

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

Gilberto Yanes Filho

**Investigando os mecanismos de síntese de ácidos graxos
insaturados em *Aspergillus fumigatus*: Insights funcionais sobre a Δ -
9 desaturase *SdeA***

Orientador: Prof. Dr. Iran Malavazi
Coorientador: Dr. Jonatas E. M. Campanella

**São Carlos-SP
2025**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

Gilberto Yanes Filho

**Investigando os mecanismos de síntese de ácidos graxos
insaturados em *Aspergillus fumigatus*: Insights funcionais sobre a Δ -
9 desaturase *SdeA***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado junto à Universidade Federal
de São Carlos, como requisito para a
obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia.

Orientador: Prof^o Dr. Iran Malavazi
Coorientador: Dr. Jonatas E. M. Campanella

**São Carlos - SP
2025**

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe, Cristina, ao meu pai, Gilberto e à minha irmã, Leticia, por todo o apoio e incentivo ao longo da minha jornada acadêmica. Por sempre acreditarem no meu potencial, pelo auxílio, suporte e presença em todos os momentos de minha vida. Sou imensamente grato pela liberdade criativa que sempre me concederam e respeitarem meu espaço durante todo o meu trajeto.

Ao meu estimado orientador, Prof. Dr. Iran Malavazi, sou grato por ter me proporcionado minha primeira experiência em um laboratório de pesquisa. Agradeço pelas inúmeras oportunidades concedidas durante minha orientação, por ser um mentor excepcional e por, incansavelmente, tentar mostrar o meu valor como cientista. Agradeço também por todo o apoio na minha caminhada como aluno e pesquisador, além da amizade e dos conselhos sempre bem vindos.

Ao meu querido co-orientador, Dr. Jonatas Erick Maimoni Campanella, por todos os ensinamentos transmitidos no ambiente de laboratório. Sou grato pela insistência e dedicação em nos ensinar, por sua impressionante capacidade de trabalho e por ser uma inspiração como cientista. Agradeço ainda pela parceria durante esses anos no laboratório, pelas caronas nos dias longos e por nunca ter deixado de acreditar em mim, sempre buscando extrair o melhor que eu poderia oferecer.

À minha querida amiga e companheira de laboratório, Giulia Sato, por tornar meus dias mais leves com sua alegria constante, por ouvir minhas angústias e dividir comigo suas próprias dificuldades. Sua amizade e confiança foram um alento em meio aos desafios diários, tanto no laboratório quanto fora dele. Sou profundamente grato por cada conversa, cada gargalhada nas madrugadas, pelos momentos em que choramos juntos e pelos inúmeros instantes em que encontramos força um no outro. Ter compartilhado esse caminho ao seu lado foi um privilégio que levarei para sempre comigo.

Aos meus queridos Aline Machado e Marcelo Folhas, que me acompanham desde o início da graduação, sou imensamente grato pela amizade duradoura. Mesmo com a distância, estiveram ao meu lado, oferecendo companhia e apoio durante os momentos difíceis. Compartilhamos alegrias e dores, e levarei comigo, com muito carinho, essa amizade.

Ao João Vitor Florido, meu querido amigo de longa data desde os meus 11 anos, agradeço pela lealdade e por ser um verdadeiro irmão. Sua presença e apoio ao longo desses anos significam muito para mim. Obrigado por continuar fazendo parte da minha vida.

Aos excelentes professores que tive durante a graduação, minha sincera gratidão pelo conhecimento e dedicação.

À FAPESP pelo apoio financeiro durante meu período como bolsista, que foi essencial para meu desenvolvimento não só como aluno de iniciação científica, mas também como aprendiz desempenhando o trabalho como técnico comprometido com a pesquisa e o laboratório.

Aos demais colegas, pelo auxílio e pela boa convivência ao longo dessa caminhada.

RESUMO

As infecções fúngicas invasivas causadas por *Aspergillus fumigatus* representam um importante desafio clínico, especialmente devido à limitação das terapias antifúngicas disponíveis e à relevância de vias metabólicas essenciais para a sobrevivência do patógeno. Entre essas vias, destaca-se o metabolismo de ácidos graxos insaturados, no qual atua o gene que codifica uma $\Delta 9$ -desaturase de ácidos graxos (*sdeA*) responsável pela produção de ácido oleico (C18:1) e palmitoleico (C16:1). A ausência ou redução da expressão da *sdeA* torna o fungo dependente do suprimento exógeno desses ácidos graxos, reforçando seu potencial como alvo antifúngico. Neste trabalho, investigou-se a importância funcional e estrutural da SdeA por meio da geração de mutantes condicionais, deleções dos domínios Cytb5 e hinge, mutações sítio-dirigidas em resíduos catalíticos e linhagens complementadas em locus seguro, utilizando CRISPR-Cas9. As análises incluíram validação genotípica, estudo da localização subcelular, ensaios fenotípicos em diferentes condições nutricionais e testes de virulência em modelo invertebrado. Os resultados demonstraram que o gene *sdeA* é essencial em *A. fumigatus* e que a proteína codificada atua como uma desaturase dimérica, cuja organização estrutural otimiza a transferência de elétrons, diferindo do mecanismo observado em desaturases de mamíferos. A deleção do domínio Cytb5 não altera a localização subcelular perinuclear e reticular da proteína, mas tudo indica que sua modificação comprometeu a viabilidade fúngica, com recuperação parcial do crescimento na presença de ácido oleico. A modelagem estrutural *in silico* foi fundamental para orientar entendimento do papel da SdeA no metabolismo lipídico, na adaptação ao estresse ambiental e na virulência de *A. fumigatus*.

Palavras-chave: *Aspergillus fumigatus*; $\Delta 9$ -desaturase; metabolismo lipídico; CRISPR-Cas9; mutantes condicionais.

ABSTRACT

Invasive fungal infections caused by *Aspergillus fumigatus* represent a major clinical challenge, particularly due to the limited availability of antifungal therapies and the importance of metabolic pathways essential for pathogen survival. Among these pathways, unsaturated fatty acid metabolism stands out, in which the gene acts by encoding a $\Delta 9$ fatty acid desaturase (*sdeA*) responsible for the production of oleic acid (C18:1) and palmitoleic acid (C16:1). The absence or reduced expression of *sdeA* renders the fungus dependent on the exogenous supply of these fatty acids, reinforcing its potential as an antifungal target. In this study, the functional and structural relevance of SdeA was investigated through the generation of conditional mutants, deletions of the Cytb5 and hinge domains, site-directed mutations in catalytic residues, and strains complemented at a safe-haven locus using CRISPR-Cas9. The analyses included genotypic validation, assessment of subcellular localization, phenotypic assays under different nutritional conditions, and virulence tests in an invertebrate model. The results demonstrated that *sdeA* is an essential gene in *A. fumigatus* and that the encoded protein functions as a dimeric desaturase, whose structural organization optimizes electron transfer, differing from the mechanism observed in mammalian desaturases. Deletion of the Cytb5 domain did not alter the characteristic perinuclear and reticular subcellular localization of the protein; however, this modification compromised fungal viability, with partial recovery of growth in the presence of oleic acid. *In silico* structural modeling was fundamental to guide the understanding of the role of SdeA in lipid metabolism, adaptation to environmental stress, and the virulence of *A. fumigatus*.

Key words: *Aspergillus fumigatus*; $\Delta 9$ -desaturase; SdeA; lipid metabolism; fungal virulence; CRISPR-Cas9; conditional mutants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Alinhamento e comparação das sequências de aminoácidos de homólogos de SdeA em diferentes organismos.	16
Figura 2 - Monômero de SdeA de <i>A. fumigatus</i> previsto pelo Alphafold3.	19
Figura 3 - Predição da estrutura do dímero de SdeA.	20
Figura 4- Construção da linhagem mutante <i>sdeA</i> ^{Δ_{citb5}} ::GFP	33
Figura 5- Construção da linhagem mutante <i>sdeA</i> ^{Δ_{hinge}}	35
Figura 6 - Sequenciamento da região correspondente ao domínio hinge do gene <i>sdeA</i>	36
Figura 7 - Microscopia confocal para a deleção do <i>Cytb5</i> e ensaios fenotípicos para os mutantes contendo as regiões <i>Cytb5</i> e hinge deletados.....	38
Figura 8 - Microscopia confocal e ensaios de crescimento do mutante ectópico.	41
Figura 9 - Modelagem estrutural, geração dos mutantes <i>sdeA</i> ^{H366A} e <i>sdeA</i> ^{H392} e ensaios fenotípicos.	44
Figura 10 - Análise comparativa da virulência das linhagens mutantes geradas.	46

LISTA DE ABREVIATURAS

bp/pb - Pares de bases

BSA - Albumina bovina sérica

CASP – Caspofungin

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

GFP - Proteína verde fluorescente

MM - Meio mínimo

mRFP - Proteína vermelha fluorescente monomérica

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro

ORF - *Open Reading frame* / fase de leitura aberta

PAE - Erro de alinhamento previsto

PBS - Tampão fosfato-salina

PCR - Reação em cadeia da polimerase

pLDDT - Teste de diferença de distância local prevista

q.s.p - Quantidade suficiente para

RE - Retículo endoplasmático

RMSD – Desvio quadrático médio

UV - Ultravioleta

WT - Wild-type/ linhagem selvagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. O fungo filamentoso <i>Aspergillus fumigatus</i>.....	11
1.2. Panorama das $\Delta 9$-desaturases fúngicas	12
1.3. Modelagem estrutural da proteína SdeA de <i>Aspergillus fumigatus</i> 16	
2. OBJETIVOS	21
2.1. Objetivos específicos	21
3. METODOLOGIA.....	22
3.1. Coleção de linhagens utilizadas.....	22
3.2. Linhagens de <i>A.fumigatus</i> utilizadas neste trabalho.....	22
3.3. Oligonucleotídeos.....	23
3.4. Meio de cultivo para <i>A.fumigatus</i>.....	23
3.5. Meio de cultivo para <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	24
3.6. Meio de cultivo para <i>E. coli</i>.....	24
3.7. Extração do DNA genômico a partir de micéliode <i>A. fumigatus</i> 24	
3.8. Extração do DNA genômico a partir de conídios de <i>A. fumigatus</i> com bead de vidro.....	24
3.9. Extração do DNA genômico rápida a partir de conideos de <i>A. fumigatus</i> com bead 0,2 mm	25
3.10. Mini preparação do DNA plasmidial e transformação bacteriana 26	
3.11. Preparo de células competentes de <i>S. cerevisiae</i> e transformação	26
3.12. Extração de DNA de <i>S. cerevisiae</i>	27
3.13. Transformação, isolamento de colônias e validações moleculares em <i>A. fumigatus</i>.....	27
3.14. Ensaio de virulência em modelo invertebrado.....	28
4. RESULTADOS.....	30
4.1. Deleção do domínio Cytb5 de SdeA.....	30
4.2. Deleção da região que conecta com o domínio desaturase na enzima SdeA (domínio hinge).....	34

4.3. <i>Microscopia confocal e ensaio fenotípico para os mutantes contendo os resíduos Cytb5 e hinge deletados</i>	36
4.4. <i>O domínio Cytb5 e sua importância para a atividade da Δ9-desaturase SdeA</i>	39
4.5. <i>Investigando as Histidinas H366 e H392 do domínio (CytB5) da Δ9-desaturase SdeA</i>	42
4.6. <i>Determinação da virulência em modelo invertebrado <i>Galleria mellonella</i></i> 45	
5. CONCLUSÃO.....	47
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

1. INTRODUÇÃO

1.1. O fungo filamentoso *Aspergillus fumigatus*

As espécies do gênero *Aspergillus* integram um amplo grupo de fungos de grande relevância patológica, agrícola, industrial, farmacêutica e científica. São consideradas generalistas, uma vez que conseguem crescer e se reproduzir utilizando uma ampla variedade de fontes de carbono (BAKER AND BENNET 2007). Sendo um fungo saprófito e prevalente no ambiente, é capaz de causar infecções invasivas graves em humanos utilizando estratégias como mascaramento molecular e manipulação da resposta imune, alterando a expressão gênica com a finalidade de evadir as defesas do hospedeiro. Seu ciclo de vida é predominantemente assexuado e inicia-se a partir de conídios, que são esporos assexuados microscópicos, altamente resistentes a condições ambientais adversas e facilmente dispersos pelo ar, constituindo a principal forma de propagação e infecção do fungo. Em condições favoráveis, os conídios germinam, passam por um processo de inchaço e emitem um tubo germinativo que dá origem às hifas, permitindo a formação do micélio. A partir do micélio, desenvolvem-se conidióforos que produzem novas cadeias de conídios, garantindo a manutenção do ciclo. A elevada capacidade de produção e dispersão de conídios, aliada à termotolerância e ao crescimento rápido das hifas, contribui tanto para a adaptação ambiental de *A. fumigatus* quanto para seu potencial patogênico em humanos, especialmente em indivíduos imunocomprometidos. (VAN DE VEERDONK *et al.* 2025). A transmissão ocorre principalmente pela inalação de conídios, que podem causar desde reações alérgicas até manifestações invasivas graves, com alta mortalidade se não tratadas adequadamente (THOMPSON AND YOUNG 2021). Estima-se que infecções por *Aspergillus fumigatus*, ao lado de outros fungos oportunistas como *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, resultem em mais mortes anuais do que a malária e a tuberculose (DENNING AND BROMLEY 2015; DENNING 2024).

A aspergilose apresenta um amplo espectro clínico, sendo dividida em aspergilose invasiva, crônica e alérgica, dependendo do estado imunológico do hospedeiro e das condições pulmonares preexistentes (KANJ *et al.* 2018). A epidemiologia mostra um aumento na incidência global, impulsionada pelo crescimento da população suscetível e fatores ambientais, como mudanças climáticas que favorecem a dispersão do fungo (WANG *et al.* 2022). Estudos recentes revelam mecanismos moleculares que conferem ao *A. fumigatus* alta virulência e capacidade de resistência, contribuindo para o desafio terapêutico (JENKS AND HOENIGL 2018). A virulência de *A. fumigatus* é multifatorial, onde depende de uma variedade de genes e moléculas que de forma conjunta propiciam a

adesão, colonização, disseminação e imunomodulação do fungo no hospedeiro (RHODES *et al.* 2001). Entre esses genes, destacam-se aqueles envolvidos na composição da parede celular, na resistência à resposta imune, na produção de metabólitos secundários e toxinas, na resposta ao estresse oxidativo, na aquisição de nutrientes, na termotolerância, bem como na composição de ácidos graxos da membrana celular, que influencia a fluidez de membrana e a adaptação do fungo às condições do hospedeiro. (ABAD *et al.* 2010).

O tratamento clínico da aspergilose envolve o uso de drogas como a anfotericina B, que é um polieno capaz de se ligar aos esteróis da membrana celular fúngica. Outro fármaco utilizado é o voriconazol, um triazol que inibe a enzima lanosterol desmetilase e, dessa forma, impede a síntese de ergosterol na membrana celular. Também são empregadas as equinocandinas caspofungina (CASP), anidulafungina e micafungina, que atuam por meio da inibição da β -1,3-glucana sintase e comprometem a manutenção da integridade da parede celular (PERLIN 2011; HERBRECHT *et al.* 2012). No entanto, estudos mostram que a terapia prolongada com azóis favorece o surgimento de linhagens resistentes (CAMPS *et al.* 2012; TASHIRO *et al.* 2012). Além disso, o tratamento muitas vezes não é eficaz devido à resistência intrínseca aos fármacos ou ao diagnóstico tardio. Altas concentrações desses medicamentos, especialmente da anfotericina B, também podem causar efeitos colaterais graves no paciente, dentre os quais o mais conhecida é a nefrotoxicidade (FANOS AND CATALDI 2000). Esse cenário reforça a necessidade de identificar novos alvos farmacológicos e desenvolver abordagens terapêuticas capazes de reduzir a mortalidade associada à aspergilose pulmonar invasiva (API). Outro fator interessante é a capacidade de *A. fumigatus* de crescer em temperaturas elevadas, sendo um dos principais fatores associados à sua patogenicidade, visto que há sobrevivência em 37°C, em picos acima de 55°C e até na forma de conídios viáveis em temperaturas de até 70°C (RHODES 2006).

1.2.Panorama das Δ 9-desaturases fúngicas

As membranas biológicas são fundamentais para o funcionamento da célula eucariótica, mantendo as diferenças entre os compartimentos intracelulares e o meio extracelular, servindo de plataforma para receptores e sensores, abrigando proteínas de transporte e enzimas metabólicas e regulando processos de sinalização (DAUM *et al.* 1998; ALBERTS *et al.* 2007). A membrana plasmática é composta principalmente por lipídios, incluindo fosfolipídios, esfingolipídios, esteróis e por proteínas, organizados em uma bicamada dinâmica e fluida (DAUM *et al.* 1998; ALBERTS *et al.* 2007).

Os fosfolipídios são os principais componentes estruturais e, por serem anfipáticos (com um grupo polar ligado ao glicerol-3-fosfato e duas cadeias de ácidos graxos), organizam a bicamada e mantêm propriedades físico-químicas, como o potencial de superfície [revisado em HENDERSON AND BLOCK (2014)]. Os esfingolipídios são moléculas mais complexas, com uma base esfingoide ligada a um ácido graxo e grupos polares contendo unidades de glicolipídeos e fosfolipídeos FERNANDES *et al.* (2018). Eles participam da formação das “jangadas lipídicas”, regiões que influenciam polaridade celular, sinalização e tráfego de proteínas [revisado em RELLA *et al.* (2016)]. Nessas regiões também está o ergosterol, sendo o principal esteroide dos fungos, essencial para elasticidade, permeabilidade e estabilidade da membrana revisado em ALCAZAR-FUOLI *et al.* (2008).

A membrana plasmática também funciona como sensor térmico em muitos microrganismos, sendo uma das primeiras estruturas a detectar variações de temperatura, impactando sua fluidez (DIGEL 2011; SHAPIRO AND COWEN 2012). Esse parâmetro é determinado pelo balanço entre ácidos graxos saturados e insaturados (DIGEL 2011; NGUYEN *et al.* 2011; SHAPIRO AND COWEN 2012; LEACH AND COWEN 2014). Em baixas temperaturas, diversos microrganismos aumentam a produção de ácidos graxos cis-insaturados evitando a rigidez da bicamada (ALBERTS *et al.* 2007). A síntese de ácidos graxos monoinsaturados em leveduras é catalisada pela esteroil-CoA desaturase ($\Delta 9$ -desaturase), codificada pelo gene essencial *OLE1* em *Saccharomyces cerevisiae* e localizada no retículo endoplasmático (STUKEY *et al.* 1990; MARTIN *et al.* 2007; NGUYEN *et al.* 2011). Essa enzima converte palmitoil-CoA (16:0) e esteroil-CoA (18:0) em palmitoleico (16:1) e oleico (18:1), que são incorporados aos fosfolipídios da membrana (MARTIN *et al.* 2007),

Em *C. albicans*, o homólogo de *OLE1* é essencial e necessário para a formação de hifas e clamidósporo (KRISHNAMURTHY *et al.* 2004). Em *A. nidulans*, o gene *sdeA* não é essencial, mas afeta a produção de conídios e ascósporos (WILSON *et al.* 2004). Em *A. fumigatus*, o ortólogo de *OLE1* foi caracterizado e é essencial (WANG *et al.* 2021). *OLE1* também está envolvido na resposta ao choque térmico e ao estresse de parede celular. Em leveduras, sua transcrição aumenta em baixas temperaturas (NAKAGAWA *et al.* 2002; SAHARA *et al.* 2002; SCHADE *et al.* 2004).

Para elucidar o efeito da ausência de ácidos graxos insaturados, principalmente oleico e palmitoleico, identificamos o ortólogo *SdeA^{Ole1}* em *A. fumigatus*, assim foram construídas no laboratório as linhagens *xyIP::sdeA* (mutante condicional), *sdeA::GFP* e *sdeA::3xHA*. A proteína codificada por esse gene possui homologia com *Ole1* de

levedura (53% de identidade e 72% de similaridade, e-value de $3e-161$), Ole1 de *C. albicans* (56% de identidade e 74% de similaridade, e-value de 0.0), Ole1 de *S. pombe* (57% de identidade e 98% de similaridade, e-value de 0.0), com a stearyl-CoA dessaturase 1 humana (SCD1) (40% de identidade e 57% de similaridade, e-value de $1e-66$) e especialmente SdeA de *A. nidulans* (92% de identidade e 95% de similaridade, e-value de 0.0), *A. niger* (92% de identidade e 100% de similaridade, e-value de 0.0) e *A. oryzae* (93% de identidade e 100% de similaridade, e-value de 0.0). A SdeA de *A. fumigatus* compartilha com as demais enzimas o domínio de desaturase de ácidos graxos, correspondendo à região mais conservada entre as sequências analisadas, porém, também apresenta o domínio tipo citocromo b5 (cytB5), ausente nos homólogos de mamíferos. (**Figura 1**).

O trabalho realizado previamente no laboratório estabeleceu as bases para a investigação do metabolismo de lipídios de membrana em *A. fumigatus*, demonstrando que o fator de transcrição de choque térmico HsfA está diretamente envolvido na regulação da biossíntese de ácidos graxos insaturados por meio do gene *sdeA*, que como foi explicado, codifica uma $\Delta 9$ -desaturase essencial. Nesse estudo, foi gerada a linhagem condicional *xyIP::sdeA*, permitindo a modulação da expressão desse gene essencial, o que revelou que a redução de *sdeA* compromete severamente o crescimento do fungo, a integridade da membrana e a tolerância ao estresse térmico, além de aumentar a sensibilidade à caspofungina. Também demonstraram que a proteína SdeA localiza-se no retículo endoplasmático e interage com a chaperona Hsp90, estabelecendo uma conexão funcional entre a resposta ao choque térmico, o metabolismo de ácidos graxos insaturados e a adaptação da membrana celular (FABRI *et al.* 2023). Esses achados inauguraram a linha de pesquisa do laboratório sobre o papel central da SdeA na fisiologia e termotolerância de *A. fumigatus*, a partir da qual o presente trabalho foi desenvolvido e aprofundado.

H. sapiens_SCD5 1 MP -GP -ATDAGKIPFCDAKEEIRAGLESSEGGGGPERP -GAR -GQRQNIIVRRVVMSSLLH 57
H. sapiens_SCD1 1 MPA -HLLQDDISSS -YTTTTITAPPSSRVLQNGGDKLETMPLY-LEDDIRPDIKDDIYDPTYKDK -EGP -SPKVEYVRRNIIIMSSLLH 83
S. pombe_Ole1 1 -MTAPSAATA -F -SSATTQPTTEGNASMRKRTIPVVPSPERKW-DPKAPKHIQEQPWTMGNWRRHLNWLHCLMIFGLP 74
A. nidulans_SdeA 1 -MSAPTADIRARAPEAKKVHIADTAINRHNWYKVVNWLNVFLIIGIP 46
A. fumigatus_SdeA 1 -MSAKPADASRPRAGDPVHIADTAITRONWYKVVNWLNVFLIIGIP 47
A. niger_SdeA 1 -MSAKPADASRPRADPKVHIADTVMTRONWYKVVNWLNVFLIIGIP 47
A. oryzae_SdeA 1 -MSAKTADATOPRAGDIKKVHIADTAITRSNWHKVVNWLNVFLIIGIP 47
S. cerevisiae_Ole1 1 MPTSGTTIELIDDQFPKDDSSSGIVDEVLTLEANILATGLNKKAPRIVNG - FGSLMGSKEMVSVFDDKKGNEKSNLDRLLEKDNQEKKEAKTIHISEQPWTLNWHQHLLNWLNMVLCVGM 123
C. albicans_Ole1 1 -MTTVEQLELTVDTITKLNIAAGTNKKVPRVVAAGLGGKMGTSDSLKVTAAE - -ITKDSMESLAEKDAKAYANKKHISEEPWTLDFAKKINLWLMILVVFIR 103

H. sapiens_SCD5 58 LGAVYSL-VLIPKAKPLTLLWAYFCFLLAALGVTAGAHLRWSHRSYRAKLPLRIFLAVANSMAFQNDIFENSRDHRRAHKYSETDADPHNARRGFFFSHIGWLFVRKHDRVIEKGRKLDVTDLLA 181
H. sapiens_SCD1 84 LGALYGI-TLIPTCKFYTWLWGFYFVSALGITAGAHLRWSHRSYKARLPLRFLLIANTMAFQNDVYEWARDHRAHKFSETHADPHNSRRGFFSHVGVLLVRKHFAVKEKGGSTLDSLLEA 207
S. pombe_Ole1 75 MIAIYGVFT--TPLQTKTLFAIIYYAYSGLGITAGYHRLWSHRAKAKKPLEYFLAAGGAAFEESIRWWSRDHRAHRYTDTDKDPYVNVKGFVYAHVQWMIILQNPFRIG--RSDVSDLNS 194
A. nidulans_SdeA 47 LYGCIQAFW--VPLQLKTAIWAVIYYFFTGLGITAGYHRLWAHCYSATLPLRIWLAAVGGGAVEGSIWWARDHRAHRYTDTDKDPYSVRKGLLYSHLDWMVMKQNPKRIG--RTDISDLNE 166
A. fumigatus_SdeA 48 LYGCISAFW--VPLQLKTAIWAVIYYFFTGLGITAGYHRLWAHCYSARLPLRIWLAAVGGGAVEGSIWWARDHRAHRYTDTDKDPYSVRKGLLYSHLDWMVMKQNPKRIG--RTDISDLNE 167
A. niger_SdeA 48 VYGCVQAFW--VPLQVQTAIWAVIYYFFTGLGITAGYHRLWAHCYSARLPLRIWLAAVGGGAVEGSIWWARDHRAHRYTDTDKDPYSVRKGLLYSHLDWMVMKQNPKRIG--RTDISDLNE 167
A. oryzae_SdeA 48 MYGCVQALW--VPLQLKTAIWAVIYYFFTGLGITAGYHRLWAHCYSARLPLRIWLAAVGGGAVEGSIWWARDHRAHRYTDTDKDPYSVRKGLLYSHLDWMVMKQNPKRIG--RTDISDLNE 167
S. cerevisiae_Ole1 124 MIGWYFALSGKVPHLNVFLSMFYAVGGVSI TAGYHRLWSHRSYSAHWPLRFYAFICGASVEGSAKWWGHSRIHHRYTDLRDPYDARRGLWYSHMGWMLLPNPKYKA--RADITDMTD 245
C. albicans_Ole1 104 VFGAYCAWNY--PPQWKTLLVTFVMAFSGSISITAGYHRLYSHKSDALEVRLFFAFFGAGIEGSIKWWGHSRIHHRYTDLRDPYDARRGLWYSHMGWMLTKANPKNRA--RADISDLVA 223

H. sapiens_SCD5 182 DPVVRIRKRYKISVVLKCFVPTLVPWYIWGESLWNSYFLASILRYTISLNIISWLVNSAAHMYGNRPYKHIISPQNPLVALGAIPEGFHHYHHTFFPDYASEFGLNFPNPTWFIDFMCWLG 306
H. sapiens_SCD1 208 EKLVMFDRRYKPGLLMCFILPTLVPWYFVWGETFQNSVVFATFLRYAVVLNATWLVNSAAHLFQYRPPYKNIISPENILVSLGAVGEGFHHYHHSFPDYDASEYRWHNFTTFIDCMAALG 332
S. pombe_Ole1 195 DPFVFNHRHFLPIASFMAFIFPSLFCGLLWQD-YRGGYFYAGVCLVVFVHATFCVNSLAHLISGPPFDITNSARNHIFITALVTLGEGHNYHHAFPNDYRNLGRWVEYDPTKIFIIYIASLFL 318
A. nidulans_SdeA 167 DPVVVQHRNRYLKVFTMGLAVPMLVAGLGWQD-WLGGFVYAGILRIFVQATFCVNSLAHLWLDQPPDDRNSPRDHVITALVTLGEGYHNFHHEFPDYSYRNAIEWHQYDPTKWSIWAWKQLG 290
A. fumigatus_SdeA 168 DPVVVQHRNRYLKVFTMGLVVPMLVAGLGWQD-WLGGFVYAGILRIFVQATFCVNSLAHLWLDQPPDDRNSPRDHVITALVTLGEGYHNFHHEFPDYSYRNAIEWHQYDPTKWTIWIKQLG 291
A. niger_SdeA 168 DPVVVQHRNRYLKVFTMGLIVPMLVSSLGWQD-WWGGFVYAGILRIFVQATFCVNSLAHLWLDQPPDDRNSPRDHVITALVTLGEGYHNFHHEFPDYSYRNAIEWHQYDPTKWSIWAWKQLG 291
A. oryzae_SdeA 168 DPVVVQHRNRYLKVFTMGLVVPMLVAGLGWQD-WWGGFVYAGILRIFVQATFCVNSLAHLWLDQPPDDRNSPRDHVITALVTLGEGYHNFHHEFPDYSYRNAIEWHQYDPTKWSIWIKQLG 291
S. cerevisiae_Ole1 246 DWTIRFQHRHYILLMLLTAFTLPTLICGYFFND-YMGLIYAGFIRVVIDQATFCINSLAHYIGTQPPDDRTPRDNWITAIIVTFEGEYHNFHHEFPDYSYRNAIKWYDPTKVIITLTSLVG 369
C. albicans_Ole1 224 DWVYTFQHRHYLLLMITAAFIPTLVAGLGWQD-YWGGFIYAGILKGFIAIQATFCVNSLAHLWLDQPPDDRTPRDNVLTAFVTFEGEYHNFHHEFPDYSYRNALKWYDPTKVTIWCLSKLG 347

H. sapiens_SCD5 307 ATDRKRATKPMIEARKARTGSSA 330
H. sapiens_SCD1 333 AYDRKKVSKAAILARIKRTGDNYSKSG 359
S. pombe_Ole1 319 AYNLNTFPDNEIQKGIQQKQKVLDRWRAKLNWGIPLDQLPVMFEDEFLEQSKT-RPLVLIINGVVHDMTGFEHPGGGLLRSAFGKDATAAFNGGVYDHTNGAHLNLLSTYRVAVVRGGMEVEV 440
A. nidulans_SdeA 291 AYDLKKFRANEIEKGRVQQLQKKLDRKRAATLDWGTPLDQLPVMWEWDDYVEQAKNRRGLVIAAGVVHDVDFIKDHPGGKAMINSGIGKDATAMFNGGVYHNSNAAHNLLSTMRVGVIRGGCEVEI 415
A. fumigatus_SdeA 292 AYDLKQFRANEIEKGRVQQLQKIDQKRAKLDWGTPLDQLPVMWEWDDYVEQAKNRRGLVIAAGVVHDVDFIKDHPGGKAMINSGIGKDATAMFNGGVYHNSNAAHNLLSTMRVGVIRGGCEVEI 416
A. niger_SdeA 292 AYDLKKFRANEIEKGRVQQLQKKLDQKRAKLDWGTPLDQLPVMWEWDDYVEQAKNRRGLVIAAGVVHDVDFIKDHPGGKAMINSGIGKDATAMFNGGVYHNSNAAHNLLSTMRVGVIRGGCEVEI 416
A. oryzae_SdeA 292 AYDLKQFRANEIEKGRVQQLQKKIDQKRAKLDWGTPLDQLPVMWEWDDYVEQAKNRRGLVIAAGVVHDVDFIKDHPGGKAMINSGIGKDATAMFNGGVYHNSNAAHNLLSTMRVGVIRGGCEVEI 416
S. cerevisiae_Ole1 370 AYDLKKFSQNAIEEALIQEQDKKINKKKAKINWGPVLTDLPMWDKQTFLAQSKENKGLVITSGIVHDVSGYISEHPGGETLIKALGKDATKAFSGGVYRHSNAQNLADMRVAVIKESKNSAI 494
C. albicans_Ole1 348 AYNLKKFSQNAIEEALIQEQDKKLDQKRAKLDWGTPLDQLPVMWEWDDYVEQAKNRRGLVIAAGVVHDVDFIKDHPGGKAMINSGIGKDATAMFNGGVYHNSNAAHNLLSTMRVAVVKDQEVNAD 471

H. sapiens_SCD5
H. sapiens_SCD1
S. pombe_Ole1 441 WKSAGAGQL-PMKDTGGQKIVRVGEGITRIQPPIEAAAAAN 479
A. nidulans_SdeA 416 WKRAQKENVEYVRDGSQQRVIRAGEQPTKIPEIPTADAA 455
A. fumigatus_SdeA 417 WKRAQKESGVEYVRDESQQRVIRAGQVTKIPDIPTADAA 456
A. niger_SdeA 417 WKRAQKEGAGYVRDDAQQQRVIRAGEQVTKIPEIPTADAA 456
A. oryzae_SdeA 417 WKRSQKESDYVRDSSGQRVIRAGEQVTKIPEIPTADAA 456
S. cerevisiae_Ole1 495 RMAK RGEIYETGKFFS 510
C. albicans_Ole1 472 TFDLQ EQMM-EKEKQS 486

Figura 1 - Alinhamento e comparação das sequências de aminoácidos de homólogos de SdeA em diferentes organismos.

Sequências de aminoácidos de *A. fumigatus*: SdeA (AFUB_091500), *S. cerevisiae* Ole1 (YGL055W), *S. pombe* Ole1 (SPCC1281.06c), *C. albicans* Ole1 (C1_08360C), *A. nidulans* SdeA (AN6731), *A. niger* SdeA (An07g01960), *A. oryzae* SdeA (AO090005000456), SCD1 (NCBI ID: 6319) e SCD5 (NCBI ID: 79966) de *Homo sapiens* foram alinhadas usando a ferramenta Clustal Ω . Resíduos idênticos são representados em caixas azuis sombreadas. As setas verdes indicam resíduos de lisina ubiquitinados na proteína Ole1 de levedura, como sinal para degradação via sistema ubiquitina-proteassoma. As setas roxas indicam resíduos de His conservados que coordenam átomos de ferro durante a reação enzimática que culmina na dessaturação de seus substratos na enzima humana (WANG *et al.* 2015). A linha ciano indica os limites do domínio de ácido graxo desaturase (Pfam PF00487, Trp 66 – Thr 282), a linha amarela indica o domínio semelhante a ligação heme/esteróide tipo citocromo b5 (Pfam PF00173, Leu 331-Arg409), ambos baseados na proteína Ole1 da levedura. As caixas sombreadas verdes indicam a localização dos resíduos KK (resíduos 17-18 e 313-314) que são sinais de localização ER previstos, e as quatro caixas pretas pontilhadas indicam as regiões transmembrana ER de SdeA identificadas pela previsão da topologia transmembrana. A proteína SdeA prevista de *A. fumigatus* mostra homologia significativa com *S. cerevisiae* Ole1 (53% de identidade e 72% de similaridade, e-valor $3e-161$), *C. albicans* Ole1 (56% de identidade e 74% de similaridade, e-valor 0,0), *S. pombe* Ole1 (57% de identidade e 98% de similaridade, e-valor 0,0), o humano SCD1 (40% de identidade e 57% de similaridade, e-valor $1e-66$) e especialmente o SdeA de *A. nidulans* (92% de identidade e 95% de similaridade, e-valor 0,0), *A. niger* (92% de identidade e 100% de similaridade, e-valor 0,0) e *A. oryzae* (93% de identidade e 100% de similaridade, e-valor 0,0). As setas pretas indicam os resíduos H366 e H392, que correspondem às histidinas altamente conservadas do domínio tipo citocromo b5 que será melhor elucidado na seção 4.5 deste trabalho. Fonte: FABRI *et al.* (2023).

1.3. Modelagem estrutural da proteína SdeA de *Aspergillus fumigatus*

A presença de um domínio citocromo b5 (Cytb5) nas $\Delta 9$ -desaturases fúngicas, como a SdeA de *A. fumigatus*, estabeleceu uma linha de investigação no laboratório relacionada ao seu mecanismo catalítico que culminou com a publicação de um artigo de revisão em que estabelecemos as diferenças entre as desaturases dessa classe em fungos com as respectivas proteínas de mamíferos (CAMPANELLA *et al.* 2025). Em contraste com as desaturases de mamíferos (SCD1/SCD5), que dependem de proteínas Cytb5 externas, isto é, codificadas por genes específicos para fornecer os elétrons necessários para a introdução da dupla ligação no carbono 9 dos substratos ácido esteárico e palmítico para gerar ácido oleico e palmitoleico, respectivamente, a desaturase SdeA é uma proteína autossuficiente que já integra seu próprio Cytb5 como domínio C-terminal (FABRI *et al.* 2023; CAMPANELLA *et al.* 2025). Os modelos preditivos de estrutura a serem apresentados também revelam que essa organização fúngica é diferenciada daquela observada em mamíferos. Considerando que SdeA desempenha um papel essencial em *A. fumigatus*, essa distinção estrutural é crucial e representa um alvo promissor para o desenvolvimento de inibidores seletivos para $\Delta 9$ -desaturases fúngicas (FABRI *et al.* 2023; CAMPANELLA *et al.* 2025). A essencialidade do Cytb5 nas desaturases fúngicas é pouco explorada na literatura. Apenas uma única publicação de 1995, evidenciou a essencialidade do domínio Cytb5 da proteína Ole1 de *S. cerevisiae* (MITCHELL AND MARTIN 1995). Nesse trabalho, é demonstrado que a complementação de um mutante Ole1 por uma $\Delta 9$ -desaturase

de rato exigia a presença adicional de um gene *cytb5* funcional, sugerindo mecanismos diferentes na atividade da enzima de fungos em organismos superiores. Além disso, mutações ou deleções no domínio Cytb5 da Ole1p, mesmo em células com níveis normais de Cytb5 endógeno, resultaram em dependência de ácidos graxos insaturados para o crescimento, sugerindo que o domínio era essencial para a correta função da enzima e que a complementação por outra proteína com domínio Cytb5 não é possível (MITCHELL AND MARTIN 1995). Um estudo recente revelou que a $\Delta 9$ -desaturase de mamíferos (SCD1) forma um complexo ternário ativo com Cytb5 e Cytb5 redutase. No entanto, quando essas proteínas foram fundidas em uma única cadeia polipeptídica (simulando a enzima fúngica), a transferência de elétrons do Cytb5 para a desaturase se mostrou mais rápida e eficiente do que na estrutura de complexo (SHEN *et al.* 2022).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa publicou um artigo de revisão discutindo aspectos relacionados à importância de SdeA em *A.fumigatus* e um panorama abrangente a respeito de sua estrutura e função e aspectos relacionados as diferenças críticas encontradas em homólogos fúngicos quando comparados a enzima de mamíferos (CAMPANELLA *et al.* 2025). A revisão traz indícios importantes a partir da modelagem estrutural, que auxiliou em grande parte dos experimentos previstos neste trabalho.

A proteína inteira foi modelada com dois domínios separados por uma longa dobradiça helicoidal usando *AlphaFold3* (**Figura 2A**). O domínio N-terminal (resíduos 19-309) foi previsto com alta pontuação para avaliar a confiança local da predição da estrutura para cada resíduo (aminoácido) individual da proteína (pLDDT) mostrando similaridade estrutural com a estrutura cristalina da SCD1 humana (WANG *et al.* 2015), PDB 4zyo), com um desvio quadrático médio (RMSD) de 0,8 Å sobre 204 pares de átomos de carbono α . Superpondo ambas as estruturas, o estearoil-Coenzima A, cristalizado ao lado do SCD1, se encaixou no canal de ligação previsto de SdeA, enquanto os dois átomos de zinco foram coordenados pelas 8 histidinas conservadas, sugerindo que o mecanismo catalítico proposto para a enzima humana pode estar conservado no homólogo fúngico (**Figura 2B**). O domínio C-terminal de SdeA (resíduos 330-409) foi previsto para ser semelhante ao citocromo b5, enquanto os resíduos 410-456 foram previstos com baixa pontuação de pLDDT, por conta da baixa cobertura no alinhamento de sequência múltipla gerado como entrada. Ao superpor a estrutura de RMN do citocromo b5 de rato neste domínio (ARNESANO *et al.* 1999) - PDB 1BFX, RMSD de 1,0 Å sobre 59 pares de átomos de carbono α), o grupo heme

está bem colocado no canal de coordenação C-terminal de SdeA, com a histidina 366 e 392 coordenando o íon de ferro de cada lado (**Figura 2C**). Assumindo que o Citocromo b5 fornece a poder redutor para a dessaturação, investigamos como se daria a estrutura terciária ou eventualmente quaternária do polipeptídeo SdeA. Nosso modelo inicial revelou que ambos os domínios estão espacialmente separados, o que impede a predição de como as duas porções N e C terminal estariam arranjadas. Além disso, a dobradiça helicoidal estruturada entre eles não favorece a interação entre ambos os domínios de forma intramolecular, isto é, um dobramento da porção N-terminal (domínio desaturase) em relação ao domínio C-terminal (domínio CytB5) de um mesmo protômero. Essa observação possibilitada a partir do modelo inicial nos levou a hipótese de que para o acoplamento entre o domínio desaturase e o domínio cytb5, a enzima necessitava que dois protômeros estivessem na forma dimérica, já que um trabalho anterior havia sugerido que a Ole1 em *S. cerevisiae* pode dimerizar *in vivo* (LOU AND SHANKLIN 2010).

Assim, novamente foi utilizado o AlphaFold3 Multimer para modelar o dímero de SdeA (RICHARD *et al.* 2022). A organização dimérica de SdeA sugere uma interação do domínio C-terminal (Cytb5) do protômero 1 com o domínio N-terminal (SdeA) do protômero 2, com o grupo heme apontando para o local de coordenação do zinco (**Figura 3A**), em uma topologia semelhante à proposta por Bai (2015) para a desaturase SCD1 de *H. sapiens*. Esta disposição permitiria a transferência da energia redutora do grupo heme para o sítio catalítico da SdeA após a dimerização (**Figura 3B**). A longa dobradiça helicoidal entre os dois domínios (resíduos 301-321) interage de forma antiparalela, apoiada por uma rede de ligações de hidrogênio e pontes de sal (**Figura 3C**), uma interação suportada pelo gráfico PAE do modelo (**Figura 3D**; quadrados vermelhos).

Assim, os resultados da predição do modelo tridimensional de SdeA de *A. fumigatus*, que pode se constituir em um protótipo para explicar a organização estrutural de todas as $\Delta 9$ desaturases fúngicas, sugerem que os protômeros se associam para gerar a forma funcional da enzima. Isso pode ter implicações sobre como os domínios Cytb5/heme de uma subunidade interagem estruturalmente com o sítio catalítico da outra (cooperação intermolecular), o que é relevante para a eficiência da reação. Isso reforça a característica única dos fungos de expressarem a uma proteína bifuncional e autossuficiente que alberga o domínio Cytb5 na região C-terminal do domínio desaturase o que pode ter implicações em como estes organismos se adaptam rapidamente a vários estresses ambientais ao longo do

tempo no nicho ecológico e possivelmente no ambiente do hospedeiro mamífero (CAMPANELLA *et al.* 2025).

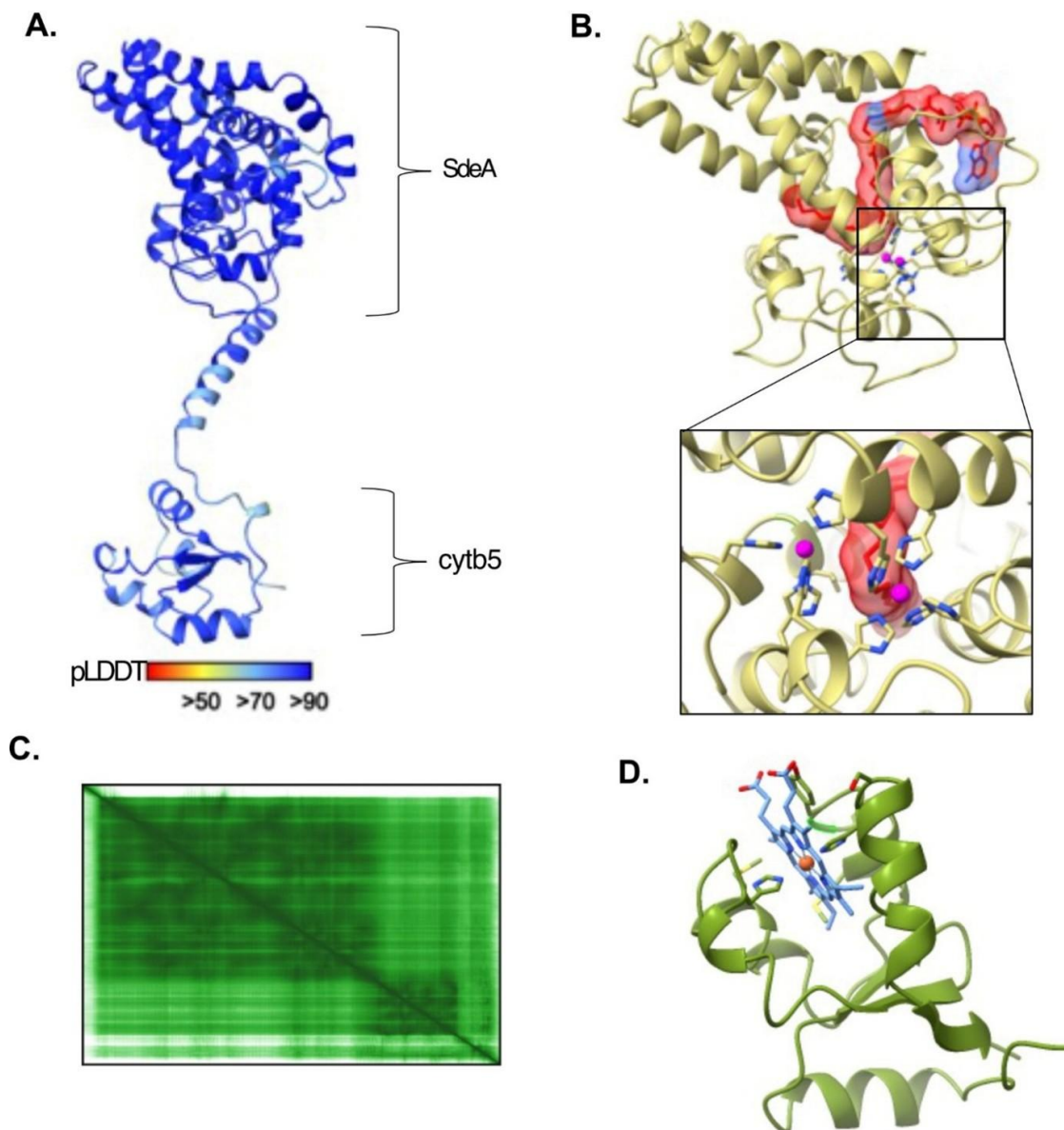


Figura 2 - Monômero de SdeA de *A. fumigatus* previsto pelo AlphaFold3.

(A) Estrutura de SdeA (resíduos 19 a 409) colorida pela confiança pLDDT. Essa estrutura é composta por dois domínios: um domínio desaturase, que vai dos resíduos 19 a 309, e um domínio citocromo b5, que vai dos resíduos 330 a 409. Esses domínios são separados por um linker de 21 resíduos, denominado neste trabalho de *hinge*. (C) No painel inferior, o gráfico de erro PAE para o monômero de SdeA representa dois domínios claros, sendo o domínio desaturase destacado em amarelo e o domínio citocromo b5 destacado em azul claro. (B) Domínio desaturase de SdeA (resíduos 37-290), colorido em dourado. A molécula de estearoil-CoA e os íons de zinco foram ancorados na estrutura ao alinhar SdeA com a estrutura cristalográfica do SDC1 humano (PDB 4zyo). Estearoil-CoA é representado em vermelho e azul, com uma densidade de 3 Å ao redor dele. Os íons de zinco são representados em magenta. No painel inferior, as nove histidinas estão representadas próximas aos íons de zinco alinhados. (D) Domínio citocromo b5 de SdeA (resíduos 330-409), representado em verde. O grupo prostético heme, colorido em azul e com átomos de oxigênio em vermelho e ferro em laranja, foi ancorado na estrutura ao alinhar SdeA com a estrutura de RNM do citocromo b5 (PDB 1BFX). Fonte: CAMPANELLA *et al.* (2025).

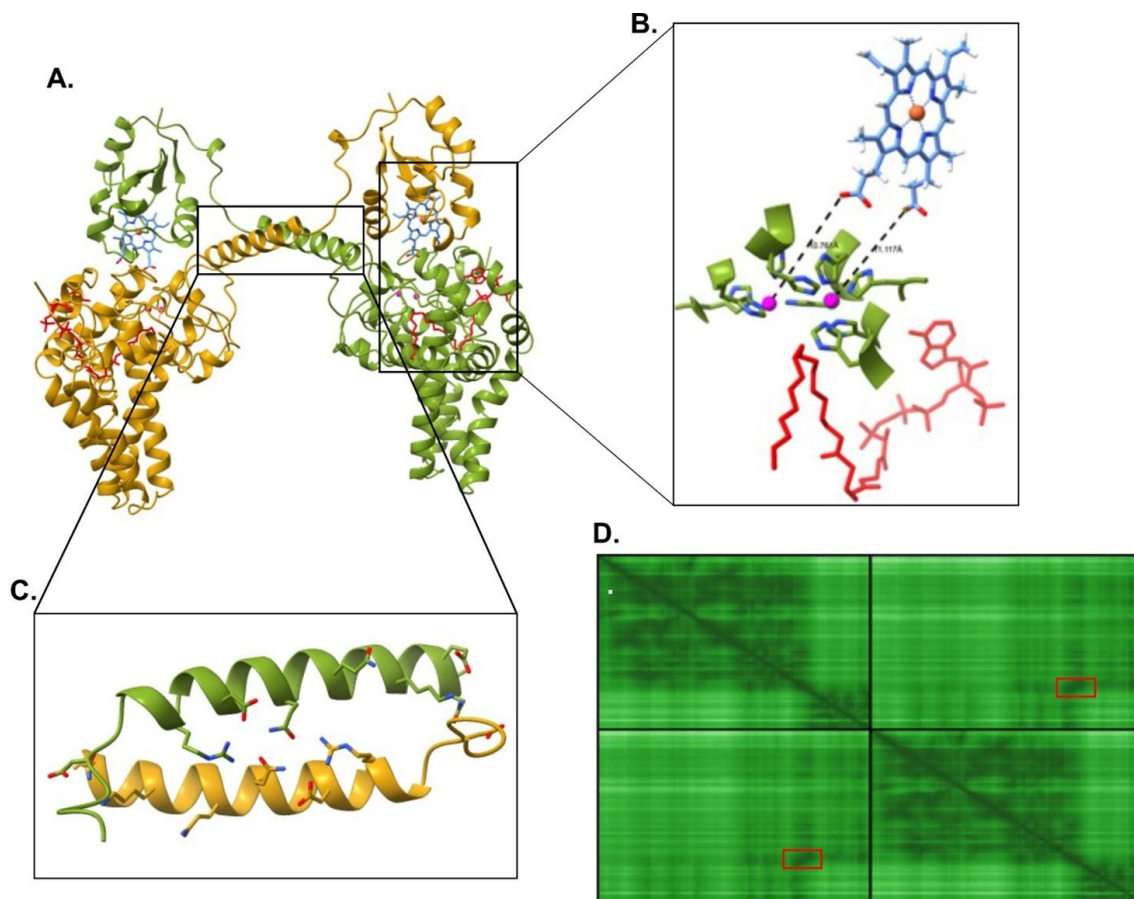


Figura 3 - Predição da estrutura do dímero de SdeA.

(A) Dímero de SdeA (resíduos 19-409), com o protômero 1 representado em dourado e o protômero 2 em verde. Estearoil-CoA, representado em vermelho, assim como os íons de zinco, representados em magenta, foram ancorados nos protômeros para alinhar SdeA com a estrutura cristalográfica do SDC1 humano (PDB 4zyo). O grupo prostético heme, colorido em azul e com átomos de oxigênio em vermelho e ferro em laranja, foi ancorado na estrutura ao alinhar SdeA com a estrutura de RNM do citocromo b5 (PDB 1BFX). (B) Arranjo das moléculas envolvidas na catálise de SdeA. Após a dimerização, o grupo heme do protômero 2 será posicionado em proximidade do sítio catalítico da desaturase do protômero 1. As distâncias entre o heme ancorada e os íons de zinco ancorados e estearoil-CoA são representadas por linhas pontilhadas pretas. O grupo heme é colorido em azul e com átomos de oxigênio em vermelho e ferro em laranja, estearoil-CoA representado em vermelho, íons de zinco em magenta e resíduos de SdeA em verde e azul, onde azul são os átomos de nitrogênio. (C) Interface de dimerização no linker (*hinge*) de SdeA (resíduos 300-322). Os dois linkers interagem principalmente via interações hidrofóbicas, com a participação de I308, L311 e I315. (D) Gráfico de Erro Alinhado Previsto (PAE) para o dímero de SdeA. Os quadrantes 1 e 4 estão relacionados aos protômeros 1 e 2 independentemente, enquanto os quadrantes 2 e 3 se referem à interação entre os protômeros. A área destacada em um quadrado vermelho relaciona-se à confiança entre ambos os linkers. Fonte: CAMPANELLA *et al.* (2025).

2. OBJETIVOS

Diante dos achados estruturais anteriores sobre a provável estrutura da desaturase SdeA de *A. fumigatus* este trabalho teve como objetivo central investigar a importância estrutural e funcional da enzima essencial $\Delta 9$ -desaturase (SdeA) de *A. fumigatus*, por meio da geração e caracterização de mutantes condicionais com deleção dos domínios Cytb5 e *hinge*, complementação gênica em um locus seguro *Safe haven* (Sh) e mutagênese sítio-dirigida das histidinas do domínio CytB5 envolvidas na organização e função deste domínio, visando elucidar os mecanismos moleculares que sustentam sua atividade enzimática e contribuição para a virulência fúngica.

2.1. Objetivos específicos

- Caracterizar a organização estrutural da *sdeA* de *A. fumigatus* e validar suas implicações funcionais.
- Desenhar primers específicos para amplificar e deletar as porções correspondentes aos domínios *cytb5* e *hinge*, a fim de obter mutantes condicionais e derivar novas linhagens a partir dessa estratégia
- Utilizar o vetor pFC332, contendo a sequência otimizada da nucleasse Cas9 para *Aspergillus*, o elemento replicativo AMA1 e o marcador de resistência à higromicina, para viabilizar a edição genética e a seleção dos transformantes.
- Inserir o cassete de complementação no locus *Safe haven* (Sh), previamente descrito como um sítio genômico seguro para integração de cassetes heterólogos, evitando efeitos de posição sobre a expressão gênica.
- Construir e amplificar um cassete de reparo (DNA donor) contendo a sequência (*p*)*sdeA::sdeA Δ cytb5::GFP*, flanqueada por regiões homólogas de 50 pb do local de inserção por CRISPR, para permitir a recombinação homóloga no locus alvo.
- Transformar e validar as construções em *A. fumigatus*, utilizando as linhagens *sdeA::GFP* e *xyIP::sdeA*, como background experimental para as investigações sobre a importância dos domínios *cytb5* e *hinge*.
- Validar por PCR e microscopia de fluorescência as linhagens contendo deleções, complementações e mutações, comparando-as com a linhagem selvagem.
- Avaliar a complementação funcional do domínio Cytb5 por meio da inserção ectópica desse domínio fusionado à mRFP em um mutante com o Cytb5 deletado, analisando sua localização subcelular.

- Realizar mutagênese sítio-dirigida nas histidinas catalíticas H366 e H392 presentes no domínio CytB5, substituindo-as por alanina (H366A e H392A), a fim de determinar seu papel na coordenação do grupo heme do domínio *cytb5* e na atividade da $\Delta 9$ -desaturase.
- Conduzir ensaios fenotípicos de crescimento em diferentes condições de carbono (glicose e xilose) para avaliar o padrão de expressão da *sdeA* sob regulação do promotor *xyIP* e testar hipóteses de não complementação em meio sem xilose.
- Realizar ensaios de virulência em modelo invertebrado (*Galleria mellonella*) para investigar o impacto das deleções e mutações na virulência fúngica.

3. METODOLOGIA

Os experimentos gerados foram baseados em protocolos de acordo com padronizações no cotidiano do laboratório, nossa finalidade foi gerar mutantes com diferentes abordagens genéticas que contribuíram para entender o papel da *sdeA* como alvo principal deste trabalho.

3.1. Coleção de linhagens utilizadas

As linhagens *SdeA::GFP*, *SdeA::3xHA* e *xyIP::SdeA* (FABRI *et al.* 2023) foram utilizadas como linhagens recipientes para a construção dos mutantes em *A. fumigatus*. A linhagem FGSC 9721 de *Saccharomyces cerevisiae*, foi utilizada para construção de cassetes gênicos por recombinação homóloga, seguindo as metodologias de (MALAVAZI AND GOLDMAN 2012) Para transformações bacterianas, foi utilizada a linhagem DH10 β (Thermo Fisher).

3.2. Linhagens de *A. fumigatus* utilizadas neste trabalho

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

Linhagem	Genótipo	Referência
<i>ΔakuB</i> ^{KU80}	<i>ΔakuB</i> ; <i>pyrG</i> - <i>MAT1-1</i>	(da Silva Ferreira <i>et al.</i> 2006)
<i>xyIP::sdeA</i>	<i>pyrG::xyIP::sdeA</i> ; <i>ΔakuB</i>	(Fabri <i>et al.</i> 2022)
<i>sdeA::GFP</i>	<i>sdeA::GFP::pyrG</i> ; <i>ΔakuB</i>	(Fabri <i>et al.</i> 2022)
<i>sdeA::3xHA</i>	<i>sdeA::3xHA::ptrA</i> ; <i>ΔakuB</i>	(Fabri <i>et al.</i> 2022)
<i>xyIP::sdeA</i> ; <i>sdeA</i> ^{Δcytb5} ::GFP(Sh)	<i>xyIP::sdeA</i> ; <i>sdeA</i> ^{Δcytb5} ::GFP(Sh); <i>ΔakuB</i>	Este trabalho
<i>xyIP::sdeA</i> ; <i>sdeA</i> ^{Δcytb5} (Sh); <i>cytb5::mRFP</i>	<i>xyIP::sdeA</i> ; <i>xyIP::sdeA</i> ^{Δcytb5} ::GFP; <i>cytb5::mRFP::3xHA</i> ; <i>ΔakuB</i>	Este trabalho

<i>xyIP::sdeA; sdeA^{Δhinge}(Sh)</i>	<i>xyIP::sdeA; xyIP::sdeA^{Δhinge}; ΔakuB</i>	Este trabalho
<i>xyIP::sdeA; sdeA^{H366A}(Sh)</i>	<i>xyIP::sdeA; xyIP::sdeA^{H366A}; ΔakuB</i>	Este trabalho
<i>xyIP::sdeA ;sdeA^{H392A}(Sh)</i>	<i>xyIP::sdeA; xyIP::sdeA^{H392A}; ΔakuB</i>	Este trabalho

3.3.Oligonucleotídeos

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados para a construção e validação das linhagens utilizadas.

Primer	Sequência
IM-170	5'-GGAACACGGGGAATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCA-3'
IM-174	5'-TGATCTGGGTATCTTGAAAAGC-3'
IM-315	5'- gtaacgccagggttttcccagtcacg ACGCGCAGAGCCTTATCACGTACCC-3'
IM-318	5'- <i>gcgqgataacaatttcacacagggaaacagc</i> AGAGGAGGAGCCACGGTGACAA-3
IM-319	5'-GGAACACGGGGAATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCA-3'
IM-320	5'- gtaacgccagggttttcccagtcacg ACGCCGTTACACCGACACTGACAAG-3'
IM-391	5'-AGCTACATTTATCTTCAATG-3'
IM-392	5'-AGCCTGAAGTCCTGACCATC-3'
IM-448	5'-CTATCATGGGGTGACGATGAGCCG-3'
IM-745	5'-CGTCCAACATCAGCGTCATG-3'
IM-746	5'-TCCGTTCCATTACGCCTTCC-3'
IM-751	5'- <u>aaagttcttctccttactcat</u> TCCCGTGTTCC <u>Cctggtcgagagggat</u> acccc-3'
IM-756	5'-TTTGATAGTTCATCCATGC-3'
IM-769	5'-TTACACATGGCATGGATGAACTATACAAATAAGCATTTCCTTACACTATATCAC-3'
IM-801	5'GGGAAGCTGGTTCGAGAGGGATACCCCAATCCTGCTTCAGATCATAGGCTAGACC-3'
IM-802	5'-AGCTTGGTCTAGCCTATGATCTGAAGCAGGATTGGGGTATCCCTCTCGAC-3'
IM-803	5'-GGGTCTCCAACATGTCATTAGC-3'
IM-804	5'-GCAAAGACATGGTTCGAGTTCGT-3'
IM-813	5'-AGAGGGATACCGTTCGAT <u>cttcttctg</u> CAT <u>gttgccgacctttg</u> cgtttct-3'
IM-814	5'-ATG <u>caqaqaqaq</u> ATCGACGGTATCCCTCTCGACCAGC
IM-815	5'-gcggaGGAGGTGGTAGCGGTGGTATGGCCTCCTCCGAGGAC-3'
IM-843	5'- <u>gctggtgtttcacg</u> atgtgaccgattcatcaaggacGCC <u>cctggtgca</u> aaagctatg-3'
IM-844	5'- <u>gccaatgccg</u> agttgatcatagctttgccaccaggGGCgtccttgatgaaatcggtcac-3'
IM-845	5'- <u>aggatgctactg</u> ccatgttcaacggtggaqgtttacaacGCCtcaaatgctgccacaacc-3'
IM-846	5'- <u>cgcatgtagacagc</u> aggtgtggtgagcatttgaGGCgttgaactccaccgttgaac-3'
IMg-48	5'-GCGCAGAGCCTTATCACGTACCC-3'
IMg-49	5'-AGCTACATTTATCTTCAATG-3'

Letras minúsculas em negrito indicam homologia à sequência do sítio de clonagem do plasmídeo pRS426.
Letras minúsculas sublinhadas indicam homologia a alguma sequência do cassete.

3.4.Meio de cultivo para *A.fumigatus*

O meio mínimo é composto de solução de sais 5,0% (p/v), dextrose 1,0% (p/v), solução de elementos traços 0,1% (p/v), ágar 2% (p/v) e água destilada q.s.p 1000 mL. Para o meio Mínimo líquido, não é adicionado ágar. O meio de regeneração dos protoplastos de uso para transformações em *A. fumigatus* consiste das proporções do meio mínimo adicionado de Sorbitol 1,2 M. Para o meio Top Ágar de regeneração dos protoplastos é adicionado 1%(p/v) de ágar. Para o preparo do meio suplementado

de xilose é adicionada uma diluição de 1% (p/v) a partir da solução estoque 25% (p/v) de xilose.

3.5.Meio de cultivo para *Saccharomyces cerevisiae*

O meio YPD é composto de dextrose 2% (p/v), extrato de levedura 1% (p/v), peptona 2% (p/v) e ágar 2% (p/v). O meio SC URA⁻ é composto de YNB (Yeast Nitrogen Base) sem aminoácidos 0,7% (p/v), dextrose 2% (p/v), lisina, triptofano leucina 0,01% (p/v), histidina 0,005% sendo acrescentado ágar em meio sólido.

3.6.Meio de cultivo para *E. coli*

O meio LB (Luria Bertani) é composto por extrato de levedura 0,5% (p/v), cloreto de sódio (0,17M) e triotona 1% (p/v). Quando necessário, o meio foi suplementado com 100 µg/mL de ampicilina, para seleção de plasmídeos.

3.7.Extração do DNA genômico a partir de micéliode *A. fumigatus*

O método de extração do DNA de *A. fumigatus* foi realizado de acordo com as modificações do método descrito em (MALAVAZI AND GOLDMAN 2012). As culturas de *A. fumigatus* crescidas em meio líquido 16 horas (overnight) a 37 °C são filtrados em papel filtro, congelados imediatamente em nitrogênio líquido e pulverizados em almofariz e pistilo estéreis com nitrogênio líquido. São utilizados 200 µL de tampão de extração Triton X-100 2% (p/v), SDS 1% (p/v), NaCl 1 mM, EDTA 75 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8,0 no processo de extração. O mesmo volume de fenol clorofórmio fenol:clorofórmio 1:1 (v/v) é usado para a extração do ácido nucleico. A mistura é homogeneizada por 3 minutos em agitador de tubos (vortex) e centrifugada por 15 minutos a 17000 rpm. O DNA é precipitado por 30 minutos com a adição de 800 µL de isopropanol. A concentração e pureza do fragmento de DNA é determinado espectrofotometricamente, segundo (GREEN AND SAMBROOK 2012)

3.8.Extração do DNA genômico a partir de conídios de *A. fumigatus* com bead de vidro

A partir do crescimento fúngico em placa, 200 µl de tampão de extração de DNA de esporos foram adicionados para desprender os conídios, que foram coletados e transferidos para um tubo de microcentrífuga compatível com o aparelho de ruptura de células. No mesmo tubo, foram adicionados 100 µl de pérolas de vidro, e as amostras foram levadas ao batedor (bead beater), durante 1 minuto. Após

bater, o conteúdo foi transferido para um novo microtubo, agora sem as pérolas de vidro, e recebeu um volume equivalente de uma solução fenol/clorofórmio (1:1). Os tubos foram então agitados no vortex por 3 minutos e centrifugados a 13.000 rpm por 10 minutos, resultando na separação de duas fases, o sobrenadante foi cuidadosamente recuperado e transferido para outro tubo. Em seguida, adicionaram-se 200 µl de clorofórmio, realizou-se uma breve homogeneização e procedeu-se à centrifugação a 13.000 rpm por 5 minutos. Novamente, formaram-se duas fases, e a fase superior foi coletada e transferida para um novo microtubo. Para a precipitação do DNA, adicionaram-se 800 µl de isopropanol, e as amostras foram mantidas por 30 minutos a -80°C. Na etapa seguinte, centrifugaram-se os tubos por 10 minutos a 13.000 rpm, descartou-se o sobrenadante e o pellet obtido foi lavado com etanol 70%. Após a secagem completa, o DNA foi ressuspensão em água ultrapura estéril e armazenado a 4°C. A integridade das amostras foi confirmada por eletroforese em gel de agarose a 1%, e quando necessário, realizou-se a quantificação por espectrofotometria ($DO_{260/280nm}$) utilizando o equipamento NanoVue Plus (GE Health Care).

3.9.Extração do DNA genômico rápida a partir de conídeos de *A. fumigatus* com bead 0,2 mm

Esse método visa otimizar o método de extração de DNA a partir de conídios em um período de razoavelmente menor, sem inviabilizar o produto final, seguindo a metodologia anterior, porém adaptada. Com o auxílio de um swab, estéril, é coletado uma quantidade de conídios (a partir do crescimento fúngico em placa), onde seja visível (light green), após a coleta, são transferidos para um tubo de microcentrífuga. Foram adicionados 100 µl da bead (0,2 mm), levadas ao disruptor de células (bead beater), durante 45 segundos. Após bater, os tubos foram incubados a 65°C por 30 minutos enquanto eram agitados por 30 segundos em vortex em intervalos de 10 minutos. Após essa etapa, recebeu um volume equivalente de uma solução fenol/clorofórmio (1:1). Os tubos foram então agitados no vortex por 3 minutos e centrifugados a 13.000 rpm por 10 minutos, resultando na separação de duas fases; o sobrenadante foi cuidadosamente recuperado e transferido para um tubo definitivo, onde é feita uma diluição (1:10). A integridade das amostras foi confirmada por eletroforese em gel de agarose a 1%, e quando necessário, realizou-se a quantificação por espectrofotometria ($DO_{260/280nm}$) utilizando o equipamento NanoVue Plus (GE Health Care).

3.10. Mini preparação do DNA plasmidial e transformação bacteriana

O método de extração do DNA plasmidial é realizado por lise alcalina descrito por Birboin & Doyle, segundo (GREEN AND SAMBROOK 2012). Os plasmídeos foram replicados e transformados em células de *E. coli* DH10B (Thermo), seguindo protocolos padrões de eletroporação. As bactérias contendo o plasmídeo pRS426 ou pFC332 foram cultivadas em meio LB suplementado com 100 µg/mL ampicilina.

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

De acordo com a metodologia descrita por (MALAVAZI AND GOLDMAN 2012), uma colônia isolada da cepa *S. cerevisiae* FGSC 9721 (Fungal Genetics Stock Center) foi inoculada em 20 ml de meio YPD e incubada a 30 °C sob agitação constante durante 18 horas. Após esse período, cerca de 500 µl da cultura foram transferidos para 50 ml de YPD e mantidos a 30 °C, também sob agitação, até que a densidade óptica a 600 nm (DO_{600nm}) atingisse valores entre 0,4 e 0,6. As células foram então centrifugadas a 2500 rpm por 2 minutos, lavadas com 20 ml de tampão TE 1×, centrifugadas novamente por 2 minutos e ressuspensas em 1,0 ml de solução TE 1×/LiAc 1× (composta por 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5 e 100 mM LiAc, pH 7,5). Esta suspensão celular foi incubada a 30 °C por 60 minutos com leve agitação. Para cada reação de transformação, foram utilizados 200 µl da suspensão celular, aproximadamente 200–500 ng do DNA plasmidial pRS426 previamente linearizado com as enzimas EcoRI e BamHI, entre 0,5–1 µg de diferentes DNAs purificados provenientes de reações de PCR destinadas à construção de cassetes de deleção e fusão, além de 200 µg de DNA de esperma de salmão, (utilizado como DNA carreador durante a transformação, atuando na proteção do DNA plasmidial contra nucleases e no aumento da eficiência de internalização celular), previamente sonificado e desnaturado. A mistura foi incubada a 30 °C por 30 minutos sob leve agitação, seguida da adição de 1,2 ml de uma solução contendo LiAc 1×/PEG-3350 a 40% (p/v)/TE 1×. Após homogeneização, a mistura foi incubada a 42 °C por 30 minutos. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos, lavadas com 1 ml de TE 1×, centrifugadas novamente e ressuspensas em 80–100 µl de TE 1×. Por fim, as células transformadas foram semeadas em placas com meio seletivo SC URA⁻ (Esse meio seleciona linhagens de levedura que possuem uma mutação no gene URA3 (ou equivalente), que as torna incapazes de produzir sua própria uracila,

quando cultivadas neste meio sem uracila, apenas as leveduras com essa mutação sobrevivem e crescem) e incubadas a 30 °C por 72 horas.

3.12.Extração de DNA de *S. cerevisiae*

As colônias de *S. cerevisiae* que se desenvolveram nas placas de transformação foram inoculadas em meio líquido SC URA- (meio de cultura seletivo elaborado para cultivar leveduras que possuem uma auxotrofia, ou seja, uma incapacidade genética de produzir uracila por conta própria) e incubadas a 30 °C sob agitação constante a 180 rpm por dois dias. Após esse período, as células foram colhidas por centrifugação a 4000 rpm durante 5 minutos, ressuspensas em 500 µl de tampão de extração de DNA e transferidas para tubos de microcentrífuga contendo 250 µl de pérolas de vidro. A suspensão foi submetida à agitação mecânica em vortex por 10 minutos. Em seguida, foi adicionado a cada amostra um volume igual de uma solução fenol:clorofórmio (1:1), e a agitação em vortex foi repetida por mais 10 minutos. Para a remoção dos resíduos celulares e precipitação das proteínas, as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 10 minutos. A fase aquosa resultante foi cuidadosamente transferida para novos tubos de microcentrífuga, nos quais foi adicionado um volume equivalente de clorofórmio, com o objetivo de eliminar qualquer traço residual de fenol. Após homogeneização manual, as amostras foram centrifugadas novamente a 13000 rpm por 5 minutos, e a fase aquosa superior foi transferida para novos tubos. Nessa etapa, foram adicionados 800 µl de isopropanol para precipitação do DNA, seguida de incubação a -80 °C por aproximadamente 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 10 minutos a 4 °C, e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi lavado com etanol 70%, centrifugado por mais 1 minuto a 13000 rpm e, após descarte do sobrenadante, o restante de etanol foi evaporado à temperatura ambiente por 30 minutos. O DNA precipitado foi então ressuspendido em água ultrapura estéril e armazenado a 4 °C. A integridade das amostras foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1%, e a quantificação do DNA, quando necessária, foi realizada por espectrofotometria (DO260/280nm) utilizando o equipamento NanoVue Plus (GE Health Care).

3.13.Transformação, isolamento de colônias e validações moleculares em *A. fumigatus*

Foram inoculados cerca de 10^7 conídios das linhagens de *A. fumigatus* em 50 mL de meio de cultivo MM líquido (o meio mínimo é suplementado com xilose 1%

(p/v) (para as linhagens sob o promotor indutor de xilose) e incubados, com agitação constante de 180 rpm, por 16 horas (overnight) a 37 °C. Os tubos germinativos são coletados por centrifugação (4800 rpm por 10 minutos) e a transformação foi realizada como descrito previamente (MALAVAZI AND GOLDMAN 2012). Para confirmar a deleção ou substituição dos genes de interesse, foram realizados experimentos de PCR com primers adequados para cada objetivo e linhagem de interesse.

Para este trabalho foi essencial trabalhar com colônias homocárias, para garantir uniformidade genética. Colônias heterocárias podem mascarar fenótipos e dificultar a interpretação de resultados, já que diferentes núcleos podem contribuir para o crescimento ou características observadas. Aplicamos essa metodologia para isolar colônias após o processo de transformação no fungo utilizando a solução de Tween 0,01%, sendo um detergente não iônico usado comumente em protocolos microbiológicos. O uso do Tween reduz a adesão dos conídios, atuando como um surfactante, dessa forma diminuindo a tensão superficial e quebrando agregados facilitando a dispersão homogênea dos conídios em suspensão e o isolamento de colônias individuais, sendo uma etapa importante de ser empregada.

Para amplificar e validar amplicons e candidatos via PCR gerados neste trabalho, foram realizadas eletroforeses em gel de agarose, que consiste em separar os fragmentos de DNA genômico ou produtos de PCR por tamanho, utilizando gel de agarose [0,8%:1%] e os marcadores High Ladder de 1kb Plus Ladder (Cellco). Para o gel é preparado um tampão de corrida 1x TAE (Tris-Acetato-EDTA), corante de DNA (Brometo de etídio), em seguida é realizada uma corrida com ajuste de voltagem entre 80-100 V por 30 minutos. Para a visualização e documentação o gel é transferido para um fotodocumentador (ChemiDoc), visualizado com luz UV, os geis foram fotografados e documentados para as validações necessárias.

3.14. Ensaio de virulência em modelo invertebrado

Larvas de *Galleria mellonella* foram obtidas a partir da reprodução das mariposas adultas, conforme descrito em (FUCHS *et al.* 2010). Os ensaios de virulência seguiram os protocolos previamente estabelecidos por (PEREIRA SILVA *et al.* 2017). Foram selecionadas larvas de tamanho semelhante (aproximadamente 250–400 mg), mantidas em jejum por 24 h em placas de Petri, incubadas a 37 °C e mantidas no escuro. Os conídios das linhagens mutantes foram produzidos após cultivo em meio mínimo por dois dias, colhidos em PBS e filtrados com Miracloth. Para avaliar a virulência de *A. fumigatus* frente a *G. mellonella*, 1×10^8 conídios de

cada linhagem foram injetados diretamente na hemolinfa da pró-pata anterior esquerda do último ínstar larval, utilizando uma seringa Hamilton (modelo 7000.5KH). Cada condição experimental contou com 15 indivíduos. Como controle, foram usadas larvas inoculadas apenas com 10 µL de PBS (inoculação de controle). Após a inoculação, as larvas foram mantidas em placas de Petri a 37 °C, no escuro, por até 15 dias. A mortalidade foi monitorada diariamente, sendo consideradas mortas aquelas que não apresentavam resposta ao estímulo tátil.

4. RESULTADOS

4.1. Deleção do domínio Cytb5 de SdeA

Nesta estratégia, um cassete de DNA para deletar a região correspondente aos aminoácidos 331-456 da SdeA em *A. fumigatus* foi gerado, com o objetivo de avaliar se esse domínio poderia ser complementado pela função de outra proteína contendo domínio Cytb5. Para montar esse cassete, utilizamos a construção que deu origem a linhagem *SdeA::GFP* (FABRI *et al.* 2023), que incluía o marcador auxotrófico *pyrG*. Foram desenhados primers com regiões de homologia (IM-751/IM-170) para amplificar duas porções do cassete: uma contendo o promotor (*p*)*sdeA* e o gene *sdeA* até o códon que codifica o aminoácido 330 (primers IM-315 e IM-751), e outra contendo a região codificadora de GFP, o marcador *pyrG* e a 3'UTR do gene *sdeA* (primers IM-170 e IM-318) (**Figura 4A**).

Esses fragmentos foram recombinados *in vivo* em *S. cerevisiae* no plasmídeo pRS426, seguindo o método descrito por (MALAVAZI AND GOLDMAN 2012). Em seguida, o cassete completo (*p*)*sdeA::SdeA^{Δcytb5}::GFP::pyrG* foi amplificado por PCR utilizando os primers IM-315 e IM-391 (**Figura 4A**). Inúmeras tentativas de transformação na linhagem selvagem de *A. fumigatus* (auxotrófica para uridina e uracila) foram feitas, mas nenhum mutante apresentando a deleção no locus *sdeA* foi obtido, sugerindo que o domínio Cytb5 é essencial para a função da proteína SdeA. Para comprovar essa essencialidade, realizamos a complementação em trans da linhagem mutante condicional *xyIP::sdeA* (FABRI *et al.* 2023) com o cassete (*p*)*sdeA::sdeA^{Δcytb5}::GFP::3'UTR*. O promotor *xyIP* é um sistema de expressão condicional devido à sua forte indução por xilose e baixa atividade basal na ausência desse açúcar. Originalmente caracterizado em *Penicillium chrysogenum*, o (*p*)*xyIP* apresenta elementos regulatórios bem definidos, incluindo uma TATA box funcional, uma região rica em pirimidinas e cópias duplicadas de uma sequência de 91 pb que contém motivos essenciais para ativação transcricional dependente do fator de transcrição XlnR (ZADRA *et al.* 2000). Em *A. fumigatus*, a regulação do (*p*)*xyIP* permanece altamente responsiva à xilose e pouco ativa sob repressão por glicose, permitindo um controle preciso e reversível da expressão gênica. O uso do promotor *xyIP* permite a construção de mutantes condicionais, permitindo modular a expressão de genes essenciais de forma controlada e não letal, o que o torna uma ferramenta valiosa para estudos funcionais. (ZADRA *et al.* 2000; YAP *et al.* 2022). A ausência de crescimento em meio contendo glicose, que reprime o gene *sdeA* colocado sob o controle do promotor *xyIP* no locus endógeno, serviria como evidência de que o

domínio Cytb5 é indispensável. A inserção desse cassete foi realizada utilizando o sistema CRISPR-Cas9 já estabelecido para *Aspergillus* (NODVIG *et al.* 2015; HOOF *et al.* 2018; NODVIG *et al.* 2018) direcionando-o para o locus *Safe haven* (Sh), reconhecido como um local seguro para integrações gênicas (PHAM *et al.* 2020; FURUKAWA *et al.* 2022). Foram utilizados dois protospacers de 20 nucleotídeos adjacentes à PAM. Esses protospacers foram fusionados ao RNA backbone e ao tRNA de glicina amplificados a partir do plasmídeo pFC902 utilizando a polimerase Phusion U (Thermo Scientific). Os fragmentos foram clonados no vetor CRISPR pFC332 por meio da metodologia USER cloning (New England Biolabs), descrito por (NOUR-ELDIN *et al.* 2010; HOOF *et al.* 2018). O USER cloning é um método de clonagem (*seamless cloning*) de DNA que permite montar múltiplos fragmentos de PCR e introduzir mutações de forma simples e direcional. Nele, o vetor e os fragmentos alvo são amplificados usando primers contendo um resíduo de desoxiuracila (dU) próximo às regiões de homologia entre os fragmentos. Após a PCR, o tratamento com a enzima USER remove o dU e gera extremidades simples-fita complementares, criando lacunas que direcionam a montagem precisa dos fragmentos em um vetor linearizado. Dessa forma, múltiplas inserções, substituições ou deleções podem ser combinadas em uma única reação, sem necessidade de enzimas de restrição ou ligase. O vetor pFC332 contém o gene da nuclease Cas9 otimizado para *Aspergillus*, a sequência AMA1 que permite replicação epissomal e autônoma em *Aspergillus*, e o gene de resistência à higromicina para seleção dos transformantes. O construto pFC332-Sh resultante foi sequenciado para verificar a integridade das fusões e a sequência correta do protospacer clonado.

Para a deleção guiada do domínio CyrtB5 pela metodologia de CRIPR-Cas9 foi construído um cassete DNA donor (**Figura 4B**), utilizando um primer com 50 pb de homologia à região localizada antes do protospacer 5' para amplificar a porção (p)*sdeA::sdeA^{Δcytb5}::GFP* (IM-g48 + IM-756). Outro primer contendo 50 pb de homologia posterior ao protospacer 3' foi utilizado para amplificar a porção 3'UTR (IM-769 + IM-g49). Os fragmentos foram fundidos por PCR com os primers IM-g48 e IM-g49, e o cassete DNA donor foi co-transformado junto com pFC332-Sh (**Figura 4B**), atuando como molde para o reparo da quebra induzida pela Cas9.

Os transformantes foram selecionados na presença de higromicina B e 1% de xilose. Após purificação dos homocários, a validação por PCR utilizando os primers IM-320 e IM-174 (**Figura 4C**) gerou um amplicon de 378 pb menor na linhagem *SdeA^{Δcytb5}::GFP*, correspondente à deleção do domínio Cytb5, quando comparado à

linhagem *sdeA::GFP*. A inserção no locus Sh foi confirmada por PCR com os primers IM-745 e IM-746, que mostraram a substituição do locus Sh selvagem (1.699 pb) pelo cassete (p)*sdeA::sdeA^{Δcytb5}::GFP* (4.470 pb), **(Figura 4D-E)**

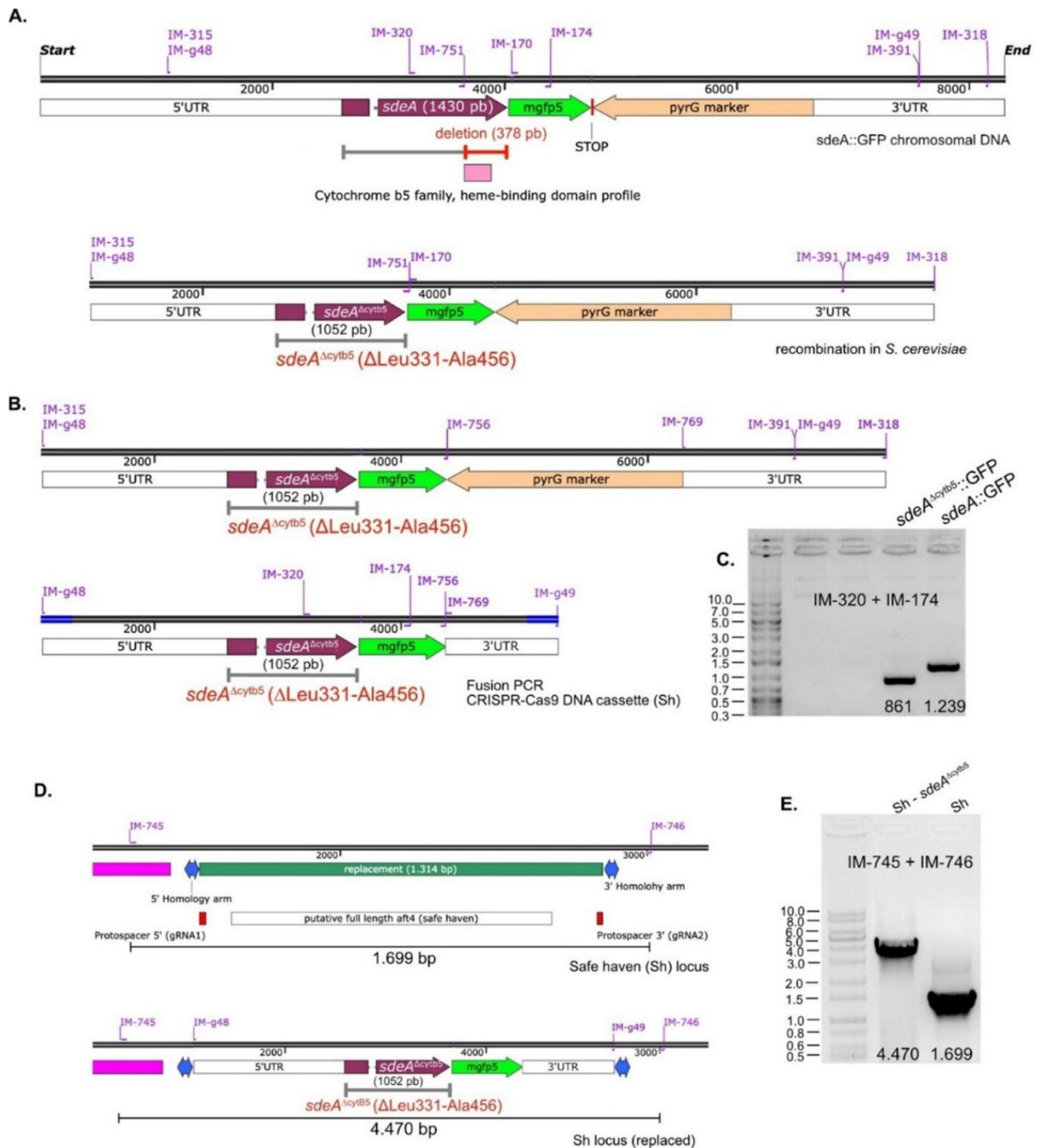


Figura 4- Construção da linhagem mutante *sdeA*^{Δcytb5}::GFP

(A) Os primers IM-315 e IM-751 amplificaram a porção (*p*)*sdeA*:: *sdeA*^{Δcytb5}, e os primers IM-170 e IM-318 amplificam a porção GFP::*pyrG*::3'UTR. Os fragmentos foram recombinados *in vivo* em *S. cerevisiae* e o cassete (*p*)*sdeA*:: *sdeA*^{Δcytb5}::GFP::*pyrG* amplificado com os primers IM-315+IM-319. (B) Construção do cassete *donor* utilizado como reparo para inserção guiada por CRISPR Cas9 do cassete de complementação (*p*)*sdeA*:: *sdeA*^{Δcytb5}::GFP no mutante condicional *xyfP*::*sdeA* no locus *Safe haven* (*aft4*). Um cassete de reparo para CRISPR-cas9 direcionado ao locus Sh foi obtido a partir do cassete de deleção (IM-g48+IM-756 e IM-769+IM-g49). Os fragmentos foram fundidos por PCR (IM-g48+IM-g49), contendo em cada extremidade 50 bp de homologia para o locus Sh. (C) PCR de validação do candidato positivo para a inserção do cassete contendo a mutação. O candidato foi validado (IM-320+IM-174, um fragmento de 861bp) correspondente a uma prção do gene *sdeA* (sem a região *Cytb5*) e o início da GFP. O controle da linhagem *sdeA*::GFP selvagem corresponde a (1239 bp). (D) Complementação no locus *aft4* (*Safe haven*, Sh) por CRISPR-cas9. (E) Validação do cassete no locus Sh. A correta inserção do cassete no locus foi validada utilizando os primers distais IM-745 e IM-746. Mutante: 4.470 bp e selvagem 1.699 bp.

4.2. Deleção da região que conecta com o domínio desaturase na enzima SdeA (domínio *hinge*)

Foi construído um plasmídeo para promover, via CRISPR-Cas9, a deleção do sítio de dimerização (*hinge*), localizado entre os resíduos Phe297 e Leu322 da SdeA. Como a modelagem estrutural sugeria que os domínios desaturase e Cytb5 poderiam interagir de forma independente entre protômeros distintos, buscamos inicialmente realizar a deleção do *hinge* diretamente no locus *sdeA*. Entretanto, apesar de várias tentativas, nenhum transformante positivo foi obtido (dados não apresentados). Esse resultado inicial sugeriu que a região *hinge* é essencial para a atividade enzimática funcional da SdeA. Uma nova estratégia de investigação foi idealizada, similar àquela utilizada para o domínio *cytB5* em que uma cópia mutante de *sdeA* com a região *hinge* deletada foi inserida no locus *Safe haven* da linhagem recipiente, o mutante condicional *xyIP::sdeA*. Para tanto, foram desenhados primers para amplificar um cassete de complementação no *Safe haven* (*p*)*sdeA::sdeA*^{Δ*hinge*}, utilizando os primers IM-g48/IM-801 e IM-802/IM-g49, posteriormente fundidos por PCR com os primers IM-g48 + IM-g49. Esse processo gerou um cassete (*p*)*sdeA::sdeA*^{Δ*hinge*} (**Figura 5A**) contendo uma deleção de 75 bp no gene *sdeA*. O cassete foi transformado com o vetor pFC332-Sh na linhagem *xyIP::sdeA*, e os candidatos resistentes à higromicina foram purificados até se tornarem homocários. A validação por PCR, usando os primers IM-544 + IM-751, mostrou uma diferença clara de tamanho de 75 bp menor que a sequência selvagem (**Figura 5B**). A inserção correta no locus Sh foi confirmada por PCR com os primers IM-803 + IM-804 (**Figura 5D–E**) e por sequenciamento (**Figura 6**).

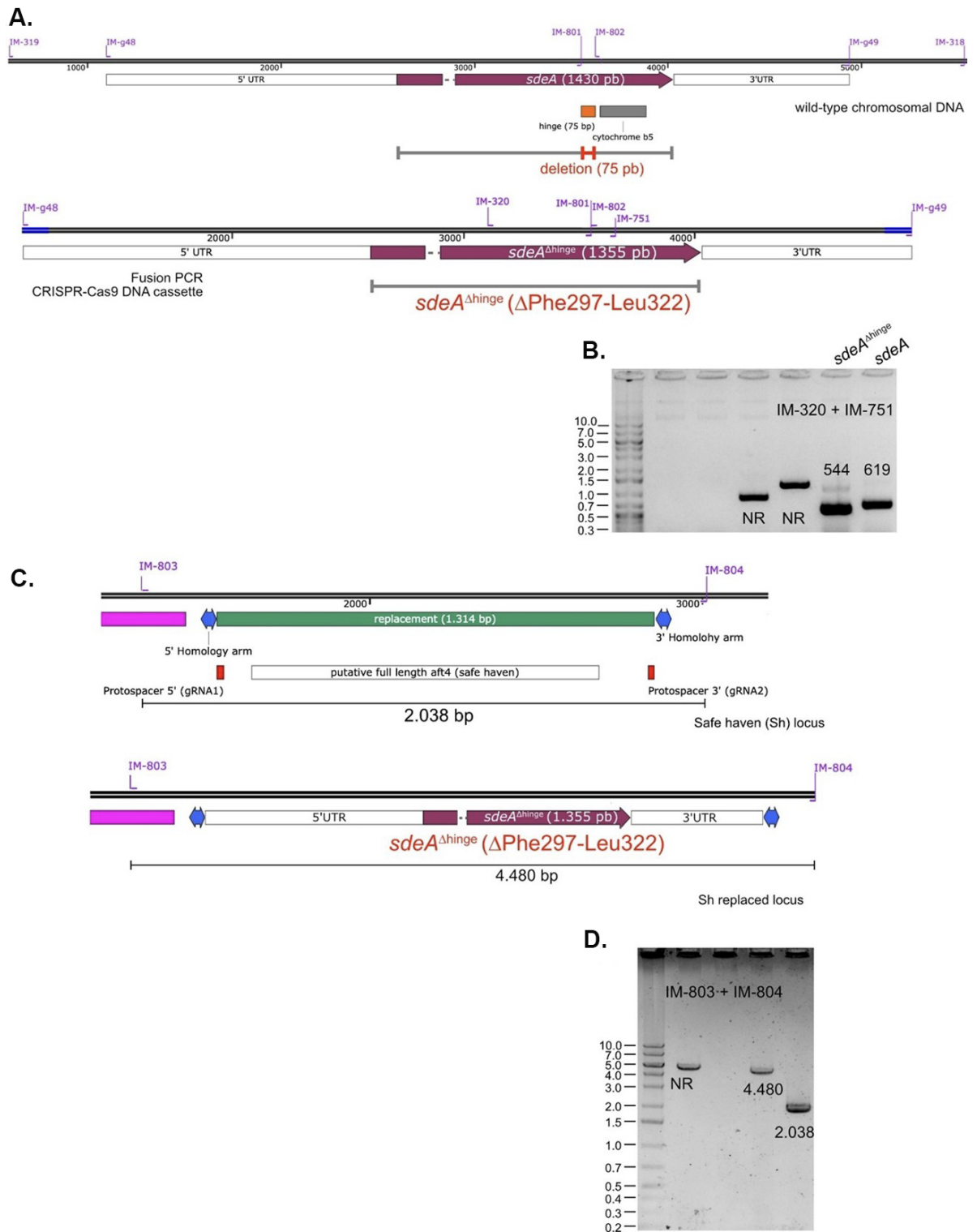


Figura 5- Construção da linhagem mutante *sdeA*^{Δhinge}.

(A) Deleção da porção para o domínio *hinge* (75bp). Foi gerado com os primers IM-48+IM-801 e IM-802+IM-g49, fundidos por PCR de fusão com os primers IM-g48+IM-g49. (B) PCR de validação do candidato positivo para a inserção do cassete de complementação com a mutação *sdeA*^{Δhinge} no locus Sh da linhagem *xyIP::sdeA*. Primers internos foram utilizados para validar a ausência dos 75 bp deletados, apresentando 544 bp para o mutante e 619 bp para o selvagem. (C) Complementação no locus *aft4* (*Safe haven*, Sh) por CRISPR-cas9. (D) Validação da inserção do cassete no locus Sh utilizando primers distais ao local de inserção do cassete. Locus com inserção do cassete: 4.480 bp, locus wild-type, 2.038 bp. NR = Não relevante para o contexto da figura. Fonte: autoria própria.

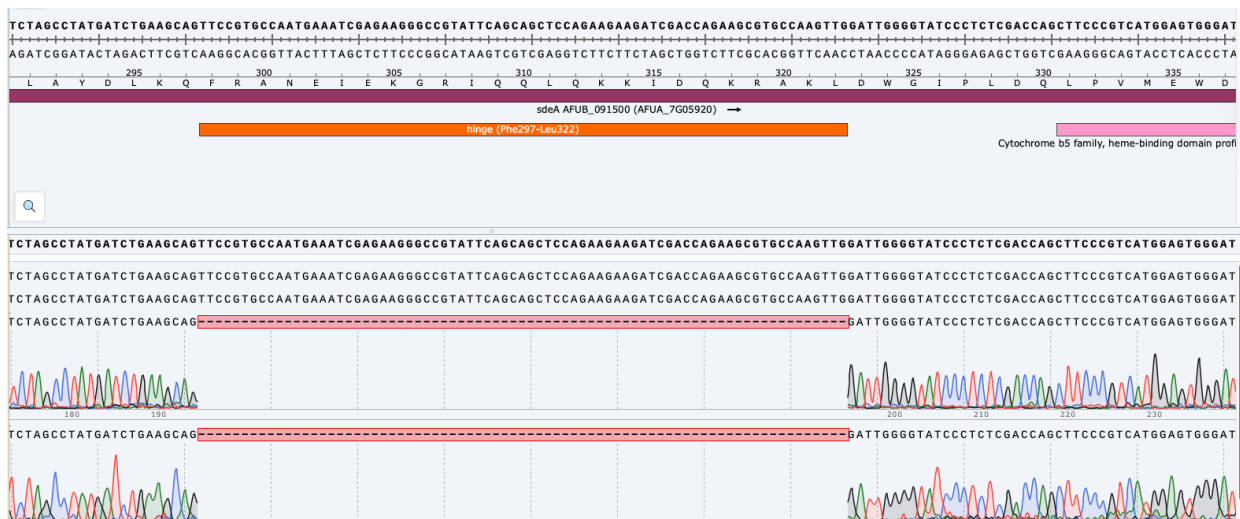


Figura 6 - Sequenciamento da região correspondente ao domínio *hinge* do gene *sdeA*.

A figura mostra o alinhamento entre a sequência de referência e os eletroferogramas obtidos, evidenciando a ausência integral do trecho que codifica o domínio *hinge*, destacado pela área em rosa pontilhada. O painel superior mostra a sequência de DNA e de proteína da SdeA selvagem. As duas primeiras linhas mostradas no painel inferior indicam sequências de duas linhagens selvagens de *A. fumigatus* em que o domínio *hinge* está preservado e pode ser utilizado para efeito de comparação da deleção. A continuidade uniforme da leitura e a ausência de sobreposições nos picos confirmam a deleção desse segmento, validando a construção do mutante.

4.3. Microscopia confocal e ensaio fenotípico para os mutantes contendo os resíduos Cytb5 e *hinge* deletados

Para avaliar se o padrão de localização subcelular do mutante condicional (*sdeA*^{Δ_{Cytb5}}::GFP no background *xyIP*::*sdeA*) apresenta alguma alteração em relação à linhagem *sdeA*::GFP, ambas as linhagens foram inoculadas em meio mínimo com 1% de glicose (condição repressora) e incubadas a 37 °C por 10 horas. Nessa etapa, os conídios do mutante não germinam, enquanto a linhagem selvagem já mostrava germinantes. Depois disso, foi adicionado 1% de xilose ao meio e as culturas foram mantidas por mais 4 horas a 30 °C. As imagens foram obtidas por Microscopia Confocal a Laser (CLSM) usando um ZEISS LSM 800 com objetiva Plan Achromat 63x/1.40 Oil DIC M27, com incrementos de 0,3 μm na z-stack. A análise foi realizada no software ZEN Blue 2.3 pelo pós-doc do laboratório, Jonatas Campanella. O padrão de localização da proteína SdeA::GFP manteve o perfil perinuclear, região apical e também em alguns septos. Os germinantes SdeA^{Δ_{Cytb5}}::GFP apresentaram o mesmo padrão perinuclear, indicando que mesmo em uma proteína em que o domínio CytB5 não está presente, ela mantém a localização reticular (**Figura 7A**).

A fim de avaliar a funcionalidade das proteínas SdeA a quem o domínio Cytb5 ou *hinge* estava deletado no locus *Safe Haven* da linhagem *xyIP*::*sdeA*, foram realizados ensaios de crescimento radial. Para tanto, 10⁴ conídios de cada uma das linhagens mutantes e das linhagens controle (selvagem e *xyIP*::*sdeA*) foram

inoculados em MM + 1% glicose ou 1% xilose. Os resultados mostraram que os mutantes apresentam o mesmo comportamento da linhagem *xyIP::sdeA* nas condições repressoras, isto é na presença de glicose 1%. Por outro lado, o crescimento em condições repressoras pode ser parcialmente recuperado quando o substrato da enzima (ácido oleico) é adicionado ao meio **(Figura 7C)**. Esses resultados coletivamente confirmam que a deleção das duas regiões da proteína SdeA resulta em inviabilidade nas condições avaliadas em *A. fumigatus* **(Figura 7B)**.

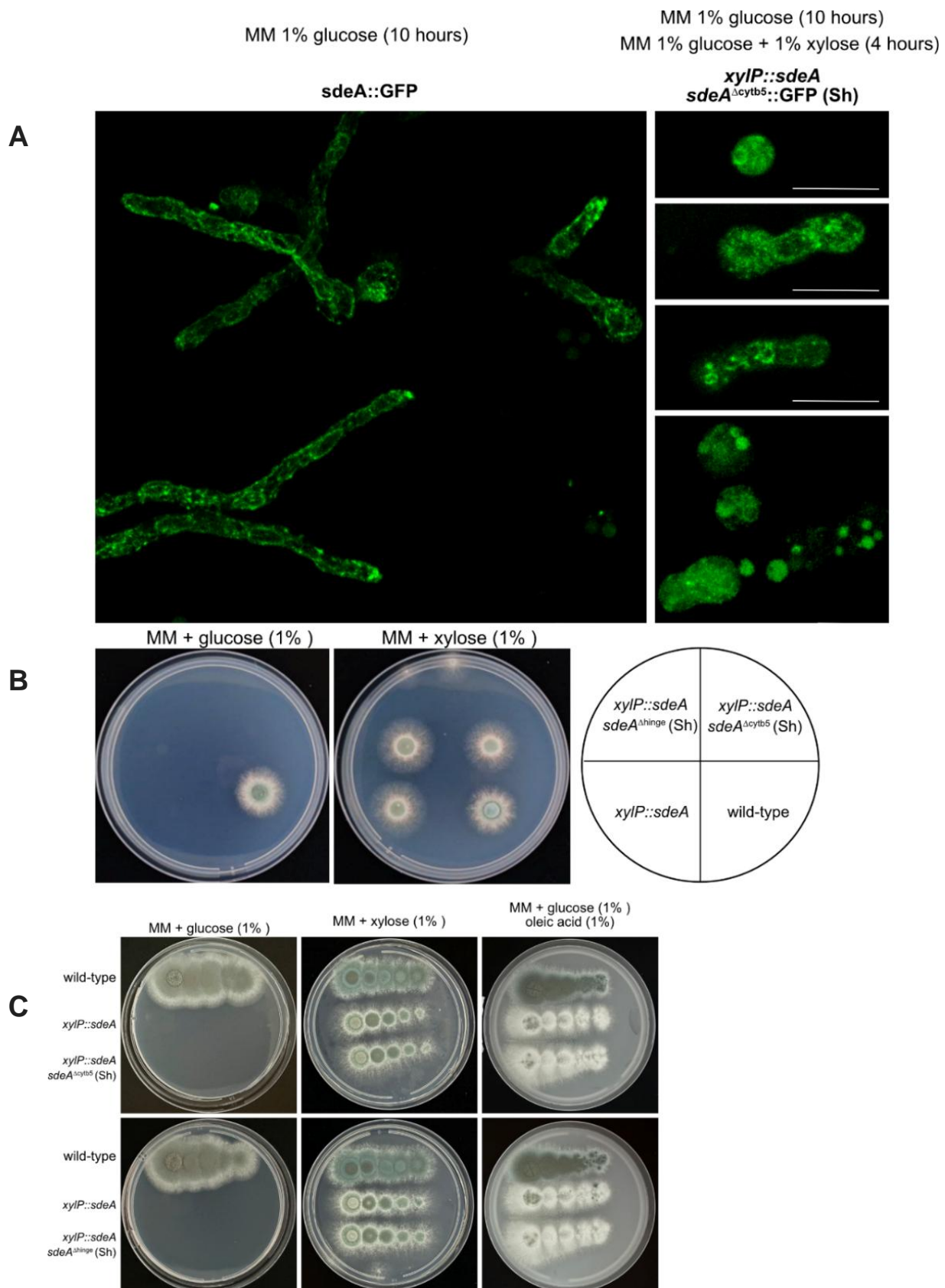


Figura 7 - Microscopia confocal para a deleção do Cytb5 e ensaios fenotípicos para os mutantes contendo as regiões Cytb5 e *hinge* deletados.

(A) Microscopia de fluorescência confocal do mutante *xyIP::sdeA::sdeA^{Δcytb5}::GFP(Sh)*. Conídios da linhagem selvagem (*sdeA::GFP*) e mutante (*sdeA^{Δcytb5}::GFP(Sh)*) foram cultivados em MM a 37°C. Para indução do gene *sdeA* e crescimento da linhagem mutante condicional, 1% de xilose foi adicionado no meio de cultivo, deixado germinar a 30°C. As imagens foram obtidas em um microscópio

confocal ZEISS LSM 800 com uma objetiva Plan Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27. Os incrementos da z-stack foram de 0,3 μm . As imagens foram analisadas usando o software ZEN Blue 2.3. As barras de escala correspondem a 20 μm . (B) 10^4 conídios das linhagens foram inoculadas em meio MM (1% glicose) ou MM (1% xilose). A ausência de crescimento das linhagens mutantes complementadas com os cassetes de DNA contendo as regiões deletadas no locus *Safe haven* em meio MM (1% glicose - repressão) indica que ambas as regiões deletadas são essenciais para função da enzima. (C) Complementação das linhagens mutantes condicionais crescidas em MM+glicose contendo 1% de ácido oleico (ácido graxo essencial, produto da enzima SdeA). Fonte: CAMPANELLA *et al.* (2025).

4.4.O domínio Cytb5 e sua importância para a atividade da $\Delta 9$ -desaturase SdeA

Para avaliar se o domínio citocromo B5 (CytB5) isolado é capaz de complementar funcionalmente a região C-terminal de SdeA, foi construído um cassete de expressão contendo a sequência CytB5 fundida ao epítipo mRFP, sob controle do promotor endógeno (*p*)*sdeA*. Para isso, a região promotora de *sdeA*, com uma extensão de homologia no início do gene CytB5, foi amplificada com os primers IM-319 e IM-813. Em seguida, o fragmento codificador do domínio CytB5, incluindo um códon de iniciação, foi amplificado com os primers IM-814 e IM-508; este último apresentava homologia ao início do cassete previamente estabelecido para expressão de Cyp51A::mRFP (FABRI *et al.* 2023). A região correspondente a mRFP::3xHA::trpC::prtA foi gerada com os primers IM-815 e IM-448. Os fragmentos foram unidos por fusão via PCR e os primers IM-315 e IM-448, originando o cassete completo (*p*)*sdeA*::*cytB5*::mRFP::3xHA::prtA. Esse cassete foi então inserido de forma ectópica na linhagem *xyIP*::*sdeA*; *sdeA* Δ *CytB5*::GFP (Sh), cuja seleção foi realizada por resistência à piritiamina. Transformantes positivos foram confirmados por PCR para a presença do fragmento *cytB5*::mRFP e posteriormente submetidos à análise por microscopia de fluorescência confocal, além de ensaios de complementação fenotípica em meio sólido (**Figura 8**). A microscopia revelou que *SdeA* Δ *CytB5*::GFP manteve o padrão reticular característico, compatível com a associação ao retículo endoplasmático, enquanto a proteína expressa ectopicamente CytB5::mRFP apresentou distribuição citoplasmática difusa, com acúmulo em pontos discretos, alguns colocalizando com o sinal de GFP. A análise de colocalização pelo coeficiente de Pearson resultou em 0,5, indicando colocalização parcial entre os dois domínios (**Figura 8A**). Apesar da expressão simultânea dos domínios catalítico (*SdeA* Δ *CytB5*) e redox (CytB5), a linhagem resultante somente germinou na presença de xilose, demonstrando que a expressão dissociada dos domínios não foi suficiente para restaurar a função da proteína nativa, sugerindo que sua atividade depende de proximidade estrutural entre as regiões catalítica e redox, ao contrário do modelo

descrito para a enzima SCD1 de mamíferos, na qual o domínio redox (Cytb5) pode atuar independentemente.

Ensaio fenotípico em meio sólido (MM) foram também conduzidos com as linhagens selvagem e os mutantes, *xyIP::sdeA*, *xyIP::sdeA; sdeA^{ΔCytB5}::GFP* (Sh), e a linhagem candidata à complementação *xyIP::sdeA; sdeA^{ΔCytB5}::GFP* (Sh); *cytB5::mRFP* (ectópico). As linhagens foram cultivadas em MM contendo glicose (repressão), glicose + xilose (indução) ou MM suplementado com 1% de ácido oleico ou palmitoleico (**Figura 8B**). Apenas sob indução por xilose ou na presença de ácidos graxos insaturados substratos naturais de SdeA houve crescimento das variantes mutantes, reforçando que a deficiência na atividade desaturase não é compensada pela expressão separada dos domínios e indicando que o mecanismo catalítico de SdeA em *A. fumigatus* difere daquele observado para SCD1 em mamíferos.

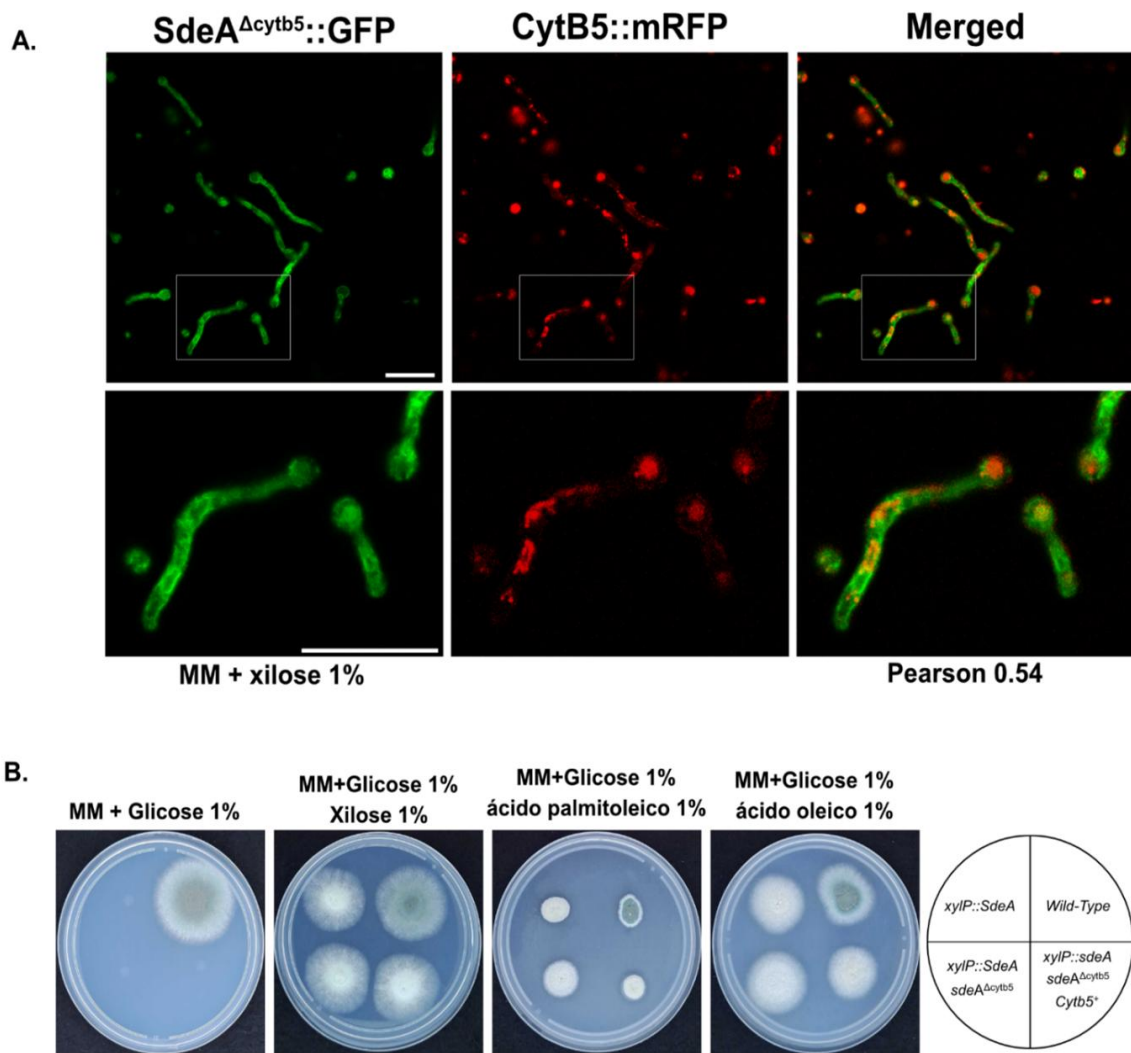


Figura 8 - Microscopia confocal e ensaios de crescimento do mutante ectópico.

O CytB5 e o domínio desaturase de SdeA co-localizam parcialmente, mas não complementam funcionalmente quando expressos separadamente. (A) Microscopia confocal mostrando que as proteínas CytB5::mRFP e *sdeA^{ΔCytB5}::GFP* são expressas nas hifas em germinação, com baixo grau de colocalização (coeficiente de Pearson = 0,54). Ambas se localizam ao retículo endoplasmático e compartilham focos discretos ao longo das hifas. Barra de escala: 10 μ m. (B) Ensaios de crescimento mostram que a expressão separada dos domínios CytB5 e da desaturase não é suficiente para restaurar a função de SdeA, sendo necessária a suplementação com ácidos graxos insaturados para viabilizar o crescimento. Fonte: CAMPANELLA *et al.* (2025).

4.5. Investigando as Histidinas H366 e H392 do domínio (CytB5) da $\Delta 9$ -desaturase SdeA

Para compreender o papel das histidinas H366 e H392, localizadas no domínio citocromo b5 (CytB5) da $\Delta 9$ -desaturase SdeA, construímos variantes mutantes contendo substituições pontuais desses resíduos por alanina (H366A e H392A). Essas histidinas são altamente conservadas nos domínios CytB5 e estão associadas à coordenação do grupo heme, fundamental para a função redox desses domínios e para o processo de transferência de elétrons necessário à dessaturação de ácidos graxos. Na estrutura do domínio CytB5 da SdeA prevista através do AlphaFold3 (**Figura 9A**), ambas foram identificadas como essenciais para estabilizar o grupo prostético heme contendo ferro, elemento indispensável para o mecanismo redox da enzima segundo CAMPANELLA *et al.* (2025). A obtenção dos alelos mutantes foi realizada por PCR em duas etapas (**Figura 9B e 9C**). No caso do alelo H366A, dois fragmentos sobrepostos foram amplificados: o primeiro, gerado com os primers IM-319 e IM-844, onde contém o promotor nativo e a região inicial da ORF de *sdeA*, com a substituição H366A; o segundo fragmento, obtido com os primers IM-843 e IM-318, apresentava uma região complementar ao primeiro, além da mutação H366A e da sequência 3' do gene, incluindo o terminador. A construção do alelo H392A seguiu a mesma estratégia; os primers IM-319 e IM-846 foram utilizados para amplificar o fragmento contendo a mutação H392A na porção 5' do gene, enquanto os primers IM-845 e IM-318 geraram o fragmento complementar contendo o restante da ORF, sendo a mutação e a região terminadora. Esses dois pares de fragmentos foram unidos por fusão via PCR utilizando os primers IM-g48 e IM-g49, que possuem 50 pb de homologia com as extremidades 5' e 3' do locus *Safe haven*. As reações de fusão resultaram em produtos finais de aproximadamente 3.840 pb (**Figura 9C**), contendo os alelos completos com o promotor, ORF mutada e terminador. Esses fragmentos foram usados para serem transformados na linhagem condicional *xyIP::sdeA* pelo sistema CRISPR-Cas9 utilizando o vetor pFC332-Sh, direcionando a integração ao locus *Safe haven*.

Após a transformação, as linhagens resultantes tiveram o locus *Safe haven* amplificado e sequenciado para confirmar a incorporação correta dos alelos mutados (**Figura 9D**). Também analisamos em meio contendo glicose como única fonte de carbono, condição repressora, fazendo com que o crescimento dependa exclusivamente da expressão do alelo mutante integrado. Nenhuma das variantes geradas (H366A e H392A) apresentou crescimento nessas condições, indicando que

nenhuma delas foi capaz de complementar a ausência da SdeA selvagem (**Figura 9E**). Esses resultados indicam que ambas as histidinas são essenciais para a função enzimática, em consonância com sua participação prevista na coordenação do grupo heme e na transferência de elétrons durante a dessaturação de ácidos graxos.

Para verificar se a falta de crescimento estava de fato relacionada à perda da atividade da enzima, foram realizados ensaios de crescimento suplementando o meio com os produtos da reação catalisada pela SdeA: os ácidos graxos monoinsaturados oleico (C18:1) e palmitoleico (C16:1). As linhagens contendo as mutações mantiveram o fenótipo auxotrófico para esses ácidos graxos, apresentando comportamento semelhante ao da linhagem parental *xylP::sdeA* (**Figura 9E**).

Foi demonstrado que as histidinas H366 e H392 são indispensáveis para a atividade catalítica da SdeA, sendo determinantes para a sobrevivência celular em *A. fumigatus*.

330-409), separados por uma região do tipo *hinge* com 21 resíduos. O modelo do domínio CytB5 (coloração verde) contendo o grupo heme (em ciano), com oxigênios em vermelho, nitrogênios em azul e ferro em laranja. Os resíduos H366 e H392 coordenam o ferro central do grupo heme, essencial para a atividade redox do domínio. Fonte: CAMPANELLA *et al.* (2025) (B–C) Construção dos cassetes contendo as mutações (B) H366A e (C) H392A por PCR de fusão. Os cassetes foram construídos para inserção no locus (Sh) da linhagem mutante condicional *xyIP::sdeA*. (D) Validação por sequenciamento. A substituição de H366 por alanina (CAC → GCC) foi confirmada no candidato 2 da linhagem *xyIP::sdeA; sdeA^{H366A}* (Sh), sem alteração da H392. Na linhagem *xyIP::sdeA; sdeA^{H392A}* (Sh), ambos os candidatos sequenciados apresentaram a substituição correta de H392 por alanina (CAC → GCC), mantendo H366 intacta. As mutações estão destacadas por quadrados pretos nas figuras. (E) As linhagens apenas crescem na presença de xilose (1%) ou quando suplementadas com ácido oleico. A ausência de crescimento em glicose indica que a substituição de H366 ou H392 compromete a coordenação do grupo heme, resultando em perda da função redutora do domínio CytB5 e da atividade desaturase de SdeA. Fonte: autoria própria.

4.6. Determinação da virulência em modelo invertebrado *Galleria mellonella*

Neste trabalho, apenas mutantes condicionais do gene *sdeA* foram obtidos. Assim, buscamos avaliar se essas linhagens, bem como o seu background genético *xyIP::sdeA*, apresentariam algum grau de virulência utilizando o modelo invertebrado *Galleria mellonella*. Para isso, conídios das linhagens mutantes, da linhagem *xyIP::sdeA* e da cepa wild-type ($\Delta ku80$) foram cultivados em MM suplementado com 1% de glicose ou 1% de xilose. Após o crescimento, os conídios foram coletados, lavados em PBS e ajustados para um inóculo de 10^8 conídios por linhagem, para inocular a pró-pata esquerda de 15 larvas com cerca de 400 mg. Como controle negativo, um grupo de larvas recebeu apenas PBS. Todas foram mantidas a 37 °C, em jejum, por 15 dias, com monitoramento diário da sobrevivência. Somente as larvas inoculadas com a linhagem selvagem exibiram o padrão de virulência esperado, levando à morte de todas as larvas entre os dias 5 e 6. Em contraste, a linhagem *xyIP::sdeA* e os mutantes *xyIP::sdeA; sdeA Δ citb5* (Sh); *xyIP::sdeA; sdeA Δ hinge* (Sh); *xyIP::sdeA; sdeA Δ citb5*; *cytb5::mRFP* (ectópico); *xyIP::sdeA; sdeA^{H366A}* (Sh) e *xyIP::sdeA; sdeA^{H392A}* (Sh) apresentaram perfil totalmente avirulento, semelhante ao grupo controle tratado com PBS.

O experimento mostrou que mesmo no interior de um hospedeiro, a falta de um nível mínimo de ativação da expressão de *sdeA* impede o desenvolvimento e a progressão da infecção pelo fungo. Assim, tanto a proteína SdeA quanto as regiões estruturais identificadas por modelagem são essenciais para a função adequada da enzima e, conseqüentemente, para a virulência do patógeno (**Figura 10**).

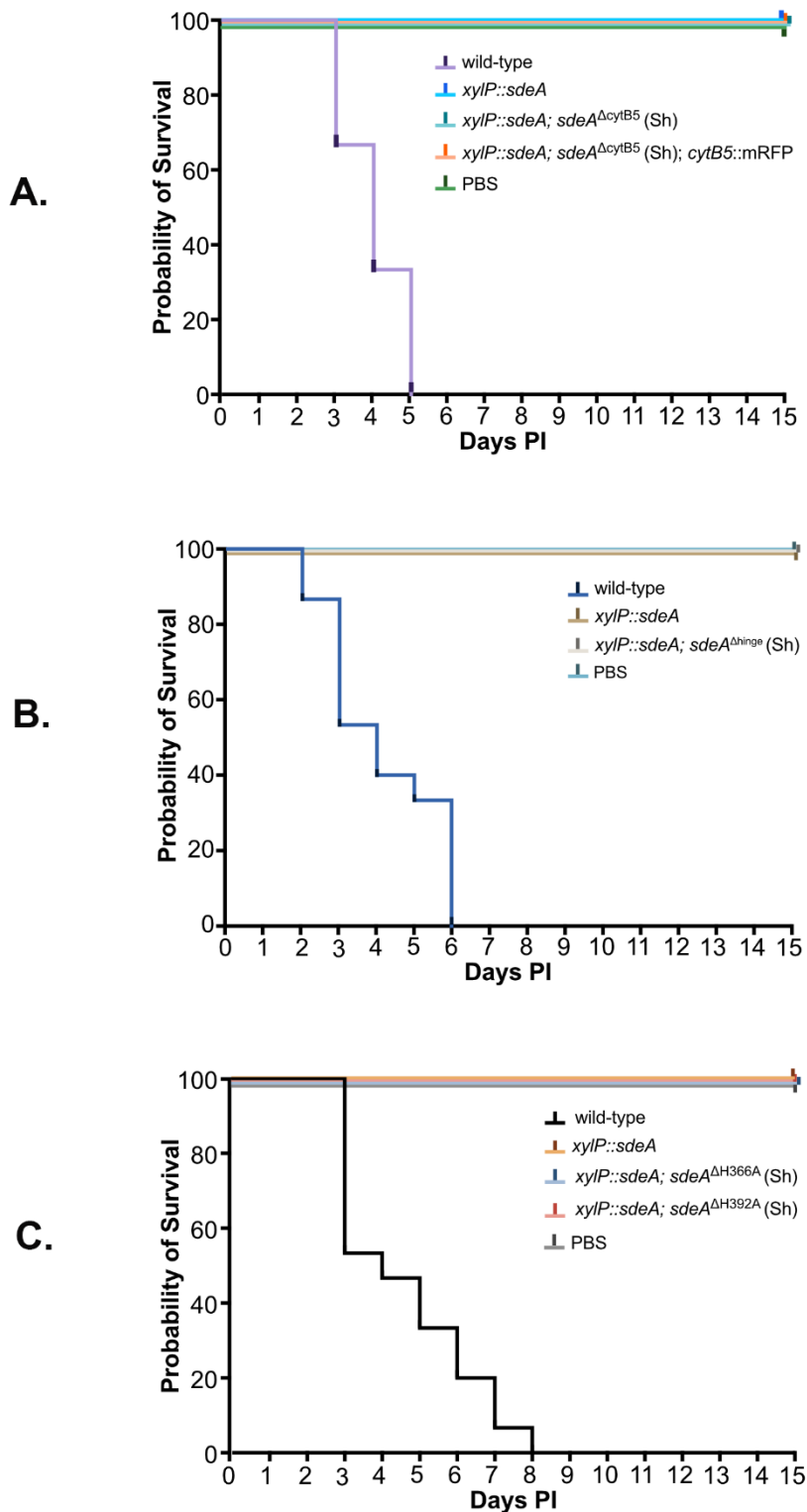


Figura 10 - Análise comparativa da virulência das linhagens mutantes geradas.

(A) Mutantes *xylP::sdeA; sdeA^{ΔcytB5} (Sh)* e *xylP::sdeA; sdeA^{ΔcytB5}(Sh); xylP::sdeA; sdeA^{ΔcytB5}(Sh); cytB5::mRFP* demonstram comportamento avirulento, com virulência na linhagem wild-type ($\Delta ku80$) e controle PBS (solução salina tampão fosfato) com ausência de mortalidade. (B) Mutante *xylP::sdeA^{Δhinge}(Sh)* com o mesmo comportamento experimental. (C) Mutantes *xylP::sdeA^{H366A}* e *xylP::sdeA^{H392A}(Sh)* apresentam o mesmo comportamento experimental. Em todos os testes foram incluídas uma linhagem wild-type ($\Delta ku80$), linhagem recipiente (*xylP::sdeA*) e controle negativo PBS. Cada ensaio foi conduzido com grupos de 15 larvas no modelo *Galleria mellonella*, inoculadas com 10^8 conídios e monitoradas diariamente. Os gráficos mostram as comparações entre os mutantes e a linhagem selvagem, bem como entre os mutantes e o grupo

tratado com PBS, utilizando os testes LogRank (Mantel Cox) e Gehan Breslow Wilcoxon (GraphPad Prism 10). Como não foram observadas diferenças entre os mutantes e o controle PBS, as linhagens são avirulentas. Fonte: autoria própria.

5. CONCLUSÃO

O gene *sdeA* é essencial em *A. fumigatus* e codifica uma desaturase de ácidos graxos importante para a produção de ácido oleico e palmitoleico. A organização dessa enzima como um dímero otimiza a transferência de elétrons, um mecanismo altamente distinto do SCD1 de mamíferos. A fusão do CytB5 com o domínio desaturase pode conferir uma vantagem evolutiva, facilitando a rápida adaptação ao estresse ambiental em fungos. A modelagem *in silico* precursora deste trabalho foi crucial para o correto entendimento dos domínios estudados, sendo um guia para o sucesso da comprovação da hipótese.

A ausência de um nível mínimo de ativação na expressão do gene *sdeA* compromete o desenvolvimento do fungo, evidenciando que tanto a proteína codificada por *sdeA* quanto as regiões estruturais identificadas por modelagem são fundamentais para o funcionamento adequado da enzima e, conseqüentemente, para o desenvolvimento do patógeno, como demonstrado por meio do experimento de virulência em modelo invertebrado.

Apesar de a deleção do domínio *cytb5* não interferir significativamente na localização subcelular da proteína (mantendo seu padrão perinuclear característico e reticular), essa modificação comprometeu a viabilidade fúngica, como evidenciado por ensaios de germinação e crescimento. A recuperação parcial do crescimento na presença de ácido oleico reforça a importância funcional da *sdeA* na biossíntese de ácidos graxos insaturados em *A. fumigatus*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad, A., J. V. Fernández-Molina, J. Bikandi, A. Ramírez, J. Margareto *et al.*, 2010 What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Rev Iberoam Micol* 27: 155-182.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, K. Roberts and P. Walter, 2007 *Molecular Biology of the Cell*, New York
- Alcazar-Fuoli, L., E. Mellado, G. Garcia-Effron, J. F. Lopez, J. O. Grimalt *et al.*, 2008 Ergosterol biosynthesis pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Steroids* 73: 339-347.
- Arnesano, F., L. Banci, I. Bertini, I. C. Felli and D. Koulougliotis, 1999 Solution structure of the B form of oxidized rat microsomal cytochrome b5 and backbone dynamics via 15N rotating-frame NMR-relaxation measurements. 260: 347-354.

- Baker, S. E., and J. W. Bennet, 2007 An Overview of the Genus *Aspergillus*. The *Aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods* 26: 3-13.
- Campanella, J. E. M., L. T. Rosa and I. Malavazi, 2025 Fungal $\Delta 9$ -fatty acid desaturase: a unique enzyme at the core of lipid metabolism in *Aspergillus fumigatus* and a promising target for the search for antifungal strategies. *mBio* 16: e0080324.
- Camps, S. M., J. W. van der Linden, Y. Li, E. J. Kuijper, J. T. van Dissel *et al.*, 2012 Rapid induction of multiple resistance mechanisms in *Aspergillus fumigatus* during azole therapy: a case study and review of the literature. *Antimicrob Agents Chemother* 56: 10-16.
- Daum, G., N. D. Lees, M. Bard and D. R., 1998 *Biochemistry, Cell Biology and Molecular Biology of Lipids of Saccharomyces cerevisiae*.
- Denning, D. W., 2024 Global incidence and mortality of severe fungal disease. *Lancet Infect Dis* 24: e428-e438.
- Denning, D. W., and M. J. Bromley, 2015 Infectious Disease. How to bolster the antifungal pipeline. *Science* 347: 1414-1416.
- Digel, I., 2011 Primary thermosensory events in cells. *Adv Exp Med Biol* 704: 451-468.
- Fabri, J., M. C. Rocha, C. M. Fernandes, J. E. M. Campanella, A. F. D. Cunha *et al.*, 2023 The Heat Shock Transcription Factor HsfA Plays a Role in Membrane Lipids Biosynthesis Connecting Thermotolerance and Unsaturated Fatty Acid Metabolism in *Aspergillus fumigatus*. *Microbiol Spectr* 11: e0162723.
- Fanos, V., and L. Cataldi, 2000 Amphotericin B-induced nephrotoxicity: a review. *J Chemother* 12: 463-470.
- Fernandes, C. M., G. H. Goldman and M. Del Poeta, 2018 Biological Roles Played by Sphingolipids in Dimorphic and Filamentous Fungi. *mBio* 9.
- Fuchs, B. B., E. O'Brien, J. B. Khoury and E. Mylonakis, 2010 Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence* 1: 475-482.
- Furukawa, T., N. van Rhijn, H. Chown, J. Rhodes, N. Alfuraiji *et al.*, 2022 Exploring a novel genomic safe-haven site in the human pathogenic mould *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol* 161: 103702.
- Green, M. R., and J. Sambrook, 2012 *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Henderson, C. M., and D. E. Block, 2014 Examining the role of membrane lipid composition in determining the ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 80: 2966-2972.
- Herbrecht, R., P. Bories, J. C. Moulin, M. P. Ledoux and V. Letscher-Bru, 2012 Risk stratification for invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Ann N Y Acad Sci* 1272: 23-30.
- Hoof, J. B., C. S. Nodvig and U. H. Mortensen, 2018 Genome Editing: CRISPR-Cas9. *Methods Mol Biol* 1775: 119-132.
- Jenks, J. D., and M. Hoenigl, 2018 Treatment of Aspergillosis. *J Fungi (Basel)* 4.
- Kanj, A., N. Abdallah and A. O. Soubani, 2018 The spectrum of pulmonary aspergillosis. *Respir Med* 141: 121-131.
- Krishnamurthy, S., A. Plaine, J. Albert, T. Prasad, R. Prasad *et al.*, 2004 Dosage-dependent functions of fatty acid desaturase Ole1p in growth and morphogenesis of *Candida albicans*. *Microbiology* 150: 1991-2003.
- Leach, M. D., and L. E. Cowen, 2014 Membrane fluidity and temperature sensing are coupled via circuitry comprised of Ole1, Rsp5, and Hsf1 in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 13: 1077-1084.
- Lou, Y., and J. Shanklin, 2010 Evidence that the yeast desaturase Ole1p exists as a dimer in vivo. *J Biol Chem* 285: 19384-19390.
- Malavazi, I., and G. H. Goldman, 2012 Gene disruption in *Aspergillus fumigatus* using a PCR-based strategy and in vivo recombination in yeast. *Methods Mol Biol* 845: 99-118.

- Martin, C. E., C. S. Oh and Y. Jiang, 2007 Regulation of long chain unsaturated fatty acid synthesis in yeast. *Biochim Biophys Acta* 1771: 271-285.
- Mitchell, A. G., and C. E. Martin, 1995 A Novel Cytochrome b5-like Domain Is Linked to the Carboxyl Terminus of the *Saccharomyces cerevisiae* Δ -9 Fatty Acid Desaturase (*). *Journal of Biological Chemistry* 270: 29766-29772.
- Nakagawa, Y., N. Sakumoto, Y. Kaneko and S. Harashima, 2002 Mga2p is a putative sensor for low temperature and oxygen to induce OLE1 transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 291: 707-713.
- Nguyen, L. N., A. Gacser and J. D. Nosanchuk, 2011 The stearyl-coenzyme A desaturase 1 is essential for virulence and membrane stress in *Candida parapsilosis* through unsaturated fatty acid production. *Infect Immun* 79: 136-145.
- Nodvig, C. S., J. B. Hoof, M. E. Kogle, Z. D. Jarczynska, J. Lehmbeck *et al.*, 2018 Efficient oligo nucleotide mediated CRISPR-Cas9 gene editing in *Aspergilli*. *Fungal Genet Biol* 115: 78-89.
- Nodvig, C. S., J. B. Nielsen, M. E. Kogle and U. H. Mortensen, 2015 A CRISPR-Cas9 System for Genetic Engineering of Filamentous Fungi. *PLoS One* 10: e0133085.
- Nour-Eldin, H. H., F. Geu-Flores and B. A. Halkier, 2010 USER cloning and USER fusion: the ideal cloning techniques for small and big laboratories. *Methods Mol Biol* 643: 185-200.
- Pereira Silva, L., P. Alves de Castro, T. F. Dos Reis, M. H. Paziani, M. R. Von Zeska Kress *et al.*, 2017 Genome-wide transcriptome analysis of *Aspergillus fumigatus* exposed to osmotic stress reveals regulators of osmotic and cell wall stresses that are SakA(HOG1) and MpkC dependent. *Cell Microbiol* 19.
- Perlin, D. S., 2011 Current perspectives on echinocandin class drugs. *Future Microbiol* 6: 441-457.
- Pham, T., X. Xie and X. Lin, 2020 An intergenic "safe haven" region in *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol* 58: 1178-1186.
- Rella, A., A. M. Farnoud and M. Del Poeta, 2016 Plasma membrane lipids and their role in fungal virulence. *Prog Lipid Res* 61: 63-72.
- Rhodes, J. C., 2006 *Aspergillus fumigatus*: growth and virulence. *Med Mycol* 44 Suppl 1: S77-81.
- Rhodes, J. C., B. G. Oliver, D. S. Askew and T. W. Amlung, 2001 Identification of genes of *Aspergillus fumigatus* up-regulated during growth on endothelial cells. *Med Mycol* 39: 253-260.
- Richard, E., O. N. Michael, P. Alexander, A. Natasha, S. Andrew *et al.*, 2022 Protein complex prediction with AlphaFold-Multimer. *bioRxiv*: 2021.2010.2004.463034.
- Sahara, T., T. Goda and S. Ohgiya, 2002 Comprehensive expression analysis of time-dependent genetic responses in yeast cells to low temperature. *J Biol Chem* 277: 50015-50021.
- Schade, B., G. Jansen, M. Whiteway, K. D. Entian and D. Y. Thomas, 2004 Cold adaptation in budding yeast. *Mol Biol Cell* 15: 5492-5502.
- Shapiro, R. S., and L. E. Cowen, 2012 Thermal control of microbial development and virulence: molecular mechanisms of microbial temperature sensing. *mBio* 3.
- Shen, J., G. Wu, A.-L. Tsai and M. Zhou, 2022 Transmembrane helices mediate the formation of a stable ternary complex of b5R, cyt b5, and SCD1. *Communications Biology* 5: 956.
- Stukey, J. E., V. M. McDonough and C. E. Martin, 1990 The OLE1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the delta 9 fatty acid desaturase and can be functionally replaced by the rat stearyl-CoA desaturase gene. *J Biol Chem* 265: 20144-20149.
- Tashiro, M., K. Izumikawa, K. Hirano, S. Ide, T. Mihara *et al.*, 2012 Correlation between triazole treatment history and susceptibility in clinically isolated *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 56: 4870-4875.

- Thompson, G. R., 3rd, and J. H. Young, 2021 Aspergillus Infections. *N Engl J Med* 385: 1496-1509.
- van de Veerdonk, F. L., A. Carvalho, J. Wauters, G. Chamilos and P. E. Verweij, 2025 Aspergillus fumigatus biology, immunopathogenicity and drug resistance. *Nature Reviews Microbiology* 23: 652-666.
- Wang, H., M. G. Klein, H. Zou, W. Lane, G. Snell *et al.*, 2015 Crystal structure of human stearyl-coenzyme A desaturase in complex with substrate. *Nat Struct Mol Biol* 22: 581-585.
- Wang, Y., S. Wang, L. Zeng, Z. Han, J. Cao *et al.*, 2021 Long-chain unsaturated fatty acids are involved in the viability and itraconazole susceptibility of Aspergillus fumigatus. *Biochem Biophys Res Commun* 585: 82-88.
- Wang, Y., L. Zhang, L. Zhou, M. Zhang and Y. Xu, 2022 Epidemiology, Drug Susceptibility, and Clinical Risk Factors in Patients With Invasive Aspergillosis. *Front Public Health* 10: 835092.
- Wilson, R. A., P. K. Chang, A. Dobrzyn, J. M. Ntambi, R. Zarnowski *et al.*, 2004 Two Delta9-stearic acid desaturases are required for Aspergillus nidulans growth and development. *Fungal Genet Biol* 41: 501-509.
- Yap, A., I. Glarcher, M. Misslinger and H. Haas, 2022 Characterization and engineering of the xylose-inducible xylP promoter for use in mold fungal species. *Metab Eng Commun* 15: e00214.
- Zadra, I., B. Abt, W. Parson and H. Haas, 2000 xylP promoter-based expression system and its use for antisense downregulation of the Penicillium chrysogenum nitrogen regulator NRE. *Appl Environ Microbiol* 66: 4810-4816.