvolvimento assexuado sincronizado para a linhagem selvagem e mutante $\Delta sebA$ de *A. fumigatus*. A abundância de mRNA para cada gene foi avaliada por RT-qPCR e normalizada com β -tubulina. O *relative expression* em cada linhagem representa a abundância de mRNA normalizada em relação à linhagem selvagem no ponto de tempo 0 (isto é, antes da indução do desenvolvimento assexuado). Os dados representam o valor médio de três repetições biológicas, cada uma repetida em duplicata na mesma corrida, Bar = Desvio padrão, * $p \leq 0,05$ (One Way ANOVA).

APÊNDICE H - Sequência de aminoácidos da proteína Hsp90 de *A. fumigatus*.

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMLEMSSETFEFQAEISQLLSLIINTVYSNKEIFL
RELISNASDALDKIRYQSLSDPTKLDTGKDLRIDIIIPDKENKTLTIRDTGIGMTKA
DLINNLGTIARSGTKQFMEALSAGADISMIGQFGVGFYSAYLVADRVTVVSKNN
DDEQYIWESAAGGTFTLTQDTEGEQLGRGTKIILHLKDEQTDYLNESRIKEVVR
KHSEFISYPIYLHVLEKETEKEVPDEEAEETKEEEDEEKKAKIEEVDDEEEEEKK
KKKKTCTVKESKIEEELNKTPIWTRNPADITQEEYASFYKSLSDWEDHLAV
KHFSVEGQLEFRAILYVPKRAPFDLFETKKTNNIKLYVRRVFITDDATDLIPEW
LGFIKGVVDSIDLPLNLSRETLQQNKIMKVIKKNIVKKTLELFNEIAEDREQFDK
FYSAFSKNIKLGIIHEDAQNRQTLAKLLRYQSTKSGDEATSLADYVTRMPEHQK
QIYYITGESIKAVAKSPFLDSLKQKNFEVLFLVDPIDEYAFTQLKEFDGKKLV
DITKDFELEETEEKAEREKEEKEYENLAKSLKNILGDKVEKVVVSHKLVGSPCAIR
TGQFGWSANMERIMKAQALRDTSMSSYMSSKKTFEISPKSSIIKELKKKVEAD
GENDRTVKSITQLLFETSLLVSGFTIEEPASFAERIHKLVSLLGLNIDEEAETTEEK
ATEEAAPAEATTGESAMEEVD

APÊNDICE I - Sequência de aminoácidos da proteína PkcA⁴⁰⁹⁻¹¹¹⁶ de *A. fumigatus*

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMLEMLIDSWFALEPVGRIHLTSLFAKQLKDRR
PFDIGLNRQGAVRQKKEEVHEKQGHKFVTQQFYNIMRCALCGDFLKYAAGM
QCADCKYTCHRKCYPKVVTKCISKANYETDPDEEKINHRIPHRFEGFSNISAN
WCCHCGYLLPFGRKSAKRCTECGLTCHAQCTHLVPDFC**G**MSMEANQILETL
IRAKNHNKSASVSSGLSGRTLPGGPPQAPQDNVALAYPQKPVEGAYGAPQ
RQPSAEAISAATNTYIPPQSPTAAQRQHIPPRTSSSQSPAAAAAAAAAAAAATGL
RTPQQASDPNRPVQPPSSHAYDPAAYASYQQAIPPQAMQKMGAPYGMF
QQQQQAVAPMQQQVAVKEEIPPQQPKVRIGLDHFNFLAVLGKGNFGKVML
AETKSTKKLYAIKVLKKEFIIENDEVESTKSEKRVFLIANKERHPFLLNLHACFQT
ETRVYFVMEYISGGDLMLHIQRGQFGLKRAQFYAAEVLLALKYFHENGVIYRD
LKLDNILLTDGHIKIADYGLCKENMWYGSTTSTFCGTPEFMAPEILLDKKYGR
AVDWWAFGVLIYQMLLQQSPFRGEDEDEIYDAILADEPLYPIHMPRDSVSILQK
LLTREPRLGSGPTDAQEVMSHAFFRNINWDDIYHKRVPPPFLPTISSPTDTS
NFDQEFTSVTPVLTPVQSVLSQAMQEEFRGFSYTADFA

APÊNDICE J - Sequência de aminoácidos da proteína PkcA^{409-1116G579R} de *A. fumigatus*

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMLEMLIDSWFALEPVGRIHLTLSFAKQLKDRR
PFDIGLNRQGAVRQKKEEVHEKQGHKFVTQQFYNIMRCALCGDFLKYAAGM
QCADCKYTCHRKCYPKVVTCKISKANYETDPDEEKINHRIPHRFEGFSNISAN
WCCHCGYLLPFGRKSAKRCTECGLTCHAQCTHLVPDFC**R**MSMEAAANQILETL
IRAKNHNKSASVSSGLSGRTLRLPGGPPQAPQDNVALAYPQKPVEGAYGAPQ
RQPSAEAISAAATNTYIPQSPATAAQRQHIPPRTSSSQSPAAAAAAAAAAATGL
RTPQQASDPNRPVQPPSSSHAHYDPAAYASYQQAIPPQAMQKMGAPYGMF
QQQQQQAVAPMQQQVAVKEEIPPQQPKVRIGLDHFNFLAVLGKGNFGKVML
AETKSTKKLYAIKVLKKEFIIENDEVESTKSEKRVFLIANKERHPFLLNLHACFQT
ETRYYFVMEYISGGDLMLHIQRGQFGLKRAQFYAAEVLLALKYFHENGVIYRD
LKLDNILLTLDGHIKIADYGLCKENMWYGSTTSTFCGTPEFMAPEILLDKKYGR
AVDWWAFGVLIYQMLLQQSPFRGEDEDEIYDAILADEPLYPIHMPRDSVSILQK
LLTREPELRLGSGPTDAQEVM SHAFFRNINWDDIYHKRVPPPFLPTISSPTDTS
NFDQEFTSVTPVLTPVQSVLSQAMQEEFRGFSYTADFA

APÊNDICE K - Sequência de aminoácidos da proteína MpkA de *A. fumigatus*

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMLEMSDLQGRKVKVFNQDFIVDERYNVTKE
LGQGAYGIVCAATNVHTGEGVAIKKVTNVFSKILAKRALREIKLLQHFRGHRNI
TCLYDMDIPRPNDFNETYLYEELMECDLAAIIRSGQPLTDAHFQSFYQILCGLK
YIHSANVLHRDLKPGNLLVNADCELKICDFGLARGFSIDPEENAGYMT EYVATR
WYRAPEIMLSFQSYTKAIDVWSVGCILAE LLGGRPFFKGRDYVDQLNQILHYL
GTPNEETLSRIGSPRAQEYVRNLPFMPKIPFQRLFPNANPDALDLLDRMLAFD
PASRISVEEALEHPYLHIWHDASDEPTCPTTFDFHFEVVDDVQEMRKMIYDEV
VRFRNLVRQQSQAQAAAAAQQQQQQAQQTNVPIPDHQQGGWKQEEP KPQ
EVHAAGGHVNDLESSLQRGMDVQ

APÊNDICE L - Atividade chaperona da proteína recombinante Hsp90 na proteína recombinante MpkA

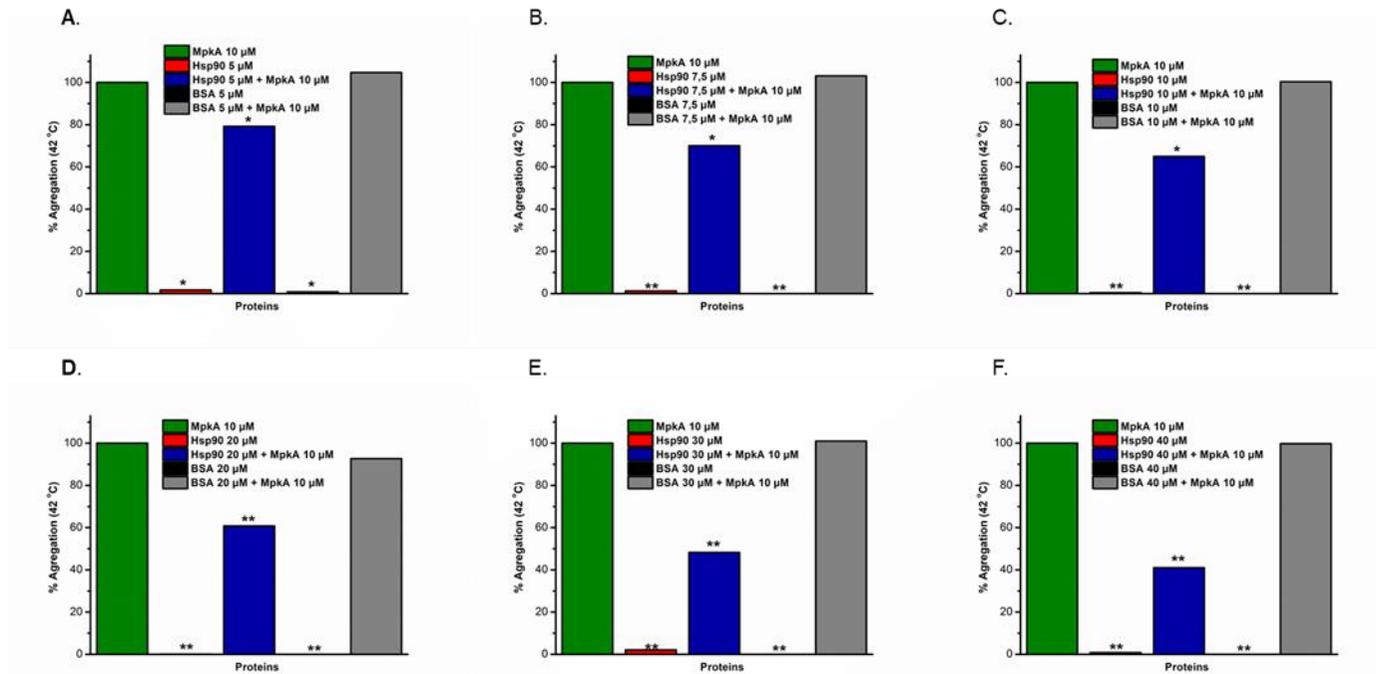


Figura L1: Atividade chaperona de Hsp90 de *A. fumigatus* com a proteína MpkA de *A. fumigatus*. (A-B-C-D-E-F). Porcentagens de agregação da MpkA calculadas na presença de 5 μ M, 7,5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, e 40 μ M de Hsp90. Os valores de agregação foram calculados considerando a agregação máxima da MpkA como 100 %. Como controle foi utilizado a proteína BSA incubada com a MpkA nas mesmas concentrações da Hsp90, onde foi possível observar que a agregação da MpkA se manteve inalterada.

APÊNDICE M - Lista de publicações

1. **ROCHA, MARINA CAMPOS**; GODOY, KRISSIA FRANCO DE; DE CASTRO, PATRÍCIA ALVES; HORI, JULIANA ISSA; BOM, VINÍCIUS LEITE PEDRO; BROWN, NEIL ANDREW; CUNHA, ANDERSON FERREIRA DA; GOLDMAN, GUSTAVO HENRIQUE; MALAVAZI, IRAN. The *Aspergillus fumigatus* pkcA^{G579R} 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**, v. 10, p. e0135195, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0135195.
2. BOM, VINÍCIUS LEITE PEDRO; DE CASTRO, PATRÍCIA ALVES; WINKELSTRÖTER, LIZZIANE K.; MARINE, MARÇAL; HORI, JULIANA I.; RAMALHO, LEANDRA NAIRA ZAMBELLI; DOS REIS, THAILA FERNANDA; GOLDMAN, MARIA HELENA S.; BROWN, NEIL ANDREW; RAJENDRAN, RANJITH; RAMAGE, GORDO ; WALKER, LOUISE A.; MUNRO, CAROL A.; **ROCHA, MARINA CAMPOS**; MALAVAZI, IRAN; HAGIWARA, DAISUKE; GOLDMAN, GUSTAVO H.. The *Aspergillus fumigatus* sitA Phosphatase Homologue Is Important for Adhesion, Cell Wall Integrity, Biofilm Formation, and Virulence. **Eukaryotic Cell**, v. 14, p. 728-744, 2015.
3. **ROCHA, M. C.**; FABRI, J. H. T. M.; GODOY, K. F. D.; CASTRO, P. A. D.; HORI, J. I.; CUNHA, A. F. D.; ARENTSHORST, M.; RAM, A. F. J.; VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J.; GOLDMAN, G. H.; MALAVAZI, I.. *Aspergillus fumigatus* MADS-box Transcription Factor rlmA Is Required for Regulation of the Cell Wall Integrity and Virulence. **G3: Genes, Genomes, Genetics (Bethesda)**, 2016. doi.org/10.1534/g3.116.031112.
4. PARK, JOOHAE; HULSMAN, MARK; ARENTSHORST, MARK; BREEMAN, MATTHIJS; ALAZI, EBRU; LAGENDIJK, ELLEN L.; **ROCHA, MARINA C.**; MALAVAZI, IRAN; NITSCHKE, BENJAMIN M.; VAN DEN HONDEL, CEES A.M.J.J.; MEYER, VERA ; RAM, ARTHUR F. J.. Transcriptomic and molecular genetic analysis of the cell wall salvage

- response of *Aspergillus niger* to the absence of galactofuranose synthesis. **Cellular Microbiology (Print)**, v. 18, p. 1268–1284, 2016.
5. DE OLIVEIRA BRUDER NASCIMENTO, ARIANE CRISTINA MENDES; DOS REIS, THAILA FERNANDA; DE CASTRO, PATRÍCIA ALVES; HORI, JULIANA I.; BOM, VINÍCIUS LEITE PEDRO; DE ASSIS, LEANDRO JOSÉ; RAMALHO, LEANDRA NAIRA ZAMBELLI; **ROCHA, MARINA CAMPOS**; MALAVAZI, IRAN; BROWN, NEIL ANDREW; VALIANTE, VITO; BRAKHAGE, AXEL A.; HAGIWARA, DAISUKE; GOLDMAN, GUSTAVO H.. Mitogen activated protein kinases Saka HOG1 and MpkC collaborate for *Aspergillus fumigatus* virulence. **Molecular Microbiology (Print)**, v. 100, p. 841-859, 2016.
 6. RIES, LAURE NICOLAS ANNICK*; **ROCHA, MARINA CAMPOS***; DE CASTRO, PATRÍCIA ALVES ; SILVA-ROCHA, RAFAEL ; SILVA, ROBERTO NASCIMENTO ; FREITAS, FERNANDA ZANOLLI ; DE ASSIS, LEANDRO JOSÉ ; BERTOLINI, MARIA CÉLIA ; MALAVAZI, IRAN ; GOLDMAN, GUSTAVO H.. The *Aspergillus fumigatus* CrzA Transcription Factor Activates Chitin Synthase Gene Expression during the Caspofungin Paradoxical Effect. **mBio**, v. 8, p. e00705-17, 2017. <http://dx.doi.org/10.1128/mbio.00705-17>. *contribuíram igualmente para a realização deste trabalho.
 7. **ROCHA, MARINA CAMPOS**; SANTOS, CAMILLA ALVES; MALAVAZI, IRAN.. The Regulatory Function of the Molecular Chaperone Hsp90 in the Cell Wall Integrity of Pathogenic Fungi. *Current Proteomics*, accepted.
 8. PIVA, ROGER HONORATO*; **ROCHA, MARINA CAMPOS***; PIVA, DIÓGENES HONORATO; MONTEDO, OSCAR RUBEM KLEGUES; IMASATO, HIDETAKE; MALAVAZI, IRAN; RODRIGUES-FILHO, UBIRAJARA PEREIRA . Combating pathogens with Cs 2.5 H 0.5 PW 12 O 40 nanoparticles: a new proton-regulated antimicrobial agent. *Journal of Materials Chemistry B*, v. 6, p. 143-152, 2018. *contribuíram igualmente para a realização deste trabalho.