

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR
LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E GENÉTICA APLICADA (LBGA)**

NAIANE LIMA GODOY

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO GENE *ypkA*, HOMÓLOGO DE *YPK1* EM
LEVEDURA, NO FUNGO PATÓGENO OPORTUNISTA HUMANO *Aspergillus fumigatus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

**SÃO CARLOS
2016**

NAIANE LIMA GODOY

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO GENE *ypkA*, HOMÓLOGO DE *YPK1* EM
LEVEDURA, NO FUNGO PATÓGENO OPORTUNISTA HUMANO *Aspergillus fumigatus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Iran Malavazi

**SÃO CARLOS
2016**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G589c Godoy, Naiane Lima
Caracterização funcional do gene ypkA, homólogo de ypk1 em levedura, no fungo patógeno oportunista humano *Aspergillus fumigatus* / Naiane Lima Godoy. -- São Carlos : UFSCar, 2016.
88 p.

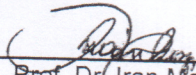
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2016.

1. *Aspergillus fumigatus*. 2. Esfingolipídios. 3. ypkA. I. Título.

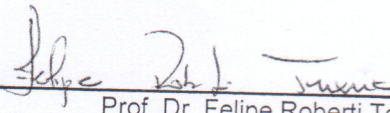


Folha de Aprovação

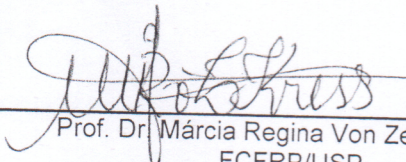
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Naiane Lima Godoy, realizada em 15/06/2016:



Prof. Dr. Iran Malavazi
UFSCar



Prof. Dr. Felipe Roberti Teixeira
UFSCar



Prof. Dr. Márcia Regina Von Zeska Kress
FCFRP/USP



BANCA EXAMINADORA**PRESIDENTE DA BANCA****Prof. Dr. Iran Malavazi**

Professor Adjunto do Departamento De Genética e Evolução (DGE) da
Universidade Federal de São Carlos – CCBS-UFSCar.

TITULARES**Prof. Dr. Felipe Roberti Texeira**

Professor Adjunto do Departamento De Genética e Evolução (DGE) da
Universidade Federal de São Carlos – CCBS-UFSCar.

Profa. Dra. Márcia Regina von Zeska Kress

Professor Adjunto do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e
Bromatológicas (DACTB) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão
Preto - FCFRP - USP.

SUPLENTE**Profa. Dra. Andréa Soares da Costa Fuentes**

Professor Adjunto do Departamento De Genética e Evolução (DGE) da
Universidade Federal de São Carlos – CCBS-UFSCar.

Profa. Dra. Taicia Pacheco Fill

Professor Adjunto do Departamento De Química Orgânica (DQO) da
Universidade Estadual de Campinas – Instituto de Química - UNICAMP.

*"Quando acordei hoje de manhã, eu sabia quem eu era, mas acho que
já mudei muitas vezes desde então."*

Lewis Carroll – Alice no País das Maravilhas

AGRADECIMENTOS

Agradeço de antemão a todos que de alguma maneira passaram pela minha vida e contribuíram para a construção de quem sou hoje.

Ao meu noivo, amor da minha vida, Jhonne Pedro, pelo companheirismo, carinho e apoio emocional prestado durante todos esses 6 anos de relacionamento.

Aos meus pais, Antonia e Charles, pelo amor incondicional, ensinamentos e apoio para que eu pudesse estudar e chegar cada vez mais longe.

A minha irmã, Rafaela, por todos os momentos de carinho e alegria, durante toda minha vida.

Aos queridos Andrieli e Joelson, por todos os momentos de descontração e palavras de ânimo e confiança.

As minhas amigas Krissia e Naiana, pela amizade construída, apoio e suporte durante todo o mestrado.

Aos amigos que considero extremamente especiais: Gabrielle Maia, João Pedro e Tatiele. Vocês tornam meus dias melhores, possibilitando momentos únicos e inesquecíveis de felicidade e sincera amizade.

Aos meus amigos de laboratório, Cynthia, Marina, João, Victor e a todos os demais integrantes do LBG1/2, sem os quais nada disso seria possível.

A Dra. Taicia Fill pelo importantíssimo auxílio e paciência, aos quais sempre serei grata.

Ao Tiago Alexandre Cocio do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto; e a Thaila Fernanda dos Reis que contribuíram significativamente na realização deste trabalho.

Ao meu orientador, prof. Dr. Iran Malavazi, pelos ensinamentos e orientação prestada no decorrer deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, pela oportunidade.

E a FAPESP; a Capes e ao CNPq pelo apoio financeiro.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Estrutura química e nomenclatura de esfingolipídios. A esfinganina, também conhecida como esfingosina, é a LCB primária encontrada em todos os esfingolipídios, onde uma cadeia de ácido graxo pode se ligar ao grupo –NH₂ da molécula por uma ligação amida, formando a ceramida, que por sua vez pode dar origem outros tipos de esfingolipídios mais complexos..... (pág. 5)
- Figura 2:** Diagrama do metabolismo dos esfingolipídios em *S.cerevisiae*. Os metabólitos são mostrados em negrito, os genes estão em itálico e os nomes das enzimas estão expostos na figura..... (pág.6)
- Figura 3:** Esquema da localização e atuação das proteínas Orm1/2p e Ypk1/2p na biossíntese de esfingolipídios em levedura. Ypk1/2p fosforilam e inibem a proteína Orm1/2p, que por sua vez não exerce mais sua função sobre a enzima SPT, deixando essa enzima livre para converter serina para 3-cetodihidro, dando início a biossíntese de esfingolipídeos.....(pág.9)
- Figura 4:** Modelo de ativação transcricional de Ypk1/2p em *S. cerevisiae*. De acordo com a manutenção da viabilidade da célula, quando um maior requerimento da síntese de esfingolipídios é necessário, Pkh1/2p e Torc2p ativam Ypk1/2p, que inibem a Orm1/2p e restauram os níveis de esfingolipídios celular.....(pág.10)
- Figura 5:** Esquema da construção do cassete de deleção do gene *ypkA* a partir da recombinação genica dos fragmentos 5' (*ypkA*); *pyrG* e 3' (*ypkA*) em *S. cerevisiae*. Os fragmentos independentes 5' e 3' foram amplificados a partir da linhagem Afu293 de *A. fumigatus*, enquanto o fragmento *pyrG* foi obtido através do vetor pCDA21.....(pág.40)
- Figura 6:** Confirmação da deleção do gene *ypkA* no mutante, por PCR, através dos primers 500 ups (para confirmação no lócus) e *pyrG* REV.....(pág.41)
- Figura 7:** *A. fumigatus*, linhagem selvagem (a esquerda) comparado com o mutante $\Delta ypkA$ (a direita), com 48 horas de crescimento a 37°C em meio de cultura completo (YAG). O mutante apresenta restrito crescimento vegetativo.....(pág.42)
- Figura 8:** (A-B) *A. fumigatus* selvagem (a esquerda) comparado com o mutante $\Delta ypkA$ (a direita). (C-D) Presença de esporos na superfície do fungo selvagem (a esquerda) comparado com a ausência na superfície do mutante $\Delta ypkA$ (a direita), em aumento de 20x do estereoscópio. Todas as placas cresceram por 120 horas a 37°C em YAG..... (pág. 43)
- Figura 9:** Microscopia de campo claro em aumento de 40X e 100X; com corante lactofenol azul de algodão. (A-B) Formação de conidióforos da linhagem selvagem crescidos por 120 horas a 37°C em YAG. (C-D) Ausência da formação de conidióforos no mutante nulo $\Delta ypkA$ crescido por 120 horas a 37°C em YAG..... (pág. 43)
- Figura 10:** Esquema da construção do cassete de substituição gênica para a obtenção do mutante condicional *niiA::ypkA*, através de recombinação homóloga dos fragmentos independentes em *S.*

cerevisiae. Os fragmentos 5' e 3' *ypkA* foram amplificados da linhagem Afu293 de *A. fumigatus*, enquanto o fragmento *pyrG-niiA* foi obtido através do vetor pCDA21.....(pág. 44)

Figura 11: Confirmação da construção do mutante *niiA::ypkA* por Southern blot, através do corte da enzima *Apal* da região 5' à *pyrG* (4.1 kb), enquanto o corte correspondente a linhagem selvagem apresentou a altura de 6,7 kb. Foi utilizado o filme fotográfico "Hyperfilm" ECL.....(pág. 45)

Figura 12: Expressão do gene *ypkA* do mutante condicional *niiA::ypkA*, tanto em repressão (50mM de TA), quanto em indução (10 mM de NM) utilizando o gene *tubA* como normalizador.....(pág. 46)

Figura 13: (A) Teste fenotípico de termosensibilidade com diferentes concentrações de esporos (10^6 ; 10^5 ; 10^4 e 10^3) da linhagem selvagem e do mutante *niiA::ypkA*, crescidos por 48 horas a temperaturas de 30°C; 37°C e 48°C em AMM + tartarato de amônio (TA) ou nitrato de magnésio (NM). (B) Crescimento radial da linhagem selvagem e do mutante condicional *niiA::ypkA* por 120 dias, com 2×10^5 de esporos, em AMM + tartarato de amônio (50 mM) ou nitrato de magnésio (10 mM), a 30°C; 37°C e 48°C. (C) Gráfico do crescimento radial durante 120 horas de crescimento da linhagem selvagem e do mutante condicional *niiA::ypkA*, em AMM + tartarato de amônio ou nitrato de magnésio.....(pág.48)

Figura 14: Gráfico da cinética de germinação dos conídios da linhagem mutante *niiA::ypkA* e selvagem em AMM com tartarato de amônio ou nitrato de magnésio, 1×10^6 de conídios cresceram durante 2; 4; 6 e 8 horas de crescimento á 37°C. A contagem dos conídios foi efetuada através de microscopia de campo claro em um aumento de 40X.....(pág.49)

Figura 15: Morfologia das hifas do mutante *niiA::ypkA* através de microscopia em contraste óptico com objetiva de 100X, em AMM com tartarato de amônio ou nitrato de magnésio, por 12 horas a 37°C.....(pág.50)

Figura 16: Quantificação do ergosterol na linhagem selvagem (10^2 de esporos) e do mutante Δ *ypkA* de *A. fumigatus*, crescidos em YG por 120 horas. As amostras foram equalizadas através da pesagem dos micélios liofilizados e da dosagem de glicose no meio de cultura de forma a se obter o mesmo consumo de glicose durante o crescimento já que a taxa de crescimento no mutante nulo é muito diferente daquela da linhagem selvagem.....(pág.51)

Figura 17: Quantificação do ergosterol, com 2×10^7 de esporos tanto da linhagem mutante quanto da selvagem, em AMM com tartarato de amônio ou nitrato de magnésio, a 37°C por 24 horas.....(pág.52)

Figura 18: Distribuição de ergosterol pela membrana das hifas do mutante *niiA::ypkA*, , através de microscopia de fluorescência utilizando o corante filipina, 1×10^6 de conídios foram inoculados em AMM com tartarato de amônio ou nitrato de magnésio, por 12 horas a 37°C.....(pág.53)

Figura 19: Teste do mutante condicional *niiA::ypkA* frente a drogas estressoras da parede celular. Utilizando a cafeína nas concentrações de 3,5 mM e 5 mM; CFW na concentração de 25 µg/ml; SDS nas concentrações de 0,007% e 0,002%, e CR nas concentrações de 15 µg/ml e 25 µg/ml. Os testes foram realizados em AMM + tartarato de amônio ou nitrato de magnésio, á 37°C por 48 horas, com as soluções de esporos nas concentrações seriadas de 10^6 ; 10^5 ; 10^4 e 10^3(pág.55)

- Figura 20:** Teste do mutante condicional *niiA::ypkA* frente a drogas inibidoras a síntese de lipídeos. Utilizando a miriocina nas concentrações de 1 µg/ml; 1,5 µg/ml; e a lovastatina na concentração de 1 µg/ml. Os testes foram realizados em AMM + tartarato de amônio ou nitrato de magnésio, á 37°C por 48 horas, com as soluções de esporos nas concentrações seriadas de 10⁶; 10⁵; 10⁴ e 10³.....(pág.57)
- Figura 21:** Teste fenotípico com o mutante *niiA::ypkA* de *A. fumigatus*, em repressão e indução sob a ação de 0,5 ug/ml; 1 ug/ml; 2 ug/ml; 3,5 ug/ml e 5 ug/ml da droga Aureobasidina A, com 5x10² de esporos, em AMM com tartarato de amônio ou com nitrato de magnésio, á 37°C por 48 horas.....(pág.58)
- Figura 22:** Teste fenotípico com o mutante *niiA::ypkA* de *Aspergillus fumigatus*, em repressão e indução sob a ação de 2,5 ug/ml; 5 ug/ml; 7,5 ug/ml; 10 ug/ml e 12 ug/ml da droga cerulenina, com 5x10² de esporos inoculados em AMM com tartarato de amônio ou com nitrato de magnésio, á 37°C por 48 horas.....(pág.59)
- Figura 23:** (A) Expressão relativa do gene *ypkA* na linhagem selvagem em AMM com tartarato de amônio. (B) Expressão relativa do gene *ypkA* na linhagem mutante *niiA::ypkA* em AMM com tartarato de amônio..... (pág.61)
- Figura 24:** (A) Expressão relativa do gene *pkhA* na linhagem selvagem em AMM com tartarato de amônio. (B) Expressão relativa do gene *pkhA* na linhagem mutante *niiA::ypkA* em AMM com tartarato de amônio.....(pág.62)
- Figura 25:** (A) Expressão relativa do gene *ormA* na linhagem selvagem em AMM com tartarato de amônio. (B) Expressão relativa do gene *ormA* na linhagem mutante *niiA::ypkA* em AMM com tartarato de amônio.....(pág.62)
- Figura 26:** Validação do duplo mutante $\Delta rlmA/niiA::ypkA$ com os primers *ypkA* 500 ups e *niiA* REV para a confirmação da inserção do cassete no locus do gene *ypkA*.....(pág.64)
- Figura 27:** Teste do duplo mutante $\Delta rlmA/niiA::ypkA$ frente a drogas inibidoras a síntese de lipídeos. Utilizando a miriocina nas concentrações de 1 µg/ml; 1,5 µg/ml; e a lovastatina nas concentrações de 1 µg/ml; 1,5 µg/ml. Os testes foram realizados em AMM + tartarato de amônio ou nitrato de magnésio, com as soluções de esporos nas concentrações seriadas de 10⁶; 10⁵; 10⁴ e 10³, á 37°C por 48horas.....(pág.65)
- Figura 28:** (A) Teste do duplo mutante $\Delta rlmA/niiA::ypkA$ frente a droga aureobasidina A, nas concentrações de 0,5 µg/ml; 1 µg/ml; 2 µg/ml; 3,5 µg/ml e 5 µg/ml, utilizando 5x10² de esporos, em AMM + tartarato de amônio ou nitrato de magnésio, á 37°C por 48 horas. (B) Teste do duplo mutante $\Delta rlmA/niiA::ypkA$ na presença da droga cerulenina, nas concentrações de 2,5 µg/ml; 5 µg/ml; 7,5 µg/ml; 10 µg/ml e 12,5 µg/ml, utilizando 5x10² de esporos, em AMM + tartarato de amônio ou nitrato de magnésio, á 37°C por 48 horas.....(pág.67)
- Figura 29:** (A) Validação do duplo mutante *niiA::ypkA*/ $\Delta mpkA$ com os primers *mpkA* 600 ups (para confirmação no locus do gene *mpkA*) e *mpkA* 3' REV. (B) PCR do duplo mutante utilizando os primers *mpkA* FW e *mpkA* REV, para verificar a ausência da amplificação da ORF no duplo mutante.....(pág.68)

Figura 30: Teste do duplo mutante $\Delta mpkA/niiA::ykpA$ frente a drogas inibidoras a síntese de lipídeos. Utilizando a miriocina nas concentrações de 1 $\mu\text{g/ml}$; 1,5 $\mu\text{g/ml}$; e a lovastatina nas concentrações de 1 $\mu\text{g/ml}$; 1,5 $\mu\text{g/ml}$. Os testes foram realizados em AMM + tartarato de amônio ou nitrato de magnésio, com as soluções de esporos nas concentrações seriadas de 10^6 ; 10^5 ; 10^4 e 10^3 , a 37°C por 48 horas.....(pág.69)

Figura 31: (A) Teste do duplo mutante $\Delta mpkA/niiA::ykpA$ frente a droga aureobasidina A, nas concentrações de 0,5 $\mu\text{g/ml}$; 1 $\mu\text{g/ml}$; 2 $\mu\text{g/ml}$; 3,5 $\mu\text{g/ml}$ e 5 $\mu\text{g/ml}$, utilizando 5×10^2 de esporos, em AMM + tartarato de amônio ou nitrato de magnésio, a 37°C por 48 horas. (B) Teste do duplo mutante $\Delta mpkA/niiA::ykpA$ na presença da droga cerulenina, nas concentrações de 2,5 $\mu\text{g/ml}$; 5 $\mu\text{g/ml}$; 7,5 $\mu\text{g/ml}$; 10 $\mu\text{g/ml}$ e 12,5 $\mu\text{g/ml}$, utilizando 5×10^2 de esporos, em AMM + tartarato de amônio ou nitrato de magnésio, a 37°C por 48 horas.....(pág.71)

Figura 32: Esquema da construção do cassete de deleção do gene *pkhA* através de PCR de fusão dos fragmentos independentes. Os fragmentos da extremidade 5' e 3' do gene foram amplificados a partir da linhagem Afu293 de *A. fumigatus*, e o fragmento *pyrG*, foi amplificado a partir do vetor pCDA21.....(pág.72)

Figura 33: Confirmação da deleção do gene *pkhA* de *A. fumigatus* por PCR, através dos primers *pkhA* 500 ups (para confirmação no locus) e *pyrG* REV.....(pág.72)

Figura 34: (A) *A. fumigatus* linhagem selvagem (a direita) comparado com o mutante $\Delta pkhA$ (a esquerda), com 48 horas de crescimento, a 37°C em YAG. (B) Fenótipo do mutante $\Delta pkhA$ com 120 horas de crescimento, a 37°C em YAG.....(pág.73)

Figura 35: Regiões de similaridade da proteína YpkA de *A. fumigatus*, obtidas através do BLASTp, com as proteínas *pkcB* de *A. nidulans* (identidade de 89%); *PkcA* de *A. fumigatus* (identidade de 43,6%); *Ypk1p* (identidade de 47%) e *Ypk2p* (identidade de 47%) de *S. cerevisiae*. As regiões sublinhadas destacam a localização da região catalítica das proteínas.....(pág.77)

Figura 36: Esquema da interação das proteínas PkhA; YpkA; OrmA e MpkA em *A. fumigatus*, baseado nos resultados obtidos neste trabalho. Em que a proteína PkhA ativa YpkA, que por sua vez fosforila e inibe OrmA, permitindo assim que a enzima SPT comece a síntese de esfingolipídios. Paralelamente, a proteína de manutenção da parede celular, a MpkA, interage com a proteína YpkA e consequentemente, com a via de síntese de esfingolipídios.....(pág. 81)

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Genótipos das linhagens de *A. fumigatus* utilizadas neste trabalho.....(pág.26)
- Tabela 2:** Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR em tempo real.....(pág.26)
- Tabela 3:** Concentração dos primers utilizados nas reações de RT-PCR em tempo real.....(pág.27)
- Tabela 4:** Sequência de oligonucleotídeos utilizados neste trabalho para a construção das linhagens mutantes.....(pág.27)
- Tabela 5:** Agentes e drogas utilizados nos ensaios de caracterização fenotípica das linhagens mutantes.....(pág.29)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABA-** Aureobasidina A
- ABPA-** Aspergilose brocopulmonar alérgica
- AIDS-** Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- AMPc-** Monofosfato cíclico de adenosina
- API-** Aspergilose pulmonar invasiva
- AT-** Tartarato de amônio
- cDNA-** DNA complementar
- CER-** Cerulenina
- CFU-** Unidade Formadora de Colônia
- CFW-** calcofluor White
- CR-** congo red (vermelho do congo)
- DAG-** Diacilglicerol
- DEPC-** Dietil pirocarbonato
- DHS-** Di-hidroesfingosina
- DIC-** Contraste diferencial de intensidade óptica
- DMSO-** Dimetilsulfóxido
- DNA-** Ácido desoxirribonucleico
- EDTA-** ácido etilenodiamino tetra-acético
- GMPc-** Monofosfato cíclico de guanosina
- GPI-** Glicofosfatidilinositol
- HPLC-** Cromatografia líquida de alta eficiência
- IPC-** Inositol-fosfoceramida
- LCB-** Longa cadeia de base esfingóide
- LOV-** Lovastatina
- MAPK-** Proteína quinase ativada por mitógeno
- MIPC-** Manose-inositol-fosfoceramida
- M(IP)2C-** Manose (inositol-P)₂ ceramida
- MN-** Nitrato de magnésio
- MOPS-** ácido 3-(N-morfolino propanosulfônico)
- MYR-** Miriocina

OMP- Ornitina 5'-monofosfato
ORF- *Open reading frame*
PDK1- *3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1*
PEG- Polietilenoglicol
PHS- Fitoesfingosina
PKA- Proteína quinase A
PKB- Proteína quinase B
PKC- Proteína quinase C
PKG- Proteína quinase G
ROS- Espécies reativas de oxigênio
RT-PCR- PCR associada a transcrição reversa
SDS- Dodecil sulfato de sódio
Ser- Serina
SGK- *Serum and glucocorticoid-regulated kinase*
SPT- Serina palmitoil-transferase
TORC- *Target of rapamycin complex*

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Aspergillus fumigatus</i>	1
1.2 Membrana Plasmática e Esfingolipídios	3
1.3 Proteína YpkA.....	7
2 OBJETIVOS.....	13
2.1 Objetivo Geral.....	13
2.2 Objetivos Específicos	13
3 MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 MEIOS DE CULTIVO	14
3.1.1 Meios de Cultivo para <i>S. cerevisiae</i>	14
3.1.1.1 Meio SC URA- (Meio Mínimo)	14
3.1.1.2 YPD	14
3.1.2 Meio de cultivo para <i>Escherichia coli</i>	14
3.1.2.1 Meio LB (Luria Bertani)	15
3.1.2.2 Meios de cultivo para <i>A. fumigatus</i>	15
3.1.2.3 Meio Mínimo (MM, MM+UU)	15
3.1.2.4 Meio Mínimo Modificado (AMM).....	15
3.1.2.5 Meio Completo (YAG, YUU, YG e YG+UU, YAG+KCl).....	16
3.2 SOLUÇÕES E TAMPÕES	16
3.2.1 Solução de elementos traços.....	16
3.2.2 Solução de sais 20x concentrada para MM.....	17
3.2.3 Solução de elementos traços para AMM.....	17
3.2.4 Solução de sais para AMM	18
3.2.5 Solução de nitrato de magnésio	18
3.2.6 Solução de tartarato de amonio	19
3.2.7 Soluções de protoplastização para transformação em <i>A. fumigatus</i>	19
3.2.7.1 Solução 1 de protoplastização	19
3.2.7.2 Solução 2 de protoplastização	19

3.2.7.3	Solução 3 de protoplastização	20
3.2.7.4	Solução 4 de protoplastização	20
3.2.7.5	Solução 5 de protoplastização	20
3.2.8	Solução para extração do DNA plasmidial de <i>E. coli</i>	21
3.2.8.1	Solução 1	21
3.2.8.2	Solução 2	21
3.2.8.3	Solução 3	21
3.2.9	Solução para transformação em <i>S. cerevisiae</i>	22
3.2.9.1	Solução de TE (Tris EDTA) 10x	22
3.2.9.2	Solução de acetato de lítio 10x	22
3.2.9.3	Solução de PEG (polietilenoglicol) 50%	22
3.2.10	Solução de SDS 10%	23
3.2.11	Solução de hidróxido de sódio 2 M	23
3.2.12	Tampão para extração de DNA	23
3.2.13	Tampão TRIS-Acetato-EDTA (TAE) 50x concentrado para eletroforese de DNA	23
3.2.14	Tampão de amostra para eletroforese de DNA 5x concentrado	24
3.2.15	Tampão de amostra para eletroforese de RNA	24
3.2.16	Tampão MOPS 10x concentrado para eletroforese de RNA	25
3.2.17	Tampão PBS (“Phosphate buffered saline”) 10x concentrado	25
3.3	GEL DE AGAROSE PARA ELETROFORESE DE DNA	25
3.4	GEL DE AGAROSE PARA ELETROFORESE DE RNA	26
3.5	LINHAGENS DE <i>A. FUMIGATUS</i> UTILIZADAS NESTE TRABALHO	26
3.6	OLIGONUCLEOTÍDEOS USADOS PARA RT-PCR EM TEMPO REAL	26
3.7	OLIGONUCLEOTÍDEOS	27
3.8	SOLUÇÃO ESTOQUE DAS DROGAS UTILIZADAS	28
3.9	PROTÓCOLOS ADOTADOS	29
3.9.1	<i>Transformação em A. fumigatus</i>	30
3.9.2	Teste de sensibilidade a drogas pelo método de “drop-out”	31
3.9.3	Determinação da cinética de germinação dos conídios	31
3.9.4	Análise do crescimento da hifas	31
3.9.5	Análise da distribuição de ergosterol	32

3.9.6	Extração de RNA total.....	32
3.9.7	Extração de DNA de micélio.....	33
3.9.8	Extração de DNA de conídios	34
3.9.9	Extração de DNA de <i>S. cerevisiae</i>	34
3.9.10	Análises de “southern blot”	35
3.9.11	Análises de PCR em tempo real.....	36
3.9.12	Extração e dosagem de ergosterol por HPLC-UV a partir do micélio de <i>A. fumigatus</i>	37
3.9.13	Análises estatísticas	38
4	RESULTADOS.....	39
4.1	Construção do Cassete de Deleção do Gene <i>ypkA</i> de <i>A. fumigatus</i>	39
4.2	Validação do Mutante Nulo Δ <i>ypkA</i>	40
4.3	Análise Fenotípica do Mutante Nulo Δ <i>ypkA</i>	41
4.4	Construção do Mutante Condicional <i>niiA::ypkA</i> de <i>A. fumigatus</i>	43
4.5	Teste da funcionalidade do promotor <i>niiA</i> na linhagem <i>niiA::ypkA</i>	45
4.6	Análise fenotípica do mutante <i>niiA::ypkA</i>	46
4.6.1.	Teste de Crescimento Radial e Termosensibilidade	46
4.6.2.	Análise do Cinética de Germinação do Mutante <i>niiA::ypkA</i>	48
4.6.3.	Quantificação de Ergosterol.....	50
4.6.4.	Testes Fenotípicos com o Mutante Condicional <i>niiA::ypkA</i> na Presença de Drogas Estressoras de Parede Celular e Inibidoras da Síntese de Lipídios e de Esfingolipídeos	53
4.7	Análise da Expressão de Genes Relacionados a Síntese de Esfingolipídios Frente ao Choque Térmico	59
4.8	Construção dos Duplos Mutantes <i>niiA::ypkA/ΔrlmA</i> e <i>niiA::ypkA/ΔmpkA</i>	63
4.9	Construção do Mutante Nulo Δ <i>pkhA</i> de <i>A. fumigatus</i>	71
5	DISCUSSÃO	74
6	CONCLUSÃO	79
6.1	Conclusões Gerais.....	80
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO GENE *ypkA*, HOMÓLOGO DE *YPK1* EM LEVEDURA, NO FUNGO PATÓGENO OPORTUNISTA HUMANO *Aspergillus fumigatus*

Aspergillus fumigatus é um fungo filamentosso patogênico oportunista, e o agente etiológico da aspergilose, que em imunocomprometidos pode vir a ocasionar a forma mais letal da doença, a aspergilose pulmonar invasiva. Como em todos os eucariotos, a membrana plasmática de *A. fumigatus* é composta por esteróis, glicolipídios e esfingolipídios. As moléculas de esfingolipídios são elementos estruturais que participam da regulação da endocitose, do citoesqueleto de actina e do crescimento celular. Em *Saccharomyces cerevisiae*, a síntese de esfingolipídios é regulada pelas proteínas do tipo “AGC quinases” conhecidas como Ypk1p e Ypk2p, que inativam Orm1p e Orm2p, as quais são proteínas inibidoras da enzima serina palmitoil-transferase (SPT), a primeira enzima que participa da via de biossíntese dos esfingolipídios. Dessa forma Ypk1/2p são responsáveis por estimular a produção de esfingolipídios na membrana plasmática em resposta a diversos fatores de estresse celular, como por exemplo o estresse de parede celular, estresse térmico entre outros. Diante disso, este trabalho teve como objetivo ampliar o estudo da biossíntese de esfingolipídios em *A. fumigatus* através da caracterização funcional do gene *ypkA*^{YPK1}, de forma a estabelecer sua função na regulação da síntese de esfingolipídios e na manutenção da integridade celular. Para cumprir esse objetivo, uma linhagem mutante nulo $\Delta ypkA^{ypk1}$ e uma linhagem mutante condicional *niiA::ypkA* em *A. fumigatus* foram obtidas. As linhagens mutantes foram caracterizadas através de ensaios fenotípicos visando a compreensão do papel desse gene na síntese de esfingolipídios, na virulência e patogenicidade desse fungo. Posteriormente, foram realizados experimentos de RT-PCR em tempo real para a quantificação da expressão desse gene em condições de estresse térmico. Os resultados indicaram que a deleção do gene *ypkA* promove alterações no desenvolvimento vegetativo do fungo, o qual cresce na forma de colônias pequenas as quais não formam conídios. Ainda, o mutante condicional, quando reprimido, apresenta sensibilidade a drogas inibidoras da síntese de lipídeos e esfingolipídios. Os resultados indicam também que não há interação genética entre *ypkA* e os genes da via da integridade da parede celular. Assim, podemos propor que a proteína quinase YpkA de *A. fumigatus* está relacionada com o crescimento vegetativo e participa da biossíntese de esfingolipídios em *A. fumigatus*, contribuindo com o desenvolvimento e integridade da célula fúngica.

Descritores: *Aspergillus fumigatus*, esfingolipídios, *ypkA*.

ABSTRACT

FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF THE *ypka* GENE, AN YPK1 HOMOLOGOUS IN YEAST, ON THE HUMAN OPPORTUNIST PATHOGENOUS FUNGUS *Aspergillus fumigatus*

Aspergillus fumigatus is an opportunistic pathogenic filamentous fungus, and the causative agent of aspergillosis, including the invasive pulmonary aspergillosis in immunocompromised individuals, most lethal form of the disease. As in all eukaryotes, the plasma membrane of *A. fumigatus* is composed of sterols, glycolipids and sphingolipids. The sphingolipids molecules are structural elements that participate in the regulation of the actin cytoskeleton endocytosis, and cell growth. In *Saccharomyces cerevisiae*, the sphingolipid synthesis is regulated by proteins such as the "AGC kinases" known as Ypk1p and Ypk2p that inactivate Orm1p and Orm2p, which are inhibitory proteins of the serine palmitoyltransferase (SPT) enzyme, the first enzyme that participates in biosynthetic pathway of sphingolipids. Thus, Ypk1/2p are responsible for stimulating the production of sphingolipids in response to several cellular stress factors, such as cell wall stress and heat stress. Here, we aimed to expand the study of sphingolipid biosynthesis in *A. fumigatus* by functional characterization of the *ypkA*^{YPK1} gene by establishing its role in the regulation of sphingolipid synthesis and in the maintenance of cell integrity. To accomplish this goal, one null mutant strain Δ *ypkA*^{ypk1} and a conditional mutant strain *niiA::ypkA* of *A. fumigatus* were obtained. The mutant strains were characterized by phenotypic tests aimed at understanding the role of this gene in sphingolipid synthesis, virulence and pathogenicity of this fungus. Subsequently real time RT-PCR experiments were performed to quantify the expression of this gene in conditions of heat stress. The results indicated that deletion of the gene *ypkA* promotes changes in the development of the fungus, which presents severe defects in the vegetative growth and absence of conidia. In addition, the conditional mutant shows increased sensitivity to lipid synthesis inhibitory drugs. The results also indicate that there is no interaction between genetic *ypkA* and pathway genes of the cell wall. Thus, we propose that protein kinase YpkA in *A. fumigatus* is related to vegetative growth and participates in the sphingolipid biosynthesis in *A. fumigatus*, contributing to the development and integrity of the fungal cell.

Keywords: *Aspergillus fumigatus*, sphingolipids, *ypkA*.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Aspergillus fumigatus*.

Ao longo dos últimos anos, a incidência de infecções fúngicas tem aumentado substancialmente. Diversos fungos são capazes de infectar o homem, causando-lhe micoses do tipo superficiais, cutâneas, subcutâneas, sistêmicas e/ou oportunistas. Esses agentes patogênicos normalmente tem vida livre no ambiente e não dependem do homem ou de animais como hospedeiros intermediários para sobreviver. Dentre os mais conhecidos, destacam-se a *Candida* ssp., *Coccidioides* ssp., *Cryptococcus* ssp. e *Aspergillus* ssp. (Lacaz, 2002, Lopes, 2004, Tortora, 2005).

Os três fungos patógenos mais predominantes em seres humanos são *C. albicans*, *C. neoformans* e *A. fumigatus*, pois desenvolveram diversos tipos de estratégias para sobreviver ao sistema imune do hospedeiro e prosperar em ambientes hostis (Latge, 1999, Tortora, 2005, Shapiro *et al.*, 2011).

Os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* são encontrados dispersos principalmente no solo ou em vegetais. O *A. fumigatus* é um fungo saprófita que participa da reciclagem do nitrogênio e do carbono ambiental; seu nicho ecológico natural é o solo, onde sobrevive e cresce sobre detritos orgânicos (Latge, 1999, de Vries *et al.*, 2001).

O ciclo de vida de *A. fumigatus* envolve a formação de conídios e hifas. Primeiramente há a formação da hifas, e depois o desenvolvimento dos conidióforos, que se submetem a conidiação, processo de desenvolvimento assexual que produz esporos clonais conhecidos como conídios, os quais são liberados ao menor contato e transportados com facilidade pelo ar. Os conídios são conhecidos como as partículas infecciosas desse fungo, pois são metabolicamente inativos, resistentes a estresses ambientais e atingem com facilidade os alvéolos pulmonares, devido ao seu pequeno tamanho entre 2 e 3 μm (Latge, 1999, Tortora, 2005, Yu, 2010).

Em indivíduos saudáveis, os conídios que não são removidos por depuração muco ciliar das células epiteliais das vias aéreas superiores, encontram macrófagos alveolares, que são os principais responsáveis pela fagocitose e morte dos conídios de *Aspergillus* ssp. Os receptores de imunidade inata, ou receptores de

reconhecimento padrão (PRRs), capazes de reconhecer moléculas conservadas presentes no patógeno; e o receptor de dectina-1 dos macrófagos que reconhecem a β (1-3) glucana da parede celular dos conídios, ativam uma resposta pró-inflamatória que recruta neutrófilos para o local da infecção, prejudicando o crescimento de hifas por processos que podem ou não serem oxidativos (Dagenais *et al.*, 2009, Barreto-Bergter *et al.*, 2014).

Ainda assim, os conídios de *A. fumigatus* podem causar micoses em indivíduos saudáveis, como a aspergilose bronco pulmonar alérgica (ABPA) e o aspergiloma. Já em pacientes imunossuprimidos, a comprometida resposta imune inata contra os conídios de *A. fumigatus*, acaba por induzir a aspergilose pulmonar invasiva (API), a qual é conhecida como a forma mais grave da doença possuindo uma taxa de mortalidade que varia de 60% a 90% (Hong *et al.*, 2005, Tekaia *et al.*, 2005).

A API é considerada uma infecção fúngica oportunista, sendo uma doença aguda que se caracteriza pela invasão do tecido pulmonar pelo *A. fumigatus*, provocando hemorragias localizadas. Afeta principalmente doentes submetidos a transplantes ou com infecção pelo HIV que apresentam severa neutropenia. Além destes, indivíduos submetidos a corticoterapia sistêmica também podem ser afetados (Latge, 1999, Tekaia *et al.*, 2005).

O diagnóstico baseia-se no quadro clínico, complementado pela identificação do agente nas secreções brônquicas e tecido pulmonar (Lopes, 2004). As diretrizes da Sociedade das Doenças Infecciosas da América recomendam o uso de voriconazol como terapia primária para API (Walsh *et al.*, 2008). Esse azólico visa a inibição da enzima lanosterol desmetilase, que participa da biossíntese de ergosterol na membrana plasmática fúngica. Outros medicamentos também podem ser utilizados, como a anfotericina B que se liga fortemente ao ergosterol, intercalando-se na membrana da célula fúngica para formar um canal que destrói o gradiente de concentração. Ainda a caspofungina, que atua como inibidor de (1,3) - β -D - glucano - sintase, uma enzima envolvida na síntese da parede celular fúngica (Hong *et al.* 2005; Shapiro *et al.* 2011).

Apesar disso, a utilização de azólicos como tratamento não vem se mostrando eficiente, e a administração da anfotericina B que tem um maior grau de

toxicidade requer a monitorização ambulatorial de parâmetros da função renal e hepática, bem como a realização do hemograma e do eletrocardiograma regularmente, além disso, podem haver associação com outros fármacos. Assim, novos alvos para ação de medicamentos devem ser pesquisados a fim de melhorar a eficiência do tratamento e diminuir os efeitos colaterais do tratamento prolongado para a população de risco (Shapiro *et al.*, 2011).

1.2. Membrana Plasmática e Esfingolipídios

A membrana plasmática, tanto de fungos quanto de outros eucariotos, serve não só como uma separação dos componentes da célula para o meio extracelular, mas também está envolvida na regulação de uma série de atividades biológicas responsáveis pela integridade celular. Possui receptores que contribuem para os processos de reconhecimento com o ambiente, e abriga proteínas que catalisam transporte seletivo de moléculas ou agem como enzimas metabólicas, e também possuem papel regulatório nos eventos de transdução de sinal na célula. Apresenta grande complexidade composicional, tendo os lipídeos como principais responsáveis pela sua estrutura básica (Daum *et al.*, 1998, Mollinedo, 2012, Stillwell, 2013).

A membrana da célula tem sido descrita como uma membrana de mosaico fluido constituída por uma bicamada lipídica uniforme composta por várias proteínas. Devido aos avanços nos estudos da composição da membrana celular, atualmente podemos confirmar que a membrana não é uniforme, mas sim contém aglomerados de lipídeos em um estado mais ordenado, que existem dentro do meio lipídico geralmente desordenado dessa mesma membrana (El-Sayed *et al.*, 2013).

Os maiores componentes lipídicos responsáveis pela estrutura da membrana são os fosfolipídios, esteróis e esfingolipídios (Daum *et al.*, 1998).

Esfingolipídios e colesterol/ergosterol têm a tendência de se associarem nas membranas eucarióticas para formarem microdomínios conhecidos como “jangadas lipídicas” ou *lipid rafts*. Essas jangadas possuem um tamanho entre 10 a 200 nm, e são estruturas heterogêneas com diferentes domínios compostos de esteróis e esfingolipídios, que compartimentam processos celulares, ou seja, direcionam os processos metabólicos, evitando redundância de funções e gastos desnecessários de energia (Pike, 2009, El-Sayed *et al.*, 2013). *Lipids rafts* desempenham papéis

fundamentais na transdução de sinal e no tráfego de proteínas de membrana, possuindo uma estrutura que pode sofrer mudanças conformacionais, por um curto tempo, durante os eventos de sinalização (Shea *et al.*, 2006, Pike, 2009, Aresta-Branco *et al.*, 2011, Surma *et al.*, 2011). Além disso, os esfingolipídios induzem uma grande variedade de respostas das células eucariotas, a maioria envolvendo regulação do crescimento celular, diferenciação e apoptose (Cheng *et al.*, 2003).

Os esfingolipídios apresentam um grupo polar e uma longa cadeia de base esfingóide (LCB) não polar formada de 18 a 20 carbonos denominada de esfingosina, formando uma molécula amino álcool de cadeia longa. A unidade central desses lipídeos é formada através da ligação amida de um ácido graxo ao grupo -NH₂ do Carbono-2 à esfingosina, formando a ceramida (Cheng *et al.*, 2001). Grupos polares como fosfocolina ou carboidratos são adicionados a região polar da molécula através de uma ligação glicosídica ou fosfodiéster, permitindo assim que vários tipos diferentes de esfingolipídios mais complexos possam ser formados (Figura 1) (Haak *et al.*, 1997, Saba *et al.*, 1997, Eisenkolb *et al.*, 2002, Trinel *et al.*, 2002, Stillwell, 2013).

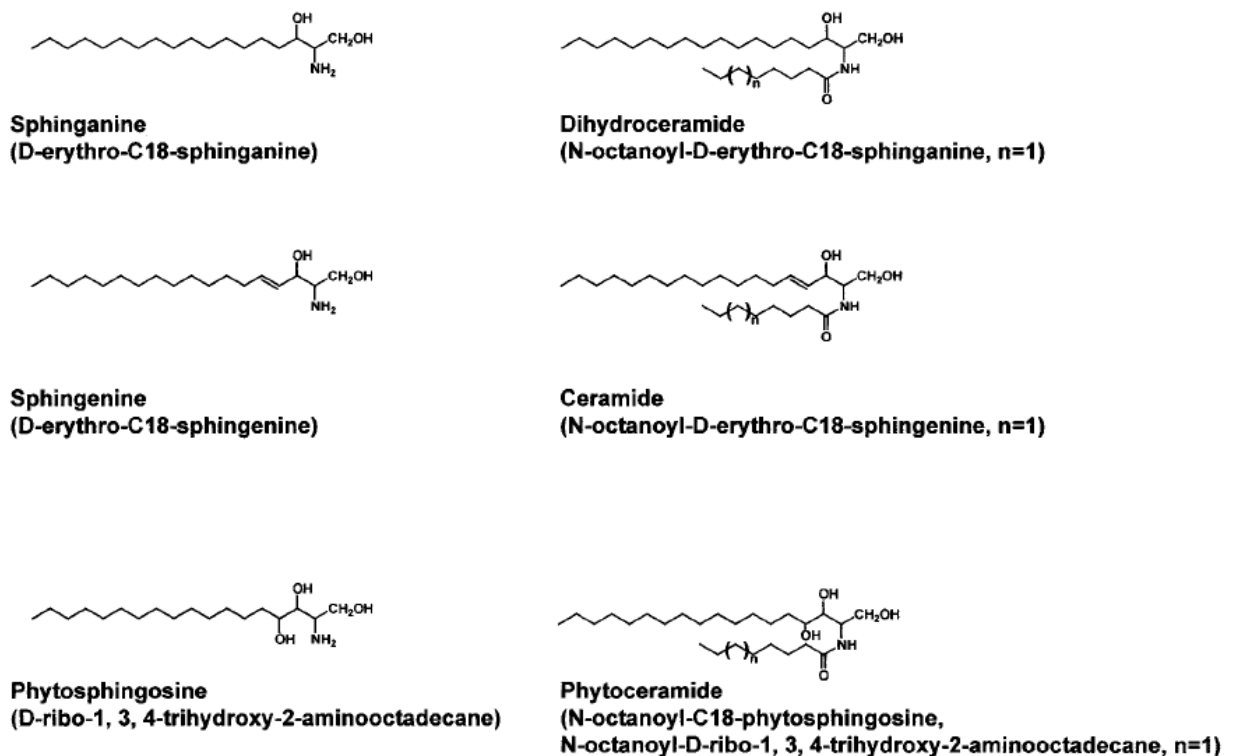


Figura 1: Estrutura química e nomenclatura de esfingolipídios. A esfinganina, também conhecida como esfingosina, é a LCB primária encontrada em todos os esfingolipídios, onde uma cadeia de ácido graxo pode se ligar ao grupo $-NH_2$ da molécula por uma ligação amida, formando a ceramida, que por sua vez pode dar origem outros tipos de esfingolipídios mais complexos. Retirada da fonte: (Omae *et al.*, 2004).

As ceramidas são o bloco de construção elementar dos esfingolipídios complexos, e em mamíferos, dão origem a esfingomielina localizada nas membranas das células do sistema nervoso; e também são responsáveis por gerar uma vasta gama de eventos celulares, como a apoptose; regulação do ciclo celular e controle de transdução de sinais (Hannun, 1996, Dickson *et al.*, 2002, Villani *et al.*, 2008).

Em *S. cerevisiae*, os esfingolipídios correspondem a cerca de 7% da massa da membrana plasmática (Dickson *et al.*, 2002), e sua biossíntese ocorre no retículo endoplasmático e se inicia pela condensação da serina ao palmitoil-CoA, reação catalisada pela enzima serina palmitoil-transferase (SPT). A 3-cetodi-hidroesfingosina resultante dessa reação é reduzida por ação do NADPH, dando origem a uma base de cadeia longa, a di-hidroesfingosina (DHS).

A hidroxilação do carbono-4 da DHS, resulta na formação da base esfingóide, e conseqüentemente da fitoesfingosina (PHS) presente essencialmente em fungos e plantas. Esta última difere da LCB primária (esfingosina) encontrada nos esfingolipídios de mamíferos, pois ao invés de uma ligação dupla entre o Carbono-4 e o Carbono-5, apresenta um grupo hidroxila no Carbono-4. A PHS pode dar origem a fitoesfingosina-1-fosfato, ou um ácido graxo de cadeia muito longa pode ligar-se à amida desta base esfingóide formando a fitoceramida, que por sua vez é convertida em inositol-fosfoceramida (IPC) pela enzima IPC sintase. Em seguida, a IPC é manosilada, formando a manose-inositol-fosfoceramida (MIPC). Por fim, a transferência de um fosfato de inositol para a MIPC, leva à formação do manose (inositol-P)₂ ceramida, a M(IP)₂C, conhecidos como esfingolipídios complexos (Figura 2) (Dickson *et al.*, 1999, Dickson *et al.*, 2002, Dickson *et al.*, 2006, Kihara *et al.*, 2007, Cowart *et al.*, 2010, Del Poeta, 2010).

Os esfingolipídios complexos (IPC; MIPC e M(IP)₂C) de *S. cerevisiae*, assim como a DHS e a PHS estão presentes no controle do crescimento e da integridade celular, sendo que a DHS e a PHS também são responsáveis por respostas

celulares ao estresse térmico (Zhong *et al.*, 1999, Dickson *et al.*, 2002) e pela apoptose tanto em *S.cerevisiae* quanto em *A. nidulans* (Cheng *et al.*, 2003).

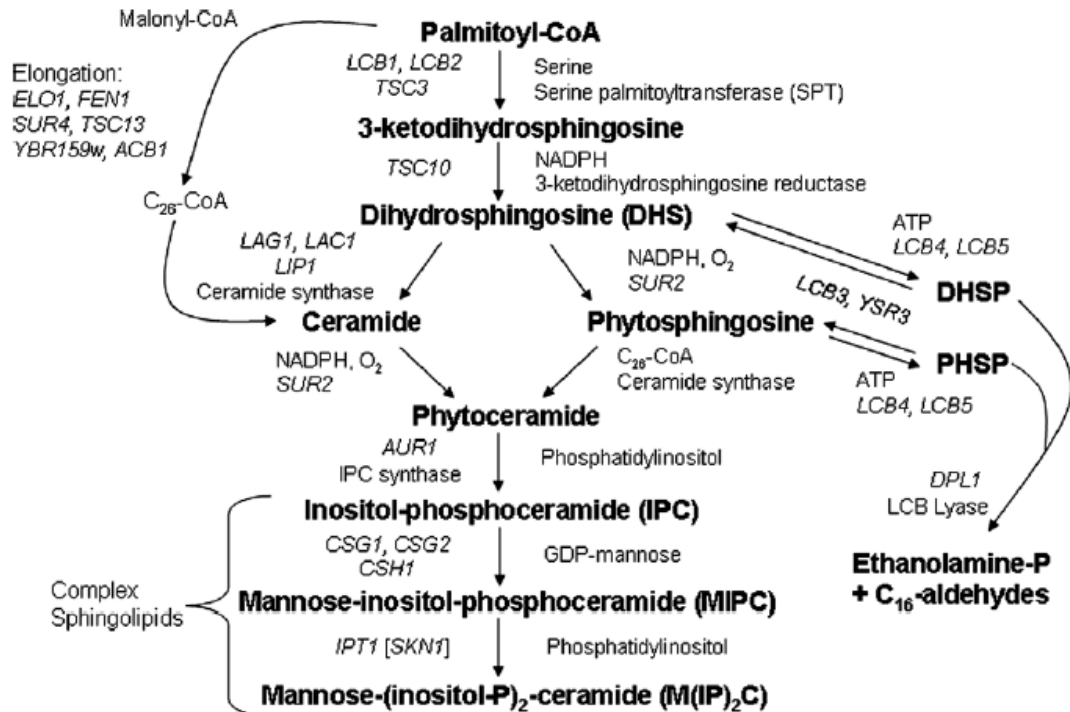


Figura 2: Diagrama do metabolismo dos esfingolípídios em *S.cerevisiae*. Os metabólitos são mostrados em negrito, os genes estão em itálico e os nomes das enzimas estão expostos na figura. Retirada da fonte (Dickson *et al.*, 2006).

Outros estudos demonstram que a fitoesfingosina-1-fosfato de leveduras regula a expressão de genes envolvidos na respiração mitocondrial (Cowart *et al.*, 2010, Swinnen *et al.*, 2014). Assim, as funções específicas dos esfingolípídios complexos ainda não estão bem elucidadas, porém a DHS e a PHS já estão documentadas como sendo necessárias na regulação de certos eventos biológicos, tais como transdução de sinal, endocitose, regulação do citoesqueleto de actina e transporte vesicular de proteínas em *S. cerevisiae* (Dickson RC, 1997, Dickson *et al.*, 2002, Dickson *et al.*, 2006).

Em *C. neoformans*, a IPC sintase é responsável pela tolerância do fungo a um baixo pH; e também pela regulação da formação de diacilglicerol (DAG), responsável pela ativação da proteína Pkc1p. Essa proteína, além de fazer parte da via de integridade da parede celular, também está diretamente relacionada com a

manutenção da produção de melanina, um fator de virulência importante desse fungo. (Luberto *et al.*, 2001, Luberto *et al.*, 2003, Heung *et al.*, 2004). Já em *C. albicans*, foi relatado que a IPC é responsável pela indução do crescimento de hifas e pela regulação da endocitose (Wells *et al.*, 1996, Del Poeta, 2010).

Estudos em *A. nidulans* indicaram um importante papel da IPC sintase na progressão do ciclo celular e essencialmente na polarização de hifas, além de que a inativação dessa enzima prejudica a germinação de esporos, promovendo um acentuado atraso na progressão do primeiro ciclo celular. Já esfingolipídios como a DHS e a PHS foram descritos como responsáveis pelas mudanças morfológicas na célula que definem a apoptose (Cheng *et al.*, 2001, Cheng *et al.*, 2003, Li *et al.*, 2006).

Assim, podemos afirmar que os esfingolipídios são responsáveis por diversos eventos que contribuem para a manutenção da viabilidade da célula fúngica, e um comprometimento da biossíntese dessas moléculas pode gerar sérias modificações nos processos fisiológicos do fungo (Omae *et al.*, 2004, Dickson *et al.*, 2006).

1.3. Proteína YpkA

A fosforilação por proteínas quinases é conhecida como um dos principais mecanismos pelo qual a atividade celular de eucariotos é controlada. Extremamente importantes para a sinalização celular, as proteínas quinases são enzimas que modificam o substrato através de fosforilação, resultando em mudanças na proteína alvo que podem interferir em sua atividade, localização ou associação com outras proteínas. As quinases são essenciais para o controle do ciclo celular e diferenciação. Além disso, participam de eventos no metabolismo celular, na transcrição gênica, no rearranjo do citoesqueleto, no movimento celular e na apoptose (Hanks, 2003). Devido a esta importância, cerca de 2% de todo o genoma humano codifica para tais proteínas (Doerig *et al.*, 2008).

As proteínas quinases são enzimas reguladoras chave que alteram as propriedades de um substrato por meio de transferência de um grupo fosfato do ATP, para um resíduo de treonina, serina (quinase específica para Ser/Thr) ou para resíduos de tirosina (quinase específica para Tyr). A capacidade de fosforilação

destes resíduos, faz com que essas proteínas sejam responsáveis pelo controle intracelular e transcricional, e pela regulação e transdução de sinais (Manning *et al.*, 2002a, Manning *et al.*, 2002b, Sobko, 2006, Pearce *et al.*, 2010).

Denomina-se AGC quinase o subgrupo de proteínas que possuem um domínio regulatório e a porção Ser/Thr como domínio catalítico. As AGC quinases estão divididas entre proteínas quinase dependentes de AMPc (PKA); proteínas quinase dependentes de GMPc (PKG) e as proteínas quinase C (PKC) (Hanks *et al.*, 1995, Pearce *et al.*, 2010). Uma proteína AGC quinase de particular importância, é a PDK1 de mamíferos, que é responsável por ativar e fosforilar pelo menos outras 23 AGC quinases, regulando suas funções (Arencibia *et al.*, 2013).

As ACG quinases de *S. cerevisiae*, Ypk1p e Ypk2p, são parálogos e correspondem a YpkA em *A. nidulans* e em *A. fumigatus*, e também a proteína *serum and glucocorticoid-regulated kinase* (SGK) em mamíferos. Em *S. cerevisiae*, a ativação de *YPK1* e *YPK2* requer a fosforilação por quinases “upstream” localizadas na membrana plasmática, conhecidas como Pkh1p e Pkh2p; e também pela proteína Torc2p (*target of rapamycin complex 2*) (deHart *et al.*, 2002, Breslow *et al.*, 2010, Del Poeta, 2010, Roelants *et al.*, 2011, Niles *et al.*, 2012).

Pkh1p e Pkh2p são proteínas de *S. cerevisiae* que ativam Ypk1p e Ypk2p através da fosforilação de Thr, em um domínio de sequência conservada no interior do loop de ativação das proteínas, sendo que essas proteínas possuem domínios catalíticos muito semelhantes a proteína *3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1* (PDK1) em mamíferos. Pkh1p e Pkh2p compartilham uma função essencial, pois os mutantes nulos de *PKH1* ou *PKH2* somente, são viáveis, porém quando a deleção desses dois genes ocorre em conjunto, o crescimento do mutante se torna inviável (Casamayor *et al.*, 1999, Roelants *et al.*, 2002, Roelants *et al.*, 2004).

Em *S. cerevisiae*, Ypk1p e Ypk2p regulam a síntese de esfingolipídios através da fosforilação de proteínas denominadas Orm1p e Orm2p, codificadas por YGR038W e YLR350W respectivamente, as quais são encontradas no retículo endoplasmático. Essas proteínas Orm1/2p são responsáveis pela inibição da SPT, a primeira enzima na biossíntese de esfingolipídios, provocando assim a diminuição

da concentração desses lipídios na membrana plasmática. (Breslow *et al.*, 2010, Roelants *et al.*, 2011, Liu *et al.*, 2012).

Orm1p e Orm2p são fosforiladas e inibidas por Ypk1p e Ypk2p em resposta ao declínio da concentração de esfingolipídios, como por exemplo, pelo tratamento com um inibidor farmacológico da SPT, a miriocina, que induz a fosforilação da Ser-51; Ser-52, ou Ser-53 em Orm1p e Ser-46; Ser-47, ou Ser-48 em Orm2p. Assim, Ypk1p e Ypk2p podem ser descritos como reguladores da síntese de esfingolipídios, já que a inibição das Orm1/2p proporciona a ativação da SPT, que por sua vez, restaura os níveis desses lipídios na célula (Figura 3) (Breslow *et al.*, 2010, Roelants *et al.*, 2011, Liu *et al.*, 2012, Shimobayashi *et al.*, 2013). É importante ressaltar que *YPK1* não pode ser suprido por *YPK2* em *S. cerevisiae*. Um estudo de Roelants e colaboradores (2002) mostrou que a deleção de *YPK1* resulta em uma maior sensibilidade a higromicina B, valinomicina, polioxina D e cicloheximida, do que a deleção somente de *YPK2*. Ainda, demonstraram que o mutante $\Delta YPK1$ cresce lentamente a 30°C e é sensível ao frio (26°C), o que não ocorre com o mutante $\Delta YPK2$. Porém, *YPK2* também não pode ser suprida por *YPK1*, já que o mutante $\Delta YPK2$ de *S. cerevisiae* possui seu crescimento alterado, formando colônias menores.

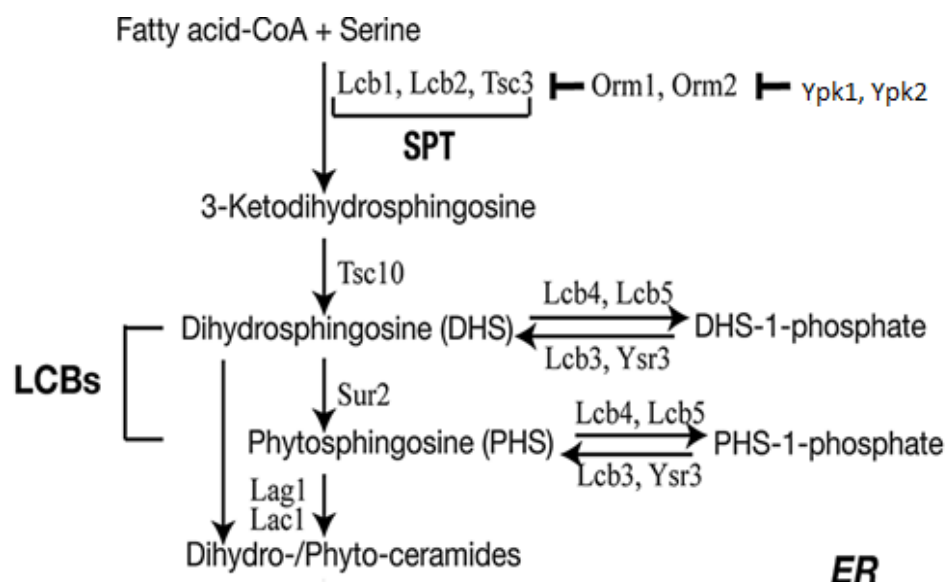


Figura 3: Esquema da localização e atuação das proteínas Orm1/2p e Ypk1/2p na biossíntese de esfingolipídios em levedura. Ypk1/2p fosforilam e inibem a proteína Orm1/2p, que por sua vez não

exerce mais sua função sobre a enzima SPT, deixando essa enzima livre para converter serina para 3-cetodihidro, dando início a biossíntese de esfingolipídios. Retirada e adaptada da fonte: (Shimobayashi *et al.*, 2013).

Outras proteínas de *S. cerevisiae* também estão relacionadas com a regulação da produção de esfingolipídios. Um estudo de Berchtold e colaboradores (2012) mostrou que a inibição de Ypk1p leva a uma indução de Torc2p, uma proteína envolvida na regulação do crescimento celular, sugerindo que a inibição da síntese de esfingolipídios causa um aumento na ativação de Torc2p. Assim, *YPK1* é tanto um sensor e efetor do nível de esfingolipídios, como também a redução dos esfingolipídios estimula a ativação de Ypk1p, pelo menos em parte, através da fosforilação dependente de Torc2p (Gelperin *et al.*, 2002, Kamada *et al.*, 2005, Del Poeta, 2010, Niles *et al.*, 2012, Muir *et al.*, 2014, Niles *et al.*, 2014).

Assim, em *S. cerevisiae* a regulação dos níveis de esfingolipídios e de suas diversas funções já citadas anteriormente, ocorre através das proteínas quinases Ypk1p e Ypk2p, e conforme haja a necessidade de induzir a produção destas, Pkh1/2p e Torc2p são responsáveis pela fosforilação e consequente ativação de Ypk1/2p (Figura 4) (Del Poeta, 2010, Berchtold *et al.*, 2012, Niles *et al.*, 2012).

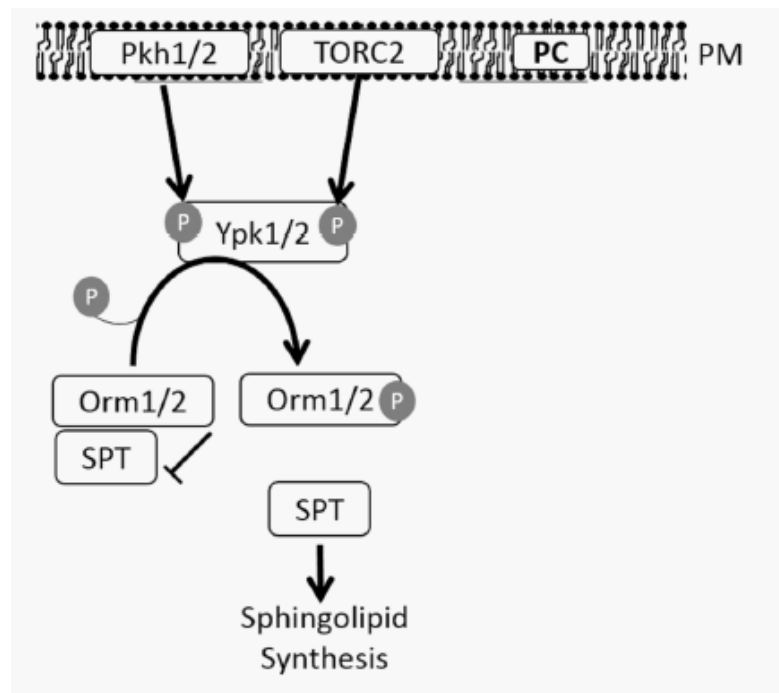


Figura 4: Modelo de ativação transcricional de Ypk1/2p em *S. cerevisiae*. De acordo com a manutenção da viabilidade da célula, quando um maior requerimento da síntese de esfingolipídios é

necessário, Pkh1/2p e Torc2p ativam Ypk1/2p, que inibem a Orm1/2p e restauram os níveis de esfingolípídios celular. Retirada e adaptada da fonte (Surlow *et al.*, 2014).

Diferente de *S. cerevisiae* que possui Ypk1/2p e Pkh1/2p, em *A. nidulans* e aparentemente em *A. fumigatus*, só existe uma proteína inibidora da Orm, denominada YpkA, e também uma única PkhA, controlando a síntese de esfingolípídios (Cheng *et al.*, 2001, Sobko, 2006, Colabardini *et al.*, 2013).

Segundo Athanasopoulos e colaboradores (2015), a repressão do gene *ypkA* em *A. nidulans*, acarreta no aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) na célula.

Ainda, um estudo de Colabardini e colaboradores (2013) demonstraram que quando um mutante condicional de YpkA, em *A. nidulans*, é cultivado em condições repressoras, a polarização da membrana plasmática se torna deficiente, sugerindo também uma importante função de YpkA na morfogênese de hifas e no processo de endocitose. Ainda no mesmo estudo, a tentativa da construção de um mutante $\Delta pkhA$ nulo em *A. nidulans* foi incapaz de gerar qualquer transformante, e um mutante condicional *pkhA* em repressão demonstrou uma diminuição dramática no diâmetro das colônias, indicando *pkhA* como um gene essencial em *A. nidulans*.

Como já foi mencionado anteriormente, Pkh1p e Pkh2p de *S. cerevisiae*, quando estimuladas fosforilam Ypk1p e Ypk2p, as quais foram originalmente isoladas com base na homologia em suas sequências com isozimas PKC, possuindo substratos específicos semelhantes à da proteína quinase B (PKB). Porém, Pkh1/2p também podem ativar a Pkc1p, que por sua vez é responsável pela fosforilação de Mpk1p, uma proteína relacionada com a integridade da parede celular fúngica. A proteína Mpk1p, também de *S. cerevisiae*, pertencente a via de MAP quinase (MAPK), ativa fatores de transcrição, incluindo Rlm1, que regulam os genes presentes na via de integridade da parede celular. A evidência genética indica que Ypk1p e Ypk2p podem atuar através do fator de transcrição Smp1, que compartilha uma especificidade de ligação ao DNA com Rlm1. Assim, as vias de síntese de esfingolípídios e integridade da parede celular podem se cruzar através da ativação completa de Pkc1p pela fosforilação de Pkh1p e/ou Pkh2p; e através de Ypk1/2p que podem contribuir direta ou indiretamente na ativação de Mpk1p (Roelants *et al.*, 2002, Schmelzle *et al.*, 2002, Levin, 2005, Chen *et al.*, 2007).

Assim, apesar da função dos genes *YPK1* e *YPK2* em *S. cerevisiae* já estarem bem elucidadas, seu único correspondente em *A. fumigatus*, o *ypkA*, ainda não possui relatos detalhados na literatura, e nem foi estabelecida sua relação entre a síntese de esfingolipídios na célula com os seus mecanismos de virulência e patogenicidade.

Além disso, o nosso laboratório tem estudado a quinase PkcA em *A. fumigatus* envolvida na manutenção da integridade da parede celular. Ambas as quinases YpkA e PkcA em *A. nidulans* compartilham grande similaridade no sítio catalítico, tornando possível que essas proteínas tenham sobreposição de função também na manutenção da integridade da parede celular, tal como em *S. cerevisiae* (Herrmann *et al.*, 2006).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o papel biológico e a essencialidade do gene que codifica a quinase YpkA de *A. fumigatus* de forma a esclarecer sua função na biossíntese de esfingolipídios, verificando a relação desse gene com o crescimento e a virulência do fungo e na manutenção da integridade da parede celular.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Especificamente, para a realização deste trabalho os objetivos primários estão detalhados a seguir:

- Construção e caracterização da linhagem mutante $\Delta ypkA$ e análise fenotípica desta;
- Construção e caracterização da linhagem mutante condicional *niiA:: $\Delta ypkA$* e análise fenotípica desta.
- Análise fenotípica das linhagens mutantes obtidas frente a interferência na biossíntese de ergosterol. Quantificação do conteúdo de ergosterol das linhagens mutante e selvagem.
- Análise transcricional de genes envolvidos na tolerância ao choque térmico, na síntese de lipídeos e de ergosterol no mutante $\Delta ypkA$ e/ou *niiA::ypkA*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MEIOS DE CULTIVO

3.1.1. Meios de Cultivo para *S. cerevisiae*

3.1.1.1. Meio SC URA⁻ (Meio Mínimo)

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

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

3.1.1.2. Meio YPD

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

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

3.1.2. Meio de cultivo para *Escherichia coli*

3.1.2.1. Meio LB (Luria Bertani)

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

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

3.1.3. Meios de cultivo para *A. fumigatus*

3.1.3.1. Meio Mínimo (MM, MM+UU, MM+Sorbitol)

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

As substâncias que compõem o meio foram dissolvidas em água destilada, o pH foi ajustado para 6,5. O meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf/cm² por 15 minutos. MM+UU indica o meio de cultura completo YAG suplementado com uridina 4 mmol/L e uracila 10 mmol/L. O meio de regeneração dos protoplastos utilizados na transformação de *A. fumigatus* em meio mínimo, consiste na adição de Sorbitol x mmol/L (xg/L). O meio top-ágar consiste no meio contendo 1,0% (p/v) de ágar.

3.1.3.2 Meio Mínimo Modificado (AMM)

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

As substâncias que compõe o meio foram dissolvidas em água destilada, o pH foi ajustado para 6,5. O meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf/cm² por 15 minutos (Cove, 1966).

3.1.3.3 Meio completo (YAG, YUU, YG e YG+UU, YAG+KCl)

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

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

3.2. SOLUÇÕES E TAMPÕES

3.2.1. Solução de elementos traços

Sulfato de zinco heptahidratado	75 mM
Ácido bórico	180 mM
Cloreto de manganês tetra hidratado	25 mM
Sulfato de ferro heptahidratado	18 mM
Cloreto de cobalto pentahidratado	6 mM

Sulfato de cobre pentahidratado	6 mM
Molibdato de amônio tetra hidratado	1 mM
EDTA	140 mM
Água destilada	q.s.p.

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

3.2.2. Solução de sais 20x concentrada para MM

Nitrato de Sódio	3,2 M
Cloreto de Potássio	0,14 M
Dihidrogenofosfato de Potássio	0,2 M
Sulfato de Magnésio heptahidratado	0,04 M
Água destilada	q.s.p.

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

3.2.3. Solução de elementos traços para AMM

Ácido bórico	0,64 mM
Fosfato de sódio monobásico	6,6 mM
Molibdato de sódio di hidratado	3,3 mM
Sulfato de cobre pentahidratado	3,2 mM
Sulfato de manganês hidratado	4,7 mM

Sulfato de zinco heptahidratado	1,4 mM
Água destilada	q.s.p.

Cada componente foi dissolvido completamente antes de adição do próximo. A solução foi então armazenada em um recipiente âmbar em temperatura ambiente (Cove, 1966).

3.2.4. Solução de sais para AMM

Cloreto de potássio	0,34 M
Clorofórmio	0,2% (v/v)
Fosfato de potássio monobásico	0,55 M
Solução de elementos traços	5% (v/v)
Sulfato de magnésio heptahidratado	0,1 M
Água destilada	q.s.p.

Os componentes foram dissolvidos em água destilada e utilizados na composição do Meio Mínimo Modificado (Cove, 1966).

3.2.5. Solução de nitrato de magnésio

Nitrato de magnésio	2 M
Água destilada	q.s.p.

O nitrato de magnésio foi dissolvido em água destilada até o volume desejado, e depois foi esterilizada por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf/cm² por 15 minutos. 10 mM dessa solução foram utilizadas em AMM para a indução dos mutantes condicionais que possuem o promotor *niiA*.

3.2.6. Solução tartarato de amônio

Tartarato de amônio	2 M
Água destilada	q.s.p.

O tartarato de amônio foi dissolvido em água destilada até o volume desejado, e depois foi esterilizada através de filtração a vácuo, utilizando uma membrana de nylon com poros de 0,45 microns. 50 mM dessa solução foram utilizadas em AMM para a repressão dos mutantes condicionais que possuem o promotor *niiA*.

3.2.7. Soluções de protoplastização para transformação em *A. fumigatus*

3.2.7.1. Solução 1 de protoplastização

Sulfato de amônio	0,8 M
Ácido cítrico pH 6	100 mM
Água destilada	q.s.p.

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

3.2.7.2. Solução 2 de protoplastização

Extrato de levedura	1% (p/v)
Sacarose	2% (p/v)
Água destilada	q.s.p.

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

3.2.7.3. Solução 3 de protoplastização

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

O sulfato de amônio e a sacarose foram dissolvidos em água destilada. Adicionou-se o volume necessário de uma solução de ácido cítrico 1 M, pH 6, previamente preparada, e o pH foi ajustado para 6. O volume foi ajustado, e a solução foi esterilizada por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf/cm² por 15 minutos.

3.2.7.4. Solução 4 de protoplastização

Polietilenoglicol PM 6000 g/mol	25% (p/v)
Cloreto de cálcio	100 mM
Cloreto de potássio	0,6 M
Tris HCl pH 7,5	10 mM
Água destilada	q.s.p.

Dissolveram-se os componentes em água destilada e acrescentou-se o volume necessário de solução Tris HCl pH 7,5 (1 M) previamente preparada. O pH foi ajustado para 7,5, o volume foi ajustado e a solução esterilizada por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf/cm² por 15 minutos.

3.2.7.5. Solução 5 de protoplastização

Cloreto de cálcio	50 mM
Cloreto de potássio	0,6 M
MES pH 6,0	10 mM
Água destilada	q.s.p.

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

3.2.8. Solução para a extração do DNA plasmidial de *E. coli*

3.2.8.1. Solução 1

Sulfato de amônio	0,8 M
Dextrose	50 mM
Tris HCl pH 8,0	25 mM
EDTA pH 8,0	10 mM
Água destilada	q.s.p.

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

3.2.8.2. Solução 2

Hidróxido de sódio	0,2 M
SDS	1% (v/v)
Água destilada	q.s.p.

Acrescentou-se o volume necessário de solução de hidróxido de sódio (10 M) e SDS (10% p/v) previamente preparadas, o volume final foi ajustado e a solução foi utilizada em seguida.

3.2.8.3. Solução 3

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

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

3.2.9. Soluções para transformação em *S. cerevisiae*

3.2.9.1. Solução de TE (Tris EDTA) 10x

Tris base	100 mM
EDTA, pH 7,5	10mM
Água destilada	q.s.p.

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

3.2.9.2. Solução de acetato de Lítio 10x

Acetato de lítio pH 7,5	1 M
Água destilada	q.s.p.

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

3.2.9.3. Solução de PEG (polietilenoglicol) 50%

PEG (polietilenoglicol) 3350	50% (p/v)
Água ultra pura	q.s.p.

Dissolveu-se o PEG 3350 em água ultra pura. O volume final foi ajustado e a solução esterilizada por calor úmido em autoclave a 120 °C e 1 kgf/cm² por 15 minutos.

3.2.10. Solução de SDS 10%

SDS	10% (p/v)
Água destilada	q.s.p.

O SDS foi dissolvido em água destilada, e em seguida o volume final foi ajustado com água destilada. A solução foi armazenada à temperatura ambiente.

3.2.11. Solução de Hidróxido de Sódio 2M

Hidróxido de sódio	2 M
Água ultra pura	q.s.p.

O hidróxido de sódio foi dissolvido em água destilada, e em seguida o volume final foi ajustado com água ultra pura. A solução foi armazenada à temperatura ambiente.

3.2.12. Tampão para extração de DNA

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

O cloreto de sódio, SDS e o EDTA foram dissolvidos em água ultra pura, acrescentou-se o volume necessário da solução de Tris-HCl, ajustou-se o volume final. A solução foi armazenada à temperatura ambiente.

3.2.13. Tampão TRIS-Acetato-EDTA (TAE) 50x concentrado para eletroforese de DNA

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

O Tris base foi dissolvido em água ultra pura, em seguida acrescentou-se a solução de EDTA 0,5 M, pH 8, previamente preparada. Acrescentou-se o ácido acético glacial, ajustou-se o pH para 8. Armazenou-se a solução à temperatura ambiente. Para uso na eletroforese de DNA, o tampão foi diluído 1x.

3.2.14. Tampão de amostra para eletroforese de DNA 5x concentrada

Azul de Bromofenol	0,1 mg/mL
Xilenocianol	0,1 mg/mL
Glicerol	50% (v/v)
Água destilada	q.s.p.

Dissolveram-se os componentes no volume necessário em água destilada. A solução foi armazenada à temperatura ambiente.

3.2.15. Tampão de amostra para eletroforese de RNA

RNA	x μ L
Formaldeído	16,5%
Formamida	50%
Tampão MOPS	10x
Azul de bromofenol	0,5%
Água ultra pura (DEPC)	q.s.p.

Acrescentou-se todos os componentes em água ultra pura tratada com dietil pirocarbonato (DEPC) 0,1%. Em seguida acrescentou-se a amostra de RNA para se estabelecer a quantidade de RNA desejada no gel (geralmente 10 μ g). As amostras foram aquecidas a 65 °C por 15 minutos em banho seco para desnaturar a amostra de RNA, em seguida aplicou-se no gel de agarose desnaturante 1,2%.

3.2.16. Tampão MOPS 10x concentrado para eletroforese de RNA

MOPS	0,2 M
Acetato de sódio	0,5 M
EDTA	0,01 M
Água ultra pura (DEPC)	q.s.p.

Dissolveu-se os componentes em água ultra pura tratada com dietil pirocarbonato (DEPC) 0,1% e o pH foi ajustado para 7, ajustou-se o volume final.

3.2.17. Tampão PBS (“Phosphate buffered saline”) 10x concentrado

Cloreto de sódio	350 mM
Cloreto de potássio	180 mM
Hidrogenofosfato de sódio	25 mM
Dihidrogenofosfato de potássio	18 mM
Água destilada	q.s.p

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

3.3. GEL DE AGAROSE PARA ELETROFORESE DE DNA

Agarose	1%
TAE 1x	q.s.p

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

3.4. GEL DE AGAROSE DESNATURANTE PARA ELETROFORESE DE RNA

Agarose	1,2%
Tampão MOPS	10x
Formaldeído	15%
Água ultra pura (DEPC)	q.s.p.

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

3.5. LINHAGENS DE *A. fumigatus* UTILIZADAS NESSE TRABALHO

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

Genótipo	Linhagem	Referências
\DeltaakuB^{ku80}	$\Delta ku80::pyrG-$	Da Silva Ferreira et al., 2006
$\Delta ypkA$	$\Delta ypkA::pyrG::\Delta ku80$	Este trabalho
$niiA::ypkA$	$pyrG::niiA::ypkA::\Delta ku80$	Este trabalho
$\Delta rlmA$	$\Delta rlmA::\Delta ku80::pyrG-$	Rocha et al. (dados não publicados)
$\Delta rlmA/niiA::ypkA$	$\Delta rlmA::pyrG::niiA::ypkA$	Este trabalho
$\Delta mpkA$	$pyrG::\Delta mpkA::ptrA::\Delta ku80$	(Valiante et al., 2009)
$niiA::ypkA/\Delta mpkA$	$pyrG::niiA::ypkA::\Delta mpkA::ptrA::\Delta ku80$	Este trabalho
$\Delta pkhA$	$\Delta pkhA::pyrG::\Delta ku80$	Este trabalho

3.6. OLIGONUCLEOTÍDEOS USADOS PARA RT-PCR EM TEMPO REAL

Tabela 2: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR em tempo real.

Oligonucleotídeos	Sequência	Gene
<i>ypkA</i> 1133 FW	5'-AGTTGTTCCACCACCTCCAG-3'	Afu2g10620
<i>ypkA</i> 1260 REV	5'-GGGCTTCAAATCACGGTAGA-3'	Afu2g10620

(<i>tubA</i>) FW	5'-TTCCCAACAACATCCAGACC-3'	Afu1g10910
(<i>tubA</i>) REV	5'-CGACGGAACATAGCAGTGAA-3'	Afu1g10910
(<i>pkhA</i>) FW	5'-CTGGGCGGGCAACCTT-3'	Afu3g12670
(<i>pkhA</i>) REV	5'-CCGCCCTTTGACCGAATC-3'	Afu3g12670
(<i>ormA</i>) FW	5'-GAGGAGATCGAGCAGCATCAT-3'	Afu4g13270
(<i>ormA</i>) REV	5'-TCACTGGTATGCTCGATGGATT-3'	Afu4g13270

Tabela 3: Concentração dos primers utilizados nas reações de RT-PCR em tempo real.

Oligonucleotídeos	Concentração dos primers (nmol/L)	Y-Intercepção	Equação da reta
<i>ypkA</i> 1133 FW	100	39,026	$y = -3,3732x + 13,056$
<i>ypkA</i> 1260 REV	150	39,026	$y = -3,3732x + 13,056$
(<i>tubA</i>) FW	150	21,908	$y = -3,3712x + 11,783$
(<i>tubA</i>) REV	150	21,908	$y = -3,3712x + 11,783$
(<i>pkhA</i>) FW	300	23,706	$y = -3,3631x + 13,62$
(<i>pkhA</i>) REV	100	23,706	$y = -3,3631x + 13,62$
(<i>ormA</i>) FW	100	40,788	$y = -3,5457x + 29,96$
(<i>ormA</i>) REV	150	40,788	$y = -3,5457x + 29,96$

3.7. OLIGONUCLEOTÍDEOS

Tabela 4: Sequência de oligonucleotídeos utilizados neste trabalho para a construção das linhagens mutantes.

Oligonucleotídeos	Sequência
Afu2g10620 5 FW	5' - GTAACGCCAGGGTTTCCAGTCACGACCGAGTTGTAGATGTGACCA CG -3'
Afu2g10620 5 REV	5' -GCCTCCTCTCAGACAGAATTCCAGAAGATAGACGGATGTCCAGAAC- 3'

Afu2g10620 3 FW	5'- GTTTGAGGCGAATTCGATATC TTAGCTCTTGAGTGTTGCTAACAG -3'
Afu2g10620 3 REV	5'- GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGC CTCAAGGATGTTCCCTCGG-3'
ypkA Xho I FW	5'-ATA CTCGAG ATGTTCGTGGAAGCTCACTAAAA-3'
ypkA Xho I REV	5'-ATA CTCGAG TCACTCAGGAATGCTGCC-3'
ypkA 500 ups	5'-CGTACTGGCAAAGCTCG-3'
pyrG FW	5'-GGAATTCTGTCTGAGAGGAGGC-3'
pyrG REV	5'-GATATCGAATTCGCCTCAAAC-3'
ypkA niiA	5'- GGTCAATACTGGCGTTGAGACTTCGTCACG ATGTTCGTGGAAGCTCACTAAA-3'
ypkA 5R niiA	5'- AGGTTCAATGGAGCTCGTATTTTCCCTGC AGAAGATAGACGGATGTC CAGAAC-3'
ypkA 1884 REV SC	5'- GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGC AAAAGGTCACGAGCGGC-3'
pyrG k7 niiA	5'- <u>GCAGGGAAAAATACGAGCTCC</u> -3'
niiA k7 niiA	5'- <u>CGTGACGAAGTCTCAACGCC</u> -3'
mpkA 600 ups	5'-GAGCCCTGACTTCACTGCA-3'
mpkA 5' FW	5'-CTCATTCCCTTGTCTGATGCG-3' (Valiante <i>et al.</i> , 2009)
mpkA 3' REV	5'-GACTGTTCGCAGAAATCCGCTT-3' (Valiante <i>et al.</i> , 2009)
mpkA FW	5'-GGCCATCAAGAAGGTTACCA-3'
mpkA REV	5'-TGAAATTGTCTGGTCGTGGA-3'
pkhA 5 FW	5'-TTGTAAAACGACGGCCAGTGCTAAATGTATGTGATCCACA TTGTG-3'
pkhA 5 REV	5'-ACAGAATTCCGATGGGCACGGATGGTGG-3'
pkhA 3 FW	5'-ATTCGATATCGCAGCTTCCGAACGTT-3'
pkhA 3 REV	5'-ATCCCCGGGTACCGAGCTCGCGGCGCAATAACCAACCT-3'
pkhA pyrG FW	5'-CGTGCCCATCGGAATTCTGTCTGAGAGGAG-3'
pkhA pyrG REV	5'-GAAGAGCGATATCGAATTCGCCTCAAAC-3'
pkhA 500 ups	5'-TGTGTTGAGGATCGTCCG-3'

As regiões em destaque correspondem a sequência de homologia dos primers.

3.8. SOLUÇÃO ESTOQUE DAS DROGAS UTILIZADAS

Tabela 5: Agentes e drogas utilizados nos ensaios de caracterização fenotípica das linhagens mutantes.

Droga	Mecanismo de Ação	Estoque
Cafeína	Inibição da fosfodiesterase	735 mM em água, na hora do uso a suspensão deve ser aquecida em banho-maria fervente para solubilização
Calcoflúor (CFW)	Inibição das enzimas constitutivas que se ligam a β -1,3-glucana e β -1,6-glucana	10 mg/mL em água
Congo red (CR)	Inibição das enzimas constitutivas que se ligam a β -1,3-glucana e β -1,6-glucana	5 mg/mL em água
SDS	Ação detergente na membrana plasmática	10% em água
Miriocina	Inibição da primeira enzima da biossíntese de esfingolípídeos, a SPT	8,33 mg/ml em DMSO, na hora do uso a suspensão deve ser aquecida em banho-maria fervente para solubilização
Lovastatina	Inibição a 3-hidroxi-3 metilglutaril-coenzima A redutase, interferindo na síntese de ergosterol e colesterol	85 mg/ml em etanol/NaOH 0,2 M, depois a suspensão deve permanecer em banho seco em 65°C por 40 min e ser diluída para 25 mg/ml em tris-HCl 25 mM pH 8
Cerulenina	Inibição de esteróis e da síntese de ácidos graxos	5 mg/ml em DMSO
Aureobasidina A	Inibição da enzima IPC da biossíntese de esfingolípídios	1º. estoque de 2,5 mg/ml em etanol 2º. Estoque de 250 μ g/ml em etanol
Filipina	Antibiótico	25 mg/ml em DMSO
Piritiamina	Antagonista de tiamina devido à inibição da pirofosforilação desta (usado como droga de seleção para o gene marcador auxotrófico <i>ptrA</i>)	1 mg/ml em água

3.9. PROTOCOLOS ADOTADOS

3.9.1. Transformação em *A. fumigatus*

Cerca de 10^7 conídios da linhagem recipiente de *A. fumigatus* Δ akuBku80 (Ferreira *et al.*, 2006) foram inoculados em 50 mL de meio completo YG líquido e incubados com agitação constante de 400 g por 16 horas a 37 °C. Os tubos germinativos foram coletados por centrifugação (900 g por 5 minutos) e a transformação foi realizada de acordo com descrito previamente (Osmani *et al.*, 1987). Os pellets foram ressuspensos em 20 mL de solução 1 de transformação, somada de 20 mL de solução 2, e 6,5 mL de sulfato de magnésio 1 M, 400 mg de BSA e 400 mg de Lallzyme MMX® (Lallemand). Essa mistura foi incubada a 30 °C sob agitação 400 g por pelo menos 5 horas, até a completa protoplastização. Após a protoplastização, a cultura foi filtrada e centrifugada a 1500 g por 10 minutos. O pellet obtido foi lavado com solução 3 gelada por duas vezes e centrifugado por 5 minutos a 1500 g. Na sequência, o pellet foi ressuspenso no volume adequado de solução 5 (já que para cada reação de transformação são usados 100 μ L dessa solução). A mistura foi incubada em banho de gelo por 10 minutos. Para cada reação foi adicionado 10-20 μ g de DNA com 50 μ L de solução 4. Esta mistura foi incubada por 20 minutos em banho de gelo. Após esse tempo, adicionou-se em cada reação 1 mL de solução 4 e incubou-se por mais 20 minutos na temperatura ambiente. Após esse tempo os protoplastos transformados foram inoculados em meio YG + KCl top ágar, (o qual tem apenas 1% de ágar). Isso foi realizado para permitir a inoculação dos protoplastos transformados pelo método de “pour plate” sobre meio YG sólido + KCl previamente depositado sobre uma placa de petri. Para tanto, nas placas foram inicialmente colocados 20 mL do meio sólido YG + KCl e em seguida, a mistura de reação de transformação foi misturada com 15 mL de meio top ágar (YG + KCl), homogeneizada delicadamente por inversão e então colocada sobre o meio sólido na placa de petri. As placas de transformação foram então incubadas a 37 °C por aproximadamente três dias, até a visualização dos transformantes. Os transformantes obtidos foram isolados e repicados três vezes consecutivas em YG sólido a partir de colônias monoespóricas para eliminação dos heterocários de transformação. Depois de expandidos, o DNA genômico dos transformantes foi extraído e usado para validação desses através de PCR convencional diagnóstica e “Southern blot”.

3.9.2. Teste de sensibilidade a drogas pelo método de “drop-out”

Para a realização da técnica de “drop-out” as linhagens foram crescidas em meio completo sólido YG por 48 horas a 37 °C. Conídios das linhagens foram coletados em água ultra pura autoclavada e em seguida filtrados em membrana Miracloth® (Merck). Após a filtração, as amostras foram diluídas e quantificadas através da contagem em câmara de Neubauer. Após a contagem estas foram diluídas sucessivamente nas concentrações de 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 a partir da concentração estoque de 10^8 . Para isto 5 μ L de cada uma das soluções foram pipetadas em placa de Petri contendo o meio apropriado, com a droga determinada para cada experimento respeitando a ordem decrescente de diluição. Em seguida as placas foram incubadas a 37 °C por 24-48 horas. Após esse tempo os resultados foram analisados e as placas fotografadas, para montagem dos painéis utilizando-se o programa Adobe Photoshop®.

3.9.3. Determinação da cinética de germinação dos conídios

Inoculou-se 1×10^6 conídios em placas de petri contendo 2 mL de meio AMM, com tartarato de amônio ou com nitrato de magnésio, uma lamínula ao fundo. As placas foram incubadas a 37°C por 2, 4, 6, e 8 horas. Cada placa foi retirada no seu tempo de incubação e realizou-se a contagem de 100 conídios de cada temperatura através da microscopia de campo claro. Foram considerados conídios com crescimento polarizado aqueles que mostravam protuberância na superfície do esporo alterando sua forma redonda característica indicando a emissão de um tubo germinativo (Harris *et al.*, 1999). Foram analisados 100 germinantes em cada experimento independente e os resultados apresentados representam média \pm desvio padrão de pelo menos dois experimentos independentes.

Já para a realização dos testes com contraste em microscopia óptica (DIC), foi utilizado o mesmo procedimento descrito anteriormente, porém somente com 12 horas de crescimento das hifas, e as análises foram feitas de forma qualitativa e não quantitativa.

3.9.4. Análise do crescimento das hifas

As amostras da linhagem mutante $\Delta ypkA$ e selvagem foram incubadas em placas de petri, com meio completo YAG durante 120 horas a 37°C. Depois essas placas tiveram sua superfície observada em estereoscópio (Zeiss) para análise do crescimento das hifas.

Também foram realizadas análises de microscopia com azul de algodão (lactofenol) – Sigma, para a observação da formação de conidióforos, em que o mutante $\Delta ypkA$ e a linhagem selvagem foram incubados a 37°C por 120 horas em YAG, com lamínulas aderidas ao meio de cultura. Depois essas lamínulas foram coradas com azul de algodão e analisadas em microscopia de campo claro.

3.9.5. Análise da distribuição de ergosterol

A fim de se verificar o padrão de distribuição de esteróis no mutante *niiA::ypkA*, os conídios das linhagens selvagem e mutante *niiA::ypkA* foram crescidos por 12 horas a 37°C em AMM + TA ou AMM + NM e imediatamente corados com filipina na concentração final de 25 µg/ml por 5 minutos em meio de cultura previamente aquecido a 37°C.

Após esse tempo, as lamínulas foram lavadas com o meio de cultura aquecido, montadas e analisadas. As lâminas foram visualizadas utilizando-se um microscópio Zeiss Observer Z1 em objetiva de 100x, filtro 49 (Zeiss), com excitação de 365 nm e emissão de 445/50 nm.

As imagens em campo claro (DIC) e em campo escuro de fluorescência foram capturadas no formato TIFF para a montagem dos painéis.

3.9.6. Extração de RNA total

Os conídios das linhagens que teriam RNA extraído foram crescidos conforme descrito em cada experimento e tratados com droga quando necessário. O micélio foi filtrado a vácuo e imediatamente congelado em nitrogênio líquido para se evitar a degradação do RNA. Para romper a parede celular do fungo, os micélios congelados foram triturados em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e pistilo esterilizados. O RNA foi extraído utilizando-se o reagente Trizol (Life Technologies

EUA), segundo as recomendações do fabricante. A integridade do RNA total foi verificada em gel de agarose 1,2% sob condições desnaturantes corado com brometo de etídio e visualizado sob luz UV de acordo com Sambrook e Russel (2001). A presença das bandas intactas correspondentes ao RNA ribossomal 28S e 18S, sendo a intensidade da primeira banda cerca de duas vezes maior que a da segunda, foi utilizado como critério de integridade do RNA total. Para a utilização nas reações de qPCR, 10 µg de RNA total de cada amostra foram tratados com a enzima Ambion Turbo DNase (Life Technologies, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. O sucesso de tratamentos de todas as amostras de RNA com DNase foi verificado através de PCR em tempo real utilizando como alvo o gene da β-tubulina de *A. fumigatus* (*tubA*), onde verificou-se o sucesso do tratamento através da ausência completa de amplificação das amostras. Após tratadas e validadas, as amostras foram transcritas, utilizando-se o kit High Capacity (Life Technologies), para a obtenção do cDNA usado nas análises de expressão por RT-PCR em tempo real.

3.9.7. Extração de DNA de micélio

Conídios das linhagens foram inoculados em meio de cultura completo YG e incubados por aproximadamente 16 horas a 37°C e 180 rpm. Os micélios obtidos foram coletados por filtração a vácuo e congelados imediatamente em nitrogênio líquido para serem triturados com almofariz e pistilo. Para cada cerca de 40 mg de micélio acrescentou-se 500 µL de tampão de extração de DNA. Adicionou-se em cada amostra, um volume igual de fenol:clorofórmio (1:1) e a mistura foi agitada mecanicamente em vortex por 10 minutos. Para sedimentar as proteínas precipitadas e restantes celulares, as amostras foram centrifugadas a 20800 g por 20 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de microcentrifuga onde foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio para a retirada de resíduos de fenol. As amostras foram centrifugadas a 20800 g por 10 minutos e a fase aquosa superior foi novamente transferida para outro tubo de microcentrifuga onde foi adicionado 900 µL de isopropanol para precipitar o DNA. A amostra foi centrifugada a 20800 g por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi lavado com etanol 70% e centrifugado novamente a 20800 g por 1 minuto. O sobrenadante

foi novamente descartado e o resíduo de etanol evaporado a temperatura ambiente por 30 minutos. O sedimento foi ressuspensionado em água ultra pura estéril e estocado a 4 °C. A integridade das amostras foi verificada através do gel de agarose 1%, e o DNA foi quantificado por espectrofotometria quando necessário (260/280 nm) utilizando-se equipamento NanoVue Plus (GE Health Care).

3.9.8. Extração de DNA de conídios

Em uma placa de cultura foram adicionados 500 µL de tampão de extração de DNA para a captura dos esporos, os quais foram transferidos para um tubo de 1,5 ml. No mesmo tubo foram colocadas pérolas de vidro, em seguida, os tubos foram incubados a 70°C por 30 minutos e em intervalos de 10 minutos agitados por 30 segundos em vortex. Em seguida, as amostras foram transferidas para um novo tubo, sem pérolas de vidro, e foram adicionados 500 µL de fenol/clorofórmio (1:1). Os tubos foram agitados por 5 minutos no vortex e depois centrifugados a 16.200 g por oito minutos. Houve a formação de duas fases, onde o sobrenadante foi recuperado e transferido para um novo tubo. Na sequência adicionou-se 500 µL de clorofórmio, misturou-se brevemente e novamente os tubos foram centrifugados nas mesmas condições anteriores. Observou-se a formação de duas fases, o sobrenadante foi recuperado e transferido para outro tubo de 1,5 ml. Adicionou-se 900 µL de isopropanol e as amostras foram incubadas por 30 minutos a -80°C. Na sequência elas foram centrifugadas por 10 minutos a 16.200 g, o sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi lavado com etanol 70% e eluído em 50 µL de água estéril.

3.9.9. Extração de DNA de *S. cerevisiae*

As leveduras foram semeadas em 10 mL de SC URA- e incubados a 30°C por 48 horas sob agitação constante. Após este período, as células foram recuperadas por centrifugação a 2.500 g por 5 minutos e ressuspensas em 1 ml de tampão de extração de DNA de leveduras. A esta suspensão foi adicionado o mesmo volume de perolas de vidro tratadas com ácido nítrico 1M para a retirada de impurezas. Os tubos contendo as células, o tampão e as pérolas de vidro foram

acoplados em agitador mecânico e a lise celular procedeu-se por 10 minutos. Após este período, o material, sem as pérolas de vidro, foi transferido para um novo tubo contendo o mesmo volume de uma mistura de fenol:cloroformio (1:1) e novamente o material foi agitado em agitador mecânico por 10 minutos. Após a extração, a mistura foi centrifugada a 20.800 *g* por 20 minutos e a fase aquosa contendo o DNA genômico foi recuperada. O DNA foi precipitado pela adição de 0,6 volumes de isopropanol e centrifugado por 20 minutos a 20.800 *g*. O DNA foi lavado com etanol 70% (v/v) gelado, seco a temperatura ambiente e ressuspensão em 50 μ L de água deionizada estéril. Foi adicionado 1 μ L de solução de RNase A (10 mg/mL) e a solução foi incubada a 37°C por 12 horas. A concentração e pureza do DNA foram determinadas espectrofotometricamente (Sambrook, 2001).

3.9.10. Análise de “southern blot”

Amostras de DNA das linhagens a serem testadas foram digeridas com enzimas de restrição apropriadas de acordo com a estratégia definida e, separadas por eletroforese (100 v por 2-3 horas) em gel de agarose 1% (p/v). O DNA foi então transferido para uma membrana de nylon carregada positivamente (Hybond N+, GE HealthCare). Para isto, o gel foi inicialmente depurinizado em solução de HCl 0,02 M por 15-20 minutos sob leve agitação a temperatura ambiente e colocado em contato com a membrana em uma plataforma para a transferência alcalina que permitia o contato direto entre o gel e a pela solução de NaOH (0,4 M). O sistema de transferência foi mantido “overnight”. No dia seguinte a membrana foi rapidamente lavada em solução salina-citrato 2x concentrada (SSC 2x; 0,3 mol/L NaCl, 0,03 mol/L citrato de sódio), e na sequência ela foi seca sobre papel de filtro. Para a fixação do material que fora transferido, a membrana foi colocada no transiluminador sob ação de luz ultravioleta por 5 minutos de cada lado. Depois foi levada até a estufa de secagem, na temperatura de 80 °C e mantida por 1 hora.

Para a hibridização dos ácidos nucléicos foi utilizado o sistema “AlkPhos Direct Labeling and Detection Systems” (GE Health Care). A membrana fixada foi colocada em 15 mL de solução de hibridização seguindo a constituição descrita pelo fabricante (0,5 mol/L de NaCl dissolvido no tampão de hibridização, 4% (p/v) do

reagente de bloqueio). A garrafa contendo a solução e a membrana foi pré-hibridizada no forno de hibridização por 3 horas na temperatura de 60 °C.

Durante esse período foi preparada a sonda utilizada na reação. Para isso, uma solução com a sequência de DNA obtida por PCR e purificada do gel de agarose correspondente a sonda foi ajustada na concentração de 20 ng/μL. 10 μL dessa solução contendo o produto de PCR foram desnaturados por 5 minutos em banho fervente e o material foi deixado por mais 5 minutos no gelo. A esse material foi somado 10 μL de “reaction buffer”, 2 μl de “labelling reagente” e 10 μL do reagente “cross linker” diluído (1:5 em água) de acordo com as instruções do fabricante. A reação foi posteriormente incubada em banho seco a 37 °C por 30 minutos. A sonda foi adicionada à membrana pré-hibridizada contida na garrafa de hibridização. A hibridização foi mantida overnight por cerca de 16-18 horas no forno de hibridização na temperatura de 55 °C em rotação leve. Após a hibridização a membrana foi lavada com a solução primária na temperatura de 55 °C (uréia 120 g/L, SDS 1 g/L, fosfato de sódio monobásico 50 mM, NaCl 8,7 g/L, MgCl 1 mM, reagente de bloqueio 2 g/L) de acordo com as instruções do fabricante. O procedimento de lavagem foi feito por duas vezes, em cada uma delas durou 10 minutos, dentro do forno de hibridização a 55 °C com rotação leve. Na sequência, a membrana foi lavada com a solução secundária (TRIS base 6,2 g/L, NaCl 5,6 g/L), dessa vez ela foi agitada por cinco minutos em temperatura ambiente por duas vezes.

Feito isso, a membrana foi colocada em uma superfície plana e sobre ela fora aplicado 30 μL/cm² do agente de detecção CDP-star (GE Health care) por cerca de 5 minutos para a revelação. Por último a membrana foi encaminhada para revelação autorradiográfica em chassi fotográfico em sala escura utilizando filme fotográfico “Hyperfilm” ECL (GE Health Care). O filme revelado foi escaneado e a imagem obtida processada no Adobe Photoshop para a edição dos painéis.

3.9.11. Análises de RT- PCR em tempo real

A técnica de RT-PCR em tempo real é baseada no monitoramento óptico da fluorescência do produto de PCR ciclo a ciclo e pode ser usada na quantificação da expressão gênica. Alíquotas de cDNA obtidas de acordo com o experimento

realizado foram usadas como molde da PCR. Utilizou-se primers construídos especificamente para o gene de interesse utilizando-se o programa Primer Express (Life Technologies). A concentração ideal de primers a ser utilizada em cada reação de RT-PCR em tempo real foi determinada, além dos padrões de eficiência da reação (foram apenas aceitos valores variando entre 95-105%), “slope”, intercepto e desvios de acordo com Bustin et al., 2009. Como controle endógeno (normalizador) utilizou-se primers para amplificação do gene *tubA* de *A. fumigatus* (β -tubulina). A detecção de amplificação em tempo real foi feita no equipamento Step One Plus (Applied Biosystems) utilizando-se o reagente SyberGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems). A concentração dos primers utilizados estão descritos na tabela 3. A quantificação dos resultados foi realizada conforme descrição do fabricante e se baseia na derivação da fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Schmittgen et al., 2008).

3.9.12. Extração e dosagem de ergosterol por HPLC-UV a partir do micélio de *A. fumigatus*

Para a extração de ergosterol, 10^7 de esporos tanto da linhagem *niiA::ypkA* quanto da linhagem selvagem foram crescidos em quadruplicata, em AMM com 50 mM de tartarato de amônio e/ou 10 mM nitrato de magnésio, a 37°C. Depois de 24 horas os micélios foram filtrados e depois liofilizados durante 4 dias. Ainda, para a quantificação do mutante $\Delta ypkA$, foi utilizada uma quantidade adequada do fungo correspondente com 10^2 de esporos da linhagem *wild type*, em meio YG por 120 horas, a 37°C, e em quadruplicata. Como a linhagem mutante $\Delta ypkA$ não possui esporos para que a exata quantidade de fungo fosse inoculada no meio de cultura, a quantidade de glicose consumida do meio pela linhagem mutante e selvagem foi devidamente medida através da enzima glucose oxidase, durante cada 24 horas de crescimento, para que a dosagem de ergosterol pudesse ser equalizada. Assim, o consumo de glicose pelas culturas foi o parâmetro usado para avaliar o crescimento. A enzima utilizada para a quantificação da glicose pertence ao kit Glucose Oxidase Assay K-GLOX (Megazyme), para mais informações consultar as instruções do fabricante.

Depois de liofilizados e já secos, 20 mg de cada uma das amostra foram pesadas em uma balança analítica para logo depois serem ressuspendidas em 500 µl de metanol. Logo após, as amostras foram sonicadas por 5 minutos, a 65°C em banho-maria. Filtrou-se a massa restante através de lã de vidro, e 10 µl de amostras de cada fração foram injetados para análise de HPLC-UV. O sistema de HPLC utilizado para a análise cromatográfica consistiu de um módulo de separação (Waters Alliance 2695), equipado com o software MassLynx 4.1 v (Waters) e uma bomba quaternária; um desgaseificador a vácuo em linha e um detector de arranjo de fotodiodos. A separação cromatográfica foi realizada sobre uma coluna de fenilhexilo (250 mm x 4 mm, 5 mm, Phenomenex) usando uma eluição em gradiente linear de B: acetonitrilo; e A: água; que foram ambos suplementados com ácido fórmico a 0,1%, a partir de 80% a 100%, ao longo de 20 minutos. A coluna foi equilibrada em 80% de B durante 5 minutos antes de iniciar a sequência de injeção seguinte. A parte caudal da fase móvel foi de 0,5 ml/min e a temperatura da coluna foi fixada em 40 °C. Os picos de ergosterol foram identificados com base no tempo de retenção, e que foram detectados a $\lambda = 282$ nm. A curva padrão foi obtida por análise de soluções padrão com o método LC-UV otimizado em 7 concentrações variando de 1 a 0,0156 mg/ml (1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,0312 e 0,0156 mg/ml), e depois traçando a área do correspondente contra a concentração do ergosterol, obtendo-se um coeficiente de correlação $>0,99$. Os picos cromatográficos foram posteriormente integrados via MassLynx v 4.1 software (Waters) e depois em Microsoft Excel para análise posterior.

3.9.13. Análises estatísticas

A análise estatística dos dados experimentais foi feita com base no teste t-Student de duas caudas por comparação de dois grupos de resultados diferentes. As diferenças foram consideradas significativas a partir de um valor de significância $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Construção do Cassete de Deleção do Gene *ypkA* de *Aspergillus fumigatus*

O gene *ypkA* de *A. nidulans* possui papel importante na biossíntese de esfingolipídios e sua deleção causa ao fungo um fenótipo doente (Colabardini *et al.*, 2013). Ainda, em *S. cerevisiae* a deleção dupla dos genes *YPK1* e *YPK2*, que são parálogos do gene *ypkA*, torna a levedura inviável (Casamayor *et al.*, 1999). Assim, a essencialidade do gene Afu2g10620 (*ypkA*) de *A. fumigatus*, foi testada através da construção de um cassete de deleção para o gene *ypkA*, através da técnica de recombinação “in vivo” em *S. cerevisiae*, que liga as extremidades 5' e 3' do gene *ypkA* com o marcador auxotrófico (no caso o gene *pyrG*) e o plasmídeo pRS426 (Malavazi *et al.*, 2012). O cassete de deleção fusionado no plasmídeo pRS426 foi transformado em células quimiocompetentes de *E. coli* (DH10B) e depois as células selecionadas tiveram seu DNA plasmidial extraído, o qual foi usado como template para as reações de PCR realizadas com o intuito de amplificar o fragmento referente ao cassete de deleção, que foi utilizado posteriormente para a obtenção do mutante $\Delta ypkA$ de *A. fumigatus*.

Na figura 5, podemos observar a abordagem utilizada para a produção do cassete de deleção do gene *ypkA*.

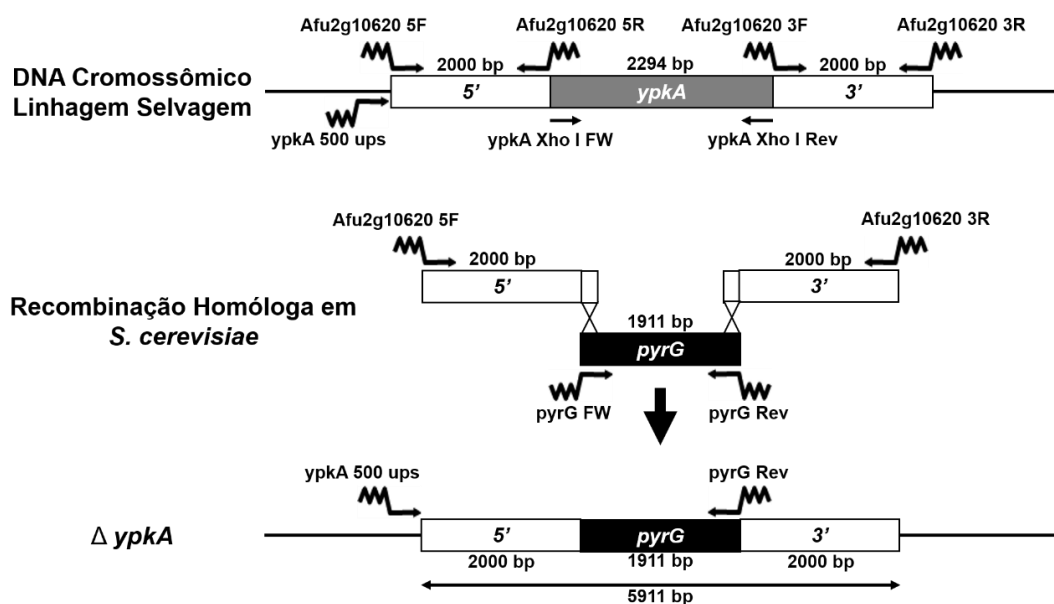


Figura 5: Esquema da construção do cassete de deleção do gene *ypkA* a partir da recombinação genica dos fragmentos 5' (*ypkA*); *pyrG* e 3' (*ypkA*) em *S. cerevisiae*. Os fragmentos independentes 5' e 3' foram amplificados a partir da linhagem Afu293 de *A. fumigatus*, enquanto o fragmento *pyrG* foi obtido através do vetor pCDA21.

O gene *pyrG* de *Aspergillus* codifica a enzima descarboxilase ornitina 5'-monofosfato (OMP) descarboxilase e participa da via de biossíntese de pirimidina, a qual é importante para síntese de uridina e uracila. O gene *pyrG*, é responsável por atribuir ao *Aspergillus* prototrofia para uridina e uracila e por isso foi adotado, como marcador auxotrófico neste trabalho (Gouka *et al.*, 1995, Weidner *et al.*, 1998).

4.2. Validação do Mutante Nulo $\Delta ypkA$

O cassete de deleção amplificado a partir do plasmídeo recombinado obtido, foi transformado na linhagem selvagem $\Delta akuB^{ku80}$ *pyrG*- de *A. fumigatus*, que possui uma maior taxa de recombinação homóloga, devido a deleção do gene *akuB*^{ku80} responsável por codificar uma proteína que participa da recombinação não homóloga do fungo (Ferreira, 2006). A transformação foi efetuada através do tratamento dos protoplastos da linhagem selvagem com Polietilenoglicol (PEG 6000), permitindo que o cassete de deleção do gene *ypkA* fosse introduzido nas células do fungo.

Após aproximadamente 72 horas de crescimento, ocorreu a aparição de colônias transformantes na placa de origem, que logo após foram isoladas três vezes consecutivas em placas de meio seletivo, com o objetivo de evitar a existência de heterocários dos transformantes. Assim, as colônias purificadas foram expandidas e tiveram seu DNA genômico extraído para a confirmação da inserção do cassete de deleção do gene *ypkA* dentro das células fúngicas. Para a validação da existência do mutante nulo, o DNA genômico das colônias transformantes foi testado através de PCR convencional utilizando o primer *pyrG* REV, que reconhece a porção 3' do marcador auxotrófico *pyrG* no cassete de deleção, e o primer denominado *ypkA* 500 ups, que foi desenhado a partir de 500 pb “upstream” ao início da sequência 5' do gene (Figura 5). Como a linhagem selvagem utilizada para a transformação não possui o gene *pyrG* funcional, a amplificação com esses primers será nula, servindo como controle negativo para a amplificação de uma

banda com 4,4411 kb nos transformantes, o que mostra a substituição do lócus gênico do gene *ypkA*. Na figura 6, temos evidenciado a figura que representa a estratégia da PCR diagnóstica para o gene *Afu2g10620* (*ypkA*), juntamente com a imagem do gel de agarose que apresenta o resultado da PCR realizada com o mutante nulo deste gene em validação.

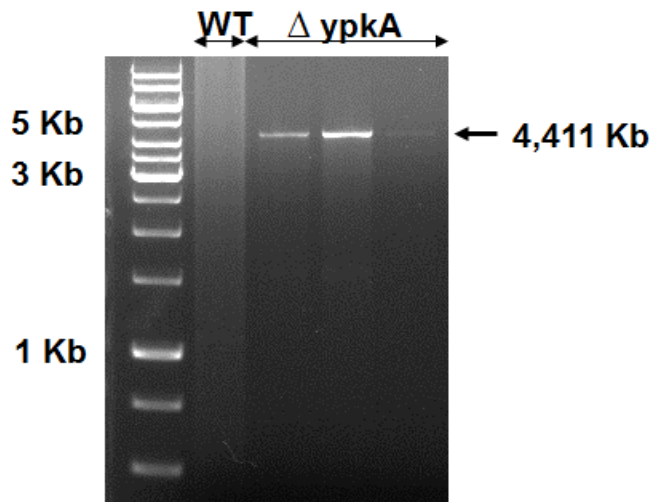


Figura 6: Confirmação da deleção do gene *ypkA* no mutante, por PCR, através dos primers 500 ups (para confirmação no lócus) e *pyrG* REV. (Ver Figura 5 para a localização dos primers).

4.3. Análise Fenotípica do Mutante Nulo $\Delta ypkA$

Segundo Colarbanidi e colaboradores (2013), os transformantes nulos $\Delta ypkA$ de *A.nidulans* apresentam um fenótipo terminal, com colônias muito pequenas e sem conidiação. Na figura 7, podemos observar que o mutante nulo $\Delta ypkA$ de *A. fumigatus*, apresenta um fenótipo semelhante, que mesmo em meio completo (YAG) e com 48 horas de crescimento não apresenta nenhum indício aparente de conidiação, formando pequenos pontos brancos na placa, o que difere muito da linhagem selvagem, que apresenta um crescimento viável dos esporos, possuindo um aspecto almofadado, com uma coloração que varia entre verde e cinza. Deste modo, podemos supor que o gene *ypkA* possui uma forte relação com o crescimento vegetativo do fungo, pois sua deleção impede a formação de esporos assexuais, conhecidos como principal meio de contágio da Aspergilose e colonização do *A. fumigatus* no pulmão (Latge, 1999).

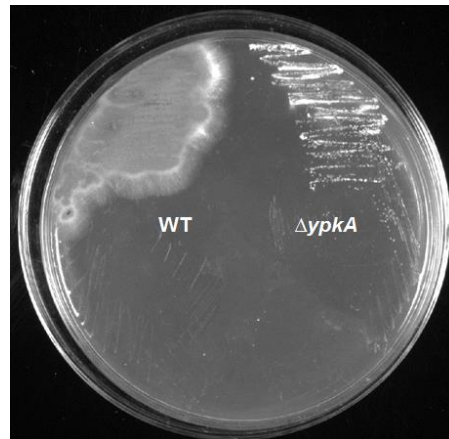


Figura 7: *A. fumigatus*, linhagem selvagem (a esquerda) comparado com o mutante $\Delta ypkA$ (a direita), com 48 horas de crescimento a 37°C em meio de cultura completo (YAG). O mutante apresenta restrito crescimento vegetativo.

Ainda, para a confirmação da total ausência de conídios na linhagem $\Delta ypkA$, tanto a linhagem selvagem quanto a mutante foram crescidas por 120 horas para que a análise através de um estereoscópio fosse possível.

Na figura 8, podemos observar nas imagens A e B novamente a diferença do fenótipo das duas linhagens, comparando respectivamente com as imagens C e D, obtidas através do estereoscópio, que mostram a presença de esporos na superfície do fungo selvagem, e a sua total ausência de crescimento na superfície do mutante nulo.

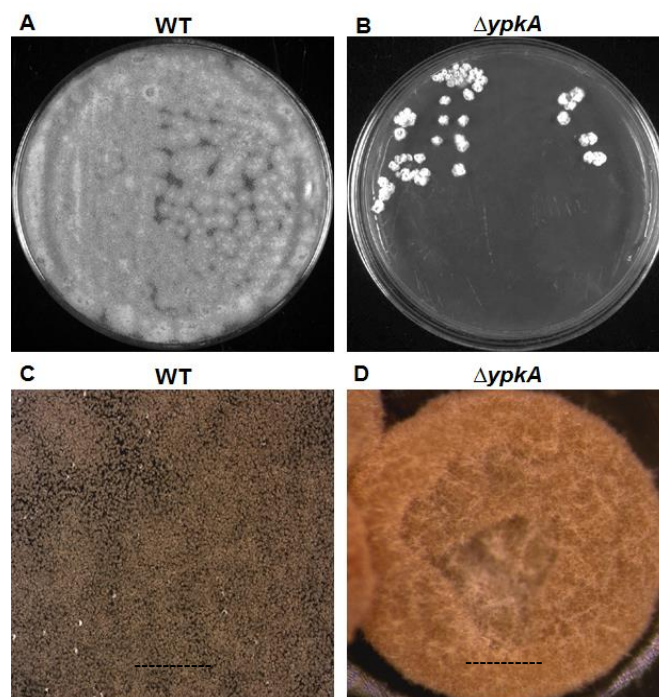


Figura 8: (A-B) *A. fumigatus* selvagem (a esquerda) comparado com o mutante $\Delta ypkA$ (a direita). (C-D) Presença de esporos na superfície do fungo selvagem (a esquerda) comparado com a ausência na superfície do mutante $\Delta ypkA$ (a direita), em aumento de 20x do estereoscópio. Todas as placas cresceram por 120 horas a 37°C em YAG.

Para reforçar a ausência de esporulação do mutante $\Delta ypkA$, o crescimento de conidióforos foi analisado através de microscopia óptica de campo claro, em que tanto a linhagem mutante quanto a selvagem foram incubados com lamínulas aderidas ao meio de cultura YAG, a 37°C por 120 horas. Depois, essas lamínulas foram coradas com lactofenol azul de algodão e analisadas em aumento de 40X e de 100X. Na figura 9 podemos observar as estruturas dos conidióforos na linhagem selvagem, o que não ocorre na linhagem mutante $\Delta ypkA$ que só apresenta o crescimento de hifas sem a formação de conidióforos (Figura 9).

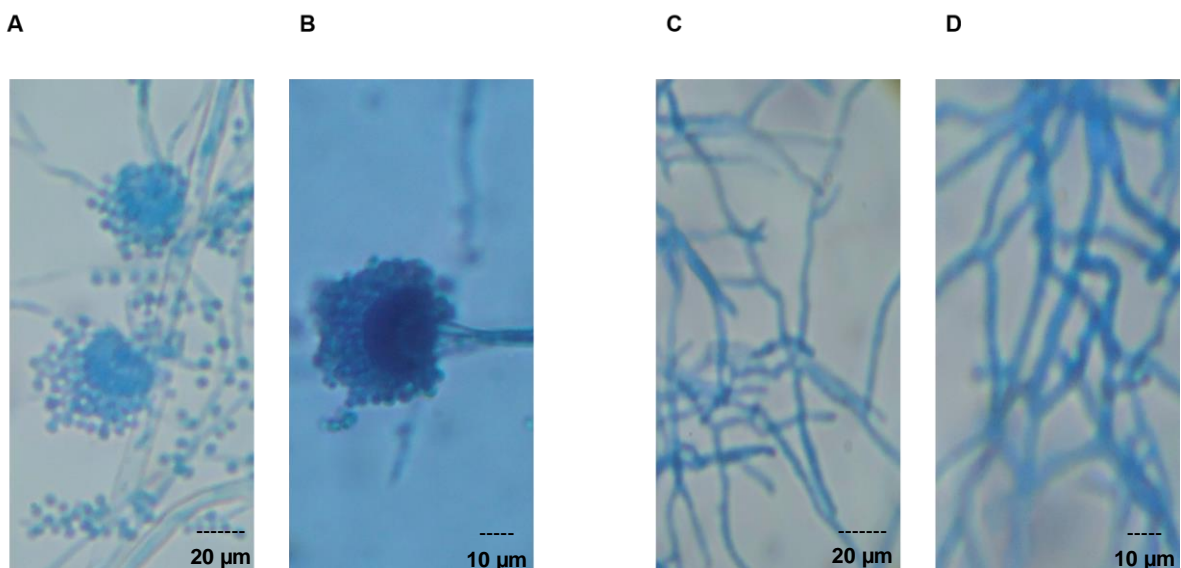


Figura 9: Microscopia de campo claro em aumento de 40x e 100X; com corante lactofenol azul de algodão. (A-B) Formação de conidióforos da linhagem selvagem crescidos por 120 horas a 37°C em YAG. (C-D) Ausência da formação de conidióforos no mutante nulo $\Delta ypkA$ crescido por 120 horas a 37°C em YAG.

4.4. Construção do Mutante Condicional *niiA::ypkA* de *A. fumigatus*

O mutante nulo $\Delta ypkA$ de *A. fumigatus* apresenta um fenótipo doente com crescimento radial bastante restrito e ausência de conidiação o que torna os estudos

fenotípicos com essa linhagem bastante difícil. Portanto, foi necessário a construção de um mutante condicional, onde o gene de interesse (Afu2g10620, ou *ypkA*) se encontre sob o controle de um promotor regulável. Para isso, utilizamos o promotor do gene que codifica a enzima nitrato redutase, ou *niiA*, que é regulado através de fonte de nitrogênio, reprimindo a expressão do gene na presença de tartarato de amônio (fonte orgânica de nitrogênio) e induzindo a expressão quando na presença de nitrato de magnésio (fonte inorgânica de nitrogênio) (Amaar *et al.*, 1998, Hu *et al.*, 2007).

A construção do cassete foi feita através de recombinação *in vivo* em *S. cerevisiae*, utilizando os fragmentos independentes, constituídos por 1900 pb do gene *ypkA*; pela extremidade 5' desse gene; e pelo promotor *niiA* junto ao gene *pyrG* (marcador auxotrófico). A figura 10 mostra o esquema de construção do cassete para a obtenção do mutante condicional descrito acima.

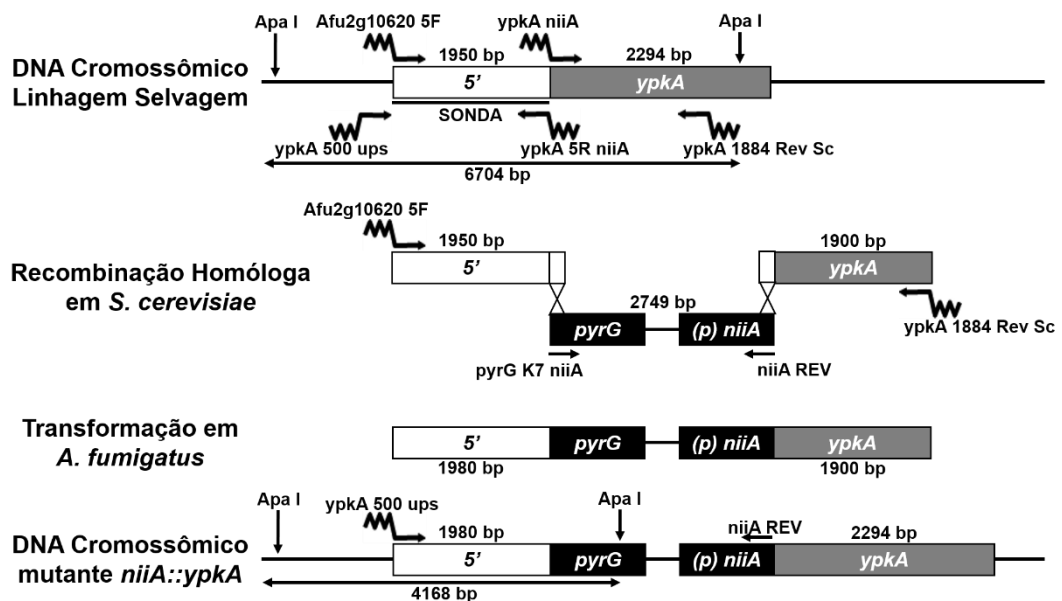


Figura 10: Esquema da construção do cassete de substituição gênica para a obtenção do mutante condicional *niiA::ypkA*, através de recombinação homóloga dos fragmentos independentes em *S. cerevisiae*. Os fragmentos 5' e 3' *ypkA* foram amplificados da linhagem Afu293 de *A. fumigatus*, enquanto o fragmento *pyrG-niiA* foi obtido através do vetor pCDA21.

O cassete de substituição genica obtido pela recombinação homóloga em *S. cerevisiae*, foi transformado em *A. fumigatus* através de protoplastos da linhagem

\DeltaakuB^{ku80} *pyrG*⁻, tratados com PEG, da mesma forma que foi realizada a transformação para a obtenção do mutante nulo (seção 4.2).

A validação das colônias transformantes foi feita por Southern blot, onde o DNA genômico dos candidatos isolados e da linhagem selvagem foram digeridos com a enzima *Apal*. A membrana foi submetida a hibridização com uma sonda correspondente à porção 5' do gene *ypkA* (Figura 10), mostrando uma banda de 6700 pb da linhagem selvagem quando comparada a banda apresentada pelo mutante *niiA::ypkA*, que teve a marcação de uma banda correspondente a 4100 pb indicando a substituição do locus do gene *ypkA*, como mostrado na figura 11.

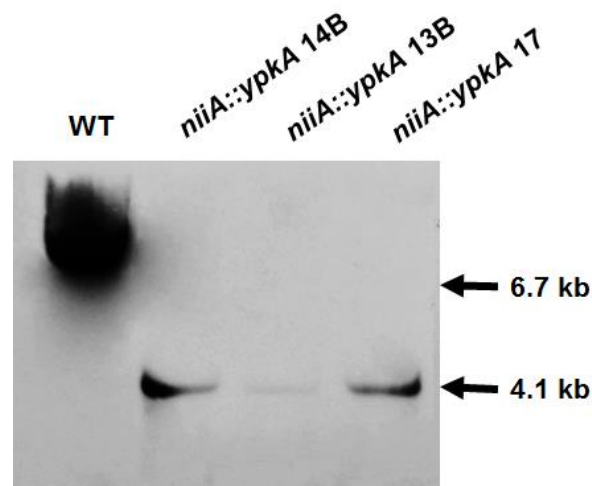


Figura 11: Confirmação da construção do mutante *niiA::ypkA* por Southern blot, através do corte da enzima *Apal* da região 5' à *pyrG* (4.1 kb), enquanto o corte correspondente a linhagem selvagem apresentou a altura de 6,7 kb. Foi utilizado o filme fotográfico “Hyperfilm” ECL.

Devido a dificuldade de manipulação e quantificação do mutante \DeltaypkA , a linhagem *niiA::ypkA* 14B foi escolhida para a realização dos testes fenotípicos que se seguem neste trabalho.

4.5. Teste da funcionalidade do promotor *niiA* na linhagem *niiA::ypkA*

Para a confirmação do ideal funcionamento do promotor *niiA* na linhagem *niiA::ypkA*, a expressão do gene *ypkA* foi testada através da análise de cDNA por

qPCR em tempo real, do mutante *niiA::ypkA* em condições de repressão e indução do gene.

Como mostrado na Figura 12, o promotor mostrou um comportamento adequado, apresentando maior expressão relativa do gene *ypkA* em condições de indução, quando comparado a expressão do gene na presença do de tartarato de amônia (condição de repressão).

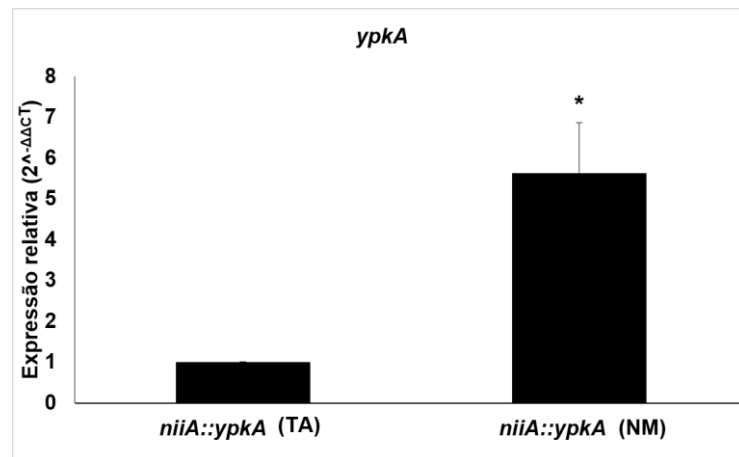


Figura 12: Expressão do gene *ypkA* do mutante condicional *niiA::ypkA*, tanto em repressão (50mM de TA), quanto em indução (10 mM de NM), utilizando o gene *tubA* como normalizador. * $p \leq 0,05$.

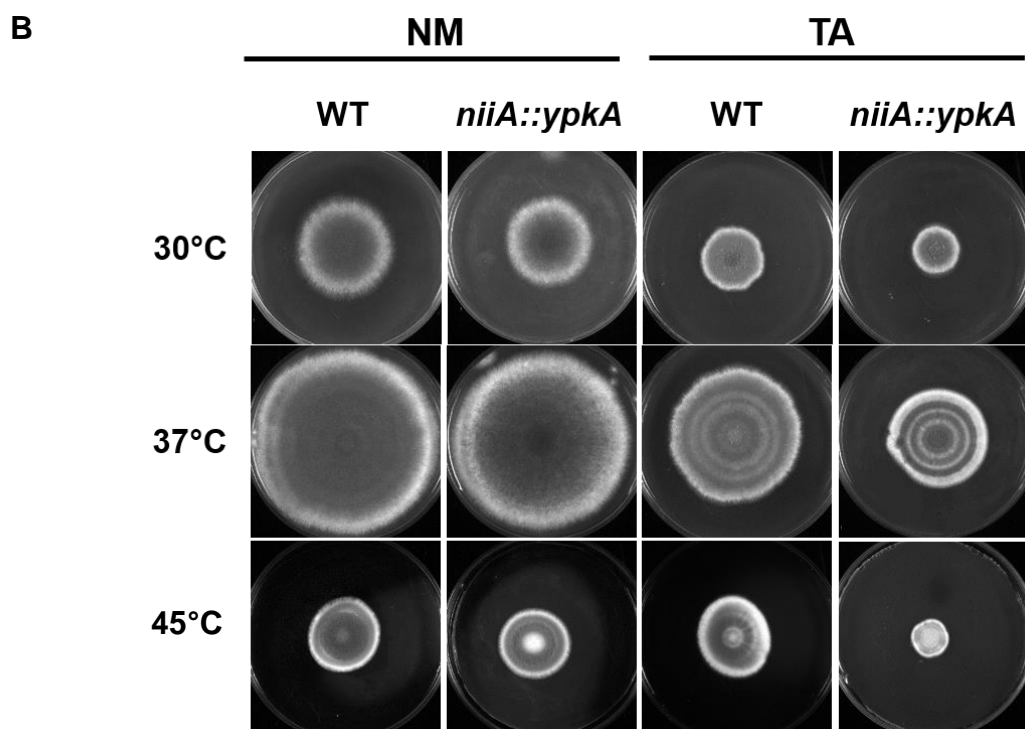
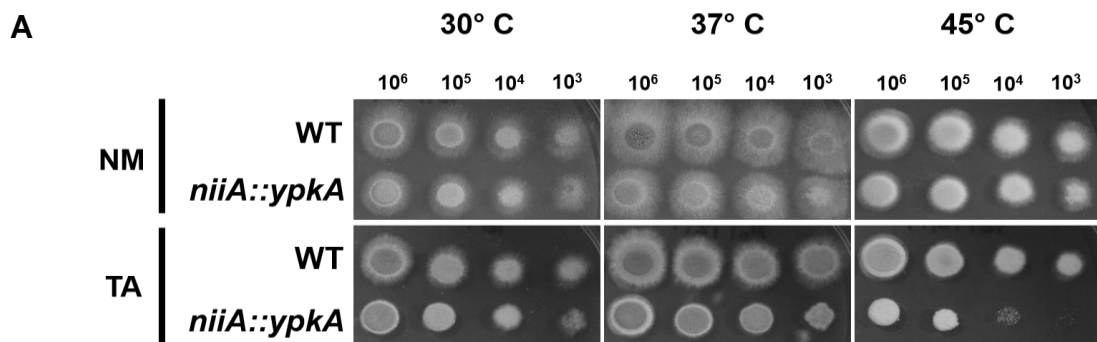
4.6. Análise fenotípica do mutante *niiA::ypkA*

4.6.1. Teste de Crescimento Radial e Termosensibilidade do Mutante

A. fumigatus é altamente termotolerante, sobrevivendo a temperaturas de até 70° C, no entanto, apenas alguns genes foram mostrados estarem envolvidos nessa termotolerância (Albrecht *et al.*, 2010). Assim, os testes foram realizados para avaliar o perfil de sensibilidade apresentado pelo mutante condicional em relação à linhagem selvagem, frente à exposição a diferentes temperaturas. Sendo assim, 10⁶, 10⁵, 10⁴ e 10³ de esporos foram inoculados pelo método de “drop-out”, em placas de petri com meio mínimo modificado (AMM), na presença de tartarato de amônio ou em nitrato de magnésio. Em seguida as placas foram incubadas nas temperaturas de 30°C, 37°C e 45°C durante 48 horas. Já para a análise do crescimento radial, 5 µl de solução de conídios na concentração de 2x10⁵ foram

pipetadas no centro de placas de petri, e em seguida foram incubadas nas mesmas temperaturas do teste anterior, porém durante 120 horas.

Conforme observado na figura 13A, a linhagem *niiA::ypkA*, quando se encontra com o gene *ypkA* reprimido, apresenta maior sensibilidade à temperatura de 45°C, quando comparado com a linhagem selvagem; e ainda na figura 13B, os diâmetros das circunferências formadas apresentaram um menor crescimento quando comparadas a linhagem selvagem em todas as temperaturas, porém essa diferença fica melhor evidenciada também em 45°C. Os diâmetros das circunferências formadas pelo crescimento do fungo foram medidas em intervalos de 24 horas, tendo os dados do final das últimas 24 horas de crescimento analisados em forma de um gráfico (Figura 13C).



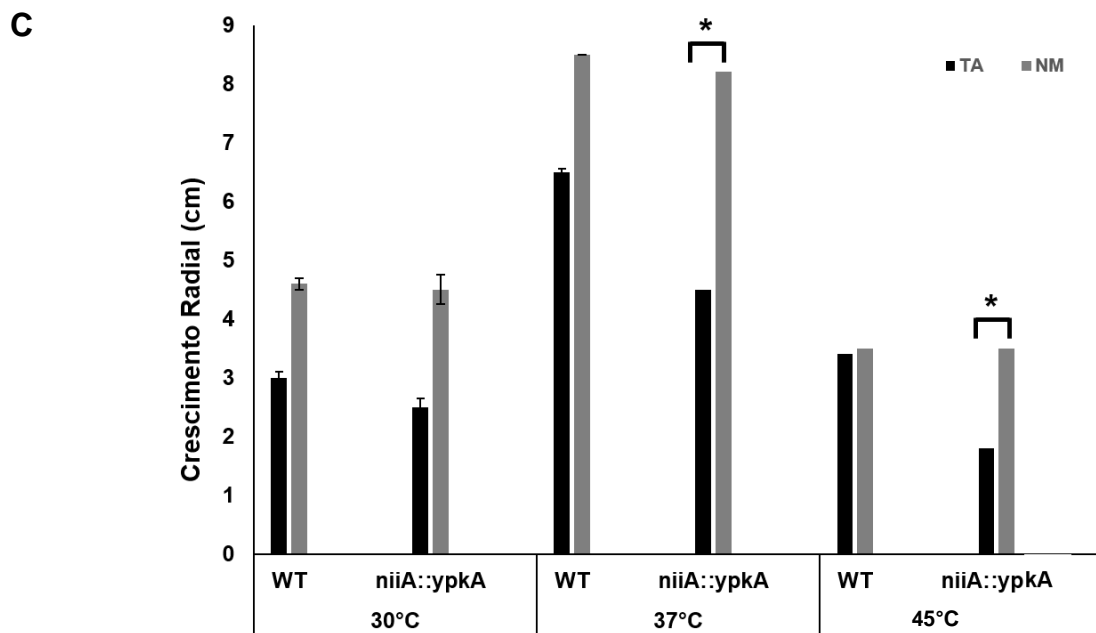


Figura 13: (A) Teste fenotípico de termosensibilidade com diferentes concentrações de conídios (10^6 ; 10^5 ; 10^4 e 10^3) da linhagem selvagem e do mutante *niiA::ypkA*, crescidos por 48 horas a temperaturas de 30°C; 37°C e 45°C em AMM + tartarato de amônio (TA) ou nitrato de magnésio (NM). (B) Crescimento radial da linhagem selvagem e do mutante condicional *niiA::ypkA* por 120 dias, com 2×10^5 de esporos, em AMM + tartarato de amônio (50 mM) ou nitrato de magnésio (10 mM), a 30°C; 37°C e 45°C. (C) Gráfico do crescimento radial durante 120 horas de crescimento da linhagem selvagem e do mutante condicional *niiA::ypkA*, em AMM + tartarato de amônio ou nitrato de magnésio. * $p \leq 0,05$.

4.6.2. Análise da Cinética de Germinação do Mutante *niiA::ypkA*

A biossíntese de esfingolipídios gera moléculas bioativas que tem demonstrado ser necessárias para a regulação da fisiologia fúngica, participando de processos como endocitose e controle do crescimento (Dickson *et al.*, 1999, Heung *et al.*, 2004, Lopes, 2004). O mutante condicional *niiA::ypkA* de *A. nidulans* mostra alteração na morfologia das hifas e na cinética de germinação dos conídios quando o gene *ypkA* se encontra reprimido (Colabardini *et al.*, 2013). Sendo assim, foi feita a análise da cinética de germinação dos conídios no decorrer de 8 horas, através da contagem de esporos tanto da linhagem selvagem quanto da linhagem mutante, em intervalos de 2 horas em AMM com tartarato de amônio ou nitrato de magnésio.

Pode-se observar na figura 14, que a porcentagem da germinação dos conídios da linhagem selvagem não se alterou significativamente tanto em condições

de indução como em repressão. Diferente da porcentagem observada na linhagem *niiA::ypkA*, em que principalmente depois de 8 horas de crescimento, foi observada uma grande diferença (19%) na porcentagem de germinação dos esporos quando o gene *ypkA* se encontrava em repressão em comparação com a condição de indução.

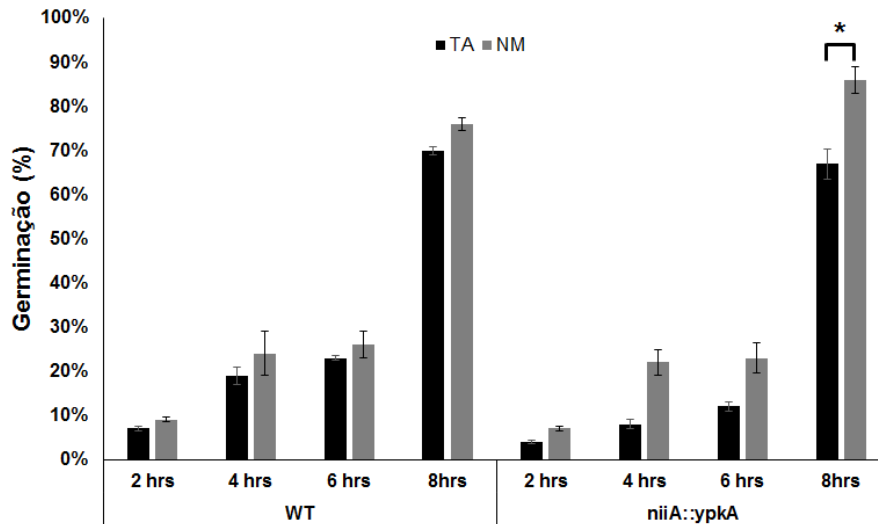


Figura 14: Gráfico da cinética de germinação dos conídios da linhagem mutante *niiA::ypkA* e selvagem em AMM com tartarato de amônio ou nitrato de magnésio, 1×10^6 de conídios cresceram durante 2; 4; 6 e 8 horas de crescimento á 37°C. A contagem dos conídios foi efetuada através de microscopia de campo claro em um aumento de 40x. * $p \leq 0,05$

Analisando o fenótipo das hifas através de microscopia de campo claro utilizando contraste diferencial de intensidade (DIC), depois de 12 horas de crescimento, podemos observar uma grande anormalidade no crescimento e estrutura das hifas da linhagem *niiA::ypkA*, quando a expressão do gene se encontra reprimida por tartarato de amônio (figura 15). As hifas do mutante condicional, em condições de repressão, apresentam menor comprimento e várias ramificações disformes emergindo de um conídio, diferente da linhagem selvagem em condições de repressão e indução e do mutante condicional em indução, em que as hifas apresentam o mesmo fenótipo saudável, com comprimento adequado e com somente uma ou duas ramificações contínuas emergindo de um conídio. Assim,

podemos supor que o gene *ypkA* de *A. fumigatus* está relacionado com a cinética de germinação desse fungo.

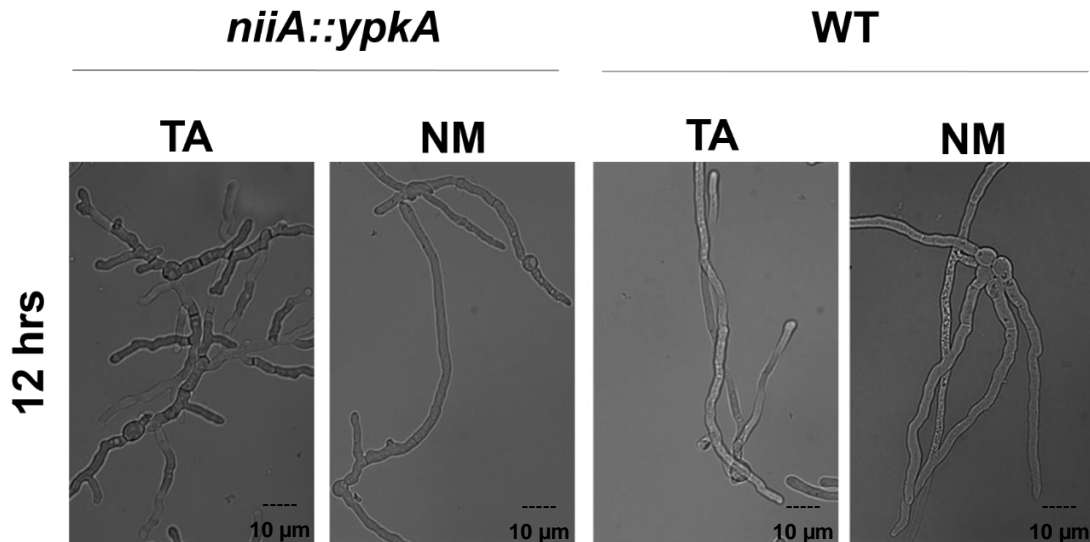


Figura 15: Morfologia das hifas do mutante *niiA::ypkA* através de microscopia em contraste óptico com objetiva de 100X, com 1×10^6 de conídios inoculados em AMM com tartarato de amônio ou nitrato de magnésio, por 12 horas a 37°C.

4.6.3. Quantificação de Ergosterol

Jangadas lipídicas (“lipids rafts”) são constituídos por pequenos domínios, heterólogos, altamente enriquecidos com esteróis e esfingolípídios que participam de processos celulares (El-Sayed *et al.*, 2013). Assim, podemos supor que alguma mudança na síntese de esfingolípídios pode causar alterações na produção de ergosterol do fungo ou em sua localização na célula, através de mecanismos compensatórios. Diante disso uma primeira abordagem utilizada neste estudo foi a quantificação do conteúdo total de ergosterol das hifas. Para que fosse efetuada a quantificação, o ergosterol das linhagens selvagem, *niiA::ypkA* e $\Delta ypkA$ foi extraído com metanol e analisado por HPLC. O ergosterol foi obtido através dos micélios do mutante condicional e da linhagem selvagem, em que 10^7 de conídios foram incubados por 24 horas á 37°C, em AMM com 10mM de nitrato de magnésio ou com 50 mM de tartarato de amônio. Já O mutante $\Delta ypkA$ e seu controle foram incubados em YG á 37°C por 120 horas. Como resultado, obteve-se um aumento da

quantidade de ergosterol encontrada no mutante nulo, quando comparada com a linhagem selvagem (figura 16).

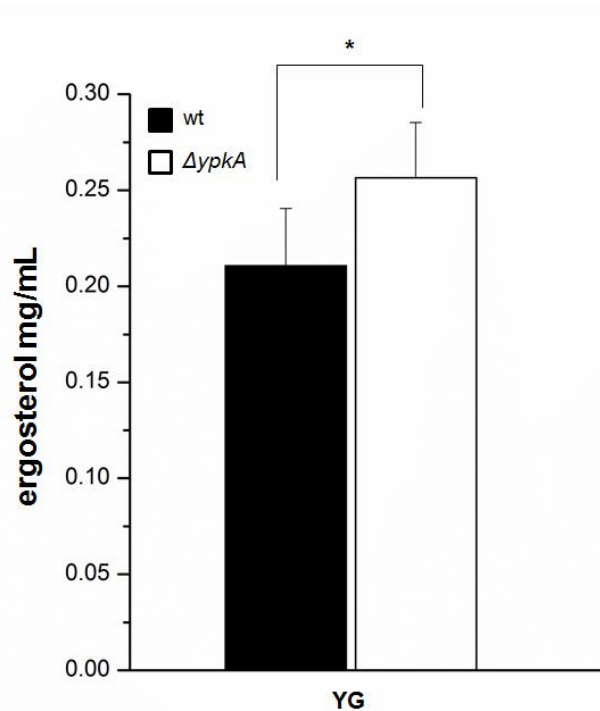


Figura 16: Quantificação do ergosterol na linhagem selvagem (10^2 de esporos) e do mutante $\Delta ypkA$ de *A. fumigatus*, crescidos em YG por 120 horas. As amostras foram equalizadas através da pesagem dos micélios liofilizados e da dosagem de glicose no meio de cultura de forma a se obter o mesmo consumo de glicose durante o crescimento já que a taxa de crescimento no mutante nulo é muito diferente daquela da linhagem selvagem. * $p \leq 0,01$.

As análises da linhagem mutante *niiA::ypkA*, também mostraram um aumento da quantidade de ergosterol encontrada no mutante condicional, quando a expressão do gene estava reprimida, e uma diminuição de ergosterol quando o gene se encontrava induzido, em comparação com a linhagem selvagem (figura 17).

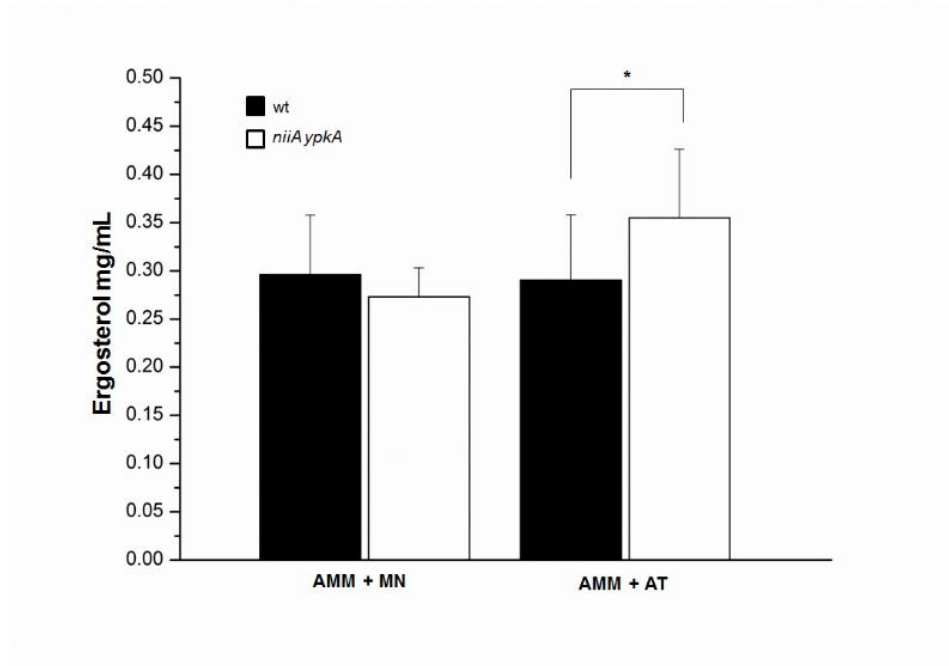


Figura 17: Quantificação do ergosterol, com 2×10^7 de esporos tanto da linhagem mutante quanto da selvagem, em AMM com tartarato de amônio ou nitrato de magnésio, a 37°C por 24 horas. * $p \leq 0,01$

Para que fosse possível determinar se os lipídios membranares estavam a ser entregues ao ápice das hifas durante a sua formação, foi realizado um teste de microscopia utilizando a filipina como marcador de ergosterol. A filipina é um antibiótico de polieno fluorescente que se liga a esteróis (Van Leeuwen *et al.*, 2009).

1×10^6 conídios tanto da linhagem selvagem quanto do mutante *niiA::ypkA*, foram inoculados em placas de petri contendo 2 mL de meio AMM, com tartarato de amônio ou com nitrato de magnésio, e com uma lamínula ao fundo. As placas foram incubadas a 37°C por 12 horas e depois as lamínulas foram marcadas com a filipina e observadas em microscópio de fluorescência. Foi observada uma coloração intensa na extremidade das hifas da linhagem selvagem quando cultivada quer na presença de nitrato de sódio ou tartarato de amônio (dados não apresentados). Por outro lado, a marcação com a filipina em germinantes da linhagem *niiA::ypkA* mostrou que o acúmulo de ergosterol foi localizado de forma uniforme por toda a extensão da hifa em condições de repressão (amônia). Nas hifas crescidas na presença de nitrato de magnésio a marcação foi localizada na extremidade das hifas do mutante, da mesma forma que o observado na linhagem selvagem, mais uma

vez indicando a funcionalidade da regulação do promotor *niiA* nesta linhagem (Figura 18).

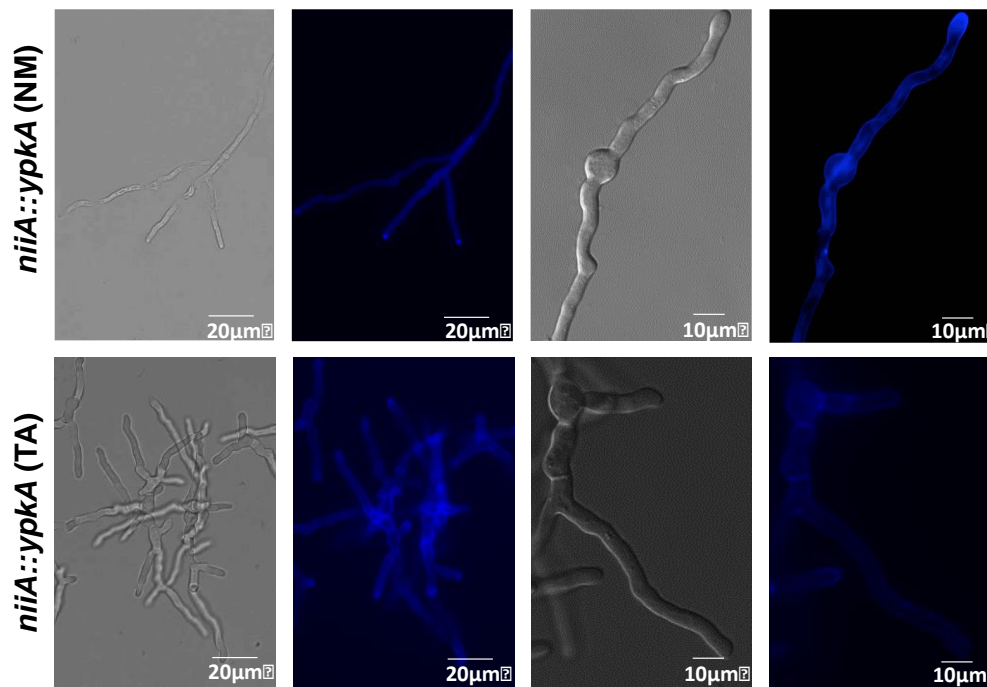


Figura 18: Distribuição de ergosterol pela membrana das hifas do mutante *niiA::ypkA*, através de microscopia de fluorescência utilizando o corante filipina, 1×10^6 de conídios foram inoculados em AMM com tartarato de amônio ou nitrato de magnésio, por 12 horas a 37°C .

Estes resultados indicam que pode haver um mecanismo compensatório entre a síntese de esfingolípídios e de ergosterol, já que a repressão e a deleção do gene *ypkA* que regula a síntese de esfingolípídios, promove alterações na distribuição e nos níveis de ergosterol em *A. fumigatus*.

4.6.4. Testes Fenotípicos com o Mutante Condicional *niiA::ypkA* na Presença de Drogas Estressoras da Parede Celular e Inibidoras da Síntese de Lipídios e Esfingolípídios

Em *S. cerevisiae*, *PKH1/2* e *YPK1/2* são genes responsáveis pela regulação da biossíntese de esfingolípídios, principalmente *YPK1/2*, que inibem os genes *ORM1/2* reativando a primeira enzima responsável pela síntese de esfingolípídios

(Dickson *et al.*, 2006, Roelants *et al.*, 2011). Ainda em *S. cerevisiae*, os genes presentes na via de integridade da parede celular estão relacionados com alguns genes envolvidos na biossíntese de esfingolipídios. Por exemplo, *PKH1/2* podem ativar *PKC1*, gene que está diretamente relacionado com a manutenção da integridade da parede celular fúngica. Ainda *YPK1/2* podem ativar o gene *MPK1*, responsável por regular a via de MAP quinase e a ativação do fator de transcrição *RLM1* (Roelants *et al.*, 2002). Sendo assim, tanto a linhagem selvagem quanto a *niiA::ypkA* foram expostas a drogas e agentes que interferem na síntese de lipídios, de esfingolipídios ou na integridade da parede celular, com o intuito de esclarecer o papel do gene *ypkA* nesses processos.

Os testes foram realizados pela técnica de “drop-out”, em placas de Petri contendo meio mínimo modificado (AMM) na presença tanto da droga quanto de nitrato de magnésio (10 mM), ou na presença da droga junto com tartarato de amônio (50 mM).

Dentre as drogas testadas está a cafeína, um análogo da purina com potencial mutagênico em bactérias e fungos, provocando efeitos pleiotrópicos que conduzem a morte celular, mas que tem sido utilizado para a avaliação de fenótipos relacionados a integridade da parede celular em fungos, incluindo *A. fumigatus* (Kuranda, 2006, Valiante *et al.*, 2008, Valiante *et al.*, 2009, Rocha *et al.*, 2015). O dodecil sulfato de sódio (SDS), um detergente que atua na fragilização da membrana celular, também foi utilizado para as análises com o intuito de verificar se a membrana da linhagem *niiA::ypkA*, quando em repressão, estaria mais susceptível a ação detergente do SDS quando comparado com a linhagem selvagem (Valiante *et al.*, 2008).

Também foram usados agentes para identificar a sensibilidade do mutante, quando em repressão, as alterações na via da integridade da parede celular, como o Calco Flúor White (CFW) e o Congo Red (CR). Ambos os compostos são formados por dois grupos de ácido sulfônico, de tal forma que exercem sua atividade somente quando um dos seus grupos de ácido sulfônico se torna negativamente carregado, geralmente quando estão solubilizados em condições ligeiramente básicas ou neutras (Roncero C, 1988.). Em fungos, CFW e CR tem como alvo a biossíntese de quitina ou a ligação de polímeros de quitina para a β -1,3-glucano e β -1,6-glucano,

resultando no enfraquecimento da parede celular (Ram AF, 2006, Rocha *et al.*, 2015).

As linhagens de *A. fumigatus* foram testadas em várias concentrações diferentes de cafeína; SDS; CFW e CR, porém como pode ser observado na figura 19, o mutante *niiA::ypkA* em repressão não demonstrou grande diferença de sensibilidade, quando comparado com a linhagem selvagem, em nenhuma dessas drogas citadas. Isso indica que o gene *ypkA* de *A. fumigatus* não participa da via de integridade da parede celular, pois as drogas estressoras de parede não interferem no crescimento do mutante *niiA::ypkA* tanto em condições de indução quanto de repressão, quando comparados com a linhagem selvagem.

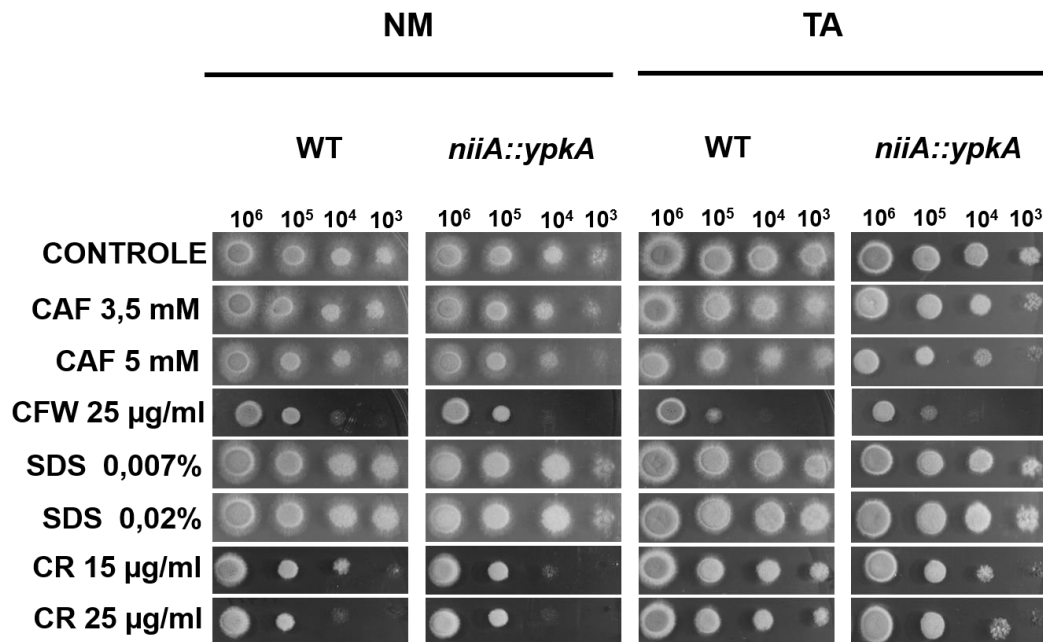


Figura 19: Teste do mutante condicional *niiA::ypkA* frente a drogas estressoras da parede celular. Utilizando a cafeína nas concentrações de 3,5 mM e 5 mM; CFW na concentração de 25 µg/ml; SDS nas concentrações de 0,007% e 0,002%, e CR nas concentrações de 15 µg/ml e 25 µg/ml. Os testes foram realizados em AMM + tartarato de amônio ou nitrato de magnésio, á 37°C por 48 horas, com as soluções de esporos nas concentrações seriadas de 10⁶; 10⁵; 10⁴ e 10³.

Também foram realizados testes frente a ação de azólicos, como voriconazol; itraconazol e fluconazol, que são drogas inibidoras da enzima lanosterol desmetilase e conseqüentemente da biossíntese de ergosterol na membrana plasmática fúngica. Outros medicamentos, como a anfotericina B, que se liga fortemente ao ergosterol, e a caspofungina, que atua como inibidor de (1,3) - β -D -

glucano – sintase (Hong *et al.*, 2005, Shapiro *et al.*, 2011), também foram utilizados nas análises. Porém, o mutante condicional *niiA::ypkA*, em repressão, não mostrou sensibilidade a essas drogas quando comparado com a linhagem selvagem (dados não mostrados).

A miriocina [2-amino-3,4-di-hidroxi-2- (hidroximetil) -14-oxoicos-6-enóico], MYR, é um metabólito patogênico de insetos, encontrado no fungo *Isaria sinclairii* (Strader *et al.*, 2011). É um análogo da esfingosina que possui propriedades imunossupressoras mais potentes do que a ciclosporina (de Melo *et al.*, 2013). A miriocina inibe o passo inicial na biossíntese de esfingolipídios, prejudicando potencialmente a formação dos esfingolipídios complexos (Figura 2). Essa droga possui duas formas de inibição a SPT (primeira enzima da síntese de esfingolipídios), uma delas é sendo um inibidor competitivo da serina e da palmitoil-CoA, não permitindo que se liguem e deem início a síntese. A segunda forma atua como um inibidor suicida, formado entre aldeído e o sítio ativo de lisina (retro-aldol-like) (Kurek *et al.*, 2014). Essa droga possui um potencial antifúngico, inibindo o crescimento do patógeno oportunista humano, *Candida albicans* (de Melo *et al.*, 2013).

A lovastatina (LOV) é uma estatina que atua inibindo a 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase, que é uma enzima limitante da velocidade da via do mevalonato, interferindo na síntese de ergosterol e colesterol, e prejudicando a estrutura da membrana celular. Devido a sensibilidade de *S. cerevisiae* e *C. neoformans* a essa droga, podemos considerar a lovastatina como um potencial antifúngico (Lorenz *et al.*, 1990, Urbina *et al.*, 1993, Chamilos *et al.*, 2006).

Assim, podemos observar na figura 20, a maior sensibilidade à diferentes concentrações dessas duas drogas citadas acima, do mutante *niiA::ypkA*, em repressão, quando comparado com a linhagem selvagem.

A maior sensibilidade a miriocina do mutante condicional, em condições de repressão, pode ser devido ao fato de que a repressão do gene *ypkA* somado a miriocina, que inibe a primeira enzima da biossíntese de esfingolipídios (Figura 2), afeta drasticamente a produção de esfingolipídios e acaba por desregular o crescimento e a integridade celular. Já a sensibilidade a droga lovastatina do mutante *niiA::ypkA* em repressão, pode ser atribuída a desestabilização da

membrana celular, devido a inibição do gene *ypkA* e conseqüentemente da síntese de esfingolípídios, e da inibição da produção de ergosterol proporcionada pela lovastatina, ocasionando na diminuição de desses dois componentes estruturais da membrana celular.

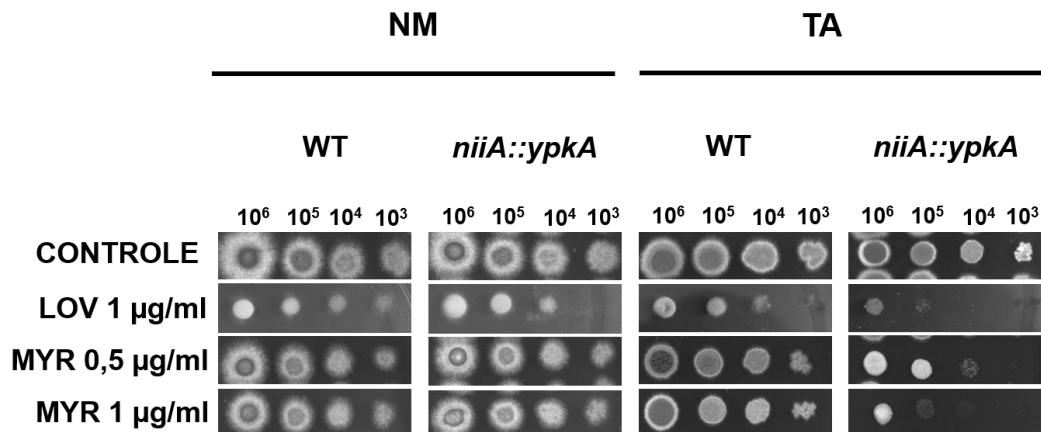


Figura 20: Teste do mutante condicional *niiA::ypkA* frente a drogas inibidoras a síntese de lipídeos. Utilizando a miriocina nas concentrações de 1 µg/ml; 1,5 µg/ml; e a lovastatina na concentração de 1 µg/ml. Os testes foram realizados em AMM + tartarato de amônio ou nitrato de magnésio, á 37°C por 48 horas, com as soluções de esporos nas concentrações seriadas de 10⁶; 10⁵; 10⁴ e 10³.

Os teste efetuados com duas drogas (descritas a seguir), foram feitos em placas de 96 poços contendo meio mínimo modificado (AMM) na presença tanto da droga quanto de nitrato de magnésio (10 mM) ou tartarato de amônio (50 mM).

A aureobasidina A é um antibiótico obtido através do caldo de fermentação da levedura *Aureobasidium pullulans*, constituída por um peptídeo de oito aminoácidos ligados por meio de um hidroxiácido para formar uma estrutura de anel (Takesako *et al.*, 1993). Essa droga é um potente inibidor da enzima IPC sintase (a primeira enzima na síntese de esfingolípídios complexos (Figura 2), e tem forte atividade fungicida *in vitro* contra muitas espécies de fungos patogênicos, incluindo *C. albicans*, *C. neoformans*, e alguns *Aspergillus spp.* (Ikai *et al.*, 1991, Endo *et al.*, 1997, Zhong *et al.*, 1999). Como a aureobasidina A bloqueia a síntese de esfingolípídios complexos, através da inibição da enzima IPC sintase, a linhagem com o gene *ypkA* e conseqüentemente com o início da via de esfingolípídios

reprimidos, apresenta maior sensibilidade à diferentes concentrações da droga. Assim, podemos observar na figura 21 que o mutante *niiA::ypkA*, em repressão, se mostra mais sensível á aureobasidina A quando comparado com a linhagem selvagem.

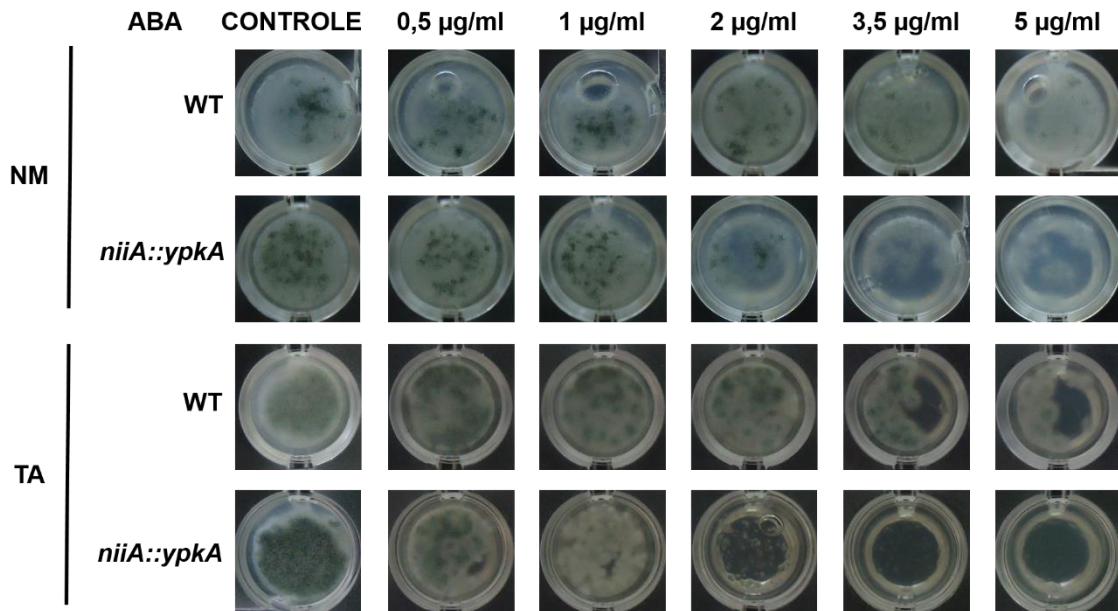


Figura 21: Teste fenotípico com o mutante *niiA::ypkA* de *A. fumigatus*, em repressão e indução sob a ação de 0,5 ug/ml; 1 ug/ml; 2 ug/ml; 3,5 ug/ml e 5 ug/ml da droga Aureobasidina A, com 5×10^2 de esporos, em AMM com tartarato de amônio ou com nitrato de magnésio, á 37°C por 48 horas.

A cerulenina [(2R) - (3S) -2,3-epoxi-4-oxo-7,10-dodecadienoilamida] é um antibiótico isolado a partir de *Cephalosporium caerulens*, descrito primeiramente por Hata e colaboradores (1960), e um potente inibidor de esteróis e da síntese de ácidos graxos. Essa droga inibe a incorporação da Acetil-CoA em fração de ácidos graxos, ou seja, inibe a fase de pós-formação de malonil-CoA e acetil-CoA na biossíntese do ácido graxo e a etapa de pré-formação de mevalonato na biossíntese de esteróis, em leveduras (Hata T, 1960, Omura, 1976, Kawaguchi *et al.*, 1982). A cerulenina inibe fortemente o crescimento de leveduras tais como *Saccharomyces*, *Candida* e *Cryptococcus* in vitro, e moderadamente inibe o crescimento de fungos filamentosos tais como *Epidernzophyton*; *Trichoplzyton*; e também de bactérias como *Mycobacterium*; *Nocardia* e *Streptomyces* (Kawaguchi *et al.*, 1982, Georgopapadakou *et al.*, 1987). Devido a possível relação do gene *ypkA* com a

biossíntese de esfingolipídios, que possuem como base da sua estrutura os ácidos graxos (Coward *et al.*, 2007), podemos observar na figura 22, a maior sensibilidade à diferentes concentrações da droga, do mutante *niiA::ypkA*, em repressão, quando comparado com a linhagem selvagem, indicando que a inibição da formação de ácidos graxos e a repressão de *ypkA* prejudicam a síntese de esfingolipídios.

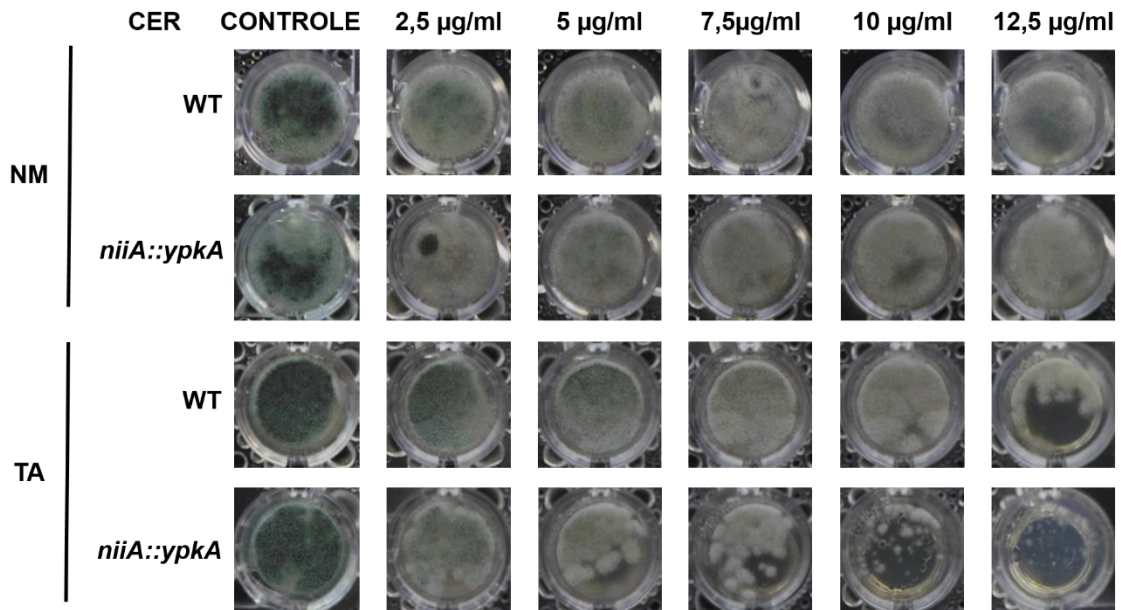


Figura 22: Teste fenotípico com o mutante *niiA::ypkA* de *Aspergillus fumigatus*, em repressão e indução sob a ação de 2,5 ug/ml; 5 ug/ml; 7,5 ug/ml; 10 ug/ml e 12 ug/ml da droga cerulenina, com 5×10^2 de esporos inoculados em AMM com tartarato de amônio ou com nitrato de magnésio, á 37°C por 48 horas.

4.7. Análise da Expressão de Genes Relacionados a Síntese de Esfingolipídios Frente ao Choque Térmico

Um dos efeitos do choque térmico é o desenovelamento de proteínas, desempenhado por proteínas de choque térmico conhecidas como chaperonas, que ativam vários processos celulares, como a expressão de genes envolvidos na integridade da parede celular; organização do citoesqueleto; no transporte molecular e vesicular, geração de energia, defesa contra o estresse oxidativo, transdução de sinal, metabolismo dos carboidratos, entre outros (Albrecht *et al.*, 2010).

A membrana plasmática serve como um sensor direto do meio ambiente do organismo. Sua estrutura lipídica é importante para a determinação das propriedades físico-químicas do ambiente, com o empacotamento molecular de lipídeos que atuam como um determinante direto da fluidez da membrana. A fluidez da membrana é regida por um equilíbrio complexo entre os ácidos-graxos saturados e insaturados, que em temperaturas fisiológicas, é aumentada através de ácidos-graxos insaturados, não empacotados, ao passo que os ácidos-graxos saturados permanecem firmemente empacotados. Consequentemente, a saturação de lipídeos é regulada em resposta a mudanças na temperatura (Leach *et al.*, 2014)

Em *S. cerevisiae* a síntese de esfingolipídios é regulada pelas AGC quinases Ypk1p e Ypk2p, através da fosforilação e inibição das proteínas Orm1p e Orm2p responsáveis pela inibição da SPT, a primeira enzima na biossíntese de esfingolipídios. Ainda, a ativação de Ypk1p e Ypk2p requer a fosforilação Pkh1p e Pkh2p (Roelants *et al.*, 2011, Niles *et al.*, 2012).

Assim, a expressão dos genes *ypkA*; *pkhA* e *ormA* de *A. fumigatus*, homólogos dos genes de *S. cerevisiae* relacionados a síntese de esfingolipídios, foi analisada frente ao choque térmico por qPCR, a partir de cDNA.

Os cDNAs utilizados foram obtidos através da extração e transcrição de RNAs do mutante *niiA::ypkA* e da linhagem selvagem, com 2×10^7 de esporos crescidos á 30°C, por 48 horas em AMM na presença de tartarato de amônio, e submetidos ao choque térmico a 37°C e 48°C durante 15, 30 e 60 minutos.

Na figura 23, podemos observar que a expressão do gene *ypkA* do mutante condicional *niiA::ypkA*, em repressão, apresentou o comportamento esperado, apresentando uma expressão relativa menor do que 1 quando induzido aos vários choques térmicos frente aos determinados períodos de tempo. A expressão de *ypkA* na linhagem selvagem também apresentou um comportamento esperado frente aos choques térmicos, com diferenças não significativas na expressão de *ypkA*.

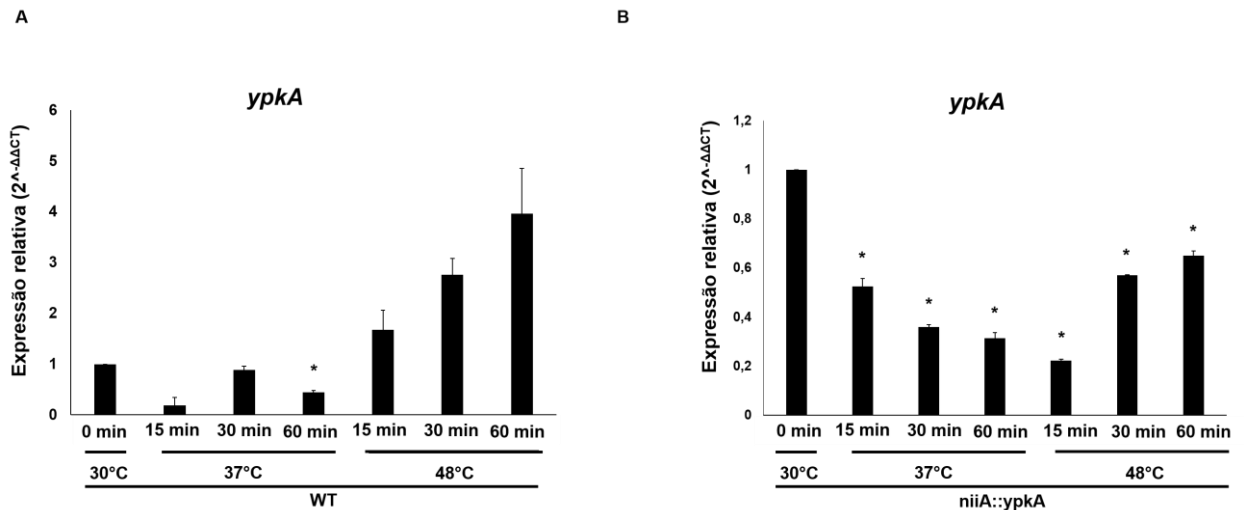


Figura 23: (A) Expressão relativa do gene *ypkA* na linhagem selvagem em AMM com tartarato de amônio. (B) Expressão relativa do gene *ypkA* na linhagem mutante *niiA::ypkA* em AMM com tartarato de amônio. * $p \leq 0,05$

Já na figura 24, podemos observar um aumento da expressão do gene *pkhA* no mutante condicional *niiA::ypkA* quando induzido ao choque térmico de 48°C por 60 min, e uma diminuição da expressão de *ypkA* principalmente nos choques de 37°C por 60 min e de 48°C por 15 min. Já a linhagem selvagem apresenta um aumento da expressão do gene quando foi induzida aos choques térmicos de 37°C por 60 min e de 48°C por 30 min, e uma diminuição da expressão de *pkhA* principalmente no choque de 37°C nos tempo de 15 min e 30 min.

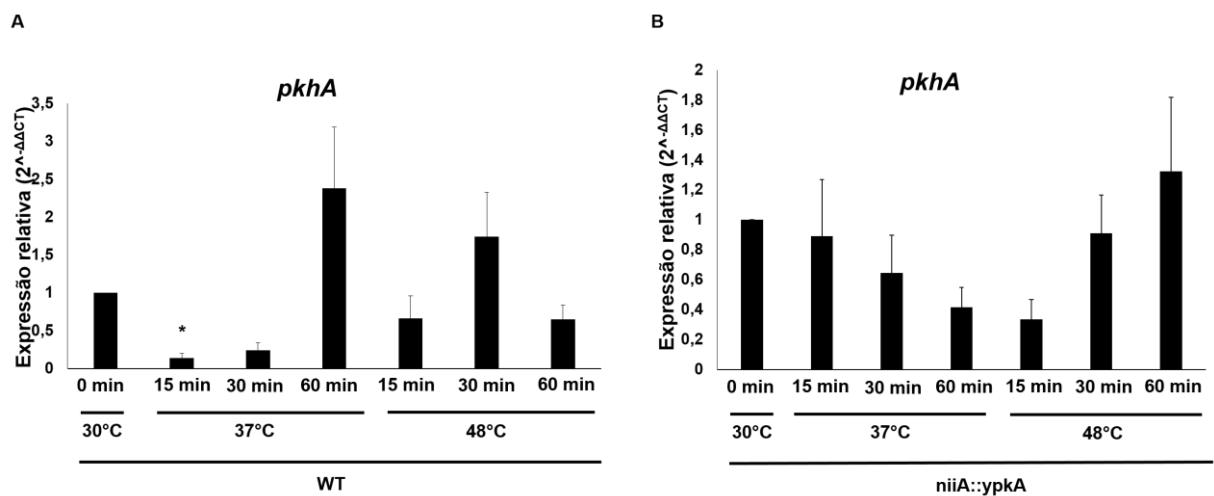


Figura 24: (A) Expressão relativa do gene *pkhA* na linhagem selvagem em AMM com tartarato de amônio. (B) Expressão relativa do gene *pkhA* na linhagem mutante *niiA::ypkA* em AMM com tartarato de amônio. * $p \leq 0,05$

Por último, podemos observar na figura 25, que a expressão do gene *ormA* (inibidor da SPT, ver Figura 3) possui uma diminuição na expressão do mutante condicional *niiA::ypkA* quando induzido ao choque térmico frente as temperaturas de 37°C e 48°C e em todos os tempos. Diferente da linhagem selvagem que apresenta um aumento da expressão do gene *ormA* quando encontrado a temperatura de 37°C por 60 min, e uma diminuição da expressão do gene principalmente nos choques térmicos de 37°C nos tempo de 15 min e 30 min.

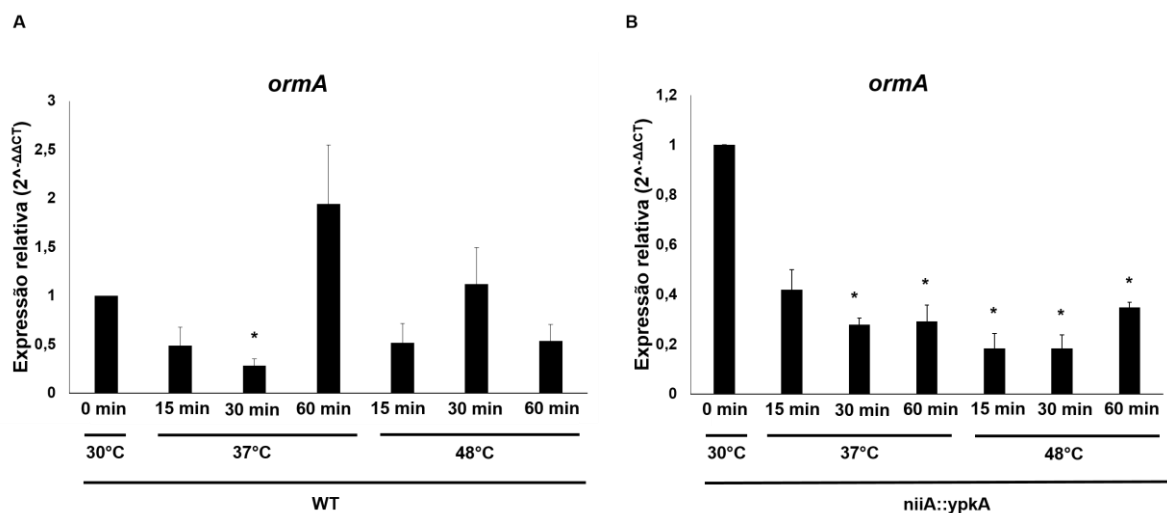


Figura 25: (A) Expressão relativa do gene *ormA* na linhagem selvagem em AMM com tartarato de amônio. (B) Expressão relativa do gene *ormA* na linhagem mutante *niiA::ypkA* em AMM com tartarato de amônio. * $p \leq 0,05$

Assim, os resultados de qPCR parecem não mostrar uma relação direta entre o aumento da temperatura e os genes *ypkA*; *pkhA* e *ormA*.

4.8 Construção dos Duplos Mutantes *niiA::ypkA/ΔrlmA* e *niiA::ypkA/ΔmpkA*

Para que o crescimento celular se torne adequado, a expansão da parede celular deve acompanhar e acomodar o crescimento da membrana plasmática. Em *S. cerevisiae*, Pkh2p e possivelmente Pkh1p, que fosforilam proteínas responsáveis pela síntese de esfingolipídios, também ativam uma proteína presente na via de integridade da parede celular, a Pkc1p (Roelants *et al.*, 2002, Schmelzle *et al.*, 2002).

Fatores de transcrição são proteínas que se ligam a sequencias de DNA, influenciando positivamente a transcrição de genes específicos (Phillips, 2008). O fator de transcrição Rlm1 de *S. cerevisiae* é ativado através da sua fosforilação pela MAP quinase Mpk1p, que é ativada pela fosforilação inicial de Pkc1p, a qual está localizada no topo da cascata de sinalização da via de integridade da parede celular (Watanabe *et al.*, 1995). Rlm1 regula a expressão de pelo menos 25 genes relacionados a síntese e reforço da parede celular (Jung *et al.*, 1999), e ainda segundo Roelants e colaboradores (2002), Rlm1 pode interagir com Ypk1/2p. Em *A. fumigatus* existe um homólogo funcional de *RLM1*, denominado *rlmA* o qual está envolvido na manutenção da integridade da parede celular e na ativação transcricional de alguns genes envolvidos na biossíntese de parede celular. (Rocha *et al.*, manuscrito em preparação).

Assim, para verificar a interação dos genes relacionados a biossíntese de esfingolipídios com os genes de manutenção da via de integridade da parede celular, foi construído primeiramente o duplo mutante $\Delta rlmA/niiA::ypkA$ de *A. fumigatus*.

A construção foi feita através da inserção do cassete de substituição genica *niiA::ypkA* no mutante $\Delta rlmA$ *pyrG*⁻, obtido anteriormente em nosso laboratório pelo trabalho de doutorado da estudante Marina Rocha. As colônias transformantes tiveram seu DNA extraído e testados através da técnica de PCR convencional, utilizando os primers *ypkA* 500 ups e *niiA* REV (Figura 10), confirmando a inserção do cassete de substituição no locus do gene *ypkA* no “background” mutante $\Delta rlmA$ (Figura 26), obtendo assim, o duplo mutante.

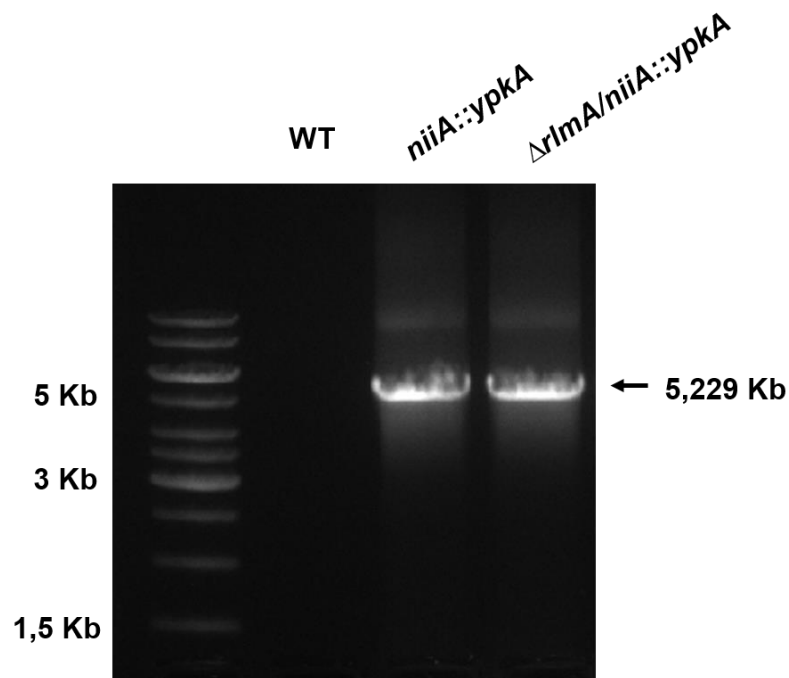


Figura 26: Validação do duplo mutante $\Delta rlmA/niiA::ypkA$ com os primers *ypkA* 500 ups e *niiA* REV para a confirmação da inserção do cassete no locus do gene *ypkA*. (Ver Figura 10 para localização dos primers).

Podemos observar no teste fenotípico a seguir, a maior sensibilidade do duplo mutante $\Delta rlmA/niiA::ypkA$ em repressão, frente as drogas miriocina e lovastatina, quando comparado com o mutante nulo $\Delta rlmA$ e com a linhagem selvagem, porém o duplo mutante apresenta sensibilidade similar a apresentada pelo mutante condicional *niiA::ypkA* (Figura 27), indicando que o fator de transcrição *rlmA* nestas condições não interage geneticamente com *ypkA* em *A. fumigatus*.

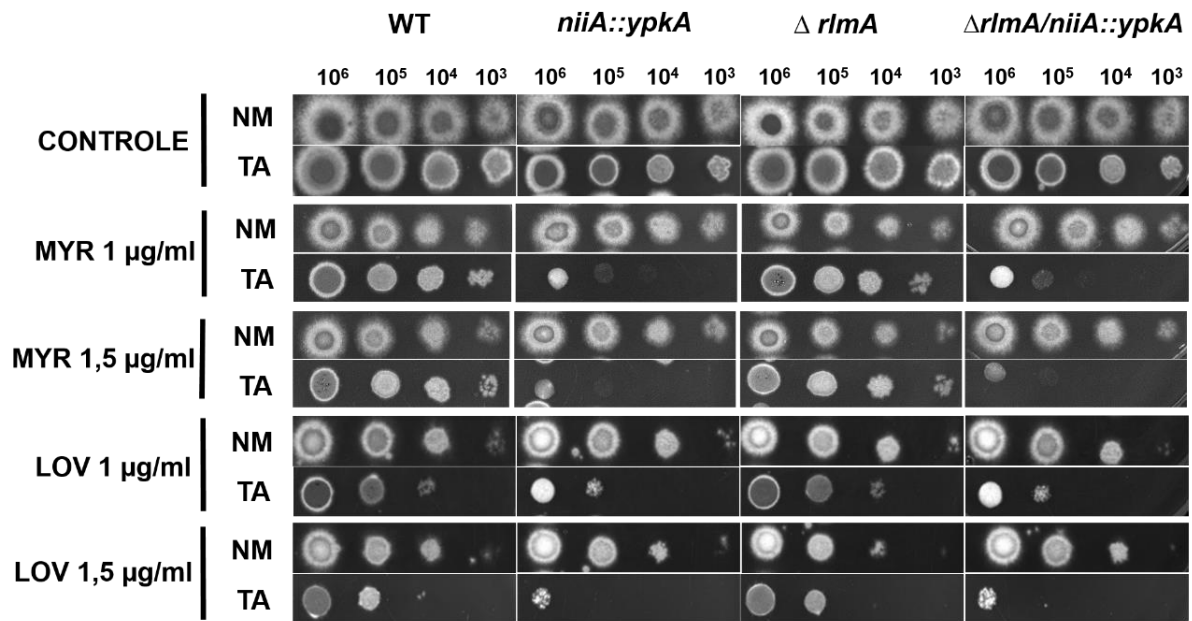


Figura 27: Teste do duplo mutante $\Delta rlmA/niiA::ypkA$ frente a drogas inibidoras a síntese de lipídeos. Utilizando a miriocina nas concentrações de 1 µg/ml; 1,5 µg/ml; e a lovastatina nas concentrações de 1 µg/ml; 1,5 µg/ml. Os testes foram realizados em AMM + tartarato de amônio ou nitrato de magnésio, com as soluções de esporos nas concentrações seriadas de 10⁶; 10⁵; 10⁴ e 10³, á 37°C por 48horas.

Na figura 28, podemos observar que a mesma sensibilidade do duplo mutante mostrada na figura acima, ocorre com as drogas cerulenina e aureobasidina A, ou seja, tanto o duplo mutante $\Delta rlmA/niiA::ypkA$ quanto o mutante condicional *niiA::ypkA*, em repressão, se mostram mais sensíveis a essas drogas do que o mutante nulo $\Delta rlmA$ e da linhagem selvagem. Estes resultados reforçam que não há interação entre o fator de transcrição *rlmA* e o gene *ypkA*, já que a deleção de *rlmA* não interfere na sensibilidade do fungo com o gene *ypkA* reprimido, frente as drogas aureobasidina A e cerulenina.

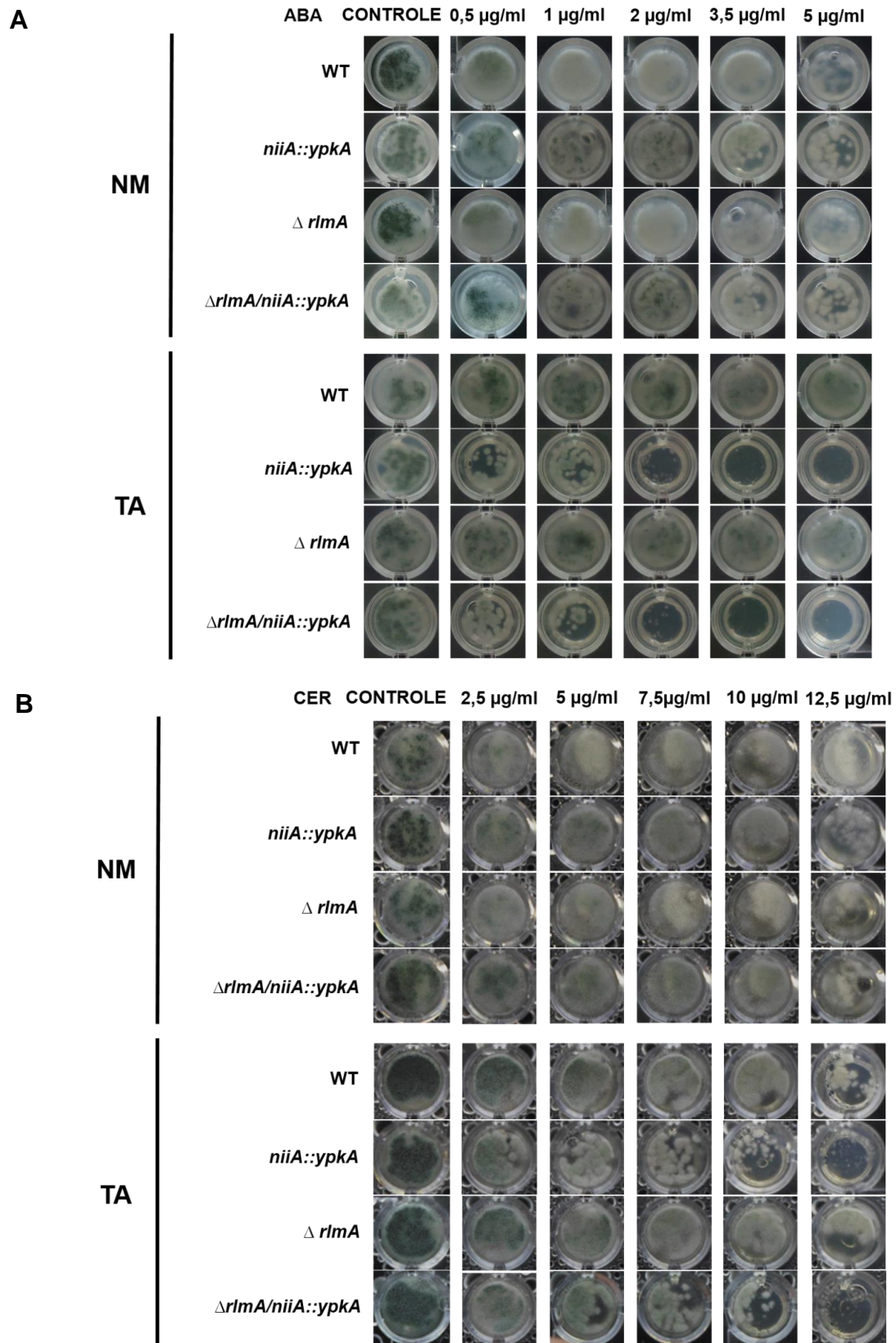


Figura 28: (A) Teste do duplo mutante $\Delta rlmA/niiA::yprkA$ frente a droga aureobasidina A, nas concentrações de 0,5 µg/ml; 1 µg/ml; 2 µg/ml; 3,5 µg/ml e 5 µg/ml, utilizando 5×10^2 de esporos, em AMM + tartarato de amônio ou nitrato de magnésio, á 37°C por 48 horas. (B) Teste do duplo mutante $\Delta rlmA/niiA::yprkA$ na presença da droga cerulenina, nas concentrações de 2,5 µg/ml; 5 µg/ml; 7,5 µg/ml; 10 µg/ml e 12,5 µg/ml, utilizando 5×10^2 de esporos, em AMM + tartarato de amônio ou nitrato de magnésio, á 37°C por 48 horas.

Em *S. cerevisiae* a MAP quinase Mpk1p, é um componente essencial da via de integridade da parede celular, ainda segundo Roelants e colaboradores (2002), Mpk1p está relacionada indiretamente com a via de biossíntese de esfingolipídios. Em *A. fumigatus* o homólogo de Mpk1p, denominado MpkA, é também um gene chave na manutenção da integridade da parede celular (Valiante *et al.*, 2009). Porém, o gene *mpkA* não foi estudado sobre o seu papel da regulação da manutenção da integridade da parede celular durante o defeito associado à via de síntese de esfingolipídios.

Sendo assim, outro duplo mutante também foi construído para as análises, através da inserção do cassete de deleção do gene *mpkA*, obtido através do mutante nulo $\Delta mpkA$. Esse mutante nulo foi obtido anteriormente em nosso laboratório (cedido por Dr. Axel A. Brakage, Alemanha) e foi construído através da substituição do gene *mpkA*, pelo gene *ptrA* de *A. oryzae* (Valiante *et al.*, 2009). Esse gene pode ser utilizado como substituto do gene *pyrG* na construção do cassete de deleção, pois proporciona ao mutante construído resistência a droga piritiamina, funcionando como marcador de seleção dos transformantes (Kubodera *et al.*, 2000).

Assim, o cassete de deleção foi inserido na linhagem *niiA::yprkA* através do método de transformação em meio mínimo com sorbitol, já explicado anteriormente, as colônias transformantes foram isoladas em meio seletivo com piritiamina, e depois tiveram seu DNA extraído para confirmação da linhagem mutante *niiA::yprkA/ΔmpkA* através de PCR convencional, utilizando o primer *mpkA* 600 ups e a extremidade 3' do gene. Na figura 29A, podemos observar que o duplo mutante apresenta uma banda maior (aprox. 6000 pb), quando comparada a linhagem selvagem (5.600 pb), mostrando a inserção do cassete de deleção no locus do gene *mpkA* no mutante *niiA::yprkA*. Além disso também foi realizada outra PCR utilizando

primers que amplificam 200 pb do gene *mpkA* com os primers *mpkA* FW e *mpkA* REV. Esse resultado mostra a ausência de amplificação desse fragmento no mutante $\Delta mpkA$ e no duplo mutante $\Delta mpkA$ *niiA::ypkA* (Figura 29B).

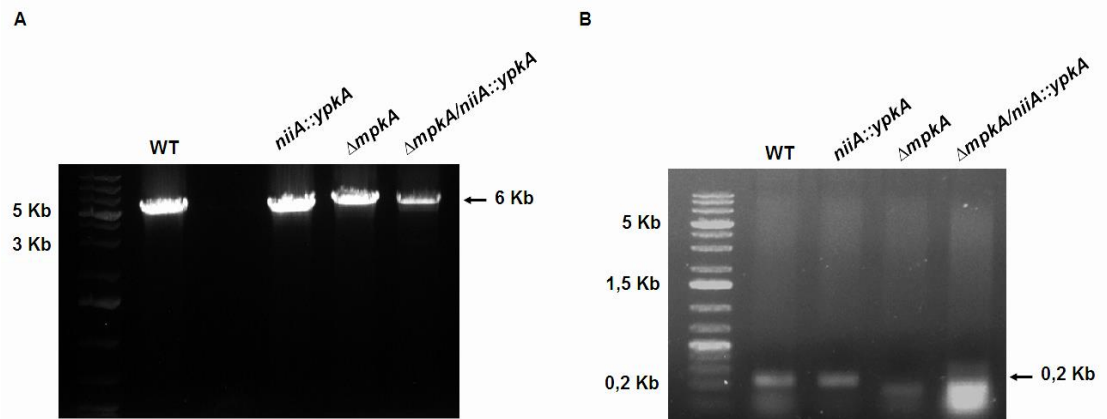


Figura 29: (A) Validação do duplo mutante *niiA::ypkA/ΔmpkA* com os primers *mpkA* 600 ups (para confirmação no locus do gene *mpkA*) e *mpkA* 3' REV. (B) PCR do duplo mutante utilizando os primers *mpkA* FW e *mpkA* REV, para verificar a ausência da amplificação da ORF no duplo mutante.

Foram realizados testes com as drogas que interferem na síntese de esfingolípídeos e ergosterol, que mostraram que o mutante duplo $\Delta mpkA/niiA::ypkA$, quando em repressão, apresenta grande sensibilidade a essas drogas quando comparado com as linhagens mutantes parentais e com a linhagem selvagem. Podemos observar na figura 30, que o duplo mutante $\Delta mpkA/niiA::ypkA$ apenas em condição de repressão, sem interação com drogas, possui o crescimento alterado e forma colônias bem menores quando comparadas com as colônias formadas pelo mutante *niiA::ypkA*, pelo mutante nulo $\Delta mpkA$ e pela linhagem selvagem, indicando letalidade sintética entre os genes *mpkA* e *ypkA*.

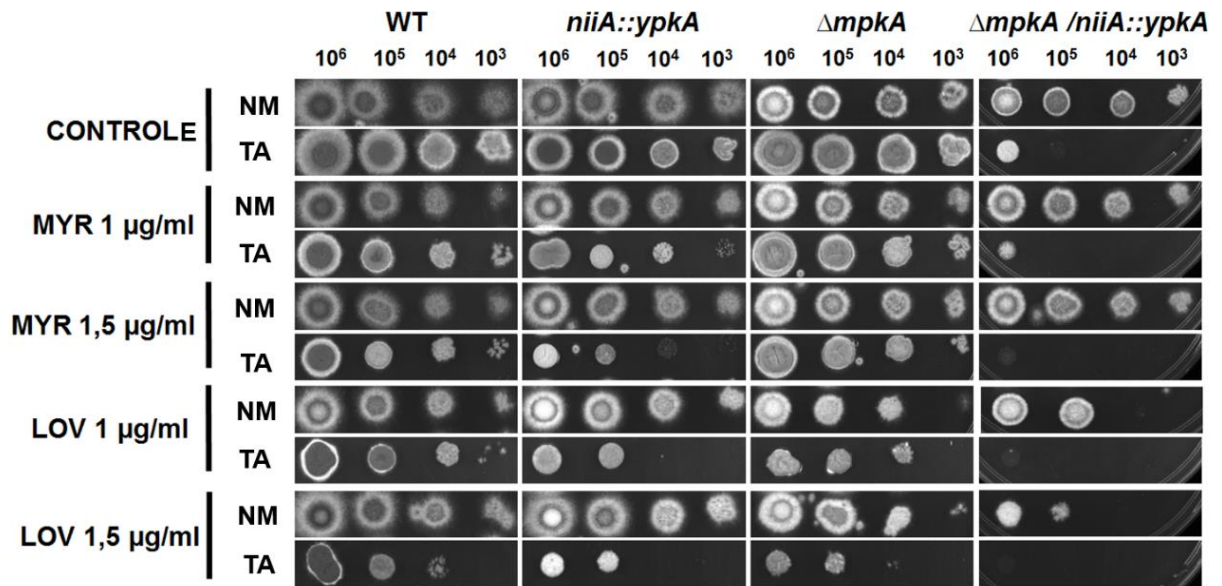


Figura 30: Teste do duplo mutante $\Delta mpkA/niiA::ypkA$ frente a drogas inibidoras a síntese de lipídeos. Utilizando a miriocina nas concentrações de 1 $\mu\text{g/ml}$; 1,5 $\mu\text{g/ml}$; e a lovastatina nas concentrações de 1 $\mu\text{g/ml}$; 1,5 $\mu\text{g/ml}$. Os testes foram realizados em AMM + tartarato de amônio ou nitrato de magnésio, com as soluções de esporos nas concentrações seriadas de 10^6 ; 10^5 ; 10^4 e 10^3 , a 37°C por 48 horas.

Na figura 31, podemos observar que os testes efetuados com a cerulenina e com a aureobasidina A apresentam maior sensibilidade do duplo mutante $\Delta mpkA/niiA::ypkA$, em repressão, quando comparado com as demais linhagens.

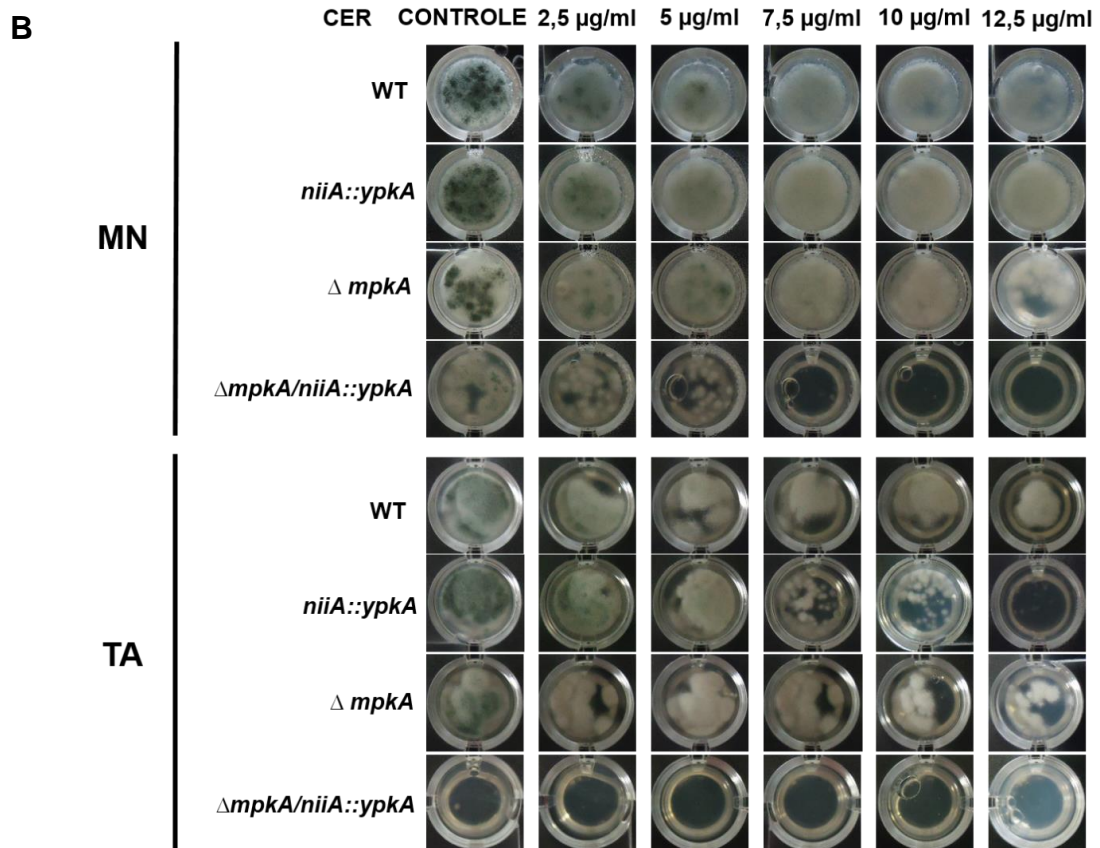
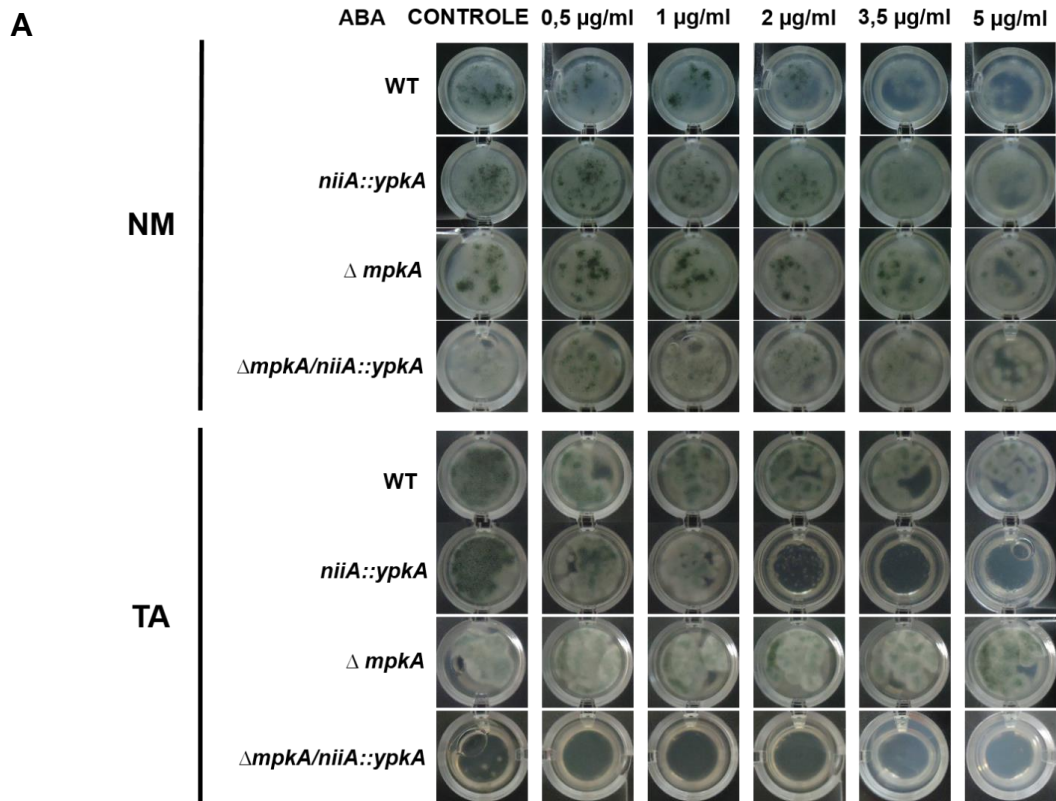


Figura 31: (A) Teste do duplo mutante $\Delta mpkA/niiA::ypkA$ frente a droga aureobasidina A, nas concentrações de 0,5 µg/ml; 1 µg/ml; 2 µg/ml; 3,5 µg/ml e 5 µg/ml, utilizando 5×10^2 de esporos, em AMM + tartarato de amônio ou nitrato de magnésio, a 37°C por 48 horas. (B) Teste do duplo mutante $\Delta mpkA/niiA::ypkA$ na presença da droga cerulenina, nas concentrações de 2,5 µg/ml; 5 µg/ml; 7,5 µg/ml; 10 µg/ml e 12,5 µg/ml, utilizando 5×10^2 de esporos, em AMM + tartarato de amônio ou nitrato de magnésio, a 37°C por 48 horas.

Estes resultados reforçam que os genes *ypkA* e *mpkA* estão interagindo através de vias paralelas, já que a sensibilidade do mutante condicional em condição de repressão de *ypkA*, frente as drogas aureobasidina A e cerulenina, aumenta de forma que não há crescimento algum do fungo, quando deletado também o gene *mpkA*, tanto na presença quanto na ausência das drogas, caracterizando um fenótipo letal sintético.

4.9. Construção do Mutante Nulo $\Delta pkhA$ de *Aspergillus fumigatus*

Apesar de Ypk1p e Ypk2p de *S. cerevisiae* estarem relacionados com Pkh1p e Pkh2p (Surlow *et al.*, 2014), seu único homólogo (YpkA) em *A. nidulans*, não interage com PkhA (Colabardini *et al.*, 2013). Como em *A. fumigatus* essa interação não está bem elucidada, uma linhagem $\Delta pkhA$ foi também construída nesse trabalho.

A construção do cassete foi feita por meio de PCR de fusão dos fragmentos que foram amplificados separadamente, como mostra a figura 32, e transformado pelo método de protoplastização, já utilizado nas outras transformações, na linhagem $\Delta akuB^{ku80} pyrG^-$.

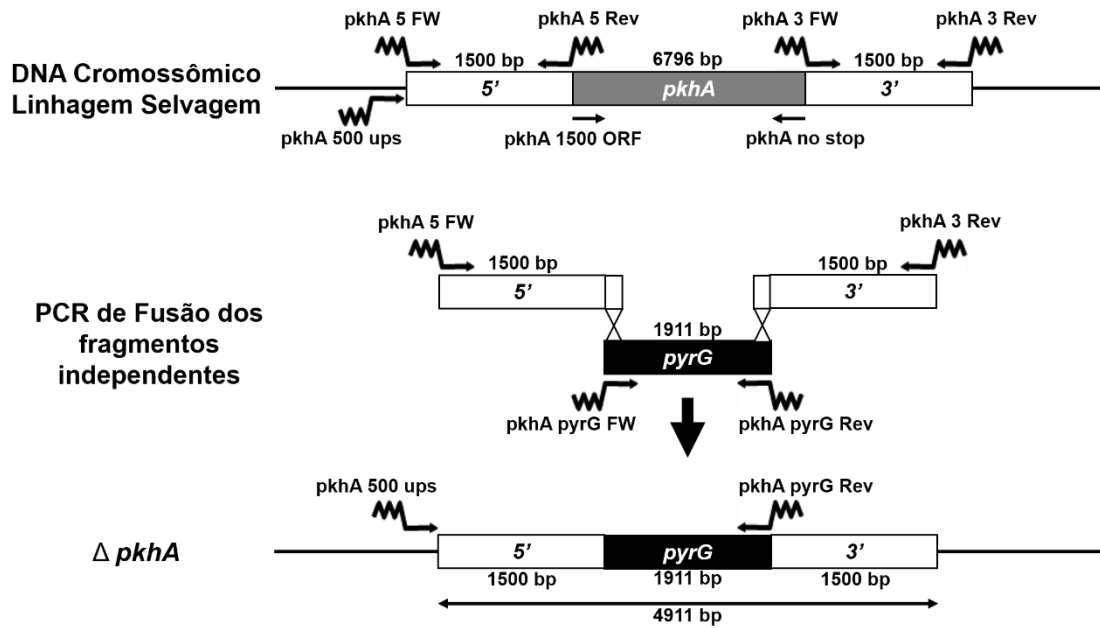


Figura 32: Esquema da construção do cassete de deleção do gene *pkhA* através de PCR de fusão dos fragmentos independentes. Os fragmentos da extremidade 5' e 3' do gene foram amplificados a partir da linhagem Afu293 de *A. fumigatus*, e o fragmento *pyrG*, foi amplificado a partir do vetor pCDA21.

A validação do mutante foi feita por PCR diagnóstica utilizando os primers *pkhA* 500ups e *pyrG* Rev, indicando que o cassete de substituição gênica foi inserido corretamente por um duplo evento de duplo "cross over" no locus do gene *pkhA* indicado pela amplificação de um fragmento de 3.911 pb apenas na linhagem mutante nulo (Figura 33).

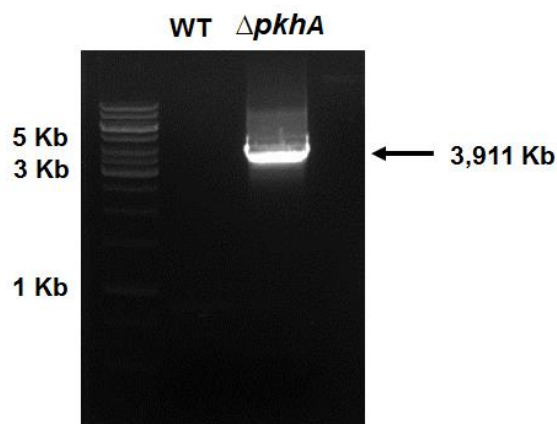


Figura 33: Confirmação da deleção do gene *pkhA* de *A. fumigatus* por PCR, através dos primers *pkhA* 500 ups (para confirmação no locus) e *pyrG* REV. (Ver Figura 32 para localização dos primers).

Até o momento foram realizados poucos experimentos com o mutante $\Delta pkhA$. Dentre estes, foi verificado o crescimento radial dessa linhagem em comparação com a linhagem selvagem. O fenótipo apresentado pelo mutante $\Delta pkhA$, foi o mesmo fenótipo obtido no mutante $\Delta ypkA$, ou seja, as colônias formadas não apresentam indício de conidiação, bem como um crescimento vegetativo bastante restrito, como podemos ver na figura 34 (ver também figura 7). Esses resultados preliminarmente indicam que tanto $ypkA$ quanto $pkhA$ interagem geneticamente de forma epistática e estão envolvidos em uma mesma via de sinalização para a síntese de esfingolipídios, sendo que $\Delta pkhA$ é uma fenocópia de $\Delta ypkA$.

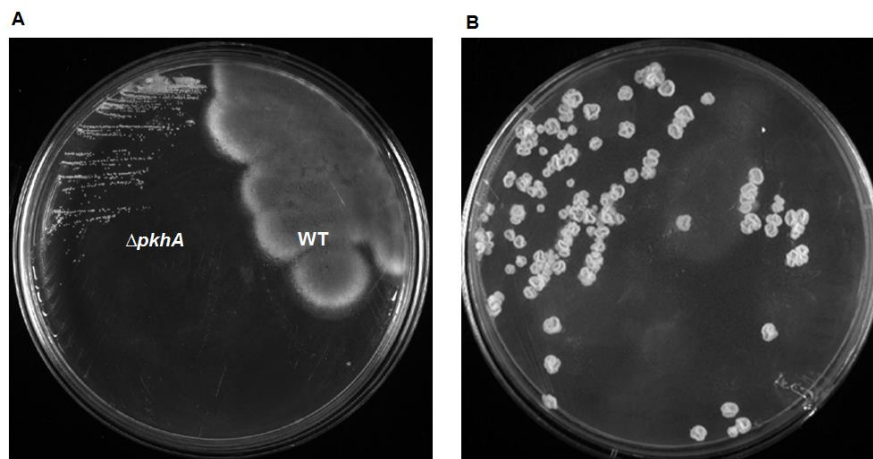


Figura 34: (A) *A. fumigatus* linhagem selvagem (a direita) comparado com o mutante $\Delta pkhA$ (a esquerda), com 48 horas de crescimento, a 37°C em YAG. (B) Fenótipo do mutante $\Delta pkhA$ com 120 horas de crescimento, a 37°C em YAG.

5. DISCUSSÃO

Ypk1p e Ypk2p em *S. cerevisiae*, atuam na regulação de diversas atividades celulares, incluindo a homeostase da síntese de esfingolipídios (Roelants *et al.*, 2011). O duplo mutante $\Delta YPK1/\Delta YPK2$, se mostra inviável e a deleção individual dos genes *ypk1* e *ypk2* torna a levedura mais sensível a drogas e a temperatura quando comparada com a linhagem selvagem (Casamayor *et al.*, 1999, Surlow *et al.*, 2014).

Colabardini e colaboradores (2013) apresentaram que a deleção do gene *ypkA* em *A. nidulans*, acarreta em um fenótipo bastante alterado quando comparado com a linhagem selvagem e limitado crescimento radial e ausência de conidiação. Assim também foi construído nesse mesmo trabalho, um mutante condicional para o gene *ypkA* utilizando o promotor *niiA*, que em condições de repressão se mostrou mais sensível do que a linhagem selvagem, as drogas miriocina e lovastatina. Estes resultados corroboram com os dados apresentados nessa dissertação, pois o mutante nulo $\Delta ypkA$ de *A. fumigatus* apresenta o mesmo fenótipo do mutante $\Delta ypkA$ de *A. nidulans*, e os testes fenotípicos realizados com o mutante condicional também correspondem as análises efetuadas neste trabalho, com o mutante *niiA::ypkA* de *A. fumigatus* quando em repressão, que só apresenta sensibilidade a drogas inibidoras da síntese de lipídios.

Tanto no trabalho de Colabardini e colaboradores (2013) quanto nos dados apresentados nesta dissertação, a repressão mutante *niiA::ypkA* de *A. nidulans* e *A. fumigatus* respectivamente, apresentam alteração na cinética de germinação dos conídios e deformação na morfologia das hifas durante seu crescimento.

Apesar dos resultados dos testes fenotípicos serem semelhantes nos dois trabalhos, o promotor *niiA* em *A. fumigatus* não inquiriu sozinho uma deficiência no crescimento do fungo quando reprimindo o gene *ypkA*, como foi observado no mutante condicional *niiA::ypkA* de *A. nidulans*.

Ainda segundo Colabardini e colaboradores (2013) o gene *pkhA* de *A. nidulans* é essencial, sendo que a deleção desse gene torna o crescimento do fungo inviável. Ainda, este mesmo trabalho apresenta que PkhA não interage com YpkA, o que difere dos seus homólogos em *S. cerevisiae*, Pkh1p e Pkh2p, que interagem e

fosforilam Ypk1p e Ypk2p (Roelants *et al.*, 2002, Surlow *et al.*, 2014). Sendo assim, este trabalho demonstrou que o gene *pkhA* de *A. fumigatus*, apesar de não ser essencial, possui uma importante relação com o desenvolvimento do fungo, pois a deleção desse gene ocasiona em um crescimento celular alterado e sem a presença de esporos. O que também acaba por demonstrar a possível participação de PkhA na ativação de YpkA, já que a deleção independente dos genes *pkhA* e *ypkA* apresentam o mesmo fenótipo, indicando que pertencem a mesma via metabólica.

Em *S. cerevisiae*, Ypk1p e Ypk2p são ativadas por Pkh1p e Pkh2p respectivamente, e possuem a função de reguladoras da síntese de esfingolipídios, pois são responsáveis pela fosforilação de proteínas denominadas Orm1p e Orm2p (Roelants *et al.*, 2002, Roelants *et al.*, 2011). Essas duas últimas proteínas proporcionam a inibição da SPT (enzima participante da via de biossíntese dos esfingolipídios), assim, a fosforilação através de Ypk1/2p, faz com que as proteínas Orm1/2p não mais exerçam sua função sobre a SPT, restaurando os níveis desses lipídeos na célula (Surlow *et al.*, 2014). Assim, a expressão relativa de *ypkA*; *ormA* e *pkhA* de *A. fumigatus*, diante da repressão do próprio *ypkA* frente a choque térmico, foi analisada com o intuito de compreender melhor a interação dos genes *pkhA*; *ypkA* e *ormA* de *A. fumigatus*.

Através dos dados obtidos, foi possível observar que o perfil da expressão do gene *pkhA* segue o mesmo perfil da expressão do gene *ypkA*, no mutante *niiA::ypkA*, diferente da expressão do gene *ormA*, que apresenta um declínio da sua expressão quando o mutante condicional, apresenta o gene *ypkA* reprimido. Porém, os resultados de qPCR apenas dos genes *ypkA*; *pkhA* e *ormA* não se mostraram suficientes para identificar uma relação entre o aumento de temperatura e a via de esfingolipídios.

Os esfingolipídios em conjunto com o ergosterol formam os *lipids rafts*, que são microdomínios ordenados na membrana plasmática da célula, responsáveis por direcionar os eventos de transdução do sinal (Surma *et al.*, 2011, El-Sayed *et al.*, 2013). Francois e colaboradores (2009), demonstraram que a deleção de genes em *S. cerevisiae* relacionados com a síntese de ergosterol e esfingolipídios não aumenta sua sensibilidade a antimicóticos azólicos (inibem a ação da enzima lanosterol desmetilase, que participa da biossíntese de ergosterol). Assim, foi

realizada neste trabalho, a dosagem de ergosterol do mutante nulo $\Delta ypkA$; do mutante condicional *niiA::ypkA* em repressão e em indução do gene; e da linhagem selvagem de *A. fumigatus* com o intuito de verificar uma possível relação entre a síntese de esfingolípídios e a síntese de ergosterol da membrana plasmática desse fungo, através de mecanismos compensatórios. Com a análise das dosagens de ergosterol pudemos verificar que a ausência e a inibição do gene *ypkA* ocasiona em um pequeno aumento da produção de ergosterol da célula, sugerindo que o organismo supre a queda da síntese de esfingolípídios causada pela perda de função de *ypkA* com um aumento na síntese de ergosterol. Os dados também indicam que embora possa haver aumento da síntese de ergosterol, a localização desse lipídeos na membrana celular encontra-se completamente desorganizada, de acordo com o observado nos experimentos de marcação com a sonda filipina que se liga especificamente em ergosterol.

Segundo Roelants e colaboradores (2002), Pkc1p e Mpk1p, proteínas reguladoras da via de integridade da parede celular de *S. cerevisiae*, atuam em uma via paralela a das proteínas Ypk1p e Ypk2p, que regulam a biossíntese de esfingolípídios, estando relacionadas com a eficiência da sinalização dependente dessas proteínas. Ainda, o homólogo de Pkc1p em *A. nidulans*, a PkcA, possui grande similaridade estrutural com a proteína YpkA, sendo esta última até mesmo inicialmente confundida como parálogo de PkcA, e nomeada de PkcB (Herrmann *et al.*, 2006).

Como mostrado na figura 35, a AGC quinase YpkA de *A. fumigatus*, além de apresentar grande similaridade com seu homólogo PkcB em *A. nidulans*, e com seus dois correspondentes Ypk1/2p em *S. cerevisiae*, também possui várias sequências de aminoácidos correspondentes com umas das proteínas reguladoras da via de integridade da parede celular de *A. fumigatus*, a PkcA.


```

ypkA MSWKLTKKLDKTHLAPLNTFTTRSSSTSTIKNESG---EETPVVSQTPSISST-NSNGINASESLVSPVDPVKPGILIVTLHEG 81
pkcB MSWKLTKKLDKETHLAPLQTFTTRSSSTSTIKGDSG---EEAQAPAQTPTISSASSNGIAASEALVSPVAPVKPGILIVTLHEG 82
pkcA GMQCADCKYTCRKCYPKVVTCKISKANYETDPDE---EKINHRIPHRFEGFNISANWCCHCYLLPFGRKSAKRC TECGLTCH 580
ypk1 -----NSSVVVRVSYDASSSTSTVDRDSNG---GNSENTNSSQNLD ET-ANIG-----STGTPNDATSSSGMMTIKVVNG 128
ypk2 -----ASFKNPSGIGNDNSKASERKASQSS-ETQG-PSSES-----GLMTVKVYSG 225

ypkA RGFALSPHFQQVFTSHFQNNNYSVSRPSSSSSHSTHG---QTASFAQSGRPQSTSGGINAAPTTHGRYSTKYL 153
pkcB RSEFALPQHYQQVFSSTIQNG---YSMRPSSSSSHSTHS---QSSSFVPSNRPQSTSSGINAAPTTHGRYSTKYL 151
pkcA AQC THLVPDFCGMSMEAAANQILETLIRAKNHNKSASVS----SGLSGRTL RPPGPPQAPQDNVALAYPQKPVEGAY----- 662
ypk1 DDFILP--FPITSSSEQILNKLASGVPPPHK--EISKE---VDALIAQLSRVQIKNOGPADEDLISSESAAKFIPSTIMLPGSS 205
ypk2 KDEFLP--FPITSNSTILQKLLSSGILTSSNDASEVAAIMRQLPRYKRVDDQSAGEGLIDRA-----FATKFIPISSILLPGST 302

ypkA -----YALLDFEKNQVFDVAVSGTPENPLWAGDNTAFKFDVSRKTE-LNVQLYLRNPSA-----R-PGAGRSEDIFLGAVRV 223
pkcB -----YALLDFDKNQVFDVAVSGTPENPLWAGDNTAFKFDVSRKTD-LNVQLYLRNPAA-----R-PGAGRNDIDIFLGAVK 221
pkcA -----GAPQRQPSAEAISAAANTYIPQSPATAAQRQHIPPRTSSSQ-SPAAAAA-----A-TGLRTPQQASDPNRPV 734
ypk1 TLNPLLYFTIEFDNTVATIEAEYGTIAKP---GFNKISTFDVTRKRLPYLKIDVFARIPSI-----LLPSKTWQQEMGLQDEKL 281
ypk2 NSSPLLYFTIEFDNSITTISSPDMGTMEQPVF---NKISTFDVTRKRLFLKIDVFARIPSLLLPSKNWQ-QEIGEQDEVL---KEI 380

ypkA LPRFEEA-QP----YVDDPKLSKKNQKAAAAHANNERHLGQLGAEWLDLQFGTSGIKIGVSVFVENKQRSLKLEDFDILLKVVGKG 301
pkcB HPRFEEEEIQP----YIDDPKLSKKNQKAAAAHAEQERALGQVGAEWHDLQFGSGSLKISVSVFVESKHRSLKLEDFDILLKVVGKG 302
pkcA QPPSSSHAHY----DPAAYASYQQAIPPQAMQKMGAPYGMPPQQQQQAVAPMQQVAVKKEIPPQQPKVIRIGLDHFNFLAVLKGK 805
ypk1 QTIFDKI-NSNQDIHLDSFHLPLNLSFDSAASRLYNHH-----WITLDNGLGKNISIDYKPSRNKPLSIDDFFLLKVIKQG 358
ypk2 LKKINTN-QD---IHLDSFHLPLNKLKIDSAQIRLYNHH-----WISLERGYGKLNITVDYKPSKNKPLSIDDFFLLKVIKQG 454

ypkA SFGKVMQVMKKDTRIRYALKTIRKAHIISRSEVTHTLAERSVLAQIN---NPFIVPLKFSFQSPKLYLVLAFAVNGGELFHHLQR 383
pkcB SFGKVMQVMKKDTRIRYALKTIRKAHIISRSEVTHTLAERSVLAQIN---NPFIVPLKFSFQSPKLYLVLAFAVNGGELFHHLQR 384
pkcA NFGKVMLAETKSTKLYAIAIKVLKKEFIIENDEVESTKSEKRVFLIANKERHPFLLNLHACFQTETRVYVMEYISGGDMLMLKIQ 890
ypk1 SFGKVMQVRKKDQKVVYALKAIRKSYIVSKSEVTHTLAERTVLARVD---CPFIVPLKFSFQSPKLYLVLAFAVNGGELFYHLQK 440
ypk2 SFGKVMQVRKKDQKIYALKALRKAYIVSKCEVTHTLAERTVLARVD---CPFIVPLKFSFQSPKLYLVLAFAVNGGELFYHLQK 536

ypkA EQRFDINRARFYTAELLCALELHGFKVIYRDLKPENILLDYTGHIACDFGLCKLDMKDEDRTNTFCGTPEYLAPELLLGGY 468
pkcB EQRFDVNRARFYTAELLCALELHGFKVIYRDLKPENILLDYTGHIACDFGLCKLDMKDEDRTNTFCGTPEYLAPELLLGGY 469
pkcA GQ-FGLKRAQFYAAEVLALALYFHENGVIYRDLKDNILLTDGHIKIADYGLCKENMWWYGSTTSTFCGTPEYLAPELLLGGY 974
ypk1 EGRFDLRRARFYTAELLCALDNLHKL DVYRDLKPENILLDYQGHIALCDFGLCKLNMKDDKDTDFCGTPEYLAPELLLGLGY 525
ypk2 EGRFSLARSRYIAELLCALDSLHKL DVYRDLKPENILLDYQGHIALCDFGLCKLNMKDNKDTDFCGTPEYLAPELLLGGY 621

ypkA KTVDWTLGVLLYEMLTGLPPFYDENTNDMYRKILQEPLTFPSSDIVPPAARDLLTRLLDRDPQRRLGA--NGAAEIKSHFFAN 551
pkcB KTVDWTLGVLLYEMLTGLPPFYDENTNDMYRKILQEPLTFPSSDIVPPAARDLLTRLLDRDPNRRLGA--NGAAEIKSHFFAN 552
pkcA RAVDWAFAGVLIYQMLLQQSPFRGEDEDEIYDAILADEPLYPH--MPRDSVSIQKLLTREPRLGSGPTDAQEVMSHAFFRN 1057
ypk1 KAVDWTLGVLLYEMLTGLPPYDEDPKMYKILQEPLVFP--DGFDRDAKDLLIGLLSRDPTRRLLGY--NGADEIRNHPFSQ 606
ypk2 KTVDWTLGILLYEMMTGLPPYDENVPVYKILQQLLFP--DGFDPAAKDLLIGLLSRDPSRRLGV--NGTDEIRNHPFEK 700

ypkA IDWRKLLQRKYEPSFRPNVGMASDNTNFDEFTSEAPQDSYVDGPVLSQTMQQFAGWSYNRPVAGLDAGGSVKDPSFSGSIPE- 634
pkcB IDWRKLLQRKYEPSFRPNVADARDTKNFDAEFTSEAPKDSYVDGPMLSSSTQQQFEGWSYNRPVAGLDAGGSVKDPSFASIPED 637
pkcA INWDDIYHKRVPFPFLPTISSPTDTSNFDQEFTSVTPVLTVPQS-VLQAMQEEFRGF SYTADFA----- 1121
ypk1 LSWKRLMLKGYIPPKYKPAVSNMDSNFDDEFTREKPIDSVVD-EYLSSEVQKQFGGWY----- 665
ypk2 LSWKRLMLKGYIPPKYKPKVSEIDTANFDQEFTEKPIDSVVD-EYLSASIQKQFGGWY----- 759

```

Figura 35: Regiões de similaridade da proteína YpkA de *A. fumigatus*, obtidas através do BLASTp, com as proteínas pkcB de *A. nidulans* (identidade de 89%); PkcA de *A. fumigatus* (identidade de 43,6%); Ypk1p (identidade de 47%) e Ypk2p (identidade de 47%) de *S. cerevisiae*. As regiões sublinhadas destacam a localização da região catalítica das proteínas.

Tendo como base essa similaridade e a interação dos genes relacionados a síntese de esfingolípídios com os genes da via de integridade da parede celular, os duplos mutantes $\Delta rlmA/niiA::ypkA$ e $niiA::ypkA/\Delta mpkA$ de *A. fumigatus* foram construídos e testados com a finalidade de observar se também havia alguma interação desses genes, e consequentemente das duas vias nesse fungo. Os dados obtidos através desse trabalho demonstraram que o fator de transcrição *rlmA* não interage com a via de síntese de esfingolípídios, porém, o gene *mpkA* interage com essa via de forma indireta, já que a repressão do gene *ypkA* somado a deleção de *mpkA*, proporciona uma letalidade sintética ao fungo.

Embora não tenha sido possível neste trabalho a dosagem de esfingolipídios e a identificação de quais esfingolipídios poderiam estar diferencialmente presentes nas linhagens mutantes de *ypkA* em relação a linhagem selvagem, os dados demonstram que a regulação da biossíntese de esfingolipídios de *A. fumigatus* é regulada através da função de YpkA. Ainda, é possível afirmar que o gene *mpkA*, responsável pela via de integridade da parede celular, interage com *ypkA* através de vias paralelas.

6. CONCLUSÕES

Este trabalho propôs inicialmente caracterizar o papel biológico e a essencialidade do gene que codifica a quinase YpkA de *A. fumigatus*, de forma a esclarecer sua função na biossíntese de esfingolipídios, verificando sua relação com o crescimento, a virulência do fungo e na manutenção da integridade da parede celular. Assim, com base nos resultados podemos concluir que:

- A deleção do gene *ypkA* de *A. fumigatus* gera sérias modificações no fenótipo desse fungo filamentoso, principalmente relacionadas ao crescimento vegetativo e a ausência de conidiação. Isso indica que apesar de não ser um gene essencial, *ypkA* apresenta grande importância na viabilidade e crescimento do fungo.
- A repressão do gene *ypkA* pelo promotor *niiA* não proporciona uma alteração do fenótipo do fungo tão evidente quanto a deleção do gene, sendo melhor evidenciada quando frente a ação de elevadas temperaturas e a drogas inibidoras da síntese de lipídeos; e também através de análises microscópicas, onde podemos observar alterações na polarização e deformações na morfologia das hifas. Essa diferença no fenótipo da linhagem mutante nulo e do mutante condicional para *ypkA* pode ser devida a não completa capacidade de repressão do promotor *niiA* em condições de repressão (tartarato de amônio), o que é um fato conhecido na literatura.
- A biossíntese de esfingolipídios é regulada através de *ypkA*. O que foi confirmado pelo aumento da sensibilidade do fungo frente a drogas que inibem duas etapas da via de biossíntese de esfingolipídios (isto é, miriocina e aureobasidina A, principalmente).

- Os resultados de qPCR dos genes *ypkA*; *pkhA* e *ormA* não se mostraram suficientes para identificar uma relação entre o aumento de temperatura e a via de esfingolipídios, sendo assim, mais genes ligados a via de esfingolipídios e ergosterol devem ser analisados.
- Foi verificado que o gene *ypkA* não interage com o fator de transcrição *rlmA* de *A. fumigatus*, já que o duplo mutante $\Delta rlmA/niiA::ypkA$ não apresenta o fenótipo diferente do mutante condicional *niiA::ypkA*. Porém, devido à presença de alteração no fenótipo do duplo mutante *niiA::ypkA*/ $\Delta mpkA$ na repressão do gene em comparação a indução, na ausência e na presença de drogas inibidoras da síntese de esfingolipídios, podemos supor que os genes *ypkA* e *mpkA* de *A. fumigatus* interagem geneticamente apresentando um fenótipo letal sintético.
- Podemos supor que o gene *ypkA* está indiretamente relacionado com a regulação da quantidade de ergosterol presente na membrana plasmática. Já que a deleção e repressão do gene promovem um aumento na produção desse esterol.
- Há interação do gene *pkhA* com o *ypkA* de *A. fumigatus*, devido ao fato de que a deleção de ambos os genes são fenocópias entre si, sugerindo que eles interagem geneticamente de forma epistática.

6.1. Conclusões Gerais

Baseado nos resultados obtidos, foi possível desenvolver um esquema para ilustrar como as proteínas PkhA; OrmA e YpkA regulam a síntese de esfingolipídios em *A. fumigatus*, e como a proteína MpkA, responsável pela manutenção da parede celular, também interage através de uma via paralela com a via de síntese dos esfingolipídios.

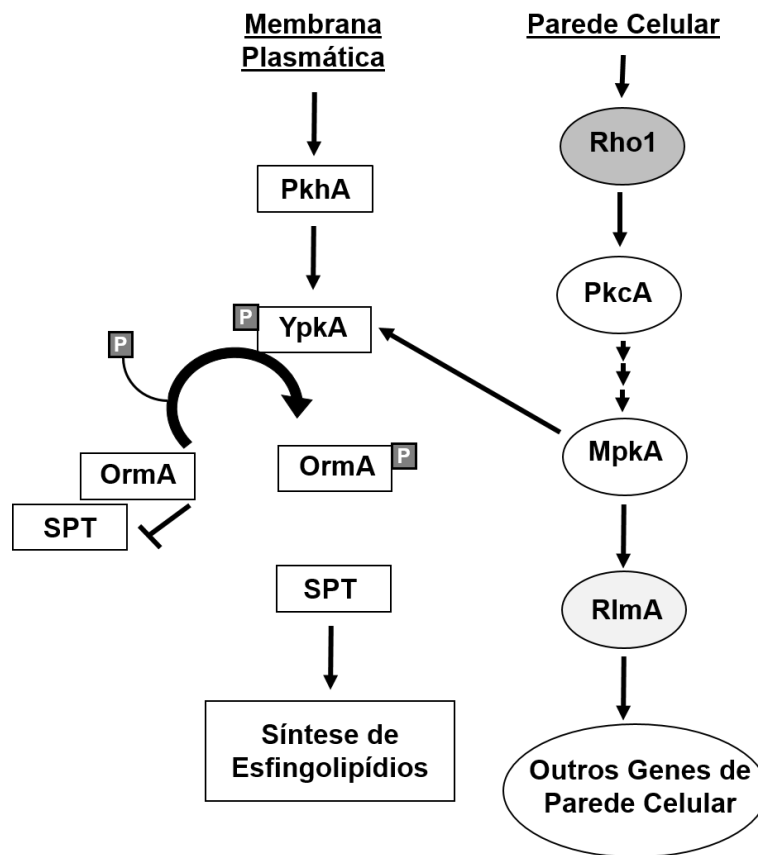


Figura 36: Esquema da interação das proteínas PkhA; YpkA; OrmA e MpkA em *A. fumigatus*, baseado nos resultados obtidos neste trabalho e na via descrita para *S. cerevisiae*. A proteína PkhA ativa YpkA, que por sua vez fosforila e inibe OrmA, permitindo assim que a enzima SPT comece a síntese de esfingolipídios. Paralelamente, a proteína quinase envolvida de manutenção da parede celular, a MpkA, interage geneticamente com a proteína YpkA e conseqüentemente, com a via de síntese de esfingolipídios.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albrecht, D., Guthke, R., Brakhage, A.A. and Kniemeyer, O. (2010). Integrative analysis of the heat shock response in *Aspergillus fumigatus*. *BMC Genomics* **11**, 32.
- Amaar, Y.G. and Moore, M.M. (1998). Mapping of the nitrate-assimilation gene cluster (*crnA-niiA-niaD*) and characterization of the nitrite reductase gene (*niiA*) in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Current genetics* **33**, 206-215.
- Arencibia, J.M., Pastor-Flores, D., Bauer, A.F., Schulze, J.O. and Biondi, R.M. (2013). AGC protein kinases: from structural mechanism of regulation to allosteric drug development for the treatment of human diseases. *Biochimica et biophysica acta* **1834**, 1302-1321.
- Aresta-Branco, F., Cordeiro, A.M., Marinho, H.S., Cyrne, L., Antunes, F. and de Almeida, R.F. (2011). Gel domains in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: highly ordered, ergosterol-free, and sphingolipid-enriched lipid rafts. *The Journal of biological chemistry* **286**, 5043-5054.
- Barreto-Bergter, E. and Figueiredo, R.T. (2014). Fungal glycans and the innate immune recognition. *Frontiers in cellular and infection microbiology* **4**, 145.
- Berchtold, D., Piccolis, M., Chiaruttini, N., Riezman, I., Riezman, H., Roux, A., *et al.* (2012). Plasma membrane stress induces relocalization of Slm proteins and activation of TORC2 to promote sphingolipid synthesis. *Nature cell biology* **14**, 542-547.
- Breslow, D.K., Collins, S.R., Bodenmiller, B., Aebersold, R., Simons, K., Shevchenko, A., *et al.* (2010). Orm family proteins mediate sphingolipid homeostasis. *Nature* **463**, 1048-1053.
- Casamayor, A., Torrance, P.D., Kobayashi, T., Thorner, J. and Alessi, D.R. (1999). Functional counterparts of mammalian protein kinases PDK1 and SGK in budding yeast. *Current biology : CB* **9**, 186-197.
- Chamilos, G., Lewis, R.E. and Kontoyiannis, D.P. (2006). Lovastatin has significant activity against zygomycetes and interacts synergistically with voriconazole. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **50**, 96-103.
- Chen, R.E. and Thorner, J. (2007). Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et biophysica acta* **1773**, 1311-1340.
- Cheng, J., Park, T.S., Chio, L.C., Fischl, A.S. and Ye, X.S. (2003). Induction of apoptosis by sphingoid long-chain bases in *Aspergillus nidulans*. *Molecular and cellular biology* **23**, 163-177.
- Cheng, J., Park, T.S., Fischl, A.S. and Ye, X.S. (2001). Cell cycle progression and cell polarity require sphingolipid biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Molecular and cellular biology* **21**, 6198-6209.
- Colabardini, A.C., Brown, N.A., Savoldi, M., Goldman, M.H. and Goldman, G.H. (2013). Functional characterization of *Aspergillus nidulans* *ypkA*, a homologue of the mammalian kinase SGK. *PloS one* **8**, e57630.
- Cove, D.J. (1966). The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochimica et biophysica acta* **113**, 51-56.

- Cowart, L.A. and Hannun, Y.A. (2007). Selective substrate supply in the regulation of yeast de novo sphingolipid synthesis. *The Journal of biological chemistry* **282**, 12330-12340.
- Cowart, L.A., Shotwell, M., Worley, M.L., Richards, A.J., Montefusco, D.J., Hannun, Y.A. and Lu, X. (2010). Revealing a signaling role of phytosphingosine-1-phosphate in yeast. *Molecular systems biology* **6**, 349.
- Dagenais, T.R. and Keller, N.P. (2009). Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clinical microbiology reviews* **22**, 447-465.
- Daum, G., Lees, N.D., Bard, M. and Dickson, R. (1998). Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 1471-1510.
- de Melo, N.R., Abdrahman, A., Greig, C., Mukherjee, K., Thornton, C., Ratcliffe, N.A., et al. (2013). Myriocin significantly increases the mortality of a non-mammalian model host during *Candida* pathogenesis. *PLoS one* **8**, e78905.
- de Vries, R.P. and Visser, J. (2001). *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR* **65**, 497-522, table of contents.
- deHart, A.K., Schnell, J.D., Allen, D.A. and Hicke, L. (2002). The conserved Pkh-Ypk kinase cascade is required for endocytosis in yeast. *The Journal of cell biology* **156**, 241-248.
- Del Poeta, M.C., C (Eds.) (2010) In *Sphingolipids as Signaling and Regulatory Molecules*. pp. 287.
- Dickson, R.C. and Lester, R.L. (1999). Yeast sphingolipids. *Biochimica et biophysica acta* **1426**, 347-357.
- Dickson, R.C. and Lester, R.L. (2002). Sphingolipid functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et biophysica acta* **1583**, 13-25.
- Dickson RC, N.E., Wells GB, Nagiec MM, Lester RL (1997). Synthesis of mannose-(inositol-P)₂-ceramide, the major sphingolipid in *Saccharomyces cerevisiae*, requires the IPT1 (YDR072c) gene. *The Journal of biological chemistry*, 272(247):29620-29625.
- Dickson, R.C., Sumanasekera, C. and Lester, R.L. (2006). Functions and metabolism of sphingolipids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Progress in lipid research* **45**, 447-465.
- Doerig, C., Billker, O., Haystead, T., Sharma, P., Tobin, A.B. and Waters, N.C. (2008). Protein kinases of malaria parasites: an update. *Trends in parasitology* **24**, 570-577.
- Eisenkolb, M., Zenzmaier, C., Leitner, E. and Schneiter, R. (2002). A specific structural requirement for ergosterol in long-chain fatty acid synthesis mutants important for maintaining raft domains in yeast. *Molecular biology of the cell* **13**, 4414-4428.
- El-Sayed, A. and Harashima, H. (2013). Endocytosis of gene delivery vectors: from clathrin-dependent to lipid raft-mediated endocytosis. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **21**, 1118-1130.
- Endo, M., Takesako, K., Kato, I. and Yamaguchi, H. (1997). Fungicidal action of aureobasidin A, a cyclic depsipeptide antifungal antibiotic, against *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **41**, 672-676.

- Ferreira, M.E.S.K., M. R.; Savoldi, M.; Goldman, M. H.; Hartl, A.; Heineksmp, T.; Brakhage, A. A.; Goldman, G. H. (2006). The *akuB^{KU80}* mutant deficient for nonhomologous end joining is a powerful tool for analyzing pathogenicity in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell* **5**, 207-211.
- Gelperin, D., Horton, L., DeChant, A., Hensold, J. and Lemmon, S.K. (2002). Loss of *ypk1* function causes rapamycin sensitivity, inhibition of translation initiation and synthetic lethality in 14-3-3-deficient yeast. *Genetics* **161**, 1453-1464.
- Georgopapadakou, N.H., Dix, B.A., Smith, S.A., Freudenberger, J. and Funke, P.T. (1987). Effect of antifungal agents on lipid biosynthesis and membrane integrity in *Candida albicans*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **31**, 46-51.
- Gouka, R.J., Hensing, J.G., Stam, H., Musters, W. and van den Hondel, C.A. (1995). A novel strategy for the isolation of defined *pyrG* mutants and the development of a site-specific integration system for *Aspergillus awamori*. *Current genetics* **27**, 536-540.
- Haak, D., Gable, K., Beeler, T. and Dunn, T. (1997). Hydroxylation of *Saccharomyces cerevisiae* ceramides requires Sur2p and Scs7p. *The Journal of biological chemistry* **272**, 29704-29710.
- Hanks, S.K. (2003). Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. *Genome biology* **4**, 111.
- Hanks, S.K. and Hunter, T. (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **9**, 576-596.
- Hannun, Y.A. (1996). Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* **274**, 1855-1859.
- Harris, S.D., Hofmann, A.F., Tedford, H.W. and Lee, M.P. (1999). Identification and characterization of genes required for hyphal morphogenesis in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **151**, 1015-1025.
- Hata T, M.A., Nomura S, Kim T, Ryan K. (1960). Studies on cerulenin, a new antifungal antibiotic. II. Biological characteristic and therapeutic effect of cerulenin. *Jpn J Med Mycol*. **1**, 382–383.
- Herrmann, M., Sprote, P. and Brakhage, A.A. (2006). Protein kinase C (PkcA) of *Aspergillus nidulans* is involved in penicillin production. *Applied and environmental microbiology* **72**, 2957-2970.
- Heung, L.J., Luberto, C., Plowden, A., Hannun, Y.A. and Del Poeta, M. (2004). The sphingolipid pathway regulates Pkc1 through the formation of diacylglycerol in *Cryptococcus neoformans*. *The Journal of biological chemistry* **279**, 21144-21153.
- Hong, S.B., Go, S.J., Shin, H.D., Frisvad, J.C. and Samson, R.A. (2005). Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia* **97**, 1316-1329.
- Hu, W., Sillaots, S., Lemieux, S., Davison, J., Kauffman, S., Breton, A., et al. (2007). Essential gene identification and drug target prioritization in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS pathogens* **3**, e24.
- Ikai, K., Takesako, K., Shiomi, K., Moriguchi, M., Umeda, Y., Yamamoto, J., et al. (1991). Structure of aureobasidin A. *The Journal of antibiotics* **44**, 925-933.

- Jung, U.S. and Levin, D.E. (1999). Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Mol Microbiol* **34**, 1049-1057.
- Kamada, Y., Fujioka, Y., Suzuki, N.N., Inagaki, F., Wullschleger, S., Loewith, R., et al. (2005). Tor2 directly phosphorylates the AGC kinase Ypk2 to regulate actin polarization. *Molecular and cellular biology* **25**, 7239-7248.
- Kawaguchi, A., Tomoda, H., Nozoe, S., Omura, S. and Okuda, S. (1982). Mechanism of action of cerulenin on fatty acid synthetase. Effect of cerulenin on iodoacetamide-induced malonyl-CoA decarboxylase activity. *Journal of biochemistry* **92**, 7-12.
- Kihara, A., Mitsutake, S., Mizutani, Y. and Igarashi, Y. (2007). Metabolism and biological functions of two phosphorylated sphingolipids, sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate. *Progress in lipid research* **46**, 126-144.
- Kubodera, T., Yamashita, N. and Nishimura, A. (2000). Pyrithiamine resistance gene (ptrA) of *Aspergillus oryzae*: cloning, characterization and application as a dominant selectable marker for transformation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **64**, 1416-1421.
- Kuranda, K.e.a. (2006). Investigating the caffeine effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways. *Mol Microbiol* **61**, 1147-1166.
- Kurek, K., Piotrowska, D.M., Wiesiolek-Kurek, P., Lukaszuk, B., Chabowski, A., Gorski, J. and Zendzian-Piotrowska, M. (2014). Inhibition of ceramide de novo synthesis reduces liver lipid accumulation in rats with nonalcoholic fatty liver disease. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* **34**, 1074-1083.
- Lacaz, C.S.P., E.; Martins, J.E.C.; Heins-Vaccou, E.M.; Melo, N.T. (2002) In *Tratado de micologia médica*, Sarvier (ed.). pp. 1104.
- Latge, J.P. (1999). *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clinical microbiology reviews* **12**, 310-350.
- Leach, M.D. and Cowen, L.E. (2014). Membrane fluidity and temperature sensing are coupled via circuitry comprised of Ole1, Rsp5, and Hsf1 in *Candida albicans*. *Eukaryotic cell* **13**, 1077-1084.
- Levin, D.E. (2005). Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **69**, 262-291.
- Li, S., Du, L., Yuen, G. and Harris, S.D. (2006). Distinct ceramide synthases regulate polarized growth in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Molecular biology of the cell* **17**, 1218-1227.
- Liu, M., Huang, C., Polu, S.R., Schneiter, R. and Chang, A. (2012). Regulation of sphingolipid synthesis through Orm1 and Orm2 in yeast. *Journal of cell science* **125**, 2428-2435.
- Lopes, A.J., & Jansen, U. (2004). Aspergiloses pulmonares. *Pulmão RJ*, 34–44.
- Lorenz, R.T. and Parks, L.W. (1990). Effects of lovastatin (mevinolin) on sterol levels and on activity of azoles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **34**, 1660-1665.
- Luberto, C., Martinez-Marino, B., Taraskiewicz, D., Bolanos, B., Chitano, P., Toffaletti, D.L., et al. (2003). Identification of App1 as a regulator of phagocytosis and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *The Journal of clinical investigation* **112**, 1080-1094.

- Luberto, C., Toffaletti, D.L., Wills, E.A., Tucker, S.C., Casadevall, A., Perfect, J.R., *et al.* (2001). Roles for inositol-phosphoryl ceramide synthase 1 (IPC1) in pathogenesis of *C. neoformans*. *Genes & development* **15**, 201-212.
- Malavazi, I. and Goldman, G.H. (2012). Gene disruption in *Aspergillus fumigatus* using a PCR-based strategy and in vivo recombination in yeast. *Methods Mol Biol* **845**, 99-118.
- Manning, G., Plowman, G.D., Hunter, T. and Sudarsanam, S. (2002a). Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends in biochemical sciences* **27**, 514-520.
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T. and Sudarsanam, S. (2002b). The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**, 1912-1934.
- Mollinedo, F. (2012). Lipid raft involvement in yeast cell growth and death. *Frontiers in oncology* **2**, 140.
- Muir, A., Ramachandran, S., Roelants, F.M., Timmons, G. and Thorner, J. (2014). TORC2-dependent protein kinase Ypk1 phosphorylates ceramide synthase to stimulate synthesis of complex sphingolipids. *eLife* **3**.
- Niles, B.J., Joslin, A.C., Fresques, T. and Powers, T. (2014). TOR complex 2-Ypk1 signaling maintains sphingolipid homeostasis by sensing and regulating ROS accumulation. *Cell reports* **6**, 541-552.
- Niles, B.J., Mogri, H., Hill, A., Vlahakis, A. and Powers, T. (2012). Plasma membrane recruitment and activation of the AGC kinase Ypk1 is mediated by target of rapamycin complex 2 (TORC2) and its effector proteins Slm1 and Slm2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 1536-1541.
- Omae, F., Miyazaki, M., Enomoto, A., Suzuki, M., Suzuki, Y. and Suzuki, A. (2004). DES2 protein is responsible for phytoceramide biosynthesis in the mouse small intestine. *The Biochemical journal* **379**, 687-695.
- Omura, S. (1976). The antibiotic cerulenin, a novel tool for biochemistry as an inhibitor of fatty acid synthesis. *Bacteriological reviews* **40**, 681-697.
- Osmani, S.A., May, G.S. and Morris, N.R. (1987). Regulation of the mRNA levels of *nimA*, a gene required for the G2-M transition in *Aspergillus nidulans*. *The Journal of cell biology* **104**, 1495-1504.
- Pearce, L.R., Komander, D. and Alessi, D.R. (2010). The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nature reviews. Molecular cell biology* **11**, 9-22.
- Phillips, T.H., L. (2008). Transcription factors and transcriptional control in eukaryotic cells. *Nature Education* **1(1):119**.
- Pike, L.J. (2009). The challenge of lipid rafts. *Journal of lipid research* **50 Suppl**, S323-328.
- Ram AF, K.F. (2006). Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor white and Congo red. *Nature protocols* **1**.
- Rocha, M.C., Godoy, K.F., de Castro, P.A., Hori, J.I., Bom, V.L., Brown, N.A., *et al.* (2015). The *Aspergillus fumigatus* *pkcAG579R* Mutant Is Defective in the Activation of the Cell Wall Integrity Pathway but Is Dispensable for Virulence in a Neutropenic Mouse Infection Model. *PloS one* **10**, e0135195.
- Roelants, F.M., Breslow, D.K., Muir, A., Weissman, J.S. and Thorner, J. (2011). Protein kinase Ypk1 phosphorylates regulatory proteins Orm1 and Orm2 to control sphingolipid homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences of the United States of America **108**, 19222-19227.
- Roelants, F.M., Torrance, P.D., Bezman, N. and Thorner, J. (2002). Pkh1 and Pkh2 differentially phosphorylate and activate Ypk1 and Ykr2 and define protein kinase modules required for maintenance of cell wall integrity. *Molecular biology of the cell* **13**, 3005-3028.
- Roelants, F.M., Torrance, P.D. and Thorner, J. (2004). Differential roles of PDK1- and PDK2-phosphorylation sites in the yeast AGC kinases Ypk1, Pkc1 and Sch9. *Microbiology* **150**, 3289-3304.
- Roncero C, V.M., Ribas JC, Durán A. (1988.). Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to Calcofluor white. *Journal of bacteriology* **170**, 1950-1954.
- Saba, J.D., Nara, F., Bielawska, A., Garrett, S. and Hannun, Y.A. (1997). The BST1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is the sphingosine-1-phosphate lyase. *The Journal of biological chemistry* **272**, 26087-26090.
- Sambrook, J.R., D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*
- Schmelzle, T., Helliwell, S.B. and Hall, M.N. (2002). Yeast protein kinases and the RHO1 exchange factor TUS1 are novel components of the cell integrity pathway in yeast. *Molecular and cellular biology* **22**, 1329-1339.
- Schmittgen, T.D. and Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols* **3**, 1101-1108.
- Shapiro, R.S., Robbins, N. and Cowen, L.E. (2011). Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **75**, 213-267.
- Shea, J.M. and Del Poeta, M. (2006). Lipid signaling in pathogenic fungi. *Current opinion in microbiology* **9**, 352-358.
- Shimobayashi, M., Oppliger, W., Moes, S., Jenö, P. and Hall, M.N. (2013). TORC1-regulated protein kinase Npr1 phosphorylates Orm to stimulate complex sphingolipid synthesis. *Molecular biology of the cell* **24**, 870-881.
- Sobko, A. (2006). Systems biology of AGC kinases in fungi. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* **2006**, re9.
- Stillwell, W. (2013) Membrane Polar Lipids. In *An Introduction of Biological Membranes*, Elsevier (ed.). pp. 57-82.
- Strader, C.R., Pearce, C.J. and Oberlies, N.H. (2011). Fingolimod (FTY720): a recently approved multiple sclerosis drug based on a fungal secondary metabolite. *Journal of natural products* **74**, 900-907.
- Surlow, B.A., Cooley, B.M., Needham, P.G., Brodsky, J.L. and Patton-Vogt, J. (2014). Loss of Ypk1, the yeast homolog to the human serum- and glucocorticoid-induced protein kinase, accelerates phospholipase B1-mediated phosphatidylcholine deacylation. *The Journal of biological chemistry* **289**, 31591-31604.
- Surma, M.A., Klose, C., Klemm, R.W., Ejsing, C.S. and Simons, K. (2011). Generic sorting of raft lipids into secretory vesicles in yeast. *Traffic* **12**, 1139-1147.
- Swinnen, E., Wilms, T., Idkowiak-Baldys, J., Smets, B., De Snijder, P., Accardo, S., et al. (2014). The protein kinase Sch9 is a key regulator of sphingolipid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell* **25**, 196-211.

- Takesako, K., Kuroda, H., Inoue, T., Haruna, F., Yoshikawa, Y., Kato, I., *et al.* (1993). Biological properties of aureobasidin A, a cyclic depsipeptide antifungal antibiotic. *The Journal of antibiotics* **46**, 1414-1420.
- Tekaia, F. and Latge, J.P. (2005). *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? *Current opinion in microbiology* **8**, 385-392.
- Tortora, G.J.F., B. R.; Case, C. L. (2005) In *Microbiologia*, Artmed (ed.). pp. 894.
- Trinel, P.A., Maes, E., Zanetta, J.P., Delplace, F., Coddeville, B., Jouault, T., *et al.* (2002). *Candida albicans* phospholipomannan, a new member of the fungal mannose inositol phosphoceramide family. *The Journal of biological chemistry* **277**, 37260-37271.
- Urbina, J.A., Lazard, K., Marchan, E., Visbal, G., Aguirre, T., Piras, M.M., *et al.* (1993). Mevinolin (lovastatin) potentiates the antiproliferative effects of ketoconazole and terbinafine against *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi*: in vitro and in vivo studies. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **37**, 580-591.
- Valiante, V., Heinekamp, T., Jain, R., Hartl, A. and Brakhage, A.A. (2008). The mitogen-activated protein kinase MpkA of *Aspergillus fumigatus* regulates cell wall signaling and oxidative stress response. *Fungal Genet Biol* **45**, 618-627.
- Valiante, V., Jain, R., Heinekamp, T. and Brakhage, A.A. (2009). The MpkA MAP kinase module regulates cell wall integrity signaling and pyomelanin formation in *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol* **46**, 909-918.
- Van Leeuwen, M.R., Golovina, E.A. and Dijksterhuis, J. (2009). The polyene antimycotics nystatin and filipin disrupt the plasma membrane, whereas natamycin inhibits endocytosis in germinating conidia of *Penicillium discolor*. *Journal of applied microbiology* **106**, 1908-1918.
- Villani, M., Subathra, M., Im, Y.B., Choi, Y., Signorelli, P., Del Poeta, M. and Luberto, C. (2008). Sphingomyelin synthases regulate production of diacylglycerol at the Golgi. *The Biochemical journal* **414**, 31-41.
- Walsh, T.J., Anaissie, E.J., Denning, D.W., Herbrecht, R., Kontoyiannis, D.P., Marr, K.A., *et al.* (2008). Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **46**, 327-360.
- Watanabe, Y., Irie, K. and Matsumoto, K. (1995). Yeast RLM1 encodes a serum response factor-like protein that may function downstream of the Mpk1 (Stt2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Molecular and cellular biology* **15**, 5740-5749.
- Weidner, G., d'Enfert, C., Koch, A., Mol, P.C. and Brakhage, A.A. (1998). Development of a homologous transformation system for the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* based on the *pyrG* gene encoding orotidine 5'-monophosphate decarboxylase. *Current genetics* **33**, 378-385.
- Wells, G.B., Dickson, R.C. and Lester, R.L. (1996). Isolation and composition of inositolphosphorylceramide-type sphingolipids of hyphal forms of *Candida albicans*. *Journal of bacteriology* **178**, 6223-6226.
- Yu, J.H. (2010). Regulation of Development in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. *Mycobiology* **38**, 229-237.
- Zhong, W., Murphy, D.J. and Georgopapadakou, N.H. (1999). Inhibition of yeast inositol phosphorylceramide synthase by aureobasidin A measured by a fluorometric assay. *FEBS letters* **463**, 241-244.