

TMUP
243
2008

ESTUDO DO FACTOR DE TRANSCRIÇÃO
Rlm1 EM *Candida albicans*

EUGÉNIA SOFIA DA COSTA NOGUEIRA

Dissertação de Mestrado em Bioquímica

Universidade do Porto
Faculdade de Ciências
Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

QH450.2
NOGe E
2008

2008



FC

Biblioteca
Faculdade de Ciências
Universidade do Porto

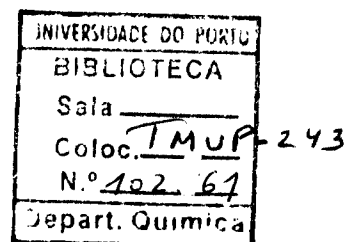


D000120093

M. Sampaio

EUGÉNIA SOFIA DA COSTA NOGUEIRA

ESTUDO DO FACTOR DE TRANSCRIÇÃO
Rlm1 EM *Candida albicans*

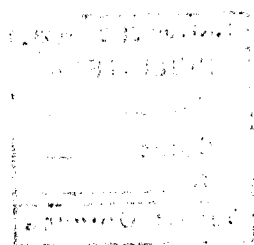


Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em
Bioquímica da Universidade do Porto

Orientador – Doutora Ana Paula Sampaio

Categoria – Professora Auxiliar

Afiliação – Universidade do Minho



Declaração:

É autorizada a reprodução parcial/integral desta tese apenas para efeitos de investigação, mediante declaração escrita do interessado, que a tal se compromete.

Eugénia Nogueira
EUGÉNIA NOGUEIRA

Agradecimentos

Queria agradecer a todos aqueles que fizeram com que a minha chegada até aqui fosse possível. Muito particularmente:

À Prof. Doutora Ana Paula Sampaio por me ter confiado este desafio, por ter acreditado mas sobretudo por continuar a acreditar nas minhas capacidades. A minha devota gratidão pela inestimável orientação, apoio, críticas, sugestões e amizade.

À Prof. Doutora Célia Pais pelo apoio e pela forma atenciosa como me recebeu e inculuiu o gosto pela investigação no campo das leveduras. É um exemplo de perseverança para todos os que têm o privilégio de consigo trabalhar.

À Aninhas, amiga e colega de trabalho, pelo incentivo, palavras amigas, pela disponibilidade e apoio que há anos me dedica. Pelos momentos de descontração partilhados e companheirismo.

A todos os elementos da Micro II, Ana, Marlene, Alexandra, Rafael, Raquel, Yolanda e Júlio, e ainda às eternas colegas da ex-Micro II, Andreia, Célia e Sílvia, pela ajuda no trabalho, transmissão de conhecimentos, carinho e estímulo permanente.

Aos colegas do LBM, nomeadamente à Rita, Raúl e Jorge, por tudo o que me ensinaram, pelo apoio e pelo carinho com que sempre me rodearam e que recordo com a maior estima. As suas qualidades humanas e humor são uma mais valia para todos.

Aos funcionários e restantes elementos do Departamento de Biologia pelo apoio desinteressado, técnico e humano, prestado ao longo de todo o trabalho.

Aos meus pais, tudo vos devo. Obrigada por tudo. E por nada. Amo-vos.

Ao Norberto e à Bia pelo sorriso e pelo amor que me têm dedicado; pelas horas não partilhadas, esperando vir a compensá-las no futuro.

Aos meus irmãos por suportarem os meus gritos, apesar de tudo estão sempre no meu coração.

À Teresa, minha madrinha do coração, que sempre me ouviu, aconselhou e apoiou.

À minha família por me ter ajudado a ser quem sou.

Obrigada a Deus...

Aos meus pais

Resumo

As infecções fúngicas sistémicas têm aumentado consideravelmente em prevalência e severidade nas últimas décadas, sendo *Candida albicans* o agente patógeno responsável pela sua grande maioria. Esta levedura comensal faz parte da população microbiana normal contudo, em indivíduos imunocomprometidos, pode tornar-se um patógeno invasivo. As infecções causadas por este fungo oportunista constituem um problema médico importante devido ao grande número de pacientes imunocomprometidos e ao facto de apenas uma gama limitada de fármacos antifúngicos estar disponível. A parede celular dos fungos é importante para a sua sobrevivência e morfogénese, e uma vez que as células humanas não possuem esta estrutura celular, esta é vista como um alvo primordial para o desenvolvimento de agentes antifúngicos seguros e efectivos.

Em *Saccharomyces cerevisiae* a via de sinalização responsável pela manutenção da integridade da parede celular é a MAPK Slt2, exercendo o factor de transcrição Rlm1 um papel primordial na regulação de genes envolvidos na sua biossíntese. O homólogo do *RLM1* em *C. albicans* foi recentemente identificado, no entanto o seu papel como efector da via da integridade da parede celular ainda não se encontra esclarecido. Neste sentido, o principal objectivo deste trabalho foi o estudo do factor de transcrição Rlm1 de *C. albicans* e a sua importância na integridade da parede celular. De modo a atingir este objectivo foram usados mutantes *rlm1* de *C. albicans* e *S. cerevisiae*, e a sua resposta a factores de stress que afectam a integridade celular foi comparada com a das estirpes parentais e complementada. Os resultados indicaram que o mutante *rlm1* de *C. albicans* mostrou ser mais sensível à presença do Calcofluor white e Congo red, compostos que interferem directamente com a quitina e β -1,3-glucano, respectivamente, bem como à presença de caspofungina, um inibidor da síntese do β -1,3-glucano. Além disto, este mutante revelou também ser mais sensível ao stress oxidativo, em particular à presença da diamida, a qual provoca a alteração da integridade celular. Os resultados obtidos com o mutante *rlm1* de *S. cerevisiae*, indicaram que este é mais resistente à presença do Calcofluor white, e mais sensível a cafeína e SDS, compostos que avaliam a integridade celular, o que está de acordo com o descrito na literatura. Além disso, este mutante demonstrou ser mais sensível ao peróxido de hidrogénio, bem como ao osmólito iónico NaCl. Estes dados permitiram verificar que o gene *RLM1* de *C. albicans* exerce um papel fundamental na manutenção da integridade da parede celular, enquanto que o seu homólogo de *S. cerevisiae* se encontra mais direccionado para a manutenção da integridade celular, tendo um papel comparativamente mais reduzido na parede celular.

Numa segunda etapa avaliou-se a importância do gene *RLM1* de *C. albicans* na virulência, procedendo-se à infecção de uma linha celular de macrófagos com o mutante *rlm1* e as estirpes selvagem e complementada. O mutante *rlm1* apresentou-se significativamente mais susceptível à morte intracelular por macrófagos. Esta susceptibilidade deve-se provavelmente a uma maior sensibilidade aos danos na parede celular, causados pelo ambiente hostil do fagócito, evidenciando-se assim a importância do gene *RLM1* na virulência de *C. albicans*.

Uma vez identificada a importância de Rlm1 quer na manutenção da integridade da parede celular quer na virulência, a proteína recombinante Rlm1 foi expressa em células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas com o vector pET25b(+), e purificada por cromatografia de afinidade em colunas contendo níquel. A proteína obtida será utilizada para estudos posteriores, nomeadamente na determinação da sequência de ligação a este factor de transcrição, essencial para a identificação de genes por ele regulados.

Em suma, os estudos realizados neste trabalho revelaram que o factor de transcrição Rlm1 exerce um papel primordial na manutenção da integridade da parede celular e na virulência de *C. albicans*. Além disso, as ferramentas obtidas, nomeadamente a proteína, serão uma base importante para identificação de genes envolvidos nos mecanismos que regem a biossíntese e integridade da parede celular.

Abstract

Systemic fungal infections increased dramatically in prevalence and severity over the last decades, being *Candida albicans* the pathogen responsible for the vast majority. This yeast belongs to the commensal microbial flora however, in immunocompromised people, it may become an invasive pathogen. Infections by opportunistic fungal agents are a major medical problem due to the growing number of immunocompromised patients and by the fact that only a limited array of antifungal drugs is available. The fungal cell wall is important for their survival and morphogenesis and because human cells do not have this cellular structure, this is regarded as a key target for the development of safe and effective antifungal agents.

In *Saccharomyces cerevisiae* the signalling pathway responsible for the cell wall integrity is the MAPK Sit2, in which the transcription factor Rlm1 plays a key role in the regulation of genes involved in its biosynthesis. The *RLM1* homolog in *C. albicans* has recently been identified, but its role as an effector of cell wall integrity pathway is not yet clear. In this sense, the main objective of this work was the study of the transcription factor Rlm1 of *C. albicans* and its importance in cell wall integrity. To achieve this goal *C. albicans* and *S. cerevisiae* *rlm1* mutants were used, and its response to stress factors affecting cell integrity was compared with the parental and complemented. The results indicated that *C. albicans* *rlm1* mutant was more sensitive to the presence of Calcofluor white and Congo red, compounds that interfere directly with chitin and β -1,3-glucan, respectively, as well as to the presence of caspofungin, an inhibitor of the β -1,3-glucan synthesis. Additionally, this mutant proved to be more sensitive to oxidative stress, particularly the presence of diamide, which affect the cell integrity. The results obtained with *S. cerevisiae* *rlm1* mutant indicated that it is more resistant to the presence of Calcofluor white, and more sensitive to caffeine and SDS, compounds that evaluate the cellular integrity, that is in agreement with that is described in the literature. Additionally, this mutant proved to be more sensitive to hydrogen peroxide, and the ionic agent NaCl. Together these data showed that *C. albicans* *RLM1* has a key role in cell wall integrity maintenance, while *S. cerevisiae* homolog is involved in greater extent in the maintenance of the cellular integrity, and in a lower extent in the cell wall integrity.

In the second stage of this work, the importance of *C. albicans* *RLM1* gene in virulence was evaluated, by infecting a macrophages cell line with the *rlm1* mutant, wild-type and complemented strains. Results indicated that the *rlm1* mutant was significantly more susceptible to macrophages intracellular death. This hypersusceptibility is probable due to a greater sensitivity to the cell wall damage, caused by the hostile environment developed

by the phagocyte, pointing toward the concept that *RLM1* gene is important to *C. albicans* virulence.

Since Rlm1 is important to *C. albicans* cell wall integrity and virulence, the recombinant Rlm1 protein was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) cells transformed with the vector pET25b(+), and purified by affinity chromatography on columns containing nickel. The protein obtained in this study will be used for further studies, namely for the determination of the DNA binding sequence to this transcription factor, and the consequently the identification of genes regulated by Rlm1.

In conclusion, the studies conducted in this work showed that the transcription factor Rlm1 has a key role in cell wall integrity maintenance and in *C. albicans* virulence. Moreover, the protein obtained, will be an important tool for the identification of genes involved in the mechanisms controlling *C. albicans* cell wall integrity and biosynthesis.

Índice

AGRADECIMENTOS	III
RESUMO	VII
ABSTRACT	IX
ÍNDICE.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII
 CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO	 1
1. Importância clínica de <i>Candida albicans</i>	3
1.1. Aspectos gerais	3
1.2. Factores de virulência	4
1.2.1. Parede Celular.....	4
1.2.2. Adesão	5
1.2.3. Morfogénese	6
1.2.4. Enzimas hidrolíticas	6
1.2.5. Switching fenotípico	8
1.3. Tratamento de candidíases.....	8
2. MAPKinases	10
2.1. Via da integridade celular em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
2.1.1. Factor de transcrição Rlm1	12
2.2. Via da integridade celular em <i>Candida albicans</i>	13
 CAPÍTULO II: IMPORTÂNCIA DO FACTOR DE TRANSCRIÇÃO Rlm1 NA INTEGRIDADE DA PAREDE CELULAR	 17
1. Introdução.....	19
2. Material e métodos	22
2.1. Estirpes utilizadas neste estudo	22
2.2. Caracterização fenotípica	23
2.2.1. Ensaios de sensibilidade a diferentes agentes de stress.....	23
2.2.2. Ensaios de filamentação	23
2.2.2. Análise estatística	24
3. Resultados.....	24
3.1. Sensibilidade dos mutantes <i>rlm1</i> a agentes que afectam a integridade celular.....	24
3.2. Sensibilidade dos mutantes <i>rlm1</i> ao stress osmótico	26
3.3. Sensibilidade dos mutantes <i>rlm1</i> ao stress oxidativo.....	27
3.4. Transições dimórficas.....	29
4. Discussão	30
 CAPÍTULO III: IMPORTÂNCIA DE Rlm1 NA INFECÇÃO COM MACRÓFAGOS	 35
1. Introdução.....	37
2. Material e métodos	40
2.1. Estirpes utilizadas neste estudo	40
2.2. Manutenção e preparação de macrófagos da linha celular	40
2.3. Avaliação da morfologia de <i>C. albicans</i> no interior dos macrófagos.....	41
2.4. Determinação da viabilidade de <i>C. albicans</i> após fagocitose	42
2.5. Análise estatística	42
3. Resultados.....	43
3.1. Avaliação da morfologia de <i>C. albicans</i> no interior dos macrófagos.....	43
3.2. Determinação da viabilidade de <i>C. albicans</i> após fagocitose	44
4. Discussão	46

CAPÍTULO IV: EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE Rlm1	49
1. Introdução.....	51
2. Material e métodos	53
2.1. Estirpes de <i>E. coli</i> e plasmídios	53
2.2. Construção do plasmídio de expressão pET25:RLM1	54
2.3. Condições de indução da expressão da proteína recombinante Rlm1.....	56
2.4. Fraccionamento celular.....	56
2.5. Isolamento e purificação da proteína recombinante Rlm1	57
2.6. Renaturação <i>in vitro</i> da proteína recombinante Rlm1	57
3. Resultados.....	58
3.1. Expressão da proteína recombinante Rlm1 em <i>E. coli</i>	58
3.2. Purificação e renaturação da proteína recombinante Rlm1	61
4. Discussão	63
CAPÍTULO V: CONSTRUÇÃO DOS VARIANTES ALÉLICOS DE <i>RLM1</i>	67
1. Introdução.....	69
2. Material e métodos	71
2.1. Construção dos variantes alélicos do gene <i>RLM1</i>	71
2.1.1. Construção dos plasmídios pDDB78-RLM1	71
2.1.2. Transformação do plasmídio pDDB78:RLM1 em <i>C. albicans</i>	73
2.1.3. Confirmação dos variantes alélicos.....	74
2.2. Ensaio de caracterização fenotípica	75
3. Resultados.....	75
4. Discussão	78
CAPÍTULO VI: CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
CAPÍTULO VII: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
ANEXOS	105

Lista de abreviaturas

CFG – Caspofungina
CFU – Colony forming unit
CFW – Calcofluor white
CR – Congo red
CWI – Cell wall integrity
CWP – Cell wall protein
DMEM – Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO – Dimethyl sulfoxide
DNA – Deoxyribonucleic acid
DO – Density optical
EMSA – Electrophoretic mobility shift assay
FBS – Fetal bovine serum
GlcNAc – N-acetil-D-glucosamina
GPI – Glycosyl phosphatidyl inositol
HEPES – 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HIV – Human Immunodeficiency Virus
IMAC – Immobilized Metal Affinity Chromatography
IPTG – Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
LATE – Lithium, Acetate, Tris, EDTA
LB – Luria Broth
MADS – Mcm1, Arg80, Deficiens, Agamous, SRF
MAPK – Mitogen activated protein kinase
MPO – Mieloperoxidase
NNISS – National Nosocomial Infection Survey System
NO – Nitric oxide
NOS – NO synthase
ORF – Open reading frame
PAGE – Polyacrilamide gel electrophoresis
PBS – Phosphate buffer saline
PCR – Polymerase chain reaction
Pir – Proteins with internal repeats
PLATE – Polyethylene glycol, Lithium, Acetate, Tris, EDTA
RNA – Ribonucleic acid
RNS – Reactive nitrogen species

Rpm – Rotations per minute
SAP – Shrimp alkaline phosphatase
SDS – Sodium dodecyl sulfate
SEM – Simple and efficient method
TAE – Tris, Acetate, EDTA
TB – Terrific Broth
TE – Tris, EDTA
X-GAL – 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside
YEPD – Yeast extract, Peptone, Dextrose

Capítulo I

Introdução

1. Importância clínica de *Candida albicans*

1.1. Aspectos gerais

As infecções fúngicas sistêmicas têm aumentado dramaticamente em prevalência e severidade nas últimas décadas, em conformidade com o aumento do número de pacientes que se encontram por largos períodos de tempo com disfunções imunitárias significativas (Lorenz & Fink, 2002). Neste grupo de pacientes incluem-se os indivíduos que sofreram transplantes de órgãos sólidos, transfecções de sangue e medula óssea, portadores do HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), com doenças neoplásicas, sujeitos a terapia imunossupressora, com idade avançada e bebês prematuros.

Os fungos oportunistas mais frequentemente isolados nestas infecções são *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus*, apesar de outros patógenos fúngicos estarem a emergir, tais como outras espécies do género *Candida* e *Aspergillus* e novos géneros como *Trichosporon* spp., *Rhodotorula* spp., *Geotrichum capitatus* (*Blastoschizomyces capitatus*), *Fusarium* spp., *Acremonium* spp., *Scedosporium* spp., *Paecilomyces* spp. e *Trichoderma* spp. (Pfaller & Diekema, 2004; Shoham & Levitz, 2005; Román *et al.*, 2007). Apesar desta grande variabilidade, uma única espécie, *C. albicans*, é responsável pela maioria das infecções. *C. albicans* é uma levedura comensal que faz parte da população microbiana normal da boca, vagina e tracto gastrointestinal dos humanos, no qual vive sem efeitos adversos para o hospedeiro. Contudo, em indivíduos imunocomprometidos, pode tornar-se um patógeno invasivo. Apesar de existirem actualmente várias classes de agentes antifúngicos disponíveis, como os azóis, os polienos, os análogos nucleosídicos e, mais recentemente as equinocandinas, têm-se assistido nos últimos anos a uma maior dificuldade no tratamento destas infecções devido essencialmente a um aumento na resistência a estes agentes. Desta forma, as infecções de fungos oportunistas constituem um grande desafio no campo da medicina.

Nos hospitais dos Estados Unidos que participam no NNISS (*National Nosocomial Infection Survey System*), a frequência das infecções fúngicas nosocomiais aumentou de 2‰ na década de 80 para 3,8‰ na década de 90, em que 78,3% correspondem a infecções provocadas por leveduras do género *Candida* (Masuoka, 2004). Na Europa a incidência da candidemia, apesar de mais baixa do que nos Estados Unidos, tem também apresentado tendência para aumentar (Pfaller & Diekema, 2002). Dados epidemiológicos recentes demonstraram que, embora *C. albicans* continue a ser o agente infeccioso mais frequente, outras espécies do género *Candida* como *C. glabrata*, *C. guilliermondi*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. dubliniensis* têm vindo a ser consideradas

agentes patogénicos de distribuição alargada. Em Portugal, apesar de pouco se conhecer sobre a epidemiologia das candidíases, estudos recentes realizados com isolados de várias instituições de saúde e com doentes portadores de diferentes patologias, revelaram que cerca de 80% das infecções se devem a *C. albicans*, sendo as restantes devidas a outras espécies, salientando-se *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*. (Correia *et al.*, 2004; Araújo *et al.*, 2008).

1.2. Factores de virulência

A patogenicidade de *C. albicans* é regulada por uma rede de factores de virulência e pela interacção com o sistema imunológico do hospedeiro (Schaller *et al.*, 2005). A definição de factor/determinante de virulência é controversa, mas nos últimos anos vários autores têm assumido que factor de virulência é qualquer componente celular que, quer por uma alteração quantitativa quer qualitativa, modifica a capacidade do microrganismo para causar doença. Estes factores de virulência incluem a parede celular, biomoléculas de reconhecimento ao hospedeiro (adesinas), morfogénese, enzimas hidrolíticas e *switching* fenotípico. Todos estes mecanismos promovem a invasão da superfície mucosa e a capacidade deste microrganismo desencadear uma infecção.

1.2.1. Parede Celular

A parede celular é uma estrutura complexa e dinâmica que confere protecção e rigidez à levedura e é essencial para muitos aspectos da biologia de *C. albicans*. Como a maioria das estruturas celulares exteriores, a parede celular tem um papel primordial na interacção entre o microrganismo e o meio que o rodeia, incluindo o hospedeiro, e desta forma na patogenicidade do fungo (Gozalbo *et al.*, 2004). Aproximadamente 80 a 90% da parede celular de *C. albicans* é constituída por carboidratos. Três constituintes básicos representam a maioria dos polissacáridos da parede celular: polímeros de D-glucose altamente ramificados, consistindo em ligações β -1,3 e β -1,6 (β -glucanos), polissacáridos lineares de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), com ligações β -1,4 (quitina) e polímeros de manose (mananos). Adicionalmente, a parede celular contém 6 a 25% de proteínas e em quantidade inferior, 1 a 7%, lípidos (Chaffin *et al.*, 1998).

A função destes componentes na parede celular é variada. O papel principal dos glucanos é estrutural; de facto, a inibição da síntese de glucanos ou a degradação das

cadeias de glucano conferem fragilidade e alterações morfológicas à célula (Gozalbo *et al.*, 2004). A quitina apesar de se encontrar em baixa quantidade, apresenta um papel fundamental na estrutura da parede, fornecendo rigidez à rede de glucano. Mutantes com baixos níveis de quitina são sensíveis a diferenças de osmolaridade, e exibem morfologias celulares anómalas (Marcilla *et al.*, 1998). A quitina tem também um papel primordial na formação de hifas, cujas células têm três vezes mais deste componente, onde formam o septo, do que a forma levedura (Masuoka, 2004).

Em *C. albicans* os mananos encontram-se unicamente sob a forma de glicoconjugados, glicoproteínas ou glicolípidos (Masuoka, 2004), cuja função parece ser a de modular as funções da imunidade humoral e celular, o que faz com que possa ser considerado simultaneamente um antigénio e um factor de virulência (Nelson *et al.*, 1991). Entre os antigénios e potenciais factores de virulência de *Candida*, os mananos têm um significado especial, uma vez que são portadores de uma grande variabilidade antigénica.

1.2.2. Adesão

A interacção das células de *Candida* com as células do hospedeiro é crucial para a colonização e indução da infecção (Filler, 2006). Adicionalmente, *Candida* spp. pode também aderir à superfície de dispositivos médicos, como cateteres e formar biofilmes, os quais constituem um factor de risco para a candidémia (Yang, 2003; Verstrepen & Klis, 2006).

As biomoléculas que medeiam a adesão de *C. albicans* às células do hospedeiro são as adesinas (Calderone & Fonzi, 2001), nas quais se incluem as proteínas da família Als (*agglutinin-like sequence*), onde já foram identificados nove membros distintos (Kaur *et al.*, 2005). As proteínas mais conhecidas desta família são a Als1 e Als5, as quais estão envolvidas na adesão a células endoteliais e epiteliais, e a proteínas da matriz extracelular, respectivamente (Sundstrom, 2002). Existem ainda fortes indicações que os diferentes genes desta família de adesinas estão diferencialmente expressos durante o desenvolvimento da infecção. Mais especificamente, ALS2, 3, 6, 7, e 9 são altamente expressos e ALS4 e ALS5 são reprimidos em modelos animais de candidíase vaginal. Em contrapartida, exemplares orais mostraram forte expressão de ALS1, 2, 3, 4, 5 e 9, enquanto ALS6 e 7 são reprimidos (Verstrepen & Klis, 2006). Esta expressão diferencial reflecte a capacidade das células de *Candida* para, em cada situação, expressar unicamente as adesinas mais apropriadas e efectivas.

Outras adesinas muito estudadas em *C. albicans* incluem a Hwp1, originalmente isolada como específica do tubo germinativo e da morfologia de hifa, e que mostrou ter um papel

importante na adesão (Calderone & Fonzi, 2001), e a Int1 uma proteína tipo integrina envolvida na ligação às proteínas da matriz extracelular do hospedeiro (Sundstrom, 2002). A Mnt1, uma enzima que adiciona a segunda manose aos aminoácidos hidroximanosilados, abundantes nos mananos da parede celular, revelou ter um papel essencial na adesão, apesar de não ser adesina (Sundstrom, 1999). Vários estudos revelaram que a supressão destes genes pode alterar até 40% a capacidade de adesão de *C. albicans* levando consequentemente a uma redução na virulência (Sundstrom, 2002; Sundstrom 1999).

1.2.3. Morfogénese

A morfogénese refere-se à transição entre as células de levedura na forma unicelular e o crescimento na forma filamentada. *C. albicans* tem a capacidade de mudar reversivelmente da forma unicelular a pseudo-hifa ou hifa (Calderone & Fonzi, 2001). Esta transição estará relacionada com a função das hifas, nomeadamente penetração no tecido e escape das células fagocíticas do hospedeiro após a internalização (Kumamoto & Vines, 2005). Esta transição é induzida por diversos factores ambientais, incluindo a temperatura (37°C ou superior), o pH neutro, e a presença de soro (Köhler & Fink, 1996). Dada a importância deste fenómeno na virulência os genes que codificam as proteínas que controlam a forma celular, como a ciclina G1 Hgc1 (específica da forma de hifa), são co-reguladas com genes que codificam factores de virulência específicos de cada morfologia como as proteases aspárticas e adesinas (Kumamoto & Vines, 2005). Esta co-regulação assegura que a conversão morfológica de células na forma de levedura para hifa ocorra sob condições em que as actividades degradativas e de adesão específicas sejam também expressas. Desta forma, a formação de hifas é um componente da estratégia de virulência geral de *C. albicans* (Kumamoto & Vines, 2005).

1.2.4. Enzimas hidrolíticas

Uma grande actividade hidrolítica extracelular com uma larga especificidade de substratos tem sido encontrada em várias espécies de *Candida*, particularmente em *C. albicans*. As enzimas hidrolíticas secretadas com maior relevância nesta espécie são as proteases aspárticas (Saps), as fosfolipases (PI) e as lipases (Lip) (Schaller *et al.*, 2005). As proteases aspárticas secretadas exibem uma larga especificidade de substratos uma vez que são hábeis para degradar muitas proteínas humanas, encontradas em locais de

lesão, como a albumina, hemoglobina, queratina, colagénio, mucina, e imunoglobulina A secretada (slgA) (Naglik *et al.*, 1999). Até à data 10 genes diferentes de SAPs foram identificados em *C. albicans*. Oito dessas proteases (Sap1-8) são secretadas no espaço extracelular, enquanto a Sap9 e Sap10 são proteínas GPI (glicosil-fosfatidilinositol) ancoradas à membrana (Schaller *et al.*, 2005). Expressão de SAP *in vivo* tem sido maioritariamente estudada utilizando o ratinho como modelo de infecção sistémica (Naglick *et al.*, 2003). Num modelo sistémico de candidíase disseminada, SAP4 a SAP6 são os principais genes desta família activados, enquanto SAP5 é principalmente activado em infecção disseminada intraperitoneal, ambos no tempo inicial de inoculação, durante a invasão e subsequente disseminação para os rins. SAP1 a SAP3 são observáveis na última fase do processo de infecção. Este padrão de activação de SAP durante infecções sistémicas sugere o papel para SAP4 a SAP6 durante as fases iniciais de invasão e colonização de órgãos e para SAP1 a SAP3 na última fase, quando *C. albicans* já estabeleceu a infecção (Naglick *et al.*, 2003; Staib *et al.*, 2000). A contribuição das SAP para o estabelecimento da doença já foi confirmada com mutantes *sap*, as quais apresentam virulência atenuada utilizando o ratinho como modelo de infecção sistémica (Hube *et al.*, 1997, Sanglard *et al.*, 1997).

O termo fosfolipase (PI) descreve um grupo heterogéneo de enzimas com capacidade de hidrolisar uma ou mais ligações éster em glicerofosfolípidos. A nomenclatura das várias PIs é baseada no seu modo de acção e na molécula alvo. As seguintes subclasses foram identificadas em *C. albicans*: PIA, PIB, PIC e PID. Destas, a PIB é a fosfolipase com maior relevância em espécies de *Candida*, apresentando actividade hidrolase libertando os ácidos gordos e lipofosfolipase-transacilase. As funções das PIs nas infecções de *C. albicans* não são conhecidas com precisão, mas têm sido implicadas na penetração e adesão às células epiteliais do hospedeiro (Schaller *et al.*, 2005).

As lipases hidrolisam as ligações que se encontram na interface entre a fase insolúvel e a fase aquosa do triglicerol na qual a enzima se dissolve. Apesar de já terem sido descritas 10 lipases diferentes (Lip1-Lip10), em *C. albicans* a função que estas desempenham durante as infecções mantêm-se por elucidar (Schaller *et al.*, 2005).

1.2.5. *Switching* fenotípico

Candida albicans e espécies relacionadas conseguem fazer *switch* de uma forma espontânea e reversível, entre dois ou mais fenótipos gerais, os quais são distinguíveis pelas diferenças na morfologia das colónias (Zhao *et al.*, 2002).

De todos os *switchings* fenotípicos descritos, o mais estudado é o sistema branco-opaco (*white-opaque*) na estirpe WO-1, no qual as colónias lisas e brancas fazem *switch* para colónias cinzentas (opacas). Existem várias diferenças entre estes dois tipos de colónias, incluindo a forma das células (células brancas são redondas-ovoides e as células opacas são alongadas ou em forma de feijão), a estrutura da superfície da célula (*pimples* são encontradas apenas nas células opacas), e a capacidade de filamentar a 37°C e pH 6,7 (células brancas filamentam mas as opacas não, excepto se as células opacas crescerem sob células epiteliais de pele humana). A expressão de alguns genes específicos também se revelou diferencial neste sistema; a expressão do *OPA1* mostrou ser específico das células opacas, bem como do gene *SAP3*. A expressão do *SAP2* é, no entanto, específico das células brancas (Calderone & Fonzi, 2001). Muitos dos principais mecanismos de transdução do sinal requeridos para a transição levedura-hifa foram identificados neste sistema, sendo a Efg1 o principal regulador deste dimorfismo (Sonneborn *et al.*, 1999). O *switching* em *C. albicans* envolvendo a expressão diferencial de inúmeras proteínas/genes torna bastante provável que os diferentes variantes fenotípicos possuam além de características fisiológicas distintas também diferentes graus de virulência.

1.3. Tratamento de candidíases

A administração de antifúngicos é a estratégia terapêutica mais comum para o tratamento de candidíases, contudo a mortalidade mantém-se elevada e os episódios de recorrência frequentes. O tratamento farmacológico de infecções invasivas de *Candida* é tradicionalmente limitado a apenas três grupos de antifúngicos, anfotericina B, flucitosina, e fluconazol usado como terapia de agente único ou combinatória. Anfotericina B, um polieno antifúngico, é tradicionalmente utilizada como terapia modelo para infecções fúngicas invasivas. Esta droga liga-se ao ergosterol na membrana celular do fungo, levando ao enfraquecimento e morte da célula. Contudo, este agente terapêutico tem sido implicado em insuficiências renais (Butler *et al.*, 1990). Mais recentemente formulações baseadas em lípidos têm sido desenvolvidas mas, a sua utilização tem sido limitada a indivíduos com falência renal e aqueles com intolerância ou falência da

anfotericina modelo. Flucitosina é um fluorino análogo da citosina que funciona por interrupção da síntese de DNA. Flucitosina tem um papel limitado no tratamento de candidíases devido ao rápido desenvolvimento de resistência quando utilizado em monoterapia e por falta de uma formulação intravenosa, além disso está associada com toxicidade para a medula óssea (Francis & Walsh, 1992). Fluconazol e intraconazol, triazóis da primeira geração, actuam por inibição de 14- α -esterol demetilase, uma enzima necessária para a produção de ergosterol, o principal esteroide da membrana celular. É importante realçar que os azóis são fungistáticos, inibindo o crescimento celular, mas não fungicida. 14- α -esterol demetilase é uma enzima dependente do citocromo P-450, desta forma os azóis podem interferir com a farmacocinética de outros medicamentos, e podem estar associados com hepatotoxicidade. A resistência ao fluconazol é comum para *C. krusei*, *C. glabrata*, e *C. parapsilosis* (Sarvikivi *et al.*, 2005). A segunda geração de triazóis tem sido desenvolvida com a finalidade de colmatar este problema, aumentando o espectro de actividade. Voriconazole é actualmente a droga nesta classe com maior distribuição (Walsh *et al.*, 2004).

As equinocandinas são a nova classe de agentes antifúngicos e têm como alvo a parede celular por inibição específica da enzima β -1,3-glucano sintetase que forma polímeros de glucanos, o principal componente da parede celular (Pfaller *et al.*, 2003). Actualmente três drogas desta classe foram licenciadas para utilização, caspofungina, micafungina, e anisulafungina. Resistências a estas drogas tornam-se actualmente mais frequentes com o aumento da sua utilização (Baixench *et al.*, 2007). Desta forma, o repertório de agentes antifúngicos disponíveis é claramente inadequado, limitado a apenas três classes efectivas, um número extremamente reduzido quando comparado com os antibióticos para tratar infecções bacterianas e virais.

Outro problema no tratamento das infecções prende-se com o número limitado de alvos identificados que distinguem claramente as células de fungos eucariotas das células dos animais. Na verdade, muito da estrutura, fisiologia, e metabolismo das células do fungo e animais é altamente conservada. Esta conservação na função celular torna difícil encontrar agentes que selectivamente discriminem entre fungos patogénicos e o hospedeiro humano (Lussier *et al.*, 1998). A parede celular é uma estrutura dinâmica e complexa que confere protecção e rigidez à célula e é essencial para muitos aspectos da biologia de *Candida*. Ao contrário das demais estruturas celulares, a parede celular desempenha um papel fundamental na interacção entre microrganismo e ambiente, incluindo o hospedeiro, e, desta forma, na patogenicidade do fungo. Além disso, os seus componentes polissacarídicos são únicos no fungo e consequentemente, putativos inibidores da via biossintética responsáveis pela construção da parede celular têm-se

tornado alvos preferenciais no desenvolvimento de antifúngicos, resultando em baixa toxicidade para o hospedeiro humano (Gozalbo *et al.*, 2004).

2. MAPKinases

As células apreendem e reagem às condições ambientais utilizando complexas vias de transdução de sinal. Em eucariotas, estes estímulos externos são maioritariamente processados através das vias MAPKinases. As cascatas funcionais MAPK compreendem MAPK kinase kinases (MAPKKKs), as quais fosforilam e activam MAPK kinases (MAPKKs), as quais por seu turno activam MAPKs por fosforilação de dois resíduos conservados de treonina e tirosina. Finalmente, MAPKs fosforilam diversos substratos bem caracterizados, incluindo factores de transcrição, reguladores translacionais, MAPKAP (*MAPK-activated protein kinases*), fosfatases e outras classes de proteínas, regulando desta forma, o metabolismo, a morfologia celular, a progressão do ciclo celular, e a expressão de genes em resposta a estímulos externos (Barba *et al.*, 2008).

O conhecimento das vias MAPK é baseado, em grande parte, em estudos conduzidos em *Saccharomyces cerevisiae*. Muitos dos componentes destas vias e o mecanismo pelo qual elas operam foram primeiro identificados e caracterizados neste organismo e é actualmente conhecido serem conservadas ao longo da evolução dos eucariotas. Esta levedura serviu como base de estudo uma vez que é facilmente manipulada para estudos genéticos, bioquímicos e biológicos celulares, e foi o primeiro eucariota a ter o seu genoma inteiramente sequenciado (Chen & Thorner, 2007).

Até hoje já foram identificadas cinco vias MAPK. A via Kss1 é requerida para o desenvolvimento de pseudo-hifas e crescimento vegetativo (Gustin *et al.*, 1998). A via Fus3 é activada pela exposição das células haplóides de levedura a feromonas para o *mating* (Bardwell *et al.*, 1996). A via Hog1 é activada pela exposição das células de levedura a ambientes hipo e hiperosmóticos e regula a biossíntese de glicerol (Gustin *et al.*, 1998). A via Smk1 revelou ser requerida para o controlo da esporulação sob condições de stress em células diplóides (Krisak *et al.*, 1994). Por fim, a via Slt2/Mpk1 é requerida para o controlo da integridade da parede celular (Watanabe *et al.*, 1995).

Estudos genéticos em fungos patogénicos revelaram que as MAPKinases são também importantes factores de virulência uma vez que mutantes defectivos nestas vias apresentam uma virulência reduzida em certos modelos animais de infecção (Román *et al.*, 2007).

2.1. Via da integridade celular em *Saccharomyces cerevisiae*

A via da integridade celular é alvo de maior atenção devido às suas potenciais aplicações no conhecimento da fisiologia e virulência de fungos patogénicos, construção da parede celular e como potencial alvo de antifúngicos (Navarro-García *et al.*, 1998).

Em *S. cerevisiae*, os putativos sensores da via Slit2 são as proteínas transmembranares Wsc1, Wsc2, Wsc3, Mid2 e Mlt1, as quais interagem com Rom1/2 para estimular Rho1. Rho1 é uma pequena GTPase que funciona como *switch* binário entre duas formas interconvertíveis, GTP activa e inactiva. Entre outras funções, Rho1 é conhecido por se ligar e activar Pkc1. Esta proteína kinase, por sua vez, activa a cascata MAPK que é composta pela MAPKK kinase Bck1, a redundante MAPKKs Mkk1 e Mkk2, e a MAPK Mpk1/Slit2 (Hahn & Thiele, 2002). Os estímulos são transmitidos através desta cascata de proteínas kinase por fosforilação sequencial. Mkk1 e Mkk2 são duas proteínas kinases específicas que catalizam a fosforilação de Slit2 em resíduos conservados, treonina e tirosina do sub-domínio VIII, levando à activação deste último elemento da cascata.

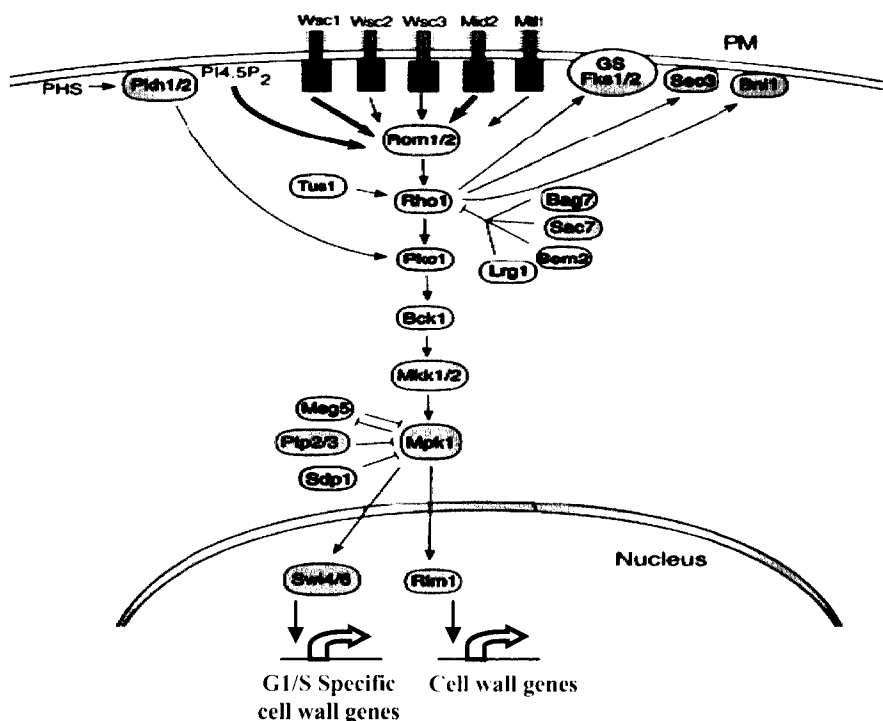


Figura 1.1 – Representação esquemática dos principais componentes da via de integridade celular de *S. cerevisiae*. Os sinais são inicialmente transmitidos para a membrana plasmática (PM) através de sensores à superfície da parede celular Wsc1, 2, 3 e Mid2 e Mlt1. Estes sensores recrutam Rom1/2 para a membrana plasmática, os quais estimulam Rho1. Este activa cinco efectores, incluindo a cascata MAPkinase Pkc1, a qual compreende Bck1, Mkk1/2 e Mpk1, e é activada por Pkc1. Dois factores de transcrição, Rlm1 e o complexo SBF (Swi4/6), são os alvos desta MAP kinase [Adaptada de Levin, 2005].

Os factores de transcrição Rlm1 e SBF são os dois factores de transcrição alvos do Slt2. Muitos dos genes regulados por Rlm1 codificam proteínas da parede celular ou enzimas envolvidas na biossíntese da parede celular. SBF é um complexo heterodímero composto pelas proteínas Swi4 e Swi6 (Lagorce *et al.*, 2003). Swi4 é a subunidade de ligação ao DNA e a activadora transcricional do SBF e é requerida para a expressão normal de ciclinas G1 *CLN1*, *CLN2*, *PCL1*, *PCL2* na transição G1/S. Swi6 é uma subunidade com papel regulador, uma vez que a sua perda leva a níveis intermédio constitutivos da expressão de *CLN1* e *CLN2*. Cln1 e Cln2 complexam com a kinase dependente de ciclina Cdc28 e, desta forma, activam a transição G1/S. SBF é, desta forma, um regulador chave na transição G1/S (Gustin *et al.*, 1998).

2.1.1. Factor de transcrição Rlm1

O *RLM1* (*resistance to lethality of MKK1^{P386} overexpression*) foi identificado como um gene conferindo resistência à letalidade da sobreexpressão de *MKK1*^{S386P} (Watanabe *et al.*, 1995). *RLM1* pertence à família de factores de transcrição MADS-box (Mcm1-Agamous-Deficiens-Serum Response Factor), apresentando especificidade de ligação ao DNA *in vitro* à sequência CTA(T/A)₄TAG. Em *S. cerevisiae*, Rlm1 está localizado no núcleo independentemente do seu estado de activação ou fosforilação, sendo fosforilado pela proteína kinase Slt2 (Damvel *et al.*, 2005). Um estudo indicou que os locais de fosforilação devem residir na região desde o resíduo 329 até 445 (Heinisch *et al.*, 1999). Estudos funcionais com Rlm1 truncados indicaram que os 221 aminoácidos do N-terminal não são requeridos para a activação da transcrição dos genes por ele regulados, enquanto que a região C-terminal (especificamente os resíduos 526 a 676) é indispensável (Dodou & Treisman, 1997).

Rlm1 é requerido para a activação de genes envolvidos na remodelação da parede celular em resposta a stresses que a danifiquem. Uma análise da expressão dos genes activados pela via da integridade celular revela que Rlm1 regula especificamente a expressão de pelo menos 25 genes, a maioria dos quais codificam proteínas da parede celular, ou proteínas envolvidas na biogénese desta (Jung & Levin, 1999). Notavelmente, o facto de se verificar a regulação da expressão de genes muito distintos, envolvidos em diferentes processos, bem como o Rlm1 poder regular tanto positiva como negativamente, indica que este factor pode actuar tanto como activador ou como repressor transcricional dependendo do contexto. Este facto sugere ainda que o comportamento do factor de transcrição Rlm1 pode ser ditado por co-factores desconhecidos (Levin, 2005).

De entre os vários grupos de genes regulados por Rlm1, o maior grupo de genes identificado codifica estabelecidas e putativas proteínas glicosil-fosfatidilinositol (GPI), as quais são conhecidas por residir na membrana plasmática e na parede celular. As proteínas GPI na parede celular têm as suas âncoras na membrana plasmática por ligação covalente aos β -1,6-glucanos na parede. Um segundo grupo é composto por outra classe de proteínas da parede celular, as Pir (*proteins with internal repeats*), que incluem Pir1, Pir2 e Cis3, as quais diferem das proteínas GPI pela sua ligação à parede directamente através de β -1,3-glucano, em vez de através de *cross-link* por β -1,6-glucano. Um outro grupo compreende genes envolvidos na síntese da quitina e do β -1,3-glucano, como *CHS1* e *FKS1/BGL2*, respectivamente, o que demonstra o papel primordial destes dois componentes na integridade da parede celular (García *et al.*, 2004; Jung & Levin, 1999).

2.2. Via da integridade celular em *Candida albicans*

Uma vez que as cascatas de sinalização MAPKinases são muito conservadas do ponto de vista evolutivo é de esperar que em *C. albicans* vias semelhantes existam e que os correspondentes homólogos possam ser expressos em *S. cerevisiae* apesar da degeneração do código genético em muitas espécies de *Candida*. Watanabe *et al.* (1995) isolaram em *C. albicans* o homólogo complementar do gene *SLT2* de *S. cerevisiae*, sugerindo a existência de uma cascata de sinalização homóloga à Slit2 em *C. albicans*. O gene isolado, denominado *MKC1*, foi capaz de substituir a função do mutante *slt2* de *S. cerevisiae*, restaurando o crescimento e prevenindo a auto-lise a 37°C do mutante. Desta forma foi demonstrado que o gene de *Candida* é expresso em células de *Saccharomyces*, e que possivelmente esta via pode existir em *C. albicans* (Navarro-García *et al.*, 1995).

A importância de *MKC1* na integridade da parede celular, bem como na virulência de *C. albicans* já foi confirmado com o mutante *mkc1*. Este mutante apresentou-se altamente sensível a enzimas que degradam a parede celular, a SDS, a cafeína, a altas concentrações de cálcio e a compostos antifúngicos que interferem com a síntese de β -1,3-glucano e quitina. Estes efeitos podem ser remediados pela adição de estabilizadores osmóticos, como 1M sorbitol, no meio. O mutante *mkc1* apresentou também reduzido crescimento invasivo em meio Spider, e as hifas produzidas pelas suas células são mais pequenas quando comparadas com as da estirpe selvagem (Navarro-García *et al.*, 1998). Este mutante não apresenta uma alteração dramática da composição celular mas difere da estirpe selvagem na deposição superficial de mananos. Além disso, sobreexpressão de

Mkc1 em *S. cerevisiae* resulta numa formação aumentada de pseudo-hifas em células crescidas em meio com falta de azoto, indicando a sua importância no crescimento polarizado (Navarro-García *et al.*, 1998). Estudos recentes indicam que esta MAPK é essencial para o crescimento invasivo de *Candida* sob determinadas condições fixas e no processo de formação de biofilme. A sinalização Mkc1 é, desta forma, relevante em processos dependentes da interacção física com superfícies externas (Kumamoto, 2005). Outros estudos indicaram também que o padrão de activação de Mkc1 é muito próximo do apresentado por kinases activadas por stresses em geral. De facto, Mkc1 é fosforilado em resposta a stress oxidativo e osmótico e choque por baixas temperaturas, entre outros (Navarro-García *et al.*, 2005). Evidências do papel de Mkc1 na integridade celular são também reforçadas pelas recentes observações que mutantes *pmr1*, defectivos numa ATPase tipo-P que altera dramaticamente a composição da superfície celular, activam constitutivamente Mkc1 (Bates *et al.*, 2005).

Num sistema de infecção experimental, utilizando ratinhos como modelo, o mutante *mkc1* de *C. albicans* mostrou-se menos virulento que a estirpe selvagem, demonstrando desta forma que a via da integridade celular está envolvida na patogenicidade deste fungo oportunista (Diez-Orejas *et al.*, 1997). Na realidade, vários estudos demonstram o papel fundamental desta via no processo de infecção, nomeadamente no processo de reconhecimento e colonização do fungo. Desta forma, esta via influencia a exposição superficial de glucanos, sendo estes essenciais para a interacção com receptores Dectin-1 e o respectivo desenvolvimento da resposta imunológica. Além disso, essa via é activada em resposta a vários tipos de stress (oxidativo, danos na parede celular e temperatura), os quais sugerem uma resposta defensiva quando confrontadas com as defesas do hospedeiro; bem como em resposta ao contacto com superfícies sólidas, influenciando a formação de biofilmes. Estas características são primordiais na etapa de colonização (Román *et al.*, 2007).

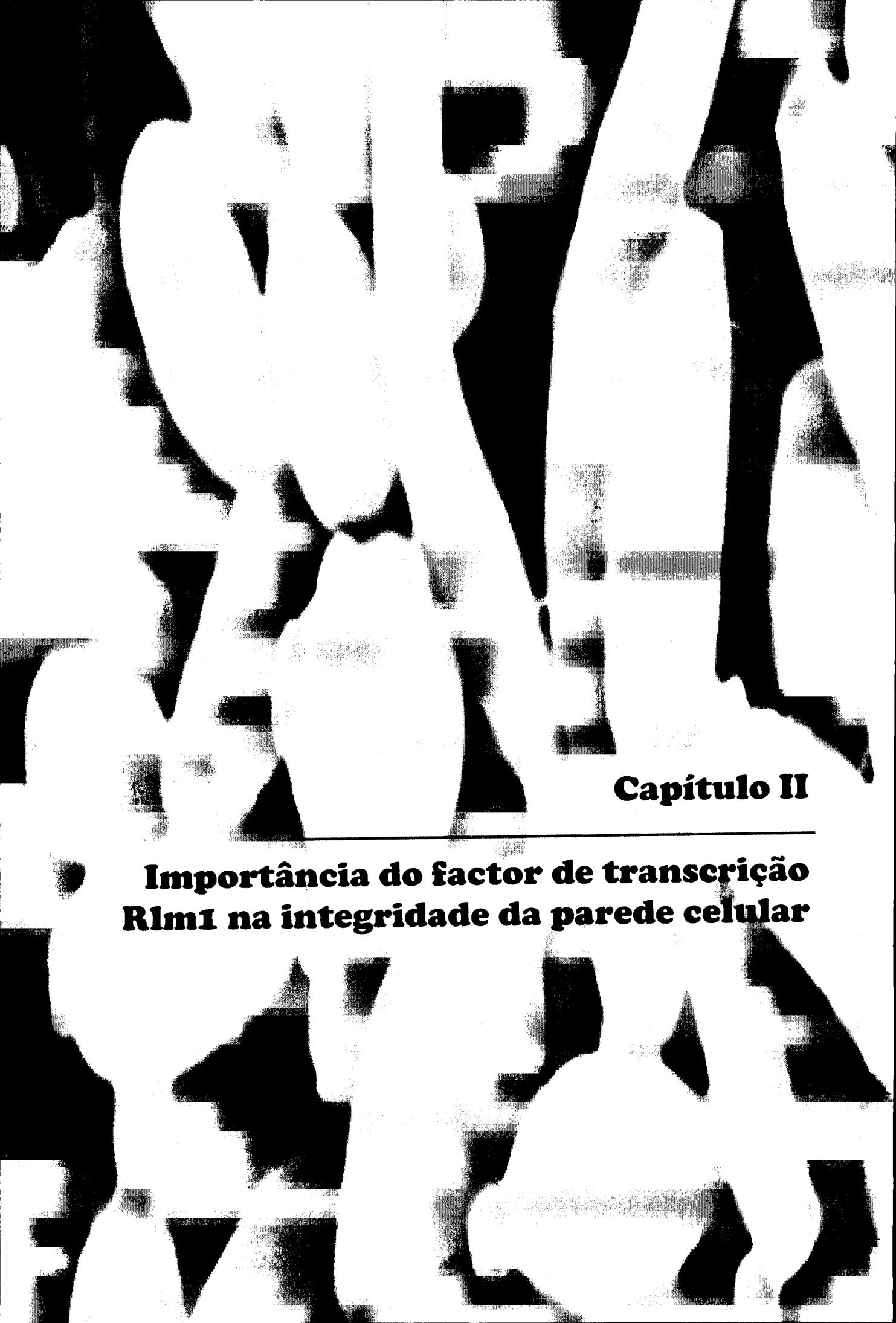
Apesar de *RLM1* em *S. cerevisiae* ter um papel fundamental na expressão de muitos genes envolvidos na integridade da parede celular, em *C. albicans* foi sugerido um papel mais limitado nesta resposta (Bruno *et al.*, 2006). Mesmo assim, *RLM1* é requerido para o normal crescimento de *C. albicans* na presença de compostos que interferem directamente com a parede celular, como caspofungina e Congo red (Bruno *et al.*, 2006), demonstrando, desta forma, o seu envolvimento na manutenção da estrutura e integridade da parede celular.

O principal objectivo deste trabalho é o estudo do factor de transcrição Rlm1 e a sua importância na manutenção da integridade da parede celular. Sendo a parede celular

uma estrutura essencial e específica do fungo, encontrando-se ausente nas células humanas, o estudo da regulação da sua biogénese por este factor de transcrição, pode constituir uma base importante para a determinação de novos alvos antifúngicos.

O trabalho será desenvolvido de acordo com os seguintes objectivos:

- (i) Determinar as condições que activam o factor de transcrição Rlm1, e a sua importância na integridade da parede celular.
- (ii) Determinar a morte intracelular e morfologia em resposta a macrófagos e avaliar a importância de Rlm1 na virulência de *C. albicans*.
- (iii) Expressar a proteína Rlm1, de modo a posteriormente determinar a sequência de ligação deste factor de transcrição Rlm1 para identificação dos genes por ele regulados.
- (iv) Construir variantes alélicas de *RLM1*, de forma a posteriormente compreender o envolvimento destes na adaptabilidade a diferentes condições de stress.



Capítulo II

Importância do factor de transcrição Rlm1 na integridade da parede celular

1. Introdução

A parede celular de *Candida albicans* é uma estrutura dinâmica cuja composição e organização estrutural é regulada durante o ciclo celular e em resposta a mudanças das condições ambientais, stresses impostos e mutações nos processos biossintéticos da parede celular. A quitina e o β -1,3-glucano representam os maiores componentes estruturais na parede celular do fungo. Estes polissacarídeos resistem à pressão de turgor positiva dentro da célula e, por último, determinam a morfologia da mesma. A síntese de quitina e glucano exerce, desta forma, um papel fundamental na manutenção da integridade celular do fungo durante o crescimento e morfogénese e na adaptação ao stress (Munro *et al.*, 2007).

A biossíntese dos polímeros estruturais ocorre na membrana plasmática, onde as cadeias de polissacarídeos são polimerizadas (Gozalbo *et al.*, 2004). A reacção de polimerização da quitina é um processo vectorial onde resíduos de UDP-GlcNAc do citoplasma são incorporados numa cadeia de quitina, por acção da quitina sintetase. As células de *C. albicans* possuem quatro quitinas sintetases principais (Chs1, Chs2, Chs3 e Chs8), codificadas por diferentes genes, as quais exercem diferentes papéis na fisiologia da célula. Chs1 sintetiza a quitina do septo e contribui para a quitina da parede celular lateral e é essencial para a viabilidade das formas de levedura e hifa. Chs3 sintetiza a maioria da quitina na parede celular tanto das formas de levedura como de hifa. Chs2 parece ser responsável por parte da quitina da hifa, enquanto a função de Chs8 ainda não é clara, apesar de parecer não exercer nenhum papel significativo (Lagorce *et al.*, 2002; Munro *et al.*, 2007; Selvaggini *et al.*, 2004). As reacções bioquímicas que levam à produção de UDP-GlcNAc a partir de glucose-6-fosfato, ocorrem no citoplasma basicamente a seguir da etapa para a formação de outros açúcares nucleosídeos difosfato (Gozalbo *et al.*, 2004).

O β -1,3-glucano é sintetizado na membrana plasmática por acção da β -1,3-glucano sintetase, uma proteína de membrana intrínseca que possui pelo menos dois componentes, a subunidade catalítica e a subunidade regulatória de ligação ao GTP. A enzima aceita UDP-glucose do citosol e adiciona à cadeia de glucano. A síntese de β -1,6-glucano aparenta ser mais complexa. Análises genéticas demonstram que a sua síntese ocorre após uma etapa de secreção, isto é, cadeias lineares de β -1,6-glucano são produzidas no retículo endoplasmático, provavelmente utilizando UDP-glucose como substrato, e libertadas na parede celular, onde a maturação, *assembly* final das cadeias de glucano e *cross-linking* com outros componentes da parede celular ocorrem (Gozalbo *et al.*, 2004).

As manoproteínas são sintetizadas no citoplasma, sendo translocadas no retículo endoplasmático e transportados através da via secretora para a parede celular. Durante este processo as proteínas sofrem modificações pós-translacionais que incluem glicosilação, fosforilação, acetilação, proteólise específica e adição de GPI (Gozalbo *et al.*, 2004).

Os principais componentes encontram-se ligados uns aos outros em complexos macromoleculares no qual o β -1,6-glucano actua como *cross-linker*, estando ligado aos componentes β -1,3-glucano, manoproteínas e, ocasionalmente, à quitina. O β -1,3-glucano está covalentemente ligado à quitina, constituindo a camada interna da parede celular, o qual é o elemento responsável pela força mecânica desta estrutura, enquanto as manoproteínas formam a camada externa da parede celular (Fig. 2.1). Duas classes de proteínas estão associadas covalentemente aos polissacarídeos: proteínas Pir (*proteins with internal repeats*), as quais estão directamente ligadas a β -1,3-glucano, e proteínas da parede celular (CWP) dependentes de GPI, as quais estão geralmente ligadas ao β -1,3-glucano através da cadeia de β -1,6-glucano.

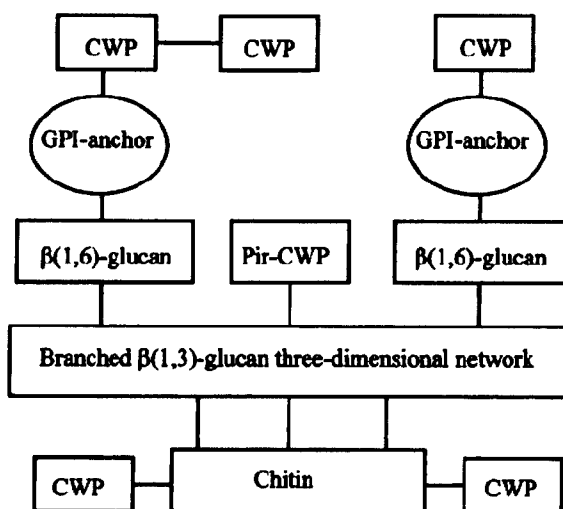


Figura 2.1 – Representação esquemática da organização molecular da parede celular de *C. albicans*. A rede de β -1,3-glucano serve como ponte de ligação covalente para outros componentes da parede celular; ligações covalentes entre diferentes manoproteínas da parede celular (CWP) também ocorrem, e muitas manoproteínas encontram-se ligadas à quitina. [Adaptada de Gozalbo *et al.*, 2004].

A parede celular não é uma estrutura estática uma vez que precisa de se adaptar às diferentes condições de crescimento como o aumento do tamanho da célula, e também precisa de ser remodelada durante processos de morfogénese como esporulação ou crescimento em pseudo-hifa. Além disso, para sobreviver a célula necessita modificar a

composição e/ou estrutura da parede celular em resposta aos stresses ambientais. A existência de uma resposta celular, a qual é denominada de “mecanismos compensatórios”, ilustra claramente a natureza dinâmica da parede celular. Estes mecanismos envolvem vários processos (García *et al.*, 2004). Primeiro, o balanço entre os polissacarídeos da parede celular é modificado, como indicado pela hiperacumulação de quitina. Segundo, o tipo de associação entre β -glucano, manoproteínas e quitina é alterado. Verifica-se que em casos de diminuição da quantidade de β -1,6-glucano leva a que uma maior fracção de proteínas da parede celular estejam ligadas directamente a β -1,3-glucano e/ou quitina. Além disto verifica-se também o aumento do nível de proteínas Pir. A terceira resposta que garante a força da parede celular é uma redistribuição transiente da síntese da parede celular, nomeadamente do complexo β -1,3-glucano sintetase, e da maquinaria de reparação que é normalmente focada para as regiões de crescimento activo na célula (García *et al.*, 2004; Lagorce *et al.*, 2003).

A principal via de transdução de sinal que é essencial para a manutenção da via de integridade da parede celular de *C. albicans* é a MAPK Mkc1. A MAPK Mkc1 activada activa, por seu turno, factores de transcrição e consequentemente promove a expressão de genes (Navarro-García *et al.*, 1995). Apesar de em *C. albicans* ainda não ter sido descrito nenhum factor de transcrição como tendo um papel primordial na expressão de genes relacionados com a integridade da parede celular, em *S. cerevisiae* o factor de transcrição Rlm1 exerce este papel fundamental.

De forma a elucidar o papel que *RLM1* exerce em *C. albicans*, nomeadamente na integridade da parede celular, à semelhança do que se encontra descrito na literatura para *RLM1* de *S. cerevisiae*, mutantes *rlm1* foram caracterizados fenotipicamente. Deste modo, foi testada a sensibilidade não só a stresses que marcadamente perturbam a integridade da parede celular, bem como a stresses osmótico e oxidativo, de forma a determinar a especificidade do papel exercido por *RLM1*. Adicionalmente, foram efectuados ensaios de filamentação, de forma a avaliar a capacidade das estirpes desenvolverem hifas, uma vez que é uma característica importante que envolve a remodelação da parede celular e está intimamente relacionada com a virulência.

2. Material e métodos

2.1. Estirpes utilizadas neste estudo

As estirpes de *Candida albicans* SC5314 e BWP17 foram provenientes da Colecção de Leveduras do Departamento de Biologia da Universidade do Minho. As estirpes de *Candida albicans* VIC1206 e VIC1209 foram gentilmente cedidas pelo Professor Aaron P. Mitchell (Universidade de Columbia, New York, USA) e as estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 e YPL089c foram obtidas através da European *Saccharomyces cerevisiae* Archives for Functional analysis (EUROSCARF) (Tab. II.I).

Tabela II.I – Estirpes de levedura utilizadas neste estudo.

Microrganismo	Estirpe	Relevância do genótipo	Referência
<i>C. albicans</i>	SC5314	wild-type	Gillum <i>et al.</i> , 1984
<i>C. albicans</i>	BWP17	<i>ura3Δ::λimm434/ura3Δ::λimm434</i> <i>his1::hisG/his1::hisG</i> <i>arg4::hisG/arg4::hisG</i>	Wilson <i>et al.</i> , 1999
<i>C. albicans</i>	VIC1206	<i>rlm1Δ::ARG4/rlm1Δ::URA3</i> <i>pHIS1::his1::hisG/his1::hisG</i>	Bruno <i>et al.</i> , 2006
<i>C. albicans</i>	VIC1209	<i>rlm1Δ::ARG4/rlm1Δ::URA3</i> <i>pRLM1::HIS1::his1::hisG/his1::hisG</i>	Bruno <i>et al.</i> , 2006
<i>S. cerevisiae</i>	BY4741	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Brachmann <i>et al.</i> , 1998
<i>S. cerevisiae</i>	YPL089c	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>YPL089c::kanMX4</i>	EUROSCARF

Todas as estirpes de levedura utilizadas neste estudo encontravam-se congeladas a -80°C em solução de glicerol 30% (v/v), sendo repicadas em placas de Petri contendo meio YEPD agar (1% (p/v) Bacto Peptona (Becton Dickinson and Company), 0,5% (p/v) yeast extract (Panreac), 2% (p/v) glucose (Vaz Pereira), 2% (p/v) agar (Vaz Pereira)) e incubadas a 30°C. Adicionalmente, para utilizações a curto prazo, todas as estirpes foram conservadas a 4°C. Quando necessário para crescimento em meio líquido as culturas foram incubadas em incubadoras orbitais a 200rpm, a 30°C, e o crescimento monitorizado por determinação da densidade óptica (D.O.) das culturas a 640nm.

2.2. Caracterização fenotípica

2.2.1. Ensaios de sensibilidade a diferentes agentes de stress

As células de levedura foram cultivadas durante a noite em meio YEPD e a concentração de células de cada cultura foi normalizada para 5×10^3 células/ μ l por diluição com meio fresco após a D.O. a 640nm ser determinada. Os *drop tests* foram efectuados plaqueando 10 μ l de 5×10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 e $10^{0.5}$ células/ μ l em placas de YEPD suplementadas com 200 μ g/ml Calcofluor white (CFW), 200 μ g/ml Congo red (CR), 30ng/ml caspofungina (CFG), 10mM cafeína, 0,035%SDS, 1,5M NaCl e 2M sorbitol. Os restantes compostos foram testados em placas de *top agar* 0,7%, contendo 2×10^7 células com discos de papel 6 mm de diâmetro (Becton Dickinson), embebidos com 10 μ l de 50mM menadiona, 35% peróxido de hidrogénio e 40mg/ml diamida. As placas foram posteriormente incubadas a 30°C por 48h e 24h para os *drop tests* e ensaios de difusão em disco, respectivamente.

2.2.2. Ensaios de filamentação

A indução da formação de hifas das diferentes estirpes a 37°C foi efectuada em meio YEPD contendo 10% FBS (Fetal Bovine Serum; Gibco) e meio Spider (1% manitol, 1% nutrient broth, 0,2% K_2HPO_4), ambos meios sólidos (adicionando 2% agar). As células de *C. albicans* foram cultivadas durante a noite em meio Lee modificado (0,5% $(NH_4)_2SO_4$, 0,02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,25% K_2HPO_4 , 0,5% NaCl, 1,25% D-galactose, 0,05% L-alanina, 0,13% L-leucina, 0,1% L-lisina, 0,01% L-metionina, 0,007% L-ornitina, 0,05% L-prolina, 0,05% L-treonina, 0,0001% biotina), a 26°C e 160rpm, condições que asseguram que as células permaneçam na forma unicelular. Seguidamente foram recolhidas por centrifugação a 5000rpm (*eppendorf centrifuge 5804R*) durante 3 minutos, lavadas duas vezes e ressuspensas em 2ml de H_2O (água desionizada). Efectuaram-se então diluições decimais sucessivas de forma a obter um máximo de 30 células por placa. As placas inoculadas com as diferentes estirpes foram incubadas a 37°C e fotografadas à lupa ao sexto dia. O rebordo das colónias foi também visualizado no microscópio "Leica DM5000B", e as imagens adquiridas num sistema integrado "Leica DFC350FX".

2.2.2. Análise estatística

O nível de significância dos resultados obtidos na estirpe mutante *rlm1* (VIC1206) contra os controlos (SC5314, BWP17 e VIC1209) foi determinado usando “*Analysis of variance (Anova) single factor*” da Microsoft Office Excel 2003. Desta forma, as diferenças estatisticamente significativas entre os grupos foram assinaladas com * quando $p < 0,05$ e por ** quando $p < 0,001$.

3. Resultados

As consequências da perda do gene *RLM1*, quer em *C. albicans* quer em *S. cerevisiae*, foram determinadas por comparação do crescimento das estirpes parentais e complementada com o crescimento da estirpe mutante em placas de agar suplementadas com diferentes agentes indutores de stress.

3.1. Sensibilidade dos mutantes *rlm1* a agentes que afectam a integridade celular

Para obter evidências do papel de *RLM1* na manutenção da integridade da parede celular, os mutantes foram avaliados pela sensibilidade a uma gama de agentes que perturbam a parede celular e outros agentes que avaliam a integridade celular.

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que a deleção de *RLM1* em *C. albicans* resulta numa hipersensibilidade ao Calcofluor white (CFW) e Congo red (CR) relativamente à estirpe parental (Fig. 2.2). Contudo, estes fenótipos não são visualizados em *S. cerevisiae*, onde a estirpe mutante *rlm1* se apresenta mais resistente ao CFW que a estirpe parental e indiferente à presença do CR (Fig. 2.2). Estes compostos são agentes que perturbam a parede celular, ligando-se à quitina e glucanos, respectivamente, e inibindo o crescimento por disrupção do *assembly* das microfibrilas (Bates *et al.*, 2004; Eisman *et al.*, 2005; Hiller *et al.*, 2007; Garcerá *et al.*, 2003; Martinez-Lopez *et al.*, 2004; Pardo *et al.*, 2004; Róman *et al.*, 2005). O mutante *rlm1* de *C. albicans* também se mostrou mais sensível à presença de caspofungina (CFG) que a estirpe parental (Fig. 2.2). Por seu turno, o mutante *rlm1* de *S. cerevisiae* não apresentou sensibilidade/resistência aumentada à CFG, relativamente à estirpe parental (Fig. 2.2). A CFG é uma equinocandina que actua como fungicida uma vez que é um inibidor não competitivo das 1,3-glucano sintetases Fks1 e Fks2, as quais catalizam a polimerização

da UDP-glucose em 1,3-glucano durante a biogénese da parede celular (Bachmann *et al.*, 2002; Masubuchi *et al.*, 2001; Onishi *et al.*, 1999; Reinoso-Martín *et al.*, 2003; Stevens *et al.*, 2004; Walker *et al.*, 2008). Em *C. albicans* todos os fenótipos foram revertidos na estirpe complementada, onde a cópia de *RLM1* da estirpe selvagem foi reintegrada no genoma.

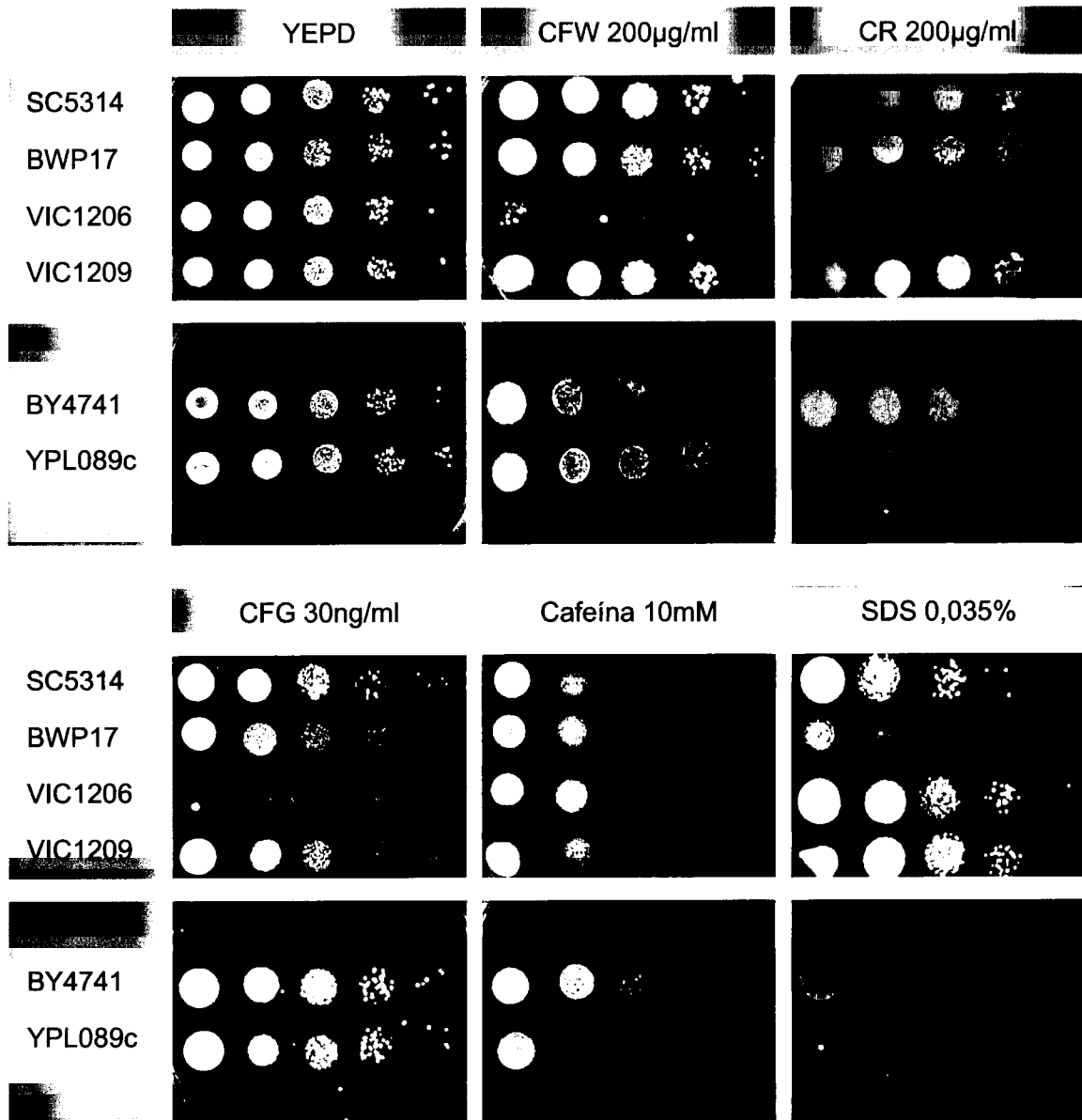


Figura 2.2 – Sensibilidade das diferentes estirpes de *C. albicans* e *S. cerevisiae* a vários agentes que afectam a integridade celular. As células das diferentes estirpes foram crescidas em meio YEPD, normalizadas para uma concentração de 5×10^3 células/ μ l, realizadas diluições decimais sucessivas e plaqueadas 10µl em placas de YEPD com as concentrações indicadas dos compostos testados. As placas foram incubadas a 30°C, e fotografadas após 48h de incubação.

Os resultados obtidos com agentes que avaliam a integridade celular, a cafeína e o SDS, mostraram que não existe nenhuma alteração na sensibilidade do mutante *rlm1* de *C. albicans* a esses compostos (Fig. 2.2). No entanto, o crescimento da estirpe auxotrófica de *C. albicans* BWP17 encontra-se bastante afectado na presença do detergente SDS. Os resultados obtidos com *S. cerevisiae* indicaram que a deleção de *RLM1* resulta numa hipersensibilidade a estes agentes relativamente à estirpe parental, contrariamente ao observado em *C. albicans* (Fig. 2.2). A cafeína é um inibidor das fosfodiesterases do cAMP, em células eucariotas, apesar do seu mecanismo de acção ainda não ser conhecido (Martín *et al.*, 2000; Munro *et al.*, 2007). Por seu turno, o SDS é um detergente que tem por alvo as proteínas, tanto da parede celular como da membrana plasmática (Bates *et al.*, 2005; Munro *et al.*, 2007; Pardo *et al.*, 2004).

Estes resultados indicam que enquanto em *C. albicans* a ausência do *RLM1* afecta o crescimento das células apenas sob o stress induzido por agentes que perturbam a parede celular (CFW, CR e CFG), em *S. cerevisiae* a ausência do gene confere resistência ao stress induzido pelo CFW e hipersensibilidade a agentes que avaliam a integridade celular (cafeína e SDS).

3.2. Sensibilidade dos mutantes *rlm1* ao stress osmótico

O comportamento das estirpes mutantes *rlm1* em meios indutores de stress osmótico também foi analisado. A estirpe VIC1206 cresceu em meio hiperosmótico contendo baixa actividade de água, condição alcançada pela adição ao meio de substâncias frequentemente utilizadas como estabilizadores osmóticos. Desta forma, o mutante *rlm1* de *C. albicans* cresceu em placas contendo o osmólito iónico NaCl, bem como um agente causador de stress osmótico de natureza não iónica, o sorbitol (Fig. 2.3). O seu crescimento em meio hipo-osmótico (20%YEPD; Davenport *et al.*, 1999) também não se encontra afectado. A estirpe auxotrófica BWP17 apresenta, no entanto, o seu crescimento bastante afectado na presença de NaCl (Fig. 2.3).

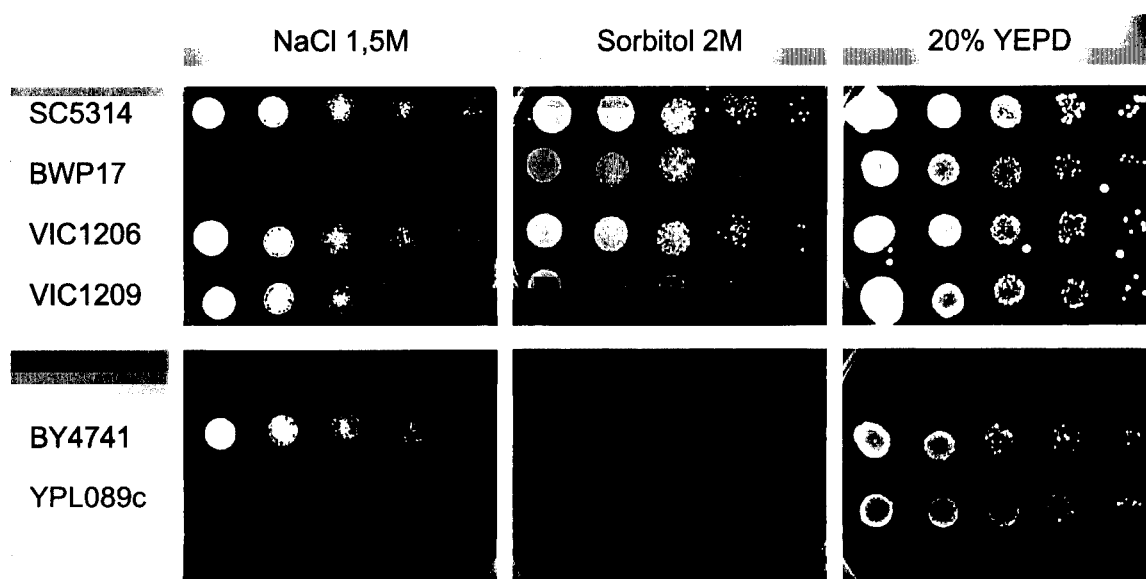


Figura 2.3 – Sensibilidade das diferentes estirpes de *C. albicans* e *S. cerevisiae* ao stress osmótico. As células das diferentes estirpes foram crescidas em meio YEPD, normalizadas para uma concentração de 5×10^3 células/ μ l, realizadas diluições decimais sucessivas e plaqueadas 10 μ l em placas de YEPD com as concentrações indicadas dos compostos testados. As placas foram incubadas a 30°C, e fotografadas após 48h de incubação.

Por seu turno, em *S. cerevisiae* a estirpe mutante *rlm1* tem o seu crescimento afectado em meio contendo NaCl, apesar de ser indiferente à presença de sorbitol. A hiposmolaridade também não afecta particularmente o crescimento deste mutante relativamente à estirpe parental (Fig. 2.3).

Estes resultados revelam que em *S. cerevisiae* o gene *RLM1* deverá ser importante na resposta ao stress induzido pelo agente iónico NaCl, enquanto que em *C. albicans* este gene não parece ser importante na resposta à osmolaridade.

3.3. Sensibilidade dos mutantes *rlm1* ao stress oxidativo

Dado o papel que a via da integridade celular exerce na reparação de danos provocados por uma variedade de stresses foi também avaliado se o *RLM1* está envolvido na resposta ao stress oxidativo.

Desta forma, a viabilidade das células mutantes *rlm1* foi observada na presença de peróxido de hidrogénio, menadiona (um oxidante gerador de superóxido) e diamida (um agente tiol-oxidante) (Navarro-García *et al.*, 2005; Staleva *et al.*, 2004; Vilella *et al.*, 2005; Westwater *et al.*, 2005), em ensaios de difusão em discos de papel. No que diz respeito

ao stress induzido pela menadiona não se observaram diferenças no crescimento do mutante *rlm1* quer de *S. cerevisiae* quer de *C. albicans*, em relação às respectivas estirpes parentais (Fig. 2.4). O mutante *rlm1* de *S. cerevisiae* apresenta-se mais sensível ao peróxido de hidrogénio, sendo esta diferença estatisticamente significativa, contrariamente ao observado com o mutante de *C. albicans* que é tão sensível como as estirpes parental e a complementada (Fig. 2.4). A estirpe mutante *rlm1* de *C. albicans*, apresenta-se significativamente mais sensível à diamida que as estirpes parental e complementada, contudo não se observam diferenças no crescimento do respectivo mutante de *S. cerevisiae* (Fig. 2.4).

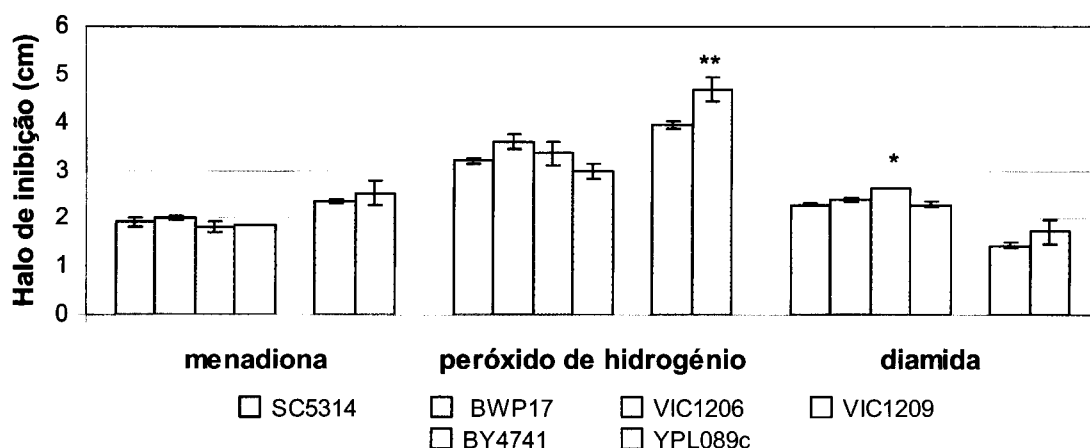


Figura 2.4 – Sensibilidade das diferentes estirpes de *C. albicans* e *S. cerevisiae* ao stress oxidativo. As células das diferentes estirpes foram crescidas em meio YEPD e plaqueadas 2×10^7 células em placas de *top agar*. Sobre os discos de difusão de papel foram depositados 10 μ l de 50mM menadiona, 35% peróxido de hidrogénio e 40mg/ml diamida. As placas foram incubadas a 30°C, e os halos determinados após 24h de incubação. As barras verticais representam a média $\pm$ DP (Desvio Padrão) de três experiências independentes (* se $p < 0,05$ e ** se $p < 0,001$).

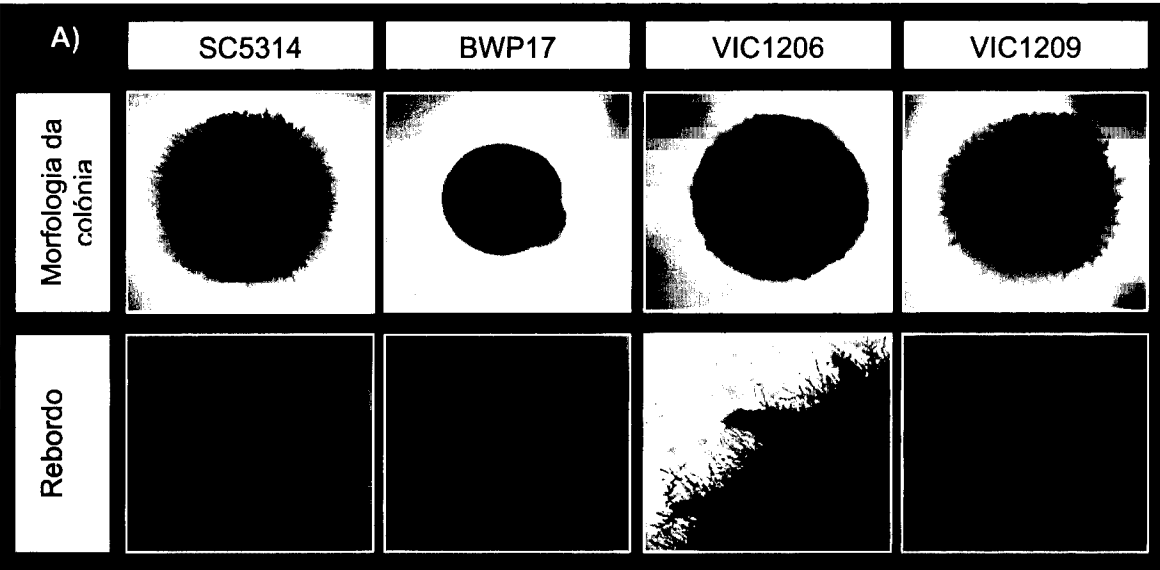
Estes resultados indicam que em *S. cerevisiae* a ausência do *RLM1* afecta o crescimento das células apenas sob o stress induzido pelo peróxido de hidrogénio, enquanto que em *C. albicans* apenas sob o stress induzido pela diamida.

3.4. Transições dimórficas

A capacidade de desenvolver hifas rapidamente é uma característica importante que envolve a parede celular e está intimamente relacionada com a virulência. Desta forma, para analisar o efeito do gene *RLM1* na morfogénese de *C. albicans* e *S. cerevisiae*, ensaios de filamentação foram realizados em diferentes meios sólidos, caracterizados por serem indutores de filamentação. As células foram inicialmente sincronizadas em forma leveduriforme, por crescimento a 26°C, e plaqueadas em meio Spider (Bockmuhl *et al.*, 2001; Krueger *et al.*, 2004; Umeyama *et al.*, 2006; Warenda & Konopka, 2002) e YEPD suplementado com 10% de FBS (Krueger *et al.*, 2004; Umeyama *et al.*, 2006; Walther & Wendland, 2004; Warenda & Konopka, 2002).

Em meio Spider sólido a análise microscópica do rebordo das colónias revelou que os filamentos que invadem o agar nas colónias da estirpe VIC1206 são mais curtos e pouco numerosos, quando comparados com os da estirpe selvagem SC5314 (Fig. 2.5A). A estirpe VIC1209 recuperou a capacidade para formar hifas invasivas, semelhantes às observadas na estirpe SC5314. A estirpe auxotrófica BWP17 não apresentou capacidade de formar hifas, nestas condições. Em meio sólido contendo FBS não são visualizadas diferenças significativas na morfologia das colónias, exceptuando a auxotrófica BWP17 na qual a extensão dos filamentos é muito reduzida comparando com a estirpe selvagem (Fig. 2.5B).

Estes resultados parecem indicar a participação de *RLM1* de *C. albicans* na capacidade de filamentação, pelo menos em meio Spider.



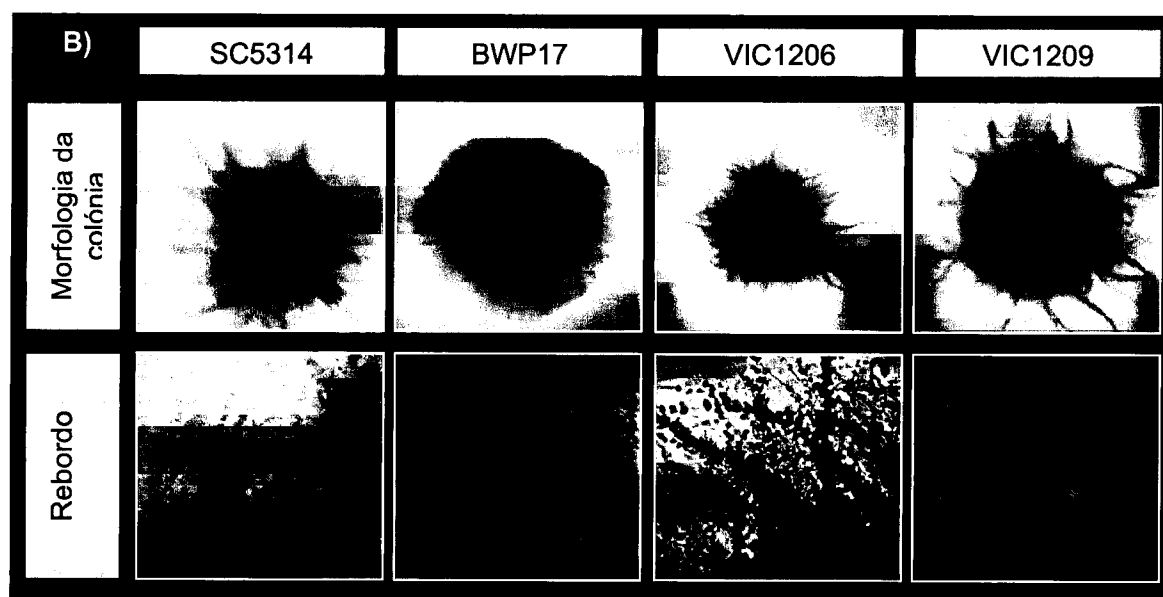


Figura 2.5 – Morfologia das colónias de *C. albicans* em meios indutores de filamentação (A) Spider e (B) YEPD suplementado com 10% de FBS. As células foram sincronizadas na forma unicelular por crescimento em meio Lee a 26°C, recolhidas por centrifugação, lavadas, contadas e aproximadamente 30 células foram plaqueadas nos meios, e incubadas a 37°C. As fotografias foram tiradas aos 6 dias de incubação.

Em *S. cerevisiae*, nem a estirpe mutante nem a parental apresentaram capacidade de produzir filamentos nos meios utilizados neste estudo. Estes resultados sugerem que ou o *RLM1* não é importante na filamentação em *S. cerevisiae*, ou os meios testados não são os mais adequados para observar filamentação nesta espécie.

4. Discussão

Em *S. cerevisiae* a via Slt2 exerce um papel fundamental na integridade da parede celular, onde o factor de transcrição Rlm1 tem um papel primordial na expressão de genes relacionados com a manutenção da integridade da parede celular (Watanabe *et al.*, 1995). Em *C. albicans* este papel é exercido pela via Mkc1, contudo o papel que Rlm1 desempenha na manutenção da integridade da parede celular ainda não foi descrito. Neste sentido, o estudo de mutantes afectados neste gene poderá fornecer informações importantes sobre a sua função.

A hipersensibilidade ao Calcofluor white (CFW) apresentada pelo mutante *rlm1* de *C. albicans* (Fig. 2.2) poderá demonstrar que a quantidade dos diferentes componentes da

parede celular foi modificada na estirpe mutante. A maioria dos casos de hipersensibilidade ao CFW descritas na literatura está intimamente relacionada com um aumento do conteúdo de quitina na parede celular (Sanz *et al.*, 2005; Selvaggini *et al.*, 2004). Isto deve-se à activação dos denominados “mecanismos compensatórios” que, entre outros processos, responde ao enfraquecimento da parede celular pelo aumento da síntese de quitina. Este resultado sugere que o mutante *rlm1* de *C. albicans* poderá apresentar um aumento do conteúdo de quitina na parede celular devido aos mecanismos compensatórios, ou que o Rlm1 participa directamente no controlo de genes envolvidos na regulação da síntese da quitina.

O Rlm1 deverá também exercer um papel de reparação dos danos provocados na parede celular, uma vez que o mutante de *C. albicans* neste gene também se encontra afectado na resposta às alterações de β -1,3-glucanos. Desta forma, o mutante encontra-se sensível tanto à presença de Congo red (CR), o qual interfere com o *assembly* dos β -1,3-glucanos, bem como à presença de caspofungina (CFG), um inibidor da β -1,3-glucano sintetase (Fig. 2.2). O aumento da sensibilidade a estes compostos poderá também ocorrer devido à activação de um outro mecanismo compensatório, que responde pelo aumento da expressão desta enzima, tornando assim o mutante mais sensível.

Diferente deverá ser o papel exercido por *RLM1* em *S. cerevisiae*. Este mutante *rlm1* não só se mostrou indiferente à presença do CR e da CFG, como se mostrou mais resistente à presença de CFW. Além disso, mostrou-se sensível à presença de cafeína e SDS (Fig. 2.2), contrariamente ao observado em *C. albicans*. Em *S. cerevisiae* a maioria destes fenótipos já foram previamente documentados em vários estudos, sugerindo sempre o envolvimento de Rlm1 na integridade da parede celular (Dodou & Treisman, 1997; Heinisch *et al.*, 1999; Jung *et al.*, 2002; Reinoso-Martín *et al.*, 2003; Watanabe *et al.*, 1995; Watanabe *et al.*, 1997). Contudo, as diferenças observadas neste estudo sugerem que Rlm1 em *C. albicans* exerce um papel mais direccionado para a reparação dos danos por agentes que perturbam a parede celular, enquanto que em *S. cerevisiae* esse papel se encontra mais limitado. Estas discrepâncias podem também ser explicadas pela existência de pequenas diferenças funcionais na construção ou manutenção da integridade da parede celular.

No que se refere aos resultados obtidos quer aumentando quer diminuindo a osmolaridade, não foi observável aumento de sensibilidade a qualquer um dos stresses osmóticos na estirpe VIC1206 (Fig. 2.3), o que indica que o mutante *rlm1* de *C. albicans* é osmoticamente estável.

No entanto, o mutante *rlm1* de *S. cerevisiae* apresenta sensibilidade aumentada ao osmólito iónico NaCl (Fig. 2.3). Em *S. cerevisiae* a homeostasia iónica está relacionada

com a via mediada pela calcineurina (Mendoza *et al.*, 1994), a qual está interrelacionada com a via da integridade celular, indicando que Rlm1 poderá ser activado sob estas condições de stress (Nakamura *et al.*, 1996; Posas *et al.*, 1993; Posas *et al.*, 1995). Contudo, como o aumento da sensibilidade a altas concentrações do osmólito NaCl que o mutante *rlm1* de *S. cerevisiae* apresentou não é compartilhado pelo mutante *rlm1* de *C. albicans*, estes dados sugerem que deve existir uma diferente regulação ou relação entre estas duas vias em *C. albicans*.

A sensibilidade ao stress oxidativo é um outro fenótipo associado a mutantes em genes envolvidos na via da integridade celular. Três diferentes agentes oxidantes foram utilizados neste estudo: menadiona, peróxido de hidrogénio e diamida.

Dos diferentes agentes de stress oxidativo utilizados o mutante *rlm1* de *C. albicans* apresenta apenas diferenças significativas na sensibilidade à diamida (Fig. 2.4). O mecanismo pelo qual a diamida oxida os elementos celulares e induz resposta por parte da via da integridade celular é diferente do descrito para o peróxido de hidrogénio e a menadiona. Segundo Vilella *et al.* (2005), o peróxido de hidrogénio e a menadiona não provocam grandes danos na parede celular, sendo a sua acção maioritariamente a nível intracelular, afectando a polarização do citoesqueleto de actina. Por seu turno, a diamida actua basicamente a nível extracelular oxidando os grupos sulfidril das proteínas à superfície da célula. Consequentemente a diamida vai provocar uma redução da porosidade da célula, alterando deste modo a integridade celular (Vilella *et al.*, 2005).

Em *S. cerevisiae* estudos descritos na literatura indicam que o tratamento com diamida e peróxido de hidrogénio induz a fosforilação de Slt2 apesar da cinética de activação ser diferente, com a activação a ocorrer consideravelmente mais rapidamente com a diamida (Vilella *et al.*, 2005). Contudo, apenas o tratamento com peróxido de hidrogénio induz a transcrição de genes dependentes da regulação de Rlm1 (Vilella *et al.*, 2005). Estes dados suportam os resultados obtidos neste trabalho no que se refere à diferente sensibilidade do mutante *rlm1* de *S. cerevisiae* à diamida e peróxido de hidrogénio (Fig. 2.4).

Assim sendo, *RLM1* de *C. albicans* parece não estar envolvido directamente na resposta ao stress oxidativo, à semelhança do que acontece para *S. cerevisiae*, sendo somente requerido na resposta a agentes que afectam directamente a integridade da parede celular como a diamida.

No que respeita à filamentação apenas foram observadas diferenças em *C. albicans*. Em meio Spider, as células mutantes *rlm1* desenvolveram hifas mais curtas e em menor quantidade comparativamente com o observado nas estirpes selvagem e complementada

(Fig. 2.5A). Em meio suplementado com soro, a filamentação da estirpe mutante não se encontra afectada (Fig. 2.5B). Junto, estes resultados, demonstram que a deleção de *RLM1* poderá reduzir a capacidade de alongação das hifas, sob determinadas condições, mas a capacidade para proceder à transição levedura para hifa mantém-se. Contudo, estes resultados sugerem que, apesar de interferir nas transições dimórficas em determinadas condições, o gene *RLM1* não é essencial para a filamentação, devendo existir vias adicionais mais relevantes no controlo da formação de hifas em *C. albicans*.

Em suma, os resultados obtidos indicam que Rlm1 de *C. albicans* está directamente envolvido na resposta a danos que perturbam a integridade da parede celular, contrariamente ao observado em *S. cerevisiae*, onde este gene parece estar mais directamente envolvido na integridade celular, independentemente da perturbação da parede. As diferenças de susceptibilidade observadas nas duas espécies sugerem que Rlm1 regula genes distintos, o que poderá ser resultado por um lado, apresentarem diferentes locais de reconhecimento ao DNA, por outro lado, por alterações nas sequências de ligação destes factores de transcrição nos genes por eles activados.

Capítulo III

Importância de RlmI na infecção com macrófagos

1. Introdução

Candida albicans coloniza normalmente o trato gastrointestinal, respiratório, reprodutivo e pele em humanos, e pode tornar-se patogénico se se deslocar do local onde normalmente actua como comensal para outro local do corpo que reage à sua presença (Ibata-Ombetta *et al.*, 2003). A transição de colonização para invasão das mucosas e/ou invasão sistémica disseminada depende de factores do hospedeiro e do fungo (Cole *et al.*, 1996). Alterações da flora normal como resultado de terapia com antibióticos, imunodeficiências adquirida ou primária, ou quebra das barreiras anatómicas são factores que predispõem à infecção. Após o microrganismo penetrar uma das barreiras de protecção primárias este encontra o sistema imune, o qual reage com vários mecanismos de defesa ao ataque do fungo (Lorenz & Fink, 2002). Uma resposta efectiva do hospedeiro contra o fungo requer a contribuição coordenada da imunidade inata e adaptativa (Antachopoulos & Roldes, 2005).

Os primeiros mecanismos de imunidade inata contra infecções por *Candida* incluem barreira físicas, como a pele e as superfícies mucosas, e barreiras químicas, que incluem proteínas, como lactoferrina, beta-defensinas, lisosima, transferrina, lactoperoxidase, mucinas e imunoglobulina A secretada. Juntos, estes mecanismos, previnem a adesão e crescimento de células de microrganismos incluindo *Candida* nas superfícies mucosas (Steele *et al.*, 2000).

A imunidade mediada por células exerce um papel dominante na prevenção de candidíases nas superfícies mucosas. Vários estudos, utilizando modelos animais, demonstraram esta importância, onde a deleção de fagócitos aumenta a susceptibilidade a infecções das mucosas e disseminadas (Hashimoto *et al.*, 1991). Tem sido também demonstrado que anomalias quantitativas e qualitativas dos neutrófilos e monócitos estão associadas com candidíases sistémicas. Por exemplo, pacientes com linfoma, leucemia, doenças granulomatosa crónica, e doentes com cancro sujeitos a quimioterapia com resultante neutropenia possuem risco aumentado para infecção disseminada (Lyall *et al.*, 1992). Estas evidências clínicas apontam para o facto da imunidade mediada por células parecer ser o mecanismo protectoro dominante contra candidíases disseminadas.

Essencial para a defesa inata e adquirida dos mamíferos são os fagócitos profissionais, consistindo em células dendríticas, monócitos/macrófagos e neutrófilos, também conhecidos como leucócitos polimorfonucleares. Os neutrófilos são a população de fagócitos mais abundantes na corrente sanguínea e normalmente os primeiros a serem recrutados para o local de infecção por quimiotaxia (Mansour & Levitz, 2002). Eles são

capazes de causar danos e matar células fúngicas quer na forma de levedura, quer hifa e pseudo-hifa. Contudo, o grande tamanho das hifas e pseudo-hifas pode prevenir a fagocitose e, nestes casos, o dano extracelular do fungo contribui para o controlo da infecção (Diamond *et al.*, 1980). A ausência de maquinaria requerida para a apresentação do antígeno às células T faz com que a principal função dos neutrófilos seja a morte das células de *Candida* (Bruno *et al.*, 2006). Por seu turno, os macrófagos possuem maquinaria necessária para a apresentação de antígenos, sendo o seu principal papel a morte e a apresentação de antígenos. Este mecanismo é partilhado com as células dendríticas. Blasi *et al.* (1992) demonstrou que macrófagos conseguem distinguir entre as duas formas de *C. albicans*, mostrando que uma linha celular de macrófagos responde à forma de hifa mas não à forma de levedura pelo aumento da produção de citocinas específicas que não é dependente da internalização do fungo pelo macrófago (Blasi *et al.*, 1992).

Como é verdade para outros microrganismos, as células fagocíticas apresentam a capacidade de matar *C. albicans*, usando tanto mecanismos dependentes de oxigénio, como mecanismos independentes de oxigénio. As evidências indirectas do envolvimento dos mecanismos dependente e independente do oxigénio na morte de *Candida* provêm da observação que monócitos manifestam semelhante actividade fungicida sobre condições aeróbias e anaeróbias (Thompson *et al.*, 1992). Contudo, nem todas as células fagocíticas são tão eficientes como os monócitos a matar *C. albicans* sob estas condições extremas. Desta forma, macrófagos e neutrófilos têm maior actividade antifúngica sob condições aeróbias que anaeróbias, o que sugere que neutrófilos e macrófagos matam *C. albicans* por mecanismos que maioritariamente envolvem a explosão respiratória. Numa primeira fase, são produzidas espécies reactivas de oxigénio (ROS) a partir de oxigénio molecular, reacção catalisada pela NADPH oxidase presente na membrana do fagossoma (Hampton *et al.*, 1998). Estes intermediários são altamente reactivos e apresentam uma elevada actividade antimicrobiana. Os fagócitos, nomeadamente os macrófagos, produzem, além das ROS, espécies reactivas de azoto (RNS), como o óxido nítrico (NO), pela acção da óxido nítrico sintetase (NOS). Esta enzima catalisa a oxidação da arginina formando-se citrulina e o gás NO (Nathan *et al.*, 1994). Adicionalmente, no interior do fagolisossoma, ROS geradas pela NADPH oxidase, como o peróxido ou superóxido de hidrogénio, podem combinar-se com o óxido nítrico produzindo compostos altamente reactivos, como radicais peroxinitrito, os quais permitem uma eliminação mais eficiente dos microrganismos (Nathan & Shiloh, 2000). Alternativamente, o peróxido de hidrogénio pode servir como substrato da mieloperoxidase (MPO) para a produção de fortes oxidantes microbicidas (Levitz &

Diamond, 1984). A maioria dos estudos publicados centraliza-se na compreensão dos mecanismos fungicidas dos fagócitos pelos efeitos tóxicos de ROS no entanto, os mecanismos independentes de oxigénio são também importantes na morte de *C. albicans*. Existem, por exemplo, evidências que indicam que enzimas lisossomais de macrófagos, como as defensinas, lisosimas e lactoferrinas, têm um papel importante na morte de *Candida* (Patterson-Delafield *et al.*, 1981; Watanabe *et al.*, 1991)

Por outro lado, *C. albicans* pode adaptar-se e sobreviver no ambiente hostil que é o ambiente intracelular do macrófago, activando várias vias de transdução de sinal em resposta à sua internalização (Lorenz & Fink, 2001; Lorenz & Fink, 2002; Lorenz *et al.*, 2004; Prigneau *et al.*, 2004). Neste contexto, a capacidade de transição da forma de levedura unicelular para a forma filamentosa de *C. albicans* contribui para a evasão aos mecanismos de defesa do hospedeiro, nomeadamente à morte intracelular. Estudos *in vitro* têm demonstrado que estirpes de *C. albicans* capazes de formar hifas escapam à morte intracelular por parte dos macrófagos, enquanto que estirpes que não são capazes de fazer esta transição morfológica continuam dentro dos macrófagos (Lo *et al.*, 1997). Estudos *in vivo* demonstraram que células de levedura, quer na forma de hifa quer unicelular, são frequentemente observadas em tecidos infectados, o que sugere que o desenvolvimento do programa de transição morfológica dota o patógeno com a capacidade para rapidamente se adaptar aos diferentes ambientes encontrados durante o processo de infecção (Tavanti *et al.*, 2006).

Apesar de alguns estudos da actividade fungicida de fagócitos mononucleares utilizarem corantes ou a incorporação de radioisótopos, muitos outros têm utilizado o método clássico de contagem de CFU (unidades formadoras de colónias) (Newman *et al.*, 2004; Molero *et al.*, 2005; Palmer *et al.*, 2007; Tavanti *et al.*, 2006; Vázquez-Torres *et al.*, 1996). Nestes estudos, os fagócitos são incubados com *C. albicans* em diferentes razões por vários períodos de incubação. No final da infecção, a morte de *C. albicans* é determinada libertando as células de levedura do interior do macrófago pela lise deste por sonicação, adição de detergentes (ex. Triton X) ou simplesmente água. Subsequentemente, a sobrevivência das células de *C. albicans* é enumerada após cultura em placas de meio apropriado a 37°C. Muitas das vantagens da quantificação da actividade fungicida dos fagócitos mononucleares pelo método microbiológico clássico inclui reprodutibilidade, eficiência de custos, ausência de necessidade de utilizar maquinaria sofisticada, e o grande número de amostras que podem ser processadas simultaneamente (Vázquez-Torres & Balish, 1997).

Dada a complexidade da virulência de *C. albicans* e o papel crítico dos macrófagos no balanço colonização/infecção causado por esta levedura oportunista, a análise da resposta de *C. albicans* à infecção por macrófagos pode ser vista como uma janela para dissecar o papel do *RLM1* na virulência exercida pela levedura e a resistência que o hospedeiro exerce sobre *C. albicans*.

Desta forma, as células de *C. albicans* mutantes *rlm1* (VIC1206) e as da estirpe selvagem (SC5314) e complementada (VIC1209) foram analisadas pela: (i) capacidade de proceder à transição de leveduriforme para hifa *in vitro* e (ii) resistência e/ou susceptibilidade à morte intracelular, ambos durante a infecção de macrófagos.

2. Material e métodos

2.1. Estirpes utilizadas neste estudo

As estirpes de *Candida albicans* SC5314, VIC1206 e VIC1209 (Tab. III.I) foram incubadas com a linha celular de macrófagos de J774A.1, de modo a estudar a sua morfologia e viabilidade em contacto com estas células fagocíticas.

Tabela III.I – Estirpes de levedura utilizadas neste estudo.

Microrganismo	Estirpe	Relevância do genótipo	Referência
<i>C. albicans</i>	SC5314	wild-type	Gillum <i>et al.</i> , 1984
<i>C. albicans</i>	VIC1206	<i>rlm1Δ::ARG4/rlm1Δ::URA3</i> <i>pHIS1::his1::hisG/his1::hisG</i>	Bruno <i>et al.</i> , 2006
<i>C. albicans</i>	VIC1209	<i>rlm1Δ::ARG4/rlm1Δ::URA3</i> <i>pRLM1::HIS1::his1::hisG/his1::hisG</i>	Bruno <i>et al.</i> , 2006

Para crescimento em meio líquido, mantendo a forma unicelular, as culturas foram incubadas em meio YEPD numa incubadora orbital a 160rpm, a 26°C e o crescimento foi monitorizado por determinação da densidade óptica a 640nm.

2.2. Manutenção e preparação de macrófagos da linha celular

A linha celular de macrófagos J774A.1 (ECACC 85011428) derivada de um tumor de uma fêmea de ratinho BALB/c, foi utilizada neste estudo. Esta linha celular foi mantida a 37°C numa atmosfera contendo 5% de CO₂, sendo o meio de cultura usado o meio DMEM

(Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Gibco) suplementado com 10% de FBS inativado (Lonza), 2mM de L-glutamina (Lonza), 1mM de Piruvato de Sódio (Sigma) e 10mM de tampão HEPES (Sigma). Aquando da sua utilização, os macrófagos foram recolhidos do frasco de cultura. Para isso, retirou-se o meio usado e fizeram-se duas lavagens com meio DMEM novo, retirando-se, desta forma, as células mortas (células não aderidas). Após os passos de lavagem, adicionou-se 8 ml de meio DMEM e raspou-se as células com o auxílio de um raspador, sendo esta suspensão transferida para um tubo Falcon. Procedeu-se à contagem das células viáveis com recurso ao corante de exclusão Tripán Blue (Sigma), através da preparação de uma suspensão contendo 90µl de Tripán Blue e 10µl da suspensão celular de macrófagos e colocou-se no hemocítmetro. Após a contagem, de acordo com o descrito no anexo P8, normalizou-se a concentração da suspensão de macrófagos para 2×10^6 células/ml.

2.3. Avaliação da morfologia de *C. albicans* no interior dos macrófagos

Para a observação da morfologia das diferentes estirpes de *C. albicans* após contacto com os macrófagos, estes foram infectados com as células de levedura das diferentes estirpes. Foram preparadas suspensões de macrófagos da linha celular J774A.1 na concentração de 2×10^6 células/ml, colocando-se 200µl desta suspensão dentro dos poços das placas de cultura de células de 24 poços, contendo coverslips (VWR) no interior. Incubou-se a 37°C, 5% CO₂ e durante duas horas, de modo a permitir a aderência dos macrófagos. Após a adesão destes, procedeu-se à infecção com 200µl das suspensões de *C. albicans* na concentração de 4×10^5 células/ml. Decorridas 2h de infecção, procedeu-se à fixação das células com uma solução de formol-etanol (1:9 (v/v)) durante 1 minuto, seguindo-se duas lavagens com água. Após lavagens, as coverslips foram cobertas com o corante vermelho de Hemacolor, incubando-se durante 3 minutos, após os quais se incubou com o corante azul de Hemacolor, por apenas 30 segundos. Uma vez concluída a coloração Hemacolor (Merck), as coverslips foram lavadas com água e deixadas a secar. Para posterior observação, foram montadas preparações definitivas, colocando-se as coverslips sobre lâminas e utilizando Entellan (Merck) como meio de montagem. As lâminas foram observadas no microscópio de fluorescência "Leica DM5000B".

2.4. Determinação da viabilidade de *C. albicans* após fagocitose

De forma a quantificar o grau de sobrevivência das diferentes estirpes em contacto com os macrófagos, placas de cultura de células de 24 poços foram preparadas com a suspensão celular de acordo com o ponto anterior (2.3). Após adesão dos macrófagos, o meio foi removido e adicionou-se a cada poço 200µl de suspensão celular de *C. albicans* a 4×10^5 células/ml contendo 125ng/ml de caspofungina. Como controlo adicionou-se também as mesmas suspensões celulares de *C. albicans* a poços sem macrófagos. As células foram incubadas a 37°C, 5% CO₂ e durante duas horas. Após a infecção adicionou-se a cada poço 800µl de água e 10µl de Saponina a 10% (Fluka), de modo a promover a lise dos macrófagos e a desaderência das células de *C. albicans*. 100µl desta suspensão foram usados para efectuar uma diluição decimal, sendo plaqueadas estas duas suspensões (duas réplicas) em placas com meio YEPD agar, de modo a determinar o número de CFU (unidades formadoras de colónias). As placas de YEPD foram incubadas a 37°C durante a noite, procedendo-se, no dia seguinte, à contagem das colónias. Os resultados foram expressos como percentagens de CFU, de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ Sobrevivência} = \frac{\text{CFU 1}}{\text{CFU 2}} \times 100$$

sendo, CFU1 o número de células viáveis de *C. albicans* em contacto com os macrófagos, e CFU2 o número de células viáveis de *C. albicans* incubadas nas mesmas condições mas na ausência de macrófagos.

2.5. Análise estatística

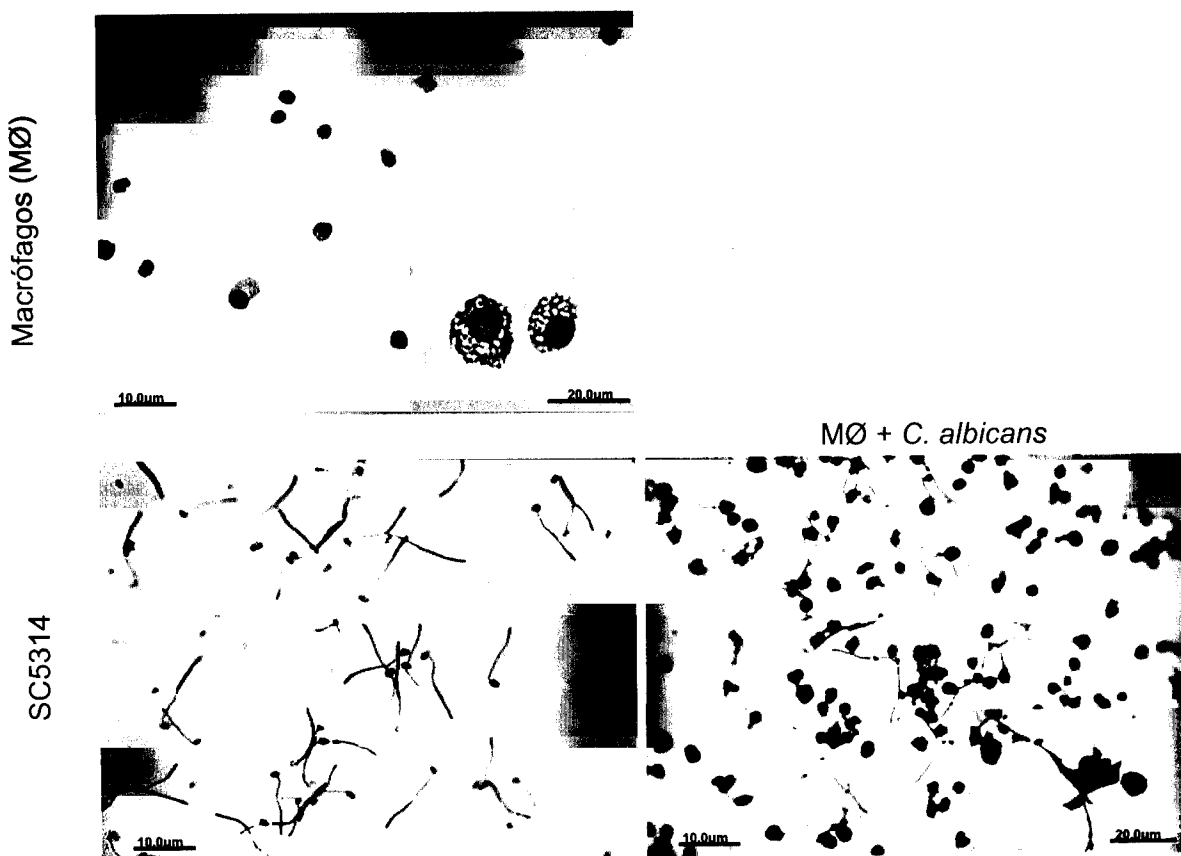
O nível de significância dos resultados obtidos com a estirpe de *C. albicans* mutante *rlm1* (VIC1206) contra os controlos (SC5314 e VIC1209) foi determinado usando “*Analysis of variance (Anova) single factor*” da Microsoft Office Excel 2003. Desta forma, as diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos serão assinaladas com * quando $p < 0,05$ e ** quando $p < 0,001$.

3. Resultados

3.1. Avaliação da morfologia de *C. albicans* no interior dos macrófagos

De modo a avaliar se *RLM1* influencia o desenvolvimento de hifas em *C. albicans* em contacto com macrófagos, foi realizada a infecção da linha celular J774A.1 (na multiplicidade 1:5, alvo:efector) com a estirpe mutante *rlm1* bem como a selvagem e complementada, como descrito previamente. As células de *C. albicans* foram inicialmente normalizadas na forma leveduriforme, por crescimento a 26°C. Após 2h de infecção, as células foram coradas e a morfologia determinada.

Uma análise geral revela que todas as estirpes parecem ser reconhecidas e internalizadas de igual modo pelos macrófagos. A morfologia das diferentes estirpes de *C. albicans* dentro dos macrófagos, monitorizada em coverslips, revela que todas as estirpes apresentam a capacidade de proceder à transição levedura para hifa intracelularmente, não existindo diferenças significativas entre as estirpes (Fig. 3.1). Todas as estirpes desenvolvem longas hifas o que pode, eventualmente, causar a ruptura e posterior destruição do macrófago, libertando a célula de *C. albicans* no meio extracelular (Fig. 3.1).



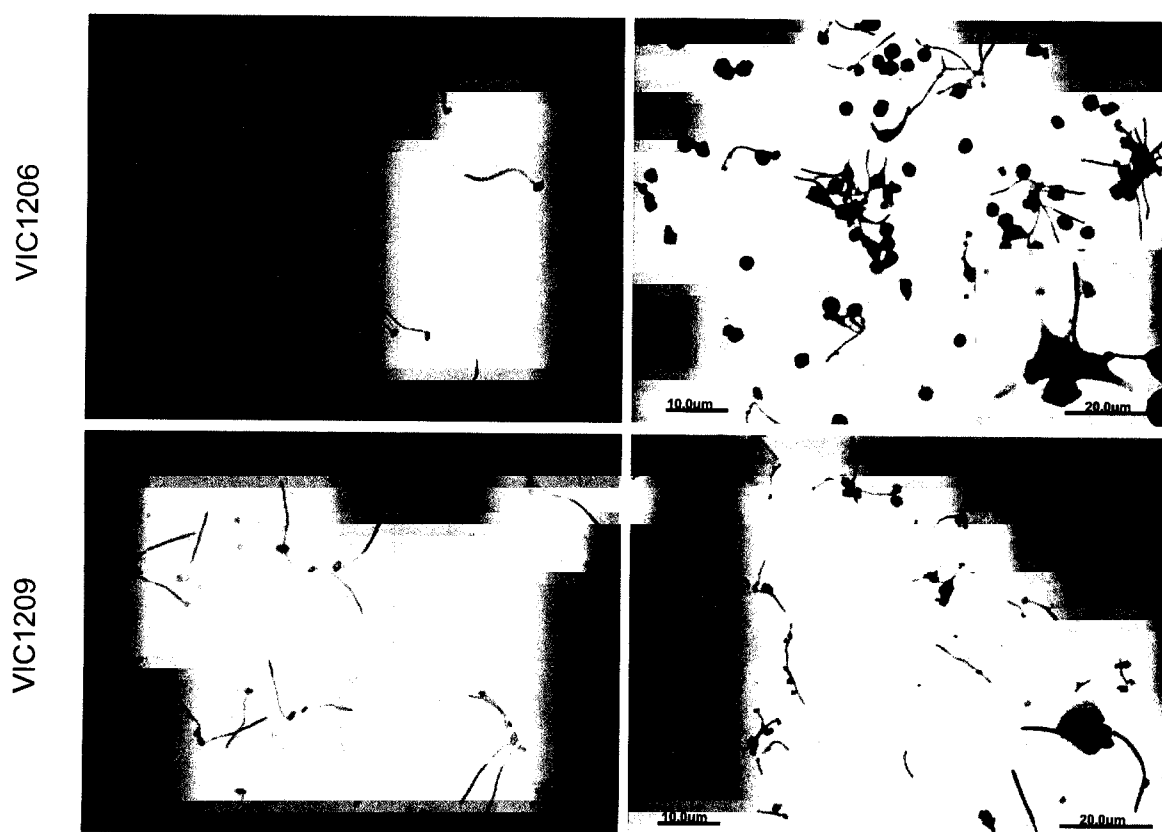


Figura 3.1 – Imagens de interacção *in vitro* das diferentes estirpes de *C. albicans* com os macrófagos. As estirpes de *C. albicans* foram incubadas em meio DMEM completo a 37°C, 5% CO₂, com ou sem a linha celular de macrófagos J774A.1. A formação das hifas ocorre sem ou com macrófagos. As microfotografias foram obtidas por microscopia, com coloração Hemacolor. * Esta imagem demonstra claramente a longa hifa desenvolvida pela célula de levedura, o que pode eventualmente causar a ruptura e posterior destruição do macrófago.

Estes resultados estão de acordo com os ensaios de filamentação anteriormente efectuados, em que todas as estirpes apresentaram capacidade de filamentação semelhante em meio YEPD suplementado com 10% de FBS, o qual é bastante idêntico ao meio DMEM, que também contém 10% de soro.

3.2. Determinação da viabilidade de *C. albicans* após fagocitose

A determinação da viabilidade das células em contacto com os macrófagos é frequentemente realizada por ensaios baseados na contagem de CFU. No entanto, esta técnica tem uma grande limitação que se baseia na propensão das células do fungo aderirem ao plástico ou à superfície celular dos macrófagos, levando a uma subestimação das células de fungo livres neste ensaio (Tavanti *et al.*, 2006; Vonk *et al.*,

2005). Para ultrapassar esta limitação foi usada a caspofungina para diminuir a adesão das células de *Candida*.

Vários estudos descrevem a utilização de caspofungina para prevenir a formação de biofilmes, por exemplo à superfície de materiais plásticos como as coverslips (Bachmann *et al.*, 2002; Kuhn *et al.*, 2002). Um estudo, efectuado com diferentes concentrações de caspofungina, permitiu concluir que a concentração óptima de inibição é de 125ng/ml, sendo que a concentrações inferiores verifica-se a formação do biofilme (Bachmann *et al.*, 2002). Um outro estudo, que pretendia avaliar se a caspofungina afectava o crescimento e morfologia de linhas celulares de macrófagos J774, permitiu verificar que estas características não são influenciadas a concentrações inferiores a 500ng/ml. Além disso, a caspofungina não altera a produção de citoquinas/quimoquinas por parte dos macrófagos, indicando que estes se mantêm metabolicamente activos (Martinez *et al.*, 2007).

Uma vez que nos estudos efectuados anteriormente a estirpe mutante *rlm1* se mostrou mais sensível à presença da caspofungina que a estirpe parental e complementada à concentração de 30ng/ml, foram efectuados estudos adicionais para avaliar o efeito na viabilidade das células das diferentes estirpes à concentração de 125ng/ml de caspofungina, durante 2 horas. Estes estudos indicaram que a viabilidade de todas as estirpes era afectada de igual modo a esta concentração de caspofungina, não existindo diferenças entre a estirpe mutante em relação à parental e complementada.

Neste contexto, no ensaio de viabilidade foi adicionado às células de *C. albicans* caspofungina à concentração de 125ng/ml, e estas foram co-incubadas com os macrófagos por 2h. Foi utilizada a multiplicidade de infecção 1:5 (alvo:efector), para maximizar o número de células de *C. albicans* internalizadas. Após o tempo de incubação o número de células de *C. albicans* foi determinado pela contagem de CFU (Fig. 3.2).

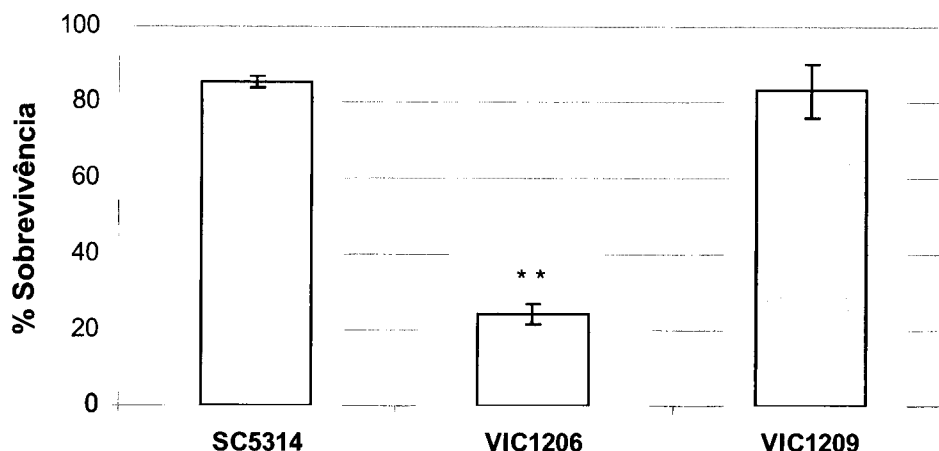


Figura 3.2 – Sobrevivência das diferentes estirpes de *C. albicans* à morte intracelular por macrófagos J774A.1. O efeito de *RLM1* na capacidade de sobrevivência dentro dos macrófagos após 2 h de infecção, com caspofungina 125ng/ml, na multiplicidade de infecção 1:5 (alvo:efector). A percentagem de sobrevivência é determinada com descrito em Materiais e métodos. As barras verticais representam a média $\pm$ DP (Desvio Padrão) de três experiências independentes, com três réplicas por experiência (* se $p < 0,05$ e ** se $p < 0,001$).

A análise dos resultados obtidos permite verificar diferenças significativas na capacidade de sobrevivência da estirpe mutante *rlm1* dentro dos macrófagos, relativamente às estirpes selvagem e complementada. Tanto a estirpe selvagem como a complementada apresentam uma percentagem de sobrevivência de cerca de 85%, enquanto que a percentagem apresentada pela estirpe mutante *rlm1* é significativamente inferior, cerca de 25%.

4. Discussão

A análise da resposta de *C. albicans* à infecção por macrófagos é fundamental para a compreensão da importância dos inúmeros mecanismos adoptados para a manutenção da integridade celular em condições ambientais adversas.

Vários estudos evidenciaram a importância da via de sinalização da integridade celular na virulência de *C. albicans* (Diez-Orejas *et al.*, 1997; Molero *et al.*, 2005). Foi demonstrado que o mutante *mkc1*, o activador transcrional de *RLM1*, apresenta uma reduzida virulência em infecções sistémicas, utilizando como modelo o ratinho (Diez-Orejas *et al.*, 1997). Adicionalmente, um outro estudo *in vitro* que visava compreender a importância dos fagócitos na resolução da infecção por mutantes de baixa virulência, verificou que

esse mesmo mutante, *mkc1*, é mais susceptível à morte por células fagocíticas, nomeadamente macrófagos, que a estirpe selvagem SC5314 (Molero *et al.*, 2005).

Uma análise exaustiva que utilizou uma estratégia integrada de proteómica e genómica para estudar a interacção de *C. albicans* com macrófagos, verificou que entre as vias activadas mais relevantes a biogénese da parede celular e a diferenciação do tipo celular ocupam um local de destaque (Fernández-Arenas *et al.*, 2007). Assim sendo, diversos genes que são conhecidos por estarem associados à transição para hifa, encontram-se sobreexpressos, bem como um grande número de genes associados com a biogénese da parede celular e envolvidos na virulência e crescimento invasivo.

Sendo a capacidade de transição de fungo para hifa um factor de extrema importância na virulência de *C. albicans*, tanto na colonização como no escape à morte intracelular por fagócitos, foi avaliada a importância do gene *RLM1* neste processo em resposta à infecção de macrófagos. O gene *RLM1* parece não ter qualquer influência no desenvolvimento de hifas em *C. albicans*, uma vez que as diferentes estirpes possuem a mesma capacidade de formar hifas dentro dos macrófagos, permitindo o seu escape (Fig. 3.1). Não foram também encontradas diferenças significativas no reconhecimento das diferentes estirpes por parte destas células fagocíticas, bem como no tamanho da hifa desenvolvida pelas diferentes estirpes de *C. albicans* (Fig. 3.1).

Os resultados de viabilidade obtidos neste estudo para a estirpe selvagem são bastante elevados, estando em conformidade com os valores descritos na literatura para infecção com macrófagos não activados, cerca de 85% (Fig. 3.2) (Leijh *et al.*, 1977; Molero *et al.*, 2005; Sasada & Johnston, 1980).

Diferenças expressivas são obtidas para o mutante *rlm1*, onde a sua capacidade de sobrevivência em contacto com o ambiente hostil dos macrófagos se encontra significativamente diminuída, pois só cerca de 25% das células se encontram viáveis após 2h de co-incubação (Fig. 3.2). A susceptibilidade aumentada do mutante *rlm1* à morte por macrófagos pode dever-se a uma deficiente reparação dos danos provocados na parede celular pelo ambiente hostil dos macrófagos, nomeadamente ao stress oxidativo, resultante da explosão respiratória no fagolisossoma, e por várias enzimas lisossomais. Por outro lado, o aumento da susceptibilidade pode dever-se a uma diferente exposição dos componentes constituintes da parede celular, que podem ter uma capacidade aumentada de activar os macrófagos, através dos receptores existentes à sua superfície. Mecanismo semelhante foi anteriormente descrito para o mutante *mkc1*, onde se verifica uma activação aumentada dos macrófagos quando expostos a extractos da parede celular das células mutantes, relativamente a células da estirpe selvagem. Isto

pode ser determinado pela diferente exposição dos β -1,3-glucanos, os quais têm a capacidade de activar os macrófagos via receptor Dectina-1 (Molero *et al.*, 2005). À luz do que está descrito para o mutante *mkc1*, esta diferença de susceptibilidade aos macrófagos por parte do mutante *rlm1* pode dever-se ainda a outros factores, nomeadamente um aumento da susceptibilidade ao óxido nítrico (NO) ou à diminuição da secreção de factores solúveis de inibição do NO. Este composto é um dos intermediários reactivos de azoto mais importante produzido pelos macrófagos e é considerado um agente crucial na morte de muitos fungos patogénicos como *C. albicans* (Molero *et al.*, 2005).

Outras evidências descritas na literatura suportam a importância do gene *RLM1* na virulência. Entre os principais genes diferencialmente expressos após internalização por macrófagos, e envolvidos na biogénese de componentes da parede celular, há a salientar o gene *MKK2*, que é um elemento essencial na via de sinalização da integridade da parede celular, e cuja proteína activa o Mck1, que por seu turno activa o factor de transcrição Rlm1. No mesmo estudo, estão também sobreexpressas várias proteínas GPI, que exercem um papel importante na parede celular (Fernández-Arenas *et al.*, 2007). Além disso sabe-se que um dos genes que se encontra subexpresso no mutante *rlm1* de *C. albicans*, quando tratados com caspofungina, é o *PGA13*, que codifica para uma proteína GPI (Bruno *et al.*, 2006). Todas estas evidências apoiam a importância do *RLM1* como um gene fundamental para a integridade da célula quando em contacto com o ambiente hostil do sistema imunológico, nomeadamente o interior dos fagócitos.

Capítulo IV

Expressão da proteína recombinante Rlm1

1. Introdução

O factor de transcrição Rlm1 é um membro da família génica das MADS box (Fig. 4.1).



Figura 4.1 – Representação esquemática de proteínas do domínio MADS box. No caso particular do factor de transcrição Rlm1, este domínio situa-se na extremidade N-terminal.

Os factores de transcrição membros da família MADS-box exercem funções fundamentais na regulação de processos biológicos vitais numa grande variedade de organismos eucariotas (revisto por Shore & Sharrocks, 1995). Denominados de MADS-box após cinco membros desta família terem sido identificados, Mcm1 (leveduras), Arg80 (leveduras) ou Agamous (plantas), Deficiens (plantas) e SRF (humanos) (Messenguy & Dubois, 2003), estas proteínas apresentam elevado grau de semelhança nos 90 resíduos de ligação ao DNA e domínio de dimerização. Actualmente, existem mais de 30 membros desta classes de proteínas, as quais estão envolvidas numa variedade de funções que vão desde a regulação transcricional de processos celulares básicos até à regulação da expressão de genes em processos celulares diferenciados (Acton *et al.*, 1997). Em animais e fungos os diferentes tipos de genes MADS-box podem ser agrupados em duas classes distintas, tipo I, os genes com grande homologia ao *SRF*, e tipo II, com homologia aos *MEF2* (Shore & Sharrockes, 1995), este último descrito mais recentemente. Em *Saccharomyces cerevisiae* quatro destas proteínas foram identificadas, Mcm1 e Arg80 (tipo I), e Rlm1 e Smp1 (tipo II), que regulam vários processos biológicos distintos. Rlm1 controla a expressão de genes requeridos para a integridade da parede celular (Watanabe *et al.*, 1995), enquanto Smp1 está envolvida na resposta ao stress osmótico mediado pela via de transdução de sinal Hog1 (Nadal *et al.*, 2003). Arg80 é unicamente requerida para a repressão de genes anabólicos e indução de genes catabólicos da arginina (Messenguy & Dubois, 2000), enquanto Mcm1, também envolvida no controlo do metabolismo da arginina, exerce um papel pleiotrópico na célula. Mcm1 é essencial para a viabilidade da célula e controla a transcrição de genes envolvidos na transição M/G1 e G2/M do ciclo celular, e genes envolvidos no mating, manutenção do minicromossoma, recombinação, transcrição TY e osmotolerância (revisto por Messenguy & Dubois, 2003). Outras espécies de levedura também contêm proteínas MADS-box. Em *Candida*

albicans, além do CaMcm1 requerido para a morfogénese da parede celular (Rottmann *et al.*, 2003), também já foi identificado o Rlm1 envolvido na integridade da parede celular (Bruno *et al.*, 2006).

Como referido anteriormente, os diferentes tipos de genes MADS-box podem ser agrupados em duas classes distintas, tipo I e tipo II, os quais exibem diferentes especificidades de ligação ao DNA (Shore & Sharrockes, 1995). Estudos de *site selection* verificaram que a sequência consenso CC(A/T)₆GG, conhecida como CArG box, é o local de ligação de proteínas tipo I (Treisman, 1990), e a sequência CTA(A/T)₄TAG o local de ligação de proteínas tipo II (Pollock & Treisman, 1991). A comparação entre as sequências consenso tipo I e tipo II revelou algumas semelhanças entre as duas, nomeadamente no que se refere ao facto da região central ser rica em A/T. Contudo, os elementos CArG box contêm dinucleótidos CC e GG invariantes separados por uma região central com 6 bases, enquanto o local consenso das proteínas tipo II contêm trinucleótidos flanqueantes CTA e TAG altamente conservados com a região central contendo 4 bases (Shore & Sharrockes, 1995).

Estudos *in vitro* da região central da sequência consenso das proteínas tipo I demonstraram que apenas alguns padrões dos que são possíveis obter com os 6 resíduos A/T da região central foram encontrados, sugerindo que certos padrões são preferidos. A análise dos locais consenso demonstrou ainda que as sequências que flanqueiam a região consenso também afectam a afinidade de ligação destes factores de transcrição (Pollock & Treisman, 1990). Na verdade, apesar da definição do local de ligação consenso, cada proteína MADS-box apresenta preferência sobre determinados padrões, podendo apresentar uma zona consenso mais alargada do que a definida. Desta forma, por exemplo, vários estudos demonstraram que Mcm1 prefere o local de reconhecimento 5' TTA-CCNAATTNGG-TAA 3'. Além disto, este estudo revelou que substituições nesta sequência, quer nas regiões flanqueantes, quer na região consenso, têm efeito significativo no grau de repressão ou activação transcricional mediada por este factor de transcrição (Acton *et al.*, 1997). Um outro estudo sobre Smp1 de *S. cerevisiae*, demonstrou que apesar deste possuir um local de ligação consenso tipo II, CTA(T/A)₄TAG, esta proteína selecciona uma sequência consenso mais extensa (A/G)-(C/T)-T-(não C)-CTA(T/A)₄TAG-(não G)-A (Dodou & Treisman, 1997). Relativamente à sequência consenso de Rlm1, um estudo *in vivo* realizado por Jung & Levin (1999) demonstrou que poucos genes activados pelo Rlm1 apresentam a sequência consenso exacta tipo II, sendo que frequentemente uma mutação era encontrada na primeira posição da sequência palindrómica, sendo possível encontrar as 4 bases nessa posição, no entanto não foi identificado na região central A/T qualquer mutação. Desta forma, a

sequência consenso, pelo menos para *S. cerevisiae*, deveria ser revista e alterada para TA(A/T)₄TAG.

De acordo com os resultados anteriores, Rlm1 tem um papel essencial na manutenção da integridade da parede celular e na virulência de *C. albicans*, pelo menos em contacto com macrófagos. Desta forma a identificação de genes regulados pelo factor de transcrição Rlm1 e a determinação da sua função celular e vias metabólicas nas quais eles participam pode ser importante para melhor compreender o papel do Rlm1 em *C. albicans*.

Neste sentido, a proteína recombinante Rlm1 será expressa e purificada, de modo a ser usada posteriormente em ensaios de *random binding site selection* para determinação da sequência consenso de ligação ao Rlm1 de *C. albicans*.

2. Material e métodos

2.1. Estirpes de *E. coli* e plasmídios

As estirpes de *Escherichia coli* XL1 Blue e BL21 (DE3) foram utilizadas como células hospedeiras na subclonagem e expressão da proteína Rlm1 (Tabela IV.I). O plasmídio T7 pET25b (+) foi obtido à Novagen.

Tabela IV.I – Estirpes de *E. coli* utilizadas neste estudo.

Estirpe	Relevância do genótipo	Referências
<i>E. coli</i> XL1 Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZΔM15 Tn10</i> (Tetr)]	Novagen
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F– <i>ompT hsdS_B</i> (r _B – m _B –) <i>gal dcm</i> (DE3)	Novagen

As culturas de *E. coli* líquidas foram crescidas no meio Luria Broth (LB) (1% (p/v) triptona (Becton Dickinson and Company), 0,5% (p/v) yeast extract (Panreac), 1% (p/v) NaCl (Panreac), e para meio sólido 2% (p/v) Bactoagar (Vaz Pereira)), a 37°C. Em ambos os casos, meio líquido ou meio sólido, este foi suplementado com 100µg/µl de ampicilina. O antibiótico foi comprado à Sigma e a solução stock foi realizada em H₂O destilada, filtro-esterilizada através de filtro de seringa de 0,2µm e armazenado a -20°C.

Para manutenção a longo prazo, as diferentes estirpes de *E. coli* foram conservadas em glicerol 65% (65% (v/v) glicerol (Difco), 0,1M MgSO₄ (Merck), 0,025M Tris-HCl pH8 (Merck)), a -80°C.

2.2. Construção do plasmídio de expressão pET25:RLM1

A estratégia utilizada para a clonagem da sequência genética que codifica para a ORF do gene *RLM1* no vector pET25b(+) encontra-se esquematizada na figura 4.2. A sequência genética de *RLM1* foi amplificada por PCR utilizando como DNA *template* o plasmídio pGEM:RLM1, construído como descrito no Capítulo V. Os *primers* utilizados (StabVida) estão descritos na tabela IV.II, e incluem a sequência de reconhecimento das enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III (Fermentas) que flanqueiam os *primers* RLM1B-F e RLM1H-R, respectivamente.

Tabela IV.II – Sequência dos *primers* utilizados para amplificação da ORF de *RLM1*.

Nome do <i>primer</i>	Sequência (5'-3')	Referências
RLM1B-F	CGGGATCCCATGGGTAGAAGAAAGATT	este estudo
RLM1H-R	CCAAGCTTTGTATTTTATTAGGTCCATTGTTGG	

O PCR foi efectuado como descrito no Anexo P4, com um programa que consistia na desnaturação inicial a 95°C durante 4 min; 30 ciclos a 94°C durante 1 min, 60°C durante 1 seg e 2 min a 72°C; e um passo de extensão final a 72°C durante 7 min.

Os produtos de PCR foram então purificados por electroforese em gel de agarose 1% (p/v) e, juntamente com o vector pET25b(+), sujeitos a uma digestão sequencial com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III, de acordo com o descrito no Anexo P5. O vector pET25b(+) digerido foi ainda desfosforilado com a enzima SAP (*Shrimp alkaline phosphatase*; Roche) durante 1h. Os produtos de digestão foram então analisados por electroforese em gel de agarose 1% (p/v). Flanqueada pelos locais de restrição *Bam*HI e *Hind*III, a sequência codificante para a ORF de *RLM1* foi então clonada no vector pET25b(+) (Anexo P6).

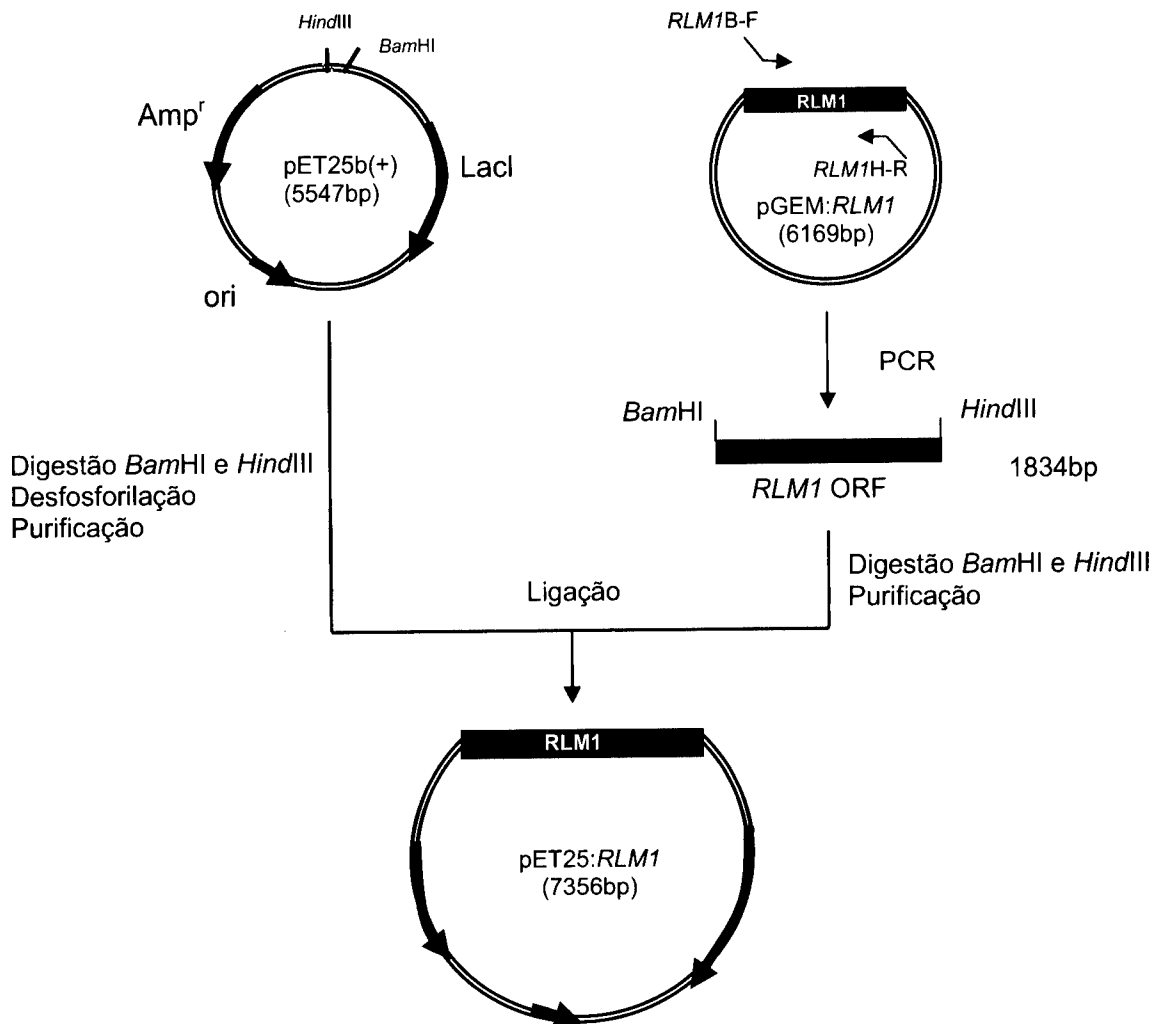


Figura 4.2 – Estratégia utilizada para a construção do vetor de expressão pET25:RLM1. Os produtos de PCR resultantes da amplificação da ORF de *RLM1* foram digeridos com *Bam*HI e *Hind*III e ligados ao vetor de expressão pET25b(+).

O vector construído foi primeiro amplificado na estirpe *E. coli* XL1 Blue (Anexos P2 e P3). A construção foi verificada por análise do mapa de restrição com a enzima *Bam*HI (Anexo P5), e por sequenciação. A sequenciação foi efectuada segundo o método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977), e usando os *primers* universais do vector. Esta reacção foi preparada usando o kit Mix Big Dye Terminator V3.1 (Applied Biosystems), adicionando 2µl do fragmento a sequenciar, 2µl do *primer* T7 a 20µM e 2µl do kit Big dye V3.1, perfazendo um volume total de 10µl com água ultra-pura. As reacções de sequenciação foram efectuadas no aparelho de PCR (modelo *mycycler* da BioRad) com um programa que consistia numa desnaturação inicial a 96°C durante 4 min; 25 ciclos com 96°C durante 10 seg, 55°C durante 20 seg e 4 min a 60°C. No final da reacção, para remover os terminadores não incorporados, os produtos sequenciados foram purificados usando

as colunas AutoSeq G50 (GE Healthcare). A cada amostra purificada foram adicionados 20µl de formamida, seguindo-se a desnaturação a 96°C durante 5 min. Os fragmentos assim tratados foram, então, separados por electroforese capilar através do polímero POP4 no sequenciador automático ABI 310™ a uma temperatura constante de 50°C e 15KV. A análise da sequência foi efectuada utilizando o programa Sequence Analysis 3.1 (Applied Biosystems).

2.3. Condições de indução da expressão da proteína recombinante Rlm1

A estirpe de expressão *E. coli* BL21 (DE3), transformada com a construção pET25:RLM1 (Anexos P2 e P3), foi utilizada para a expressão da proteína. O tempo e a temperatura de expressão, bem como a concentração de IPTG, foram optimizados para maximizar a quantidade de proteína expressa. Uma única colónia foi inoculada em 10ml de LB com 100µg/ml de ampicilina e crescida a 37°C, durante a noite. A cultura foi depois ressuspensa em 50ml de meio fresco, para uma D.O. (600nm) inferior a 0,1 e crescidas a 18°C ou 37°C até atingir uma D.O. de aproximadamente 0,6. As células foram então induzidas com IPTG 0,5-1mM (Invitrogen) a 18°C ou 37°C num período até 24h. Após optimização das condições de expressão da proteína 250ml de cultura foi utilizado para produção de proteína a maior escala.

2.4. Fraccionamento celular

Após serem recolhidas por centrifugação (10000g por 10 min), as células de *E. coli* foram ressuspensas em $\frac{3}{4}$ do volume de cultura no tampão 30mM Tris-HCl, 20% sacarose e 1mM EDTA, pH 8, e incubadas à temperatura ambiente durante 15 min, sob agitação. As células foram então recolhidas por centrifugação (10000g por 10 min a 4°C) e ressuspensas no mesmo volume de 5mM MgSO₄ frio. As células foram incubadas em gelo durante 15 min sob agitação. Durante este passo as proteínas periplasmáticas são libertadas no tampão. A suspensão foi centrifugada (10000g por 10 min a 4°C), o sobrenadante guardado e o pellet (fracção intracelular) ressuspenso em tampão de imidazole contendo 20mM imidazole, 0,5M de NaCl e 20mM de tampão fosfato pH 7,6. Para recolher as proteínas intracelulares foi efectuado o tratamento ultra-sónico das células com quatro pulsos de 10 seg, entrecalados de 2 min em gelo, a 20KHz com sonda de 13mm no Ultrasonic Processor GEX 400. Os lisados foram centrifugados por 30 min a 14300rpm a 4°C. O sobrenadante, fracção intracelular solúvel, foi decantado e

guardado. O pellet, fracção intracelular insolúvel, foi ressuspensão no tampão de imidazole e guardado. As diferentes fracções celulares foram analisadas por gel SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulphate-polyacrilamide*), com coloração por Comassie Blue ou cloreto de cobre, e/ou por Western-Blotting utilizando o anticorpo monoclonal contra as caudas de histidina, conjugado com a peroxidase (Sigma), de acordo com o descrito no Anexo P9. A massa molecular da proteína recombinante foi calculada utilizando a aplicação informática do Expasy (<http://www.expasy.ch/tools>).

2.5. Isolamento e purificação da proteína recombinante RIm1

A purificação de RIm1 foi efectuada por cromatografia de afinidade, utilizando o sistema de IMAC (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*) com colunas *HiTrap Chelating HP* contendo 5ml de Sefarose (*Chelating Sepharose High Performanmce*; Amersham Pharmacia Biotech). A coluna foi ligada a uma bomba peristáltica e após passagem com 2,5ml 0,1M NiSO₄ em H₂O, a coluna foi equilibrada com o tampão de imidazole. A amostra foi aplicada no topo da coluna a um fluxo de 5ml/min, seguida de lavagem com o tampão anterior. A eluição das proteínas foi realizada, com um volume total equivalente a 5 vezes o volume da coluna, com tampão de imidazole numa gama entre 40 a 500mM de imidazole. Para a purificação do RIm1 desnaturado a amostra foi incubada em tampão de imidazole 20mM com 6M de ureia, durante a noite, a 4°C sob agitação, antes da sua aplicação na coluna. A eluição da proteína desnaturada foi realizada com o tampão de imidazole, na mesma gama de concentrações, mas incluindo 6M de ureia. As fracções individuais de aproximadamente 5ml recolhidas nas eluições foram analisadas posteriormente por SDS-PAGE e/ou Western-Blotting (Anexo P9).

2.6. Renaturação *in vitro* da proteína recombinante RIm1

A renaturação da proteína foi realizada por passos sequenciais de diálise contra o tampão de diálise contendo 50mM Tris-HCl (pH 7,0), 0,5M (NH₄)SO₄, 1mM CaCl₂, 5mM β-mercaptoetanol e concentrações decrescentes de ureia, a 4°C, sob agitação. O tampão foi mudado a cada 24h para completa remoção de ureia. Foi utilizada a manga de diálise *Dialysis Tubing- Visking, Size Stuf Dia 24/32"-190mm, MW CO 12-14000 Daltons* (MEDICELL International Ltd).

3. Resultados

3.1. Expressão da proteína recombinante Rlm1 em *E. coli*

A proteína Rlm1 de *C. albicans* foi expressa em células de *E. coli* BL21 (DE3), para posterior determinação da sequência consenso de ligação deste factor de transcrição. Desta forma, a sua sequência codificante foi clonada em *frame* no plasmídeo pET25b(+) (Novagen), o qual contém a sequência sinal *pelB leader*, que direciona a proteína recombinante para o periplasma. Utilizando o vector pET25 a proteína recombinante apresenta ainda a sequência HSV•Tag e a His•Tag, sendo esta última um domínio de seis oligo-histidinas, usado na purificação e imuno-deteção da proteína (Fig. 4.3). Desta forma, a proteína recombinante Rlm1 contém no seu terminal C a sequência KLAAALEIKRASQPELAPEDPEDVEHHHHHH, que corresponde aos tags adicionais.

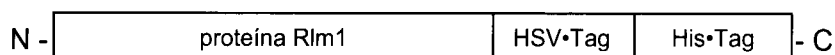


Figura 4.3 – Representação esquemática da proteína Rlm1 recombinante. A sequência codificante de *RLM1* foi inserida entre os locais *Bam*HI e *Hind*III da região *polylinker* do plasmídeo pET25b(+); o HSV•Tag codifica para 12 resíduos de aminoácidos; o His•Tag compreende 6 resíduos de histidinas. O tamanho total previsto da proteína é 71,25 KDa, que compreende 67,51 KDa de Rlm1 e 3,74 KDa dos tags adicionais.

O passo seguinte foi estabelecer as condições óptimas de crescimento das células de *E. coli* e expressão da proteína. As características de cada produto génico são únicas e, desta forma, o esquema óptimo para a indução da expressão do gene varia entre proteínas.

Os resultados obtidos neste estudo indicaram que as células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas com a construção pET25:*RLM1* crescendo a 37°C não conseguem expressar Rlm1 na presença de 1mM de IPTG a 37°C (Fig. 4.4).



Figura 4.4 – Análise por (A) SDS-PAGE (coloração por Comassie Blue) e por (B) Western Blotting das proteínas de células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas, crescidas a 37°C e induzidas com IPTG 1mM a 37°C durante 24h. M: Marcador de pesos moleculares *Broad Range*, BioRad (em KDa). Poços 1 e 5: meio de cultura; poços 2 e 6 : fracção periplasmática; poços 3 e 7: fracção intracelular solúvel; poços 4 e 8: fracção intracelular insolúvel.

No entanto, quando a temperatura de indução foi diminuída para 18°C as células de *E. coli* já foram capazes de expressar a proteína recombinante, embora esta só se encontre na fracção intracelular insolúvel (pellet) (Fig. 4.5).

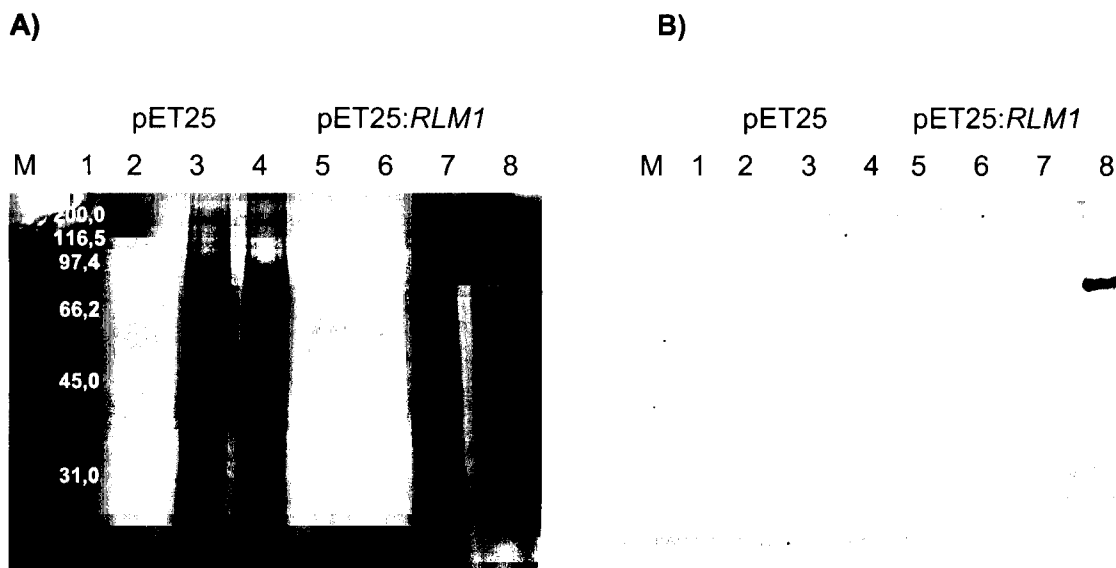


Figura 4.5 – Análise por (A) SDS-PAGE (coloração por Comassie Blue) e por (B) Western Blotting das proteínas de células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas, crescidas a 37°C e induzidas com IPTG 1mM a 18°C durante 24h. M: Marcador de pesos moleculares *Broad Range*, BioRad (em KDa). Poços 1 e 5: meio de cultura; poços 2 e 6 : fracção periplasmática; poços 3 e 7: fracção intracelular solúvel; poços 4 e 8: fracção intracelular insolúvel.

De forma a aumentar a solubilidade das proteínas recombinantes, a estirpe de *E. coli* produtora foi crescida à temperatura de 18°C e a fase de indução foi efectuada com menor concentração de IPTG (0,5mM) à temperatura de indução de 18°C, a diferentes tempos (Fig. 4.6.1 e 4.6.2). Contudo, mesmo efectuando estas alterações, não foi observada proteína Rlm1 no espaço periplasmático, apesar de às 24h de indução ter sido possível encontrar proteína recombinante solúvel na fracção intracelular (Fig. 4.6.1).

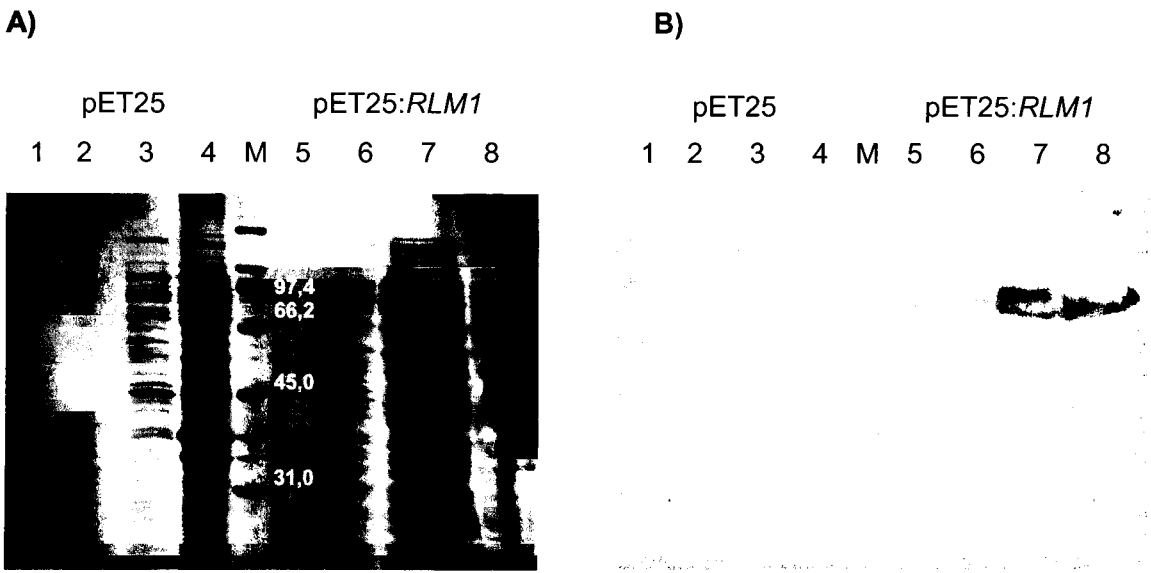


Figura 4.6.1 – Análise por (A) SDS-PAGE (coloração por Coomassie Blue) e por (B) Western Blotting das proteínas de células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas, crescidas a 18°C e induzidas com IPTG 0,5mM a 18°C durante 24h. M: Marcador de pesos moleculares *Broad Range*, BioRad (em KDa). Poços 1 e 5: meio de cultura; poços 2 e 6: fracção periplasmática; poços 3 e 7: fracção intracelular solúvel; poços 4 e 8: fracção intracelular insolúvel.

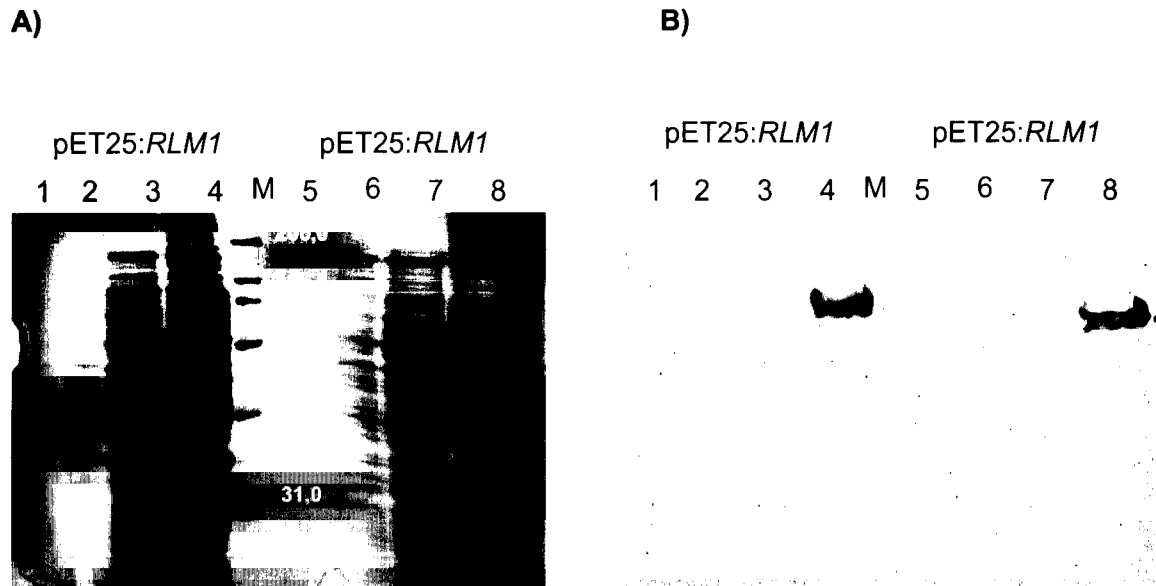


Figura 4.6.2 – Análise por (A) SDS-PAGE (coloração por Coomassie Blue) e por (B) Western Blotting das proteínas de células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas, crescidas a 18°C e induzidas com IPTG 0,5mM (amostras 1, 2, 3 e 4) e 1mM (amostras 5, 6, 7 e 8) a 18°C durante 6h. M: Marcador de pesos moleculares *Broad Range*, BioRad (em KDa). Poços 1 e 5: meio de cultura; poços 2 e 6 : fracção periplasmática; poços 3 e 7: fracção intracelular solúvel; poços 4 e 8: fracção intracelular insolúvel.

3.2. Purificação e renaturação da proteína recombinante Rlm1

Para a purificação da proteína recombinante Rlm1, inicialmente as proteínas presentes na fracção intracelular solúvel foram introduzidas na coluna contendo resina com afinidade para o níquel. De seguida foram utilizadas soluções com concentrações crescentes de imidazole para recolher a proteína que se encontrava ligada à coluna. Contudo, nenhuma proteína foi observada nas fracções eluídas com imidazole, encontrando-se no eluato da amostra (Fig. 4.7), sugerindo que a proteína recombinante não se ligou à coluna, provavelmente devido ao facto de as caudas de histidinas estarem insuficientemente expostas.

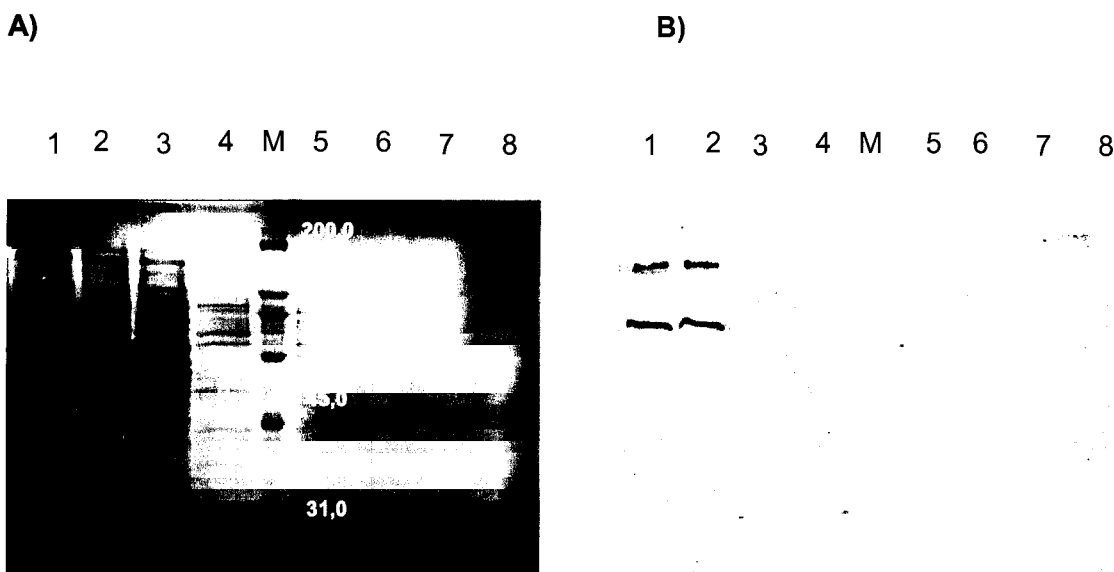


Figura 4.7 – Análise por (A) SDS-PAGE (coloração por cloreto de cobre) e por (B) Western Blotting das diferentes etapas de purificação da proteína recombinante Rlm1, utilizando a coluna HiTrap Chelating HP (Amersham Pharmacia Biotech). M: Marcador de pesos moleculares *Broad Range*, BioRad (em kDa). Poço 1: fracção intracelular solúvel; poço 2: eluato; poço 3: eluição com tampão de imidazole 20mM; poço 4: eluição com tampão de imidazole 40mM; poço 5: eluição com tampão de imidazole 80mM; poço 6: eluição com tampão de imidazole 150mM; poço 7: eluição com tampão de imidazole 250mM; poço 8: eluição com tampão de imidazole 500mM.

Para ultrapassar este problema, a proteína recombinante foi desnaturada utilizando tampão de imidazole contendo 6M de ureia, sendo então purificada na coluna contendo níquel (Fig. 4.8).

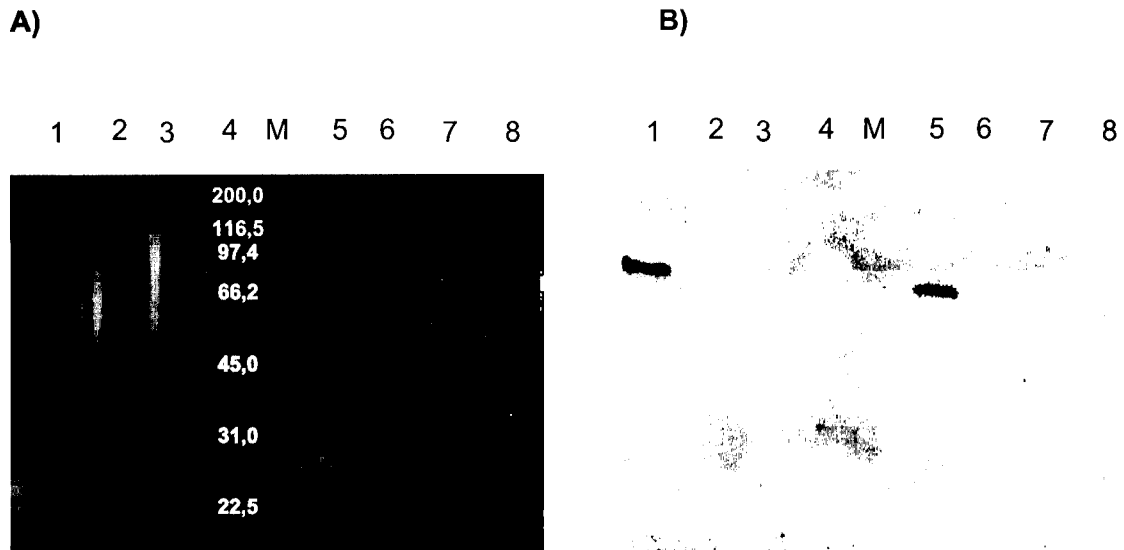


Figura 4.8 – Análise por (A) SDS-PAGE (coloração por cloreto de cobre) e por (B) Western Blotting das diferentes etapas de purificação da proteína recombinante Rlm1 utilizando a coluna HiTrap Chelating HP (Amersham Pharmacia Biotech). A fracção intracelular solúvel foi desnaturada com ureia 6M, sendo que os respectivos tampões de eluição contêm também 6M ureia. M: Marcador de pesos moleculares *Broad Range*, BioRad (em KDa). Poço 1: fracção intracelular solúvel; poço 2: eluato; poço 3: eluição com tampão de imidazole 20mM; poço 4: eluição com tampão de imidazole 40mM; poço 5: eluição com tampão de imidazole 80mM; poço 6: eluição com tampão de imidazole 150mM; poço 7: eluição com tampão de imidazole 250mM; poço 8: eluição com tampão de imidazole 500mM.

Após purificação a proteína foi renaturada por diálise, diminuindo gradualmente a concentração de ureia no tampão utilizado para dialisar a proteína. A proteína recombinante foi convenientemente guardada para futuras utilizações.

4. Discussão

A proteína Rlm1 de *C. albicans* foi expressa em células de *E. coli*, para posterior determinação da sequência consenso de ligação deste factor de transcrição. As condições óptimas de expressão de cada proteína devem ser determinadas empiricamente, pois muitas proteínas recombinantes são tóxicas para *E. coli* e pouco expressas, enquanto que outras são instáveis e sujeitas a degradação.

Desta forma, o primeiro objectivo foi a escolha de um sistema de expressão de proteínas recombinantes, tendo sido seleccionado o sistema de secreção periplasmático. Comparada com a produção citosólica, a produção secretora comporta várias vantagens, por exemplo (i) a possibilidade de obter proteínas com autênticos terminais N, após clivagem da sequência sinal pela peptidase sinal específica; (ii) aumento da formação de

ligações dissulfeto, uma vez que o espaço periplasmático contém um ambiente mais oxidativo que o citoplasma; (iii) diminuição da proteólise e (iv) minimização da acção deletéria para a célula de algumas proteínas recombinantes (Makrides, 1996). Além do mais o periplasma contém apenas cerca de 100 proteínas quando comparado com as cerca de 400 proteínas do citoplasma, logo os procedimentos de purificação da proteína recombinante podem ser mais eficientes quando as proteínas são dirigidas para o periplasma (Blattner *et al.*, 1997).

Desta forma, para expressar a proteína recombinante Rlm1 em *E. coli* para o periplasma, a sua sequência codificante foi clonada no plasmídeo pET25b(+) (Novagen), o qual contém a sequência sinal *pelB leader*. A ORF de Rlm1 foi inserida em *frame* com dois epítomos tag e sob o controlo do promotor T7, o qual é transcrito apenas pela acção da T7 RNA polimerase. Deste modo, este vector só pode ser utilizado em estirpes que contenham o gene para a T7 RNA polimerase, sob o controlo do promotor lac (Studier, 1991; Studier *et al.*, 1990; Studier & Moffatt, 1986). Neste estudo foi utilizada a estirpe *E. coli* BL21 (DE3).

O passo seguinte foi estabelecer as condições óptimas de crescimento das células de *E. coli* e expressão da proteína. As células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas com a construção pET25:RLM1, crescendo a 37°C não conseguiram expressar Rlm1 na presença de 1mM de IPTG a 37°C (Fig. 4.4). Mesmo alterando a temperatura de indução para 18°C, a proteína recombinante só se encontrou na fracção intracelular insolúvel (Fig. 4.5), pelo que a temperatura de crescimento e concentração de indutor tiveram que ser diminuídas. É assumido que combinando a diminuição da temperatura com baixas concentrações de indutor se pode impedir o sobrecarregamento do sistema de transporte periplasmático de *E. coli* e, por outro lado, as proteínas recombinantes conseguem efectuar o *folding* correcto, tornando-se solúveis. Desta forma, com indução a 18°C com 1mM de IPTG, já foi possível obter proteína solúvel, apesar de não se encontrar no espaço periplasmático (Fig. 4.6.1). Este dado indica que na gama de condições testadas a sequência *pelB leader* do pET25b (+) não foi capaz de exportar esta proteína.

Utilizando o vector pET25 a proteína recombinante apresenta a sequência HSV•Tag e a His•Tag, sendo esta última um domínio de seis oligo-histidinas, usado tanto na imunodetecção como na purificação da proteína. A proteína recombinante Rlm1 foi purificada por IMAC (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*), utilizando colunas que contêm uma resina com afinidade para metal, à qual se liga a His•Tag. Este método é baseado na interacção entre os metais de transição electropositivos e os resíduos de histidina da proteína recombinante (revisto por Porath, 1992). As proteínas presentes na fracção

intracelular solúvel foram então introduzidas na coluna, contendo resina com afinidade para o níquel, no entanto nenhuma proteína foi observada nas fracções eluídas com imidazole, encontrando-se no eluato da amostra (Fig. 4.7), sugerindo que a proteína recombinante não se ligou à coluna, provavelmente devido ao facto de as caudas de histidinas estarem insuficientemente expostas. Desta forma, as proteínas tiveram que ser previamente desnaturadas com ureia 6M, antes da sua purificação na coluna. No final, a proteína foi renaturada por diálise, diminuindo gradualmente a concentração de ureia no tampão utilizado.

Uma vez que a expressão da proteína, utilizando um sistema heterólogo, bem como a sua purificação, já foram alcançadas com êxito, o próximo passo constituirá na determinação da sequência específica de ligação da proteína Rlm1, por ensaios e *random binding site selection*. Neste procedimento a proteína será incubada com um grupo de sequências oligonucleótídicas *random*, tendo por base a sequência consenso das proteínas tipo II. O complexo proteína-DNA será purificado do gel de poliácridamida após EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) e posteriormente o DNA retardado sequenciado.

De forma a identificar os genes regulados pelo factor de transcrição Rlm1, a sequência obtida será utilizada num Blast na *Candida Genome Database* da Universidade de Stanford. Os genes identificados serão agrupados por classes funcionais e vias metabólicas.

À semelhança do que acontece para Rlm1 de *S. cerevisiae*, o factor de transcrição Rlm1 de *C. albicans* deverá regular a expressão de genes envolvidos na integridade da parede celular. A salientar, uma série de genes, de diferentes classes, que exercem um papel fundamental na parede celular, bem como genes envolvidos na síntese dos principais componentes estruturais, nomeadamente quitina e β -1,3-glucano (Jung & Levin, 1999). No entanto, devido a inúmeras diferenças na susceptibilidade a compostos que interferem directamente com a integridade da parede celular, os genes regulados por estas duas espécies deverão ser substancialmente diferentes. Estas diferenças poderão ser reflexo de *C. albicans*, como fungo patogénico, possuir uma melhor capacidade para se adaptar aos microambientes do corpo humano e para colonizar e invadir os tecidos.

Capítulo V

Construção dos variantes alélicos de *RLM1*

1. Introdução

O factor de transcrição Rlm1 pertence à família génica das MADS box, a qual além de possuir a MADS box no seu terminal 5', caracteriza-se pela presença de uma região repetitiva no terminal 3' (Fig. 5.1).

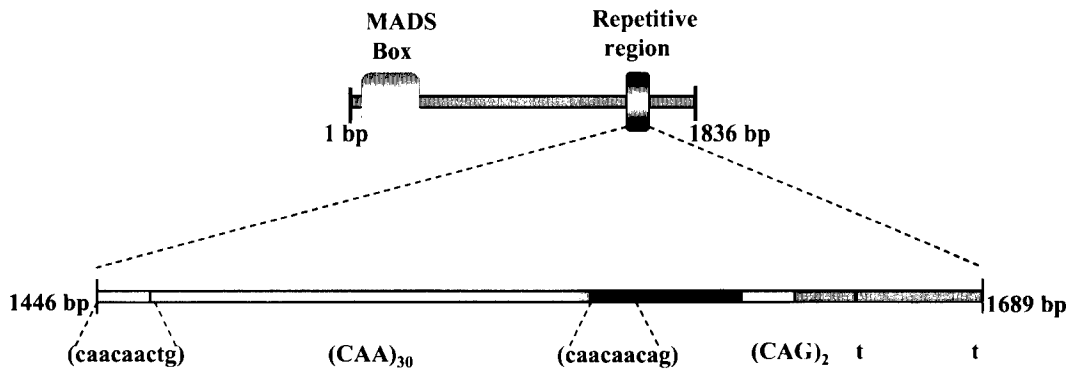


Figura 5.1 – Representação esquemática do gene *RLM1* de *C. albicans*. A sequência repetitiva presente no terminal 3' consiste no microsatélite CAI, o qual apresenta uma estrutura bastante complexa composta de unidades trinucleotídicas e nanonucleotídicas.

Uma avaliação mais detalhada da sequência do gene *RLM1* em *Candida albicans* demonstrou que a região repetitiva deste gene consiste no microsatélite CAI. Este microsatélite foi descrito por Sampaio *et al.* (2003) e uma análise directa da sequência revelou que este apresentava uma estrutura interna complexa, baseada na presença de unidades trinucleotídicas repetidas de CAA/G.

Um estudo da variabilidade genética do microsatélite CAI em 117 isolados clínicos de *C. albicans* independentes revelou a existência de 30 alelos, onde se encontram unidades repetitivas que variam entre 11 e 49 (Sampaio *et al.*, 2007). Os alelos mais pequenos são os mais frequentes (86%: 11 a 28 unidades repetitivas), enquanto os mais longos estão claramente pouco representados (14%) (Fig. 5.2).

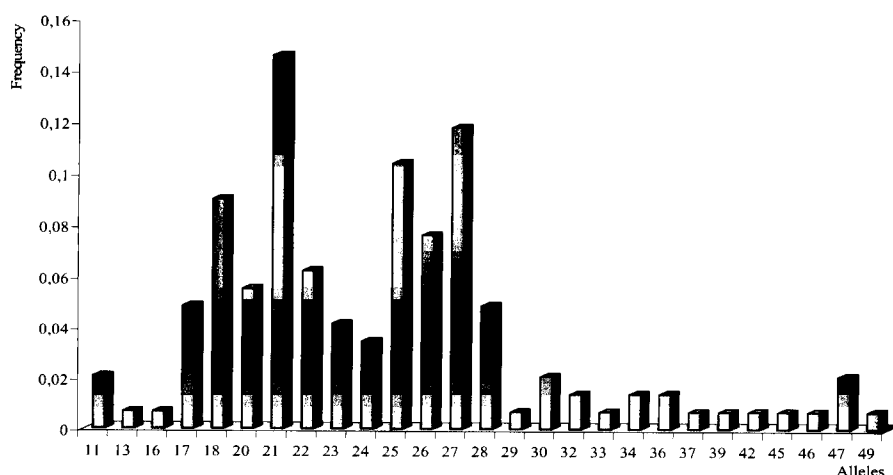


Figura 5.2 – Frequência alélica de CAI, demonstrando que os alelos longos têm uma frequência baixa e são claramente pouco representados [Adaptada de Sampaio *et al.*, 2007].

O facto deste gene apresentar uma elevada variabilidade sugere que o comportamento de *C. albicans* a stresses que afectam a integridade da parede celular pode apresentar uma viabilidade de acordo com o variante alélico presente em cada estirpe. Vários estudos têm repetidamente demonstrado a existência de grupos de estirpes prevalentes numa dada região geográfica, e que a incidência dessas estirpes é significativamente maior em pacientes que desenvolvem infecção do que no estado comensal (Schmid *et al.*, 1990, 1992, 1995a, b). O facto de no estudo da caracterização da variabilidade do gene *RLM1* se ter observado a existência de um grupo de estirpes prevalentes, reflectindo a distribuição alélica observada, pode indicar que variantes alélicas de *RLM1* podem ter uma resistência aumentada a stresses que afectam a integridade da parede celular, contribuindo para a sua alta prevalência.

Desta forma, o presente trabalho tem como principal objectivo a construção de estirpes de *C. albicans* com três variantes alélicas do *RLM1*, um com um alelo de baixo peso molecular (11 repetições), outro com um alelo predominante (21 repetições), e por fim um com um alelo representante de maior peso molecular (43 repetições). As estirpes contendo os diferentes variantes alélicos serão então caracterizadas fenotipicamente no que diz respeito à sua resposta a vários tipos de stress. Pretende-se, deste modo, compreender se a predominância de alelos entre os isolados clínicos se deve a diferentes proteínas Rlm1 ou a diferenças da base genética dos isolados clínicos.

A estirpe de *Candida albicans* mutante *rlm1*, auxotrófica para histidina (VIC1090), utilizada neste capítulo, foi construída pela técnica de disrupção mediada por PCR, a qual

veio ultrapassar as limitações da amplamente utilizada URA-blaster (Alani & Kleckner, 1987; Fonzi & Irwin, 1993; Pla *et al.*, 1996). A disrupção mediada por PCR, descrita por Wilson *et al.* (1999), utiliza *primers* que incluem pequenas regiões (cerca de 20 nucleótidos) de homologia para um vector com a marca auxotrófica requerida, e cerca de 70 nucleótidos de sequência homóloga do gene que queremos interromper. Esta região homóloga corresponde habitualmente a sequências que flanqueiam a ORF inteira do gene a ser deletado (Berman & Sudbery, 2002). A estirpe VIC1090 foi construída a partir da estirpe BWP17, a qual possui três marcadores auxotróficos (*URA3*, *HIS1* e *ARG4*) o que simplificou a construção deste mutante por passos de transformação sequenciais (Berman & Sudbery, 2002; Gola *et al.*, 2003).

Desta forma, foi iniciada a construção das estirpes de *C. albicans* com os três variantes alélicos do *RLM1*, para serem utilizadas em estudos posteriores com o objectivo de compreender a relevância destes na adaptabilidade às diferentes condições de stress quer *in vitro* quer *in vivo*.

2. Material e métodos

2.1. Construção dos variantes alélicos do gene *RLM1*

2.1.1. Construção dos plasmídios pDDB78-*RLM1*

Os isolados clínicos de *Candida albicans* CIP060 e 17J, que possuem os alelos 11 e 21, respectivamente, são provenientes da Colecção de Leveduras do Departamento de Biologia da Universidade do Minho.

A estratégia utilizada para a clonagem dos variantes alélicos de *RLM1* no plasmídio pDDB78 foi descrita por Bruno *et al.* (2006), e encontra-se esquematizada na figura 5.3. Após extracção do DNA dos isolados clínicos, como descrito no Anexo P1, os variantes alélicos de *RLM1* foram amplificados utilizando os *primers* descritos na tabela V.I. As amplificações foram efectuadas de acordo com o descrito no Anexo P4, com um programa que consistia na desnaturação inicial a 95°C durante 5 min; 30 ciclos a 94°C durante 1 min, 55°C durante 3 min e 4 min a 72°C; e um passo de extensão final a 72°C durante 10 min.

Tabela V.I – Sequência dos *primers* utilizados para amplificação dos variantes alélicos do gene *RLM1*.

Nome do <i>primer</i>	Sequência (5' – 3')	Referências
<i>RLM1-F</i>	AGACCTTGCTACCCATTTGT	Bruno <i>et al.</i> , 2006
<i>RLM1-R</i>	GCAAATGAAACCAAAGAGTTC	

Os variantes alélicos do *RLM1* obtidos por PCR foram primeiro clonados no sistema de clonagem pGEMT-Ez (Promega), como descrito no Anexo P6, e em seguida propagados por transformação das células competentes de *Escherichia coli* XL1 Blue (Anexos P2 e P3). Os plasmídios foram então purificados com o kit “*GenElute™ Plasmid Miniprep Kit*” (Sigma-Aldrich), de acordo com as instruções do fabricante, e sujeitos a uma dupla digestão com as enzimas de restrição *NotI* e *PvuII* (New England Biolabs), como descrito no Anexo P5. Os produtos da digestão foram analisados por electroforese em gel de agarose 1% (p/v), e os fragmentos relativos aos variantes alélicos ligados ao vector pDDB78 (gentilmente cedido pelo Professor Aaron P. Mitchell), linearizado com *NotI* e desfosforilado com a enzima SAP (*Shrimp alkaline phosphatase*; Roche) durante 1h (Anexo P5). As células competentes de *E. coli* XL1 Blue foram transformadas com os produtos de ligação resultantes (Anexos P2 e P3), para propagação dos plasmídios (pDDB78:*RLM1*), os quais foram posteriormente purificados com o kit de purificação referido anteriormente.

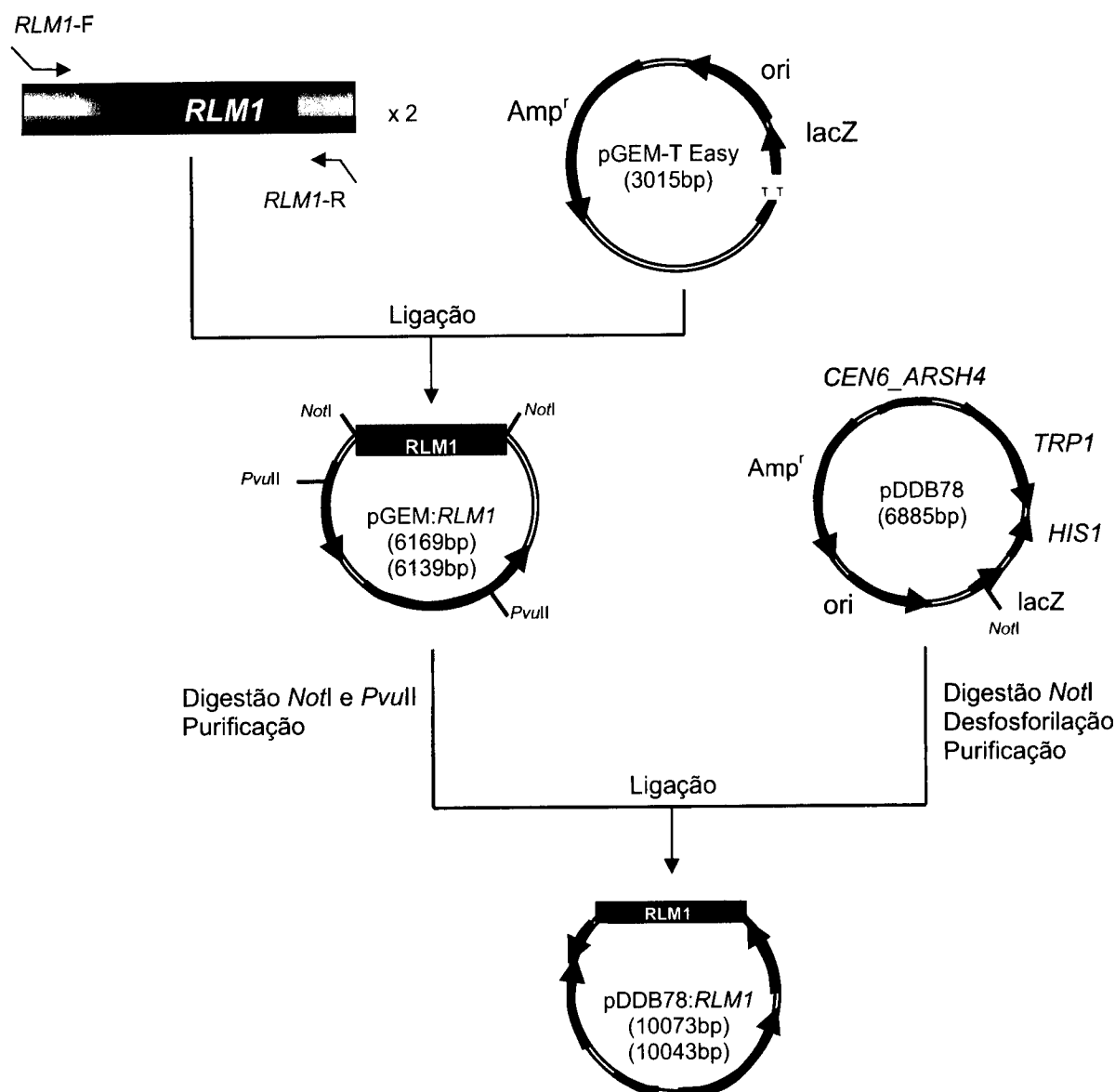


Figura 5.3 – Estratégia utilizada para a construção do vetor de expressão pDDB78:RLM1. Os produtos de PCR, resultantes da amplificação dos variantes alélicos do gene *RLM1*, foram ligados ao vetor pGEM-T Easy. Os produtos de ligação foram então digeridos com *NotI* e *PvuII* e ligados ao plasmídeo pDDB78.

2.1.2. Transformação do plasmídeo pDDB78:RLM1 em *C. albicans*

O plasmídeo pDDB78:RLM1 construído foi linearizado com a enzima de restrição *NruI* (Fermentas; Anexo P5). A estirpe de *C. albicans* VIC1090, mutante *rlm1* e auxotrófica para a histidina (tabela V.II), foi então transformada com o plasmídeo pDDB78:RLM1 *NruI*-linearizado, de acordo com o descrito no Anexo P7, o qual tem como alvo de integração o locus *HIS1*.

Tabela V.II – Estirpes de levedura utilizadas neste estudo.

Microrganismo	Estirpe	Relevância do genótipo	Referência
<i>C. albicans</i>	SC5314	wild-type	Gillum <i>et al.</i> , 1984
<i>C. albicans</i>	VIC1090	<i>rlm1Δ::ARG4/rlm1Δ::URA3</i> <i>his1::hisG/his1::hisG</i>	Bruno <i>et al.</i> , 2006
<i>C. albicans</i>	VIC1209	<i>rlm1Δ::ARG4/rlm1Δ::URA3</i> <i>pRLM1::HIS1::his1::hisG/his1::hisG</i>	Bruno <i>et al.</i> , 2006

A estirpe VIC1090 transformada foi plaqueadaa em meio selectivo sem histidina, e a presença dos diferentes variantes alélicos nos transformantes obtidos confirmada por amplificação da região repetitiva CAI, presente no *RLM1*.

2.1.3. Confirmação dos variantes alélicos

Uma vez que os variantes alélicos diferem apenas no tamanho da região repetitiva do *RLM1*, designada por CAI, procedeu-se à amplificação deste locus para confirmação dos variantes obtidos na transformação, usando os *primers* da tabela V.III. A determinação correcta dos pesos moleculares dos fragmentos obtidos foi efectuada no sequenciador automático ABI 310 (Applied Biosystems).

Tabela V.III – Sequência dos *primers* utilizados para amplificação do fragmento CAI.

Nome do <i>primer</i>	Sequência (5'–3')	Referências
CAI-F	ATGCCATTGAGTGGAATTGG	Sampaio <i>et al.</i> , 2003
CAI-R	AGTGGCTTGTGTTGGGTTTT	

O DNA genómico dos transformantes obtidos foi extraído como descrito no Anexo P1, e sujeito a amplificação por PCR (Anexo P4) com um programa que consistia na desnaturação inicial a 95°C durante 5 min; 30 ciclos a 94°C durante 30 seg, 60°C durante 30 seg e 1 min a 72°C; e um passo de extensão final a 72°C durante 7 min. Adicionou-se então 1µl dos produtos de PCR resultantes com 0,6µl do padrão interno de pesos moleculares TAMRA GeneScan™ 350 (Applied Biosystems) e 14,4µl de formamida. Após a desnaturação das amostras a 96°C durante 5 min a electroforese capilar foi realizada, utilizando o polímero POP4 (Applied Biosystems) a 60°C e a uma voltagem de 15KV. No final da electroforese, os pesos moleculares dos fragmentos foram determinados automaticamente através do programa de análise GeneScan Analysis 3.1 (Applied Biosystems).

2.2. Ensaios de caracterização fenotípica

Os ensaios de caracterização fenotípica realizados foram executados de acordo com o descrito nos Capítulos II e III.

3. Resultados

Com o intuito de verificar se os variantes alélicos do gene *RLM1* poderão ter um comportamento diferencial a stresses que afectam a integridade da parede celular, foram construídas estirpes de *C. albicans* com os três variantes alélicos principais, definidos em estudos anteriores.

O variante alélico com maior peso molecular não foi construído neste trabalho, pois a análise do perfil de GeneScan da estirpe VIC1209 (amavelmente cedida por A. Mitchell) permitiu verificar que esta possui no plasmídeo pDDB78:*RLM1* 43 repetições trinucleotídicas no microssatélite CAI (Fig. 5.5) isto é, um dos alelos de maior peso molecular do grupo de alelos menos representado entre os isolados clínicos. Desta forma, apenas se procedeu à construção de plasmídios pDDB78:*RLM1*, com os variantes alélicos de 11 e 21 repetições.

Inicialmente foram seleccionadas, de entre os isolados clínicos do Departamento de Biologia, as estirpes homozigóticas para os respectivos alelos, a CIPO 60 para o variante contendo o alelo 11, e a estirpe 17J para o alelo 21.

Depois de amplificado o fragmento contendo o gene *RLM1* (que inclui a ORF completa, 989bp da sequência promotora e 398bp da UTR 3'), procedeu-se à pré-clonagem deste fragmento no vector pGEMT-Ez, seguida da sua clonagem no plasmídeo pDDB78, contendo o gene *HIS1* (Spreghini *et al.*, 2003). O pDDB78 possui um único local de reconhecimento da enzima de restrição *Nrul*, na sequência da histidina, que é utilizada como alvo de integração no locus *HIS1* de *C. albicans*.

Desta forma, depois de linearizado com a enzima de restrição *Nrul*, o plasmídeo pDDB78:*RLM1*, referente a cada variante alélico, foi transformado na estirpe de *C. albicans* VIC1090, a qual é mutante *rlm1* e auxotrófica para a histidina. Os transformantes foram então plaqueados em meio selectivo sem histidina, de modo que apenas as estirpes que integraram o plasmídeo pDDB78:*RLM1* têm a capacidade de crescer neste meio.

As colónias de transformantes obtidos foram novamente repicadas em meio selectivo sem histidina e os resultados obtidos indicaram que a estirpe VIC1090 transformada com

os plasmídios pDDB78:RLM1 referente a cada variante alélica, alelos 11 e 21, apresentam crescimento semelhante às estirpes selvagem e complementada em meio selectivo sem histidina. Por seu turno, a estirpe VIC1090, mutante *rlm1* e auxotrófica para a histidina, não consegue crescer no referido meio (Fig. 5.4).

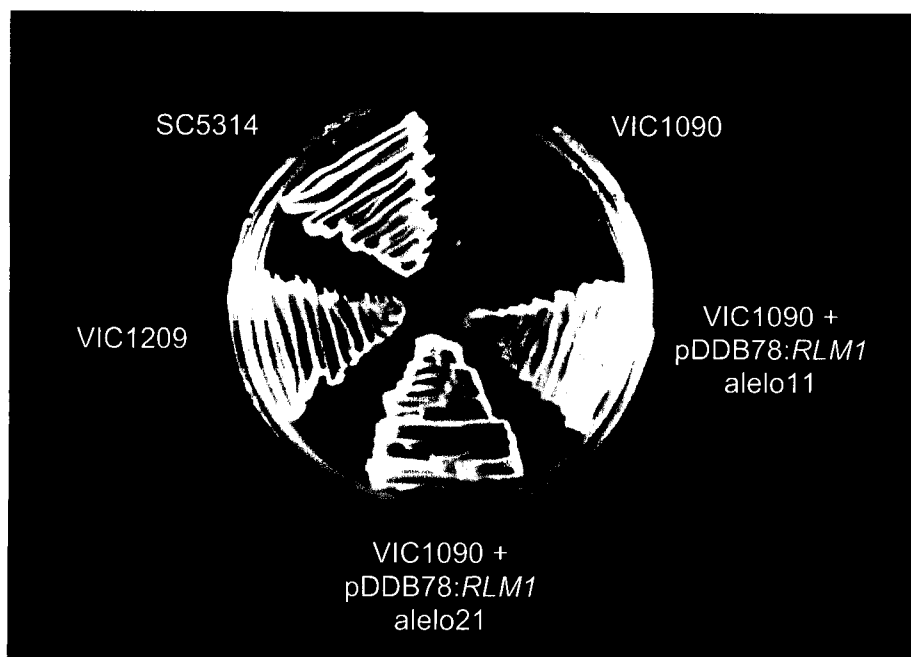


Figura 5.4 – Comparação do crescimento dos clones obtidos de *C. albicans* VIC1090 transformada com os plasmídios pDDB78:RLM1, referentes aos diferentes alelos, com as estirpes selvagem (SC5314), mutante *rlm1* auxotrófica para histidina (VIC1090), e complementada (VIC1209), em meio selectivo sem histidina.

Para confirmar este resultado, os transformantes obtidos foram posteriormente analisados por GeneScan após amplificação do microssatélite CAI, bem como as estirpes SC5314, VIC1090 e VIC1209 (Fig. 5.5).

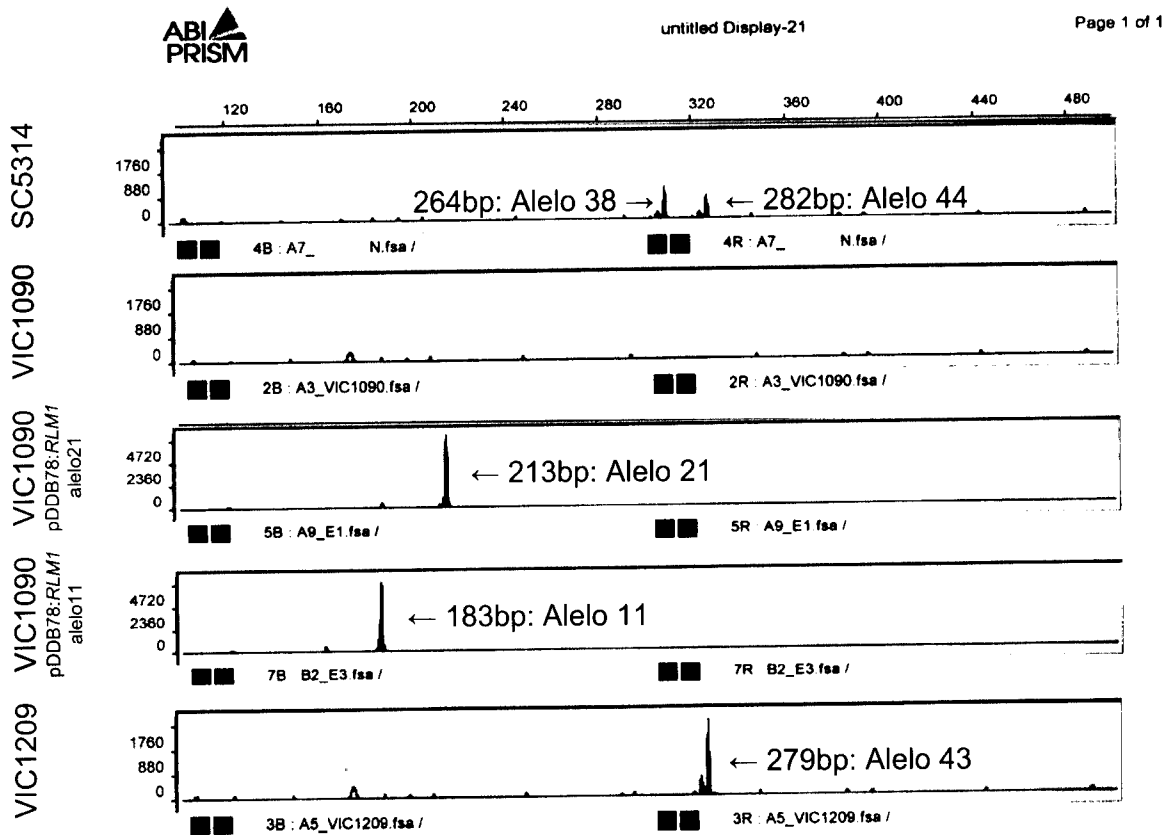


Figura 5.5 – Perfis de GeneScan obtidos após análise de CAI para as estirpes de *C. albicans* VIC1090 transformadas com os plasmídios pDDB78:*RLM1*, referente a cada um dos grupos de alelos, e que cresceram em meio selectivo sem histidina, bem como da estirpe SC5314, VIC1090 e VIC1209.

Para avaliar o comportamento dos diferentes variantes alélicos na adaptabilidade às diferentes condições de stress quer *in vitro* quer *in vivo*, as estirpes transformantes obtidas foram caracterizadas fenotipicamente de acordo com o descrito nos Capítulos II e III. Apesar das estirpes transformantes crescerem em meio selectivo sem histidina e apresentarem o respectivo alelo CAI, estas não apresentaram comportamento idêntico às estirpes de referência nos ensaios iniciais de caracterização fenotípica. O seu crescimento encontrava-se seriamente afectado em meios indutores de stress, com um perfil de sensibilidade semelhante ao observado para a estirpe mutante *rlm1* (Fig. 5.6).

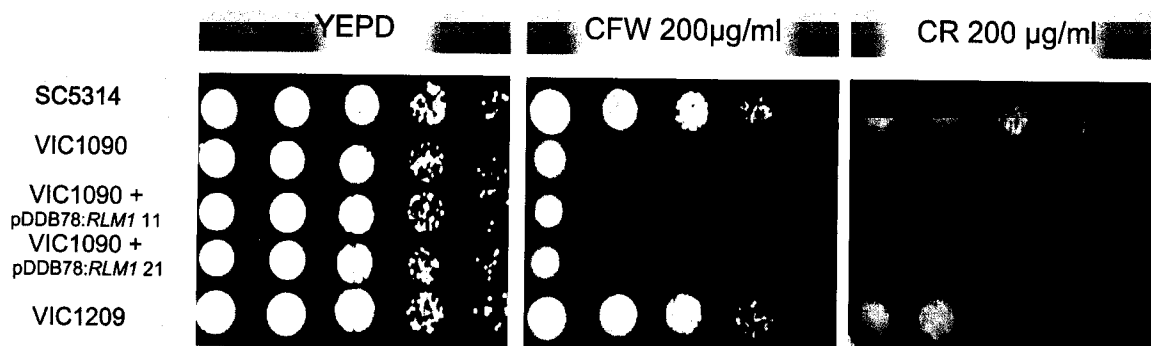


Figura 5.6 – Sensibilidade dos transformantes *C. albicans*, VIC1090 com pDDB78:RLM1 dos variantes alélicos 11 e 21, a agentes que afectam a integridade da parede celular, em comparação com a estirpe selvagem, mutante *rlm1* auxotrófica para a histidina, e complementada. As células das diferentes estirpes foram crescidas em meio YEPD, normalizadas para uma concentração de 5×10^3 células/ μ l, realizadas diluições decimais sucessivas e plaqueadas 10 μ l em placas de YEPD com as concentrações indicadas dos compostos testados. As placas foram incubadas a 30°C, e fotografadas após 48h de incubação.

A susceptibilidade destes transformantes aos macrófagos também se mostrou aumentada, apresentando valores próximos aos determinados para a estirpe mutante *rlm1* (resultado não apresentado). Assim sendo, a caracterização fenotípica destes transformantes não foi continuada.

4. Discussão

RLM1 é um membro da família génica das MADS box, apresentando duas regiões características, a MADS box no terminal 5' e uma região repetitiva no terminal 3', onde o microsatélite CAI está inserido. Estudos preliminares demonstraram que os variantes alélicos de maior e menor peso molecular estão pouco representados entre os isolados clínicos, relativamente aos variantes de peso molecular intermédio. Estes dados parecem indicar que as estirpes que expressem variantes alélicos *RLM1* intermédios apresentam uma maior adaptabilidade às diferentes condições de stress no hospedeiro, nomeadamente no que diz respeito à integridade da parede celular.

Desta forma, a estirpe mutante *rlm1* e auxotrófica para a histidina, VIC1090, foi complementada com os diferentes variantes alélicos para ensaios de caracterização fenotípica e estudos comparativos. Foram obtidos transformantes, com capacidade de crescerem em meio selectivo sem histidina, e cuja presença do variante alélico foi confirmada. Contudo, os ensaios de caracterização fenotípica demonstraram que as

referidas estirpes apresentavam um comportamento semelhante à estirpe mutante *rlm1*, em resposta aos stresses testados.

Estes resultados parecem indicar que apesar do plasmídeo pDDB78:*RLM1* ter sido integrado no genoma de *C. albicans* (i) ou não foi integrado no local correcto, locus *HIS1*, ou (ii) o plasmídeo sofreu alguma mutação que fez com que o gene *RLM1* embora no local de inserção correcto se tornasse inactivo.

Assim sendo, a caracterização fenotípica destes transformantes foi abandonada, tendo que o processo de transformação dos plasmídios pDDB78:*RLM1* na estirpe VIC1090 de *C. albicans* ser repetido. Contudo, o período de duração restrito para conclusão do mestrado impossibilitou a repetição a tempo útil deste trabalho.

Capítulo VI

Considerações finais

Em *Saccharomyces cerevisiae* a via Slr2 exerce um papel fundamental na integridade da parede celular, sendo o factor de transcrição Rlm1 descrito como o efector principal na regulação de genes relacionados com a manutenção da integridade da parede celular (Watanabe *et al.*, 1995). Em *Candida albicans* este papel é exercido pela via funcionalmente conservada denominada de Mkc1, contudo o papel de *RLM1* na manutenção da integridade da parede celular não está claramente definido. Neste sentido, este trabalho centrou-se no estudo do factor de transcrição Rlm1 em *C. albicans*, de forma a elucidar o seu papel na integridade da parede celular.

Inicialmente foi testada a sensibilidade de mutantes afectados neste gene a uma gama de agentes que perturbam a parede celular e outros agentes que avaliam a integridade celular. O mutante *rlm1* de *C. albicans* apresentou hipersensibilidade ao Calcofluor white (CFW), um composto que interage com a quitina da parede celular. Este resultado sugere que o mutante poderá apresentar um aumento do conteúdo de quitina na parede celular devido aos mecanismos compensatórios, ou que o Rlm1 participa directamente no controlo de genes envolvidos na regulação da síntese da quitina. Adicionalmente, uma vez que este mutante é sensível à presença de Congo red (CR), o qual interfere com o *assembly* dos β -1,3-glucanos, bem como à presença de caspofungina (CFG), um inibidor da β -1,3-glucano sintetase, o Rlm1 deverá também exercer um papel de reparação dos danos provocados na parede celular. Diferente deverá ser o papel exercido por *RLM1* em *S. cerevisiae*, uma vez que o mutante *rlm1* não só se mostrou indiferente à presença do CR e da CFG, como se mostrou mais resistente à presença de CFW. Além disso, mostrou-se sensível à presença de cafeína e SDS, compostos que avaliam a integridade celular. Na resposta ao stress osmótico, por parte dos mutantes das duas espécies, também se verificaram diferenças, onde ao contrário do mutante *rlm1* de *C. albicans*, o de *S. cerevisiae* se mostrou sensível à presença do osmólito iónico NaCl. A sensibilidade ao stress oxidativo é um outro fenótipo associado a mutantes em genes envolvidos na via da integridade celular. Três diferentes agentes oxidantes foram utilizados neste estudo: menadiona, peróxido de hidrogénio e diamida. O mutante *rlm1* de *C. albicans* só apresentou sensibilidade aumentada à diamida. Por seu turno, em *S. cerevisiae* este mutante só se mostrou particularmente sensível à presença do peróxido de hidrogénio. Estes dois compostos actuam por mecanismos diferentes, enquanto o peróxido de hidrogénio actua principalmente a nível intracelular, a diamida centraliza a sua acção a nível das proteínas da membrana e parede celular. A capacidade de desenvolver hifas rapidamente é uma característica importante que está intimamente relacionada com a virulência e envolve a remodelação da parede celular. Desta forma, para analisar a relevância do gene *RLM1* na morfogénese de *C. albicans* e *S. cerevisiae*, foram

realizados ensaios de filamentação em diferentes meios sólidos indutores de filamentação. Em *C. albicans*, os filamentos produzidos pelo mutante *rlm1* em meio Spider são mais curtos e pouco numerosos do que os produzidos pela estirpe selvagem. Este resultado sugere que apesar de interferir nas transições dimórficas em determinadas condições, o gene *RLM1* não é essencial para a filamentação, devendo existir vias adicionais mais relevantes no controlo da formação de hifas em *C. albicans*. Em *S. cerevisiae*, nem o mutante nem a estirpe parental apresentaram capacidade de produzir filamentos nos meios utilizados neste estudo. Estes resultados sugerem que ou o *RLM1* não é importante na filamentação em *S. cerevisiae*, ou os meios testados não são os mais adequados para observar filamentação nesta espécie.

Em suma, os resultados obtidos nesta caracterização inicial sugerem que Rlm1 de *C. albicans* está directamente envolvido na resposta a danos que perturbam a integridade da parede celular, contrariamente ao observado em *S. cerevisiae*. Este gene em *S. cerevisiae* parece estar mais directamente envolvido na integridade celular, independentemente da perturbação da parede. Estas diferenças de susceptibilidade sugerem que Rlm1 regule genes distintos nas duas espécies estudadas, o que poderá ser resultado de, por um lado apresentarem diferentes locais de reconhecimento ao DNA, por outro lado devido a alterações nas sequências de ligação destes factores de transcrição nos genes por eles activados.

A análise da resposta de *C. albicans* à infecção de macrófagos é fundamental para a compreensão dos inúmeros mecanismos adoptados para a manutenção da integridade celular em condições ambientais adversas em contacto com o hospedeiro. Sendo a capacidade de transição de fungo para hifa um factor de extrema importância na virulência de *C. albicans*, tanto na colonização como no escape à morte intracelular por fagócitos, foi avaliada a importância do gene *RLM1* neste processo em resposta à infecção de macrófagos. O gene *RLM1* parece não ter qualquer influência no desenvolvimento de hifas de *C. albicans* em contacto com os macrófago uma vez que as diferentes estirpes possuem igual capacidade de formar hifas dentro dos macrófagos, permitindo a sua saída para o meio extracelular. Não foram também encontradas diferenças significativas no reconhecimento das diferentes estirpes por parte destas células fagocíticas, uma vez que todas as estirpes parecem ser fagocitadas na mesma extensão. No entanto, foram obtidas diferenças significativas para o mutante *rlm1* onde a sua capacidade de sobrevivência em contacto com macrófagos se encontra significativamente diminuída, relativamente à estirpe selvagem e complementada. A susceptibilidade aumentada do mutante *rlm1* à morte por macrófagos pode dever-se a uma deficiente reparação dos danos provocados na parede celular pelo ambiente hostil

criado pelos macrófagos, nomeadamente ao stress oxidativo, resultante da explosão respiratória no fagolisossoma, e por várias enzimas lisossomais. Por outro lado, à luz do que está descrito para o mutante *mkc1*, o aumento da susceptibilidade pode dever-se ainda a uma diferente exposição dos componentes constituintes da parede celular que podem ter uma capacidade aumentada de activar os macrófagos ou à diminuição da secreção de factores solúveis de inibição do NO, um agente crucial na morte de muitos fungos patogénicos, por parte do mutante *rlm1*.

Este resultado apoia a importância do *RLM1*, como um gene fundamental para a integridade da célula, neste caso em contacto com o ambiente hostil do sistema imunológico, nomeadamente o interior dos fagócitos, estando desta forma envolvido na virulência de *C. albicans*.

De acordo com os resultados anteriores, Rlm1 tem um papel essencial na manutenção da integridade da parede celular e na virulência de *C. albicans*, pelo menos em contacto com macrófagos. Desta forma, a identificação de genes regulados pelo factor de transcrição Rlm1 e a determinação da sua função celular e vias metabólicas nas quais eles participam pode ser importante para melhor compreender o papel do Rlm1 em *C. albicans*.

Neste sentido, a proteína recombinante Rlm1 foi expressa em células de *Escherichia coli* BL21 (DE3) transformadas com o vector pET25b(+) onde a sequência codificante para *RLM1* foi clonada. Após as condições óptimas de expressão terem sido determinadas e a proteína recombinante obtida, procedeu-se à sua purificação utilizando o sistema IMAC, com colunas que contêm uma resina com afinidade para metal, à qual se liga o His•Tag da proteína. Possivelmente devido ao facto de as caudas de histidinas estarem insuficientemente expostas, a proteína encontrava-se no eluato da amostra, pelo que antes da sua passagem pela coluna a proteína teve que ser previamente desnaturada e, depois da sua purificação, dialisada para voltar à sua conformação nativa.

RLM1 é um membro da família génica das MADS box, apresentando duas regiões características, a MADS box no terminal 5' e uma região repetitiva no terminal 3', onde o microssatélite CAI está inserido. Estudos preliminares demonstraram que os variantes alélicos de maior e menor peso molecular estão pouco representados entre os isolados clínicos, relativamente aos variantes de peso molecular intermédio. Estes dados parecem indicar que as estirpes que expressem variantes alélicas *RLM1* intermédios apresentam uma maior adaptabilidade às diferentes condições de stress no hospedeiro, nomeadamente no que diz respeito à integridade da parede celular. Com o intuito de verificar se os variantes alélicos do gene *RLM1* poderão ter um comportamento

diferencial a stresses que afectam a integridade da parede celular, foram construídas estirpes de *C. albicans* com os três variantes alélicos principais.

Os transformantes obtidos, por complementação da estirpe mutante de *rlm1* e auxotrófica para a histidina, VIC1090, com os diferentes variantes alélicos clonados no vector pDDB78, apresentaram capacidade de crescerem em meio selectivo sem histidina e a presença do variante alélico foi confirmada. Contudo, os ensaios de caracterização fenotípica demonstraram que as referidas estirpes apresentavam um comportamento semelhante à estirpe mutante *rlm1*, em resposta aos stresses testados. Estes resultados parecem indicar que apesar do plasmídeo pDDB78:*RLM1* ter sido integrado no genoma de *C. albicans* ou (i) não foi integrado no local correcto, locus *HIS1*, ou (ii) o plasmídeo sofreu alguma mutação que fez com que o gene *RLM1*, embora no local de inserção correcto, se tornasse inactivo. Assim sendo, a caracterização fenotípica destes transformantes foi abandonada, tendo que o processo de transformação dos plasmídios pDDB78:*RLM1* na estirpe VIC1090 de *C. albicans* ser repetido.

Devido à importância do factor de transcrição Rlm1 na integridade da parede celular de *C. albicans*, demonstrada ao longo de todo o trabalho, e ao facto desta estrutura ser essencial ao fungo, a identificação dos genes regulados por Rlm1 poderão constituir uma óptima base para a compreensão dos mecanismos envolvidos na biogénese e remodelação da parede celular. Uma vez que os objectivos de expressão e purificação da proteína recombinante já foram alcançados, o próximo passo consistirá na determinação da sequência específica de ligação da proteína Rlm1, por ensaios de *random binding site selection*. De forma a identificar os genes regulados pelo factor de transcrição Rlm1, a sequência obtida será utilizada num Blast na *Candida Genome Database* da Universidade de Stanford. Os genes identificados serão agrupados por classes funcionais e vias metabólicas. À semelhança do que acontece para Rlm1 de *S. cerevisiae*, o factor de transcrição Rlm1 de *C. albicans* deverá regular a expressão de genes envolvidos na integridade da parede celular. No entanto, devido a inúmeras diferenças na susceptibilidade a compostos que interferem directamente com a integridade da parede celular, os genes regulados por estas duas espécies deverão ser substancialmente diferentes.

Capítulo VII

Referências bibliográficas

Acton T., Zhong H. & Vershon A. (1997). DNA-Binding Specificity of Mcm1: Operator Mutations That Alter DNA-Bending and Transcriptional Activities by a MADS Box Protein. *Molec Cell Biol*, 17(4): 1881–1889.

Alani E. & Kleckner N. (1987). A new type of fusion analysis applicable to many organisms: protein fusions to the *URA3* gene of yeast. *Genet*, 117: 5–12.

Antachopoulos C. & Roilides E. (2005). Cytokines and fungal infections. *Br J Haematol*, 129(5): 583–596.

Araújo R., Carneiro A., Costa-Oliveira S., Pina-Vaz C., Rodrigres A. & Guimarães J. (2008). Fungal infections after haematology unit renovation: evidence of clinical, environmental and economical impact. *Eur J Haematol*, 80(5): 436–443.

Bachmann S., Patterson T. & López-Ribot J. (2002). In Vitro Activity of Caspofungin (MK-0991) against *Candida albicans* Clinical Isolates Displaying Different Mechanisms of Azole Resistance. *J Clin Microb*, 40: 2228–2230.

Bachmann S., VandeWalle K., Ramage G., Patterson T., Wickes B., Graybill J. & López-Ribot J. (2002). In Vitro Activity of Caspofungin against *Candida albicans* Biofilms. *Antimicrob Agen Chemot*, 46(11): 3591–3596.

Baixench M., Aoun N., Desnos-Olivier M., Garcia-Hermoso D., Bretagne S., Ramires S., Piketty C. & Dannaoui E. (2007). Acquired resistance to echinocandins in *Candida albicans*: case report and review. *J Antimicrob Chem*, 59: 1076–1083.

Barba G., Soto T., Madrid M., Núñez A., Vicent J., Gacto M. & Cansado J. (2008). Activation of the cell integrity pathway is channelled through diverse signalling elements in fission yeast. *Cel Signal*, 20: 748–757.

Bardwell L., Cook J., Chang E., Cairns B. & Thorner J. (1996). Signaling in the yeast pheromone response pathway: specific and high-affinity interaction of the mitogen-activated protein (MAP) kinases Kss1 and Fus3 with the upstream MAP kinase kinase Ste7. *Mol Cell Biol*, 16(7): 3637–3650.

Bates S., MacCallum D., Bertram G., Munro C., Hughes H., Buurman E., Brown A., Odds F. & Gow N. (2005). *Candida albicans* Pmr1p, a secretory pathway P-type $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -ATPase, is required for glycosylation and virulence. *J Biol Chem*, 280: 23408–23415.

Berman J. & Sudbery P. (2002). *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nature Rev*, 3: 918–930.

Blasi E., Pitzurra L., Puliti M., Lanfranccone L. & Bistoni F. (1992). Early differential molecular response of a macrophage cell line to yeast and hyphal forms of *Candida albicans*. *Infect Immun*, 60(3): 832–837.

Blattner F., Plunkett G., Bloch C., Perna N., Burland V., Riley M., Collado-Vides J., Glasner J., Rode C., Mayhew G., Gregor J., Davis N., Kirkpatrick H., Goeden M., Rose D., Mau B. & Shao Y. (1997). The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 277(5331): 1453–74.

Bockmuhl D., Krishnamurthy S., Gerads M., Sonneborn A. & Ernst J. (2001). Distinct and redundant roles of the two protein kinase A isoforms Tpk1p and Tpk2p in morphogenesis and growth of *Candida albicans*. *Mol Microb*, 42(5): 1243–1257.

Bruno V., Kalachikov S., Subaran R., Nobile C., Kyratsous C. & Mitchell A. (2006). Control of the *C. albicans* Cell Wall Damage Response by Transcriptional Regulator Cas5. *PLoS Pathog*, 2: 204–210.

Butler K., Rench M. & Backer C. (1990). Amphotericin B as a single agent in the treatment of systemic candidiasis in neonates. *Pediatr Infect Dis J*, 9:51–56.

Calderone R. & Fonzi W. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiol*, 9: 327–335.

Chaffin W., López-Ribot J., Casanova M., Gozalbo D. & Martínez J. (1998). Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62: 130–80.

Chen R. & Thorner J. (2007). Function and Regulation in MAPK Signaling Pathways. *Biochim Biophys Acta*, 8: 1311–1340.

Correia A., Sampaio P., Almeida J. & Pais C. (2004). Identification of *Candida* clinical isolates by PCR fingerprinting: a contribution to the study of molecular epidemiology of candidiasis in Portugal. *J Clin Microbiol*, 42: 5899–5903.

Damveld R., Arentshorst M., Franken A., VanKuyk P., Klis F., Hondel C. & Ram A. (2005). The *Aspergillus niger* MADS-box transcription factor RlmA is required for cell wall reinforcement in response to cell wall stress. *Mol Microb*, 58(1): 305–319.

- Davenport K. R., Sohaskey M., Kamada Y., Levin D. E. & Gustin M. C. (1995).** A second osmosensing signal transduction pathway in yeast. Hypotonic shock activates the PKC1 protein kinase-regulated cell integrity pathway. *J Biol Chem*, 270: 30157–30161.
- Diamond R., Oppenheim F., Nakagawa Y., Krzesicki R. & Haudenschild C. (1980).** Properties of a product of *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae that inhibits contact between the fungi and human neutrophils in vitro. *J Immunol*, 125(6): 2797–2804.
- Diez-Orejas R., Molero G., Navarro-García F., Pla J., Nombela C. & Sánchez-Pérez M. (1997).** Reduced virulence of *Candida albicans* *MKC1* mutants: a role for a mitogen-activated protein kinase in pathogenesis. *Infect Immun*, 65: 833–837.
- Dodou E. & Treisman R. (1997).** The *Saccharomyces cerevisiae* MADS-Box Transcription Factor Rlm1 Is a Target for the Mpk1 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. *Mol Cell Biol*, 17: 1848–1859.
- Eisman B., Alonso-Monge R., Román E., Nombela C. & Pla J. (2006).** The Cek1 and Hog1 Mitogen-Activated Protein Kinases Play Complementary Roles in Cell Wall Biogenesis and Chlamydospore Formation in the Fungal Pathogen *Candida albicans*. *Eukar Cell*, 5: 347–358.
- Fernández-Arenas E., Cabezón V., Bermejo C., Arroyo J., Nombela C., Diez-Orejas R. & Gil C. (2007).** Integrated Proteomics and Genomics Strategies Bring New Insight into *Candida albicans* Response upon Macrophage Interaction. *Molec Cell Proteom*, 6: 460–478
- Filler S. (2006).** *Candida*–host cell receptor–ligand interactions. *Curr Opin in Microbiol*, 9: 333–339
- Fonzi W. & Irwin M. (1993).** Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genet*, 134: 717–718.
- Francis P. & Walsh T. (1992).** Evolving role of flucytosine in immunocompromised patients: new insights into safety, pharmacokinetics, and antifungal therapy. *Clin Infect Dis*, 15:1003–1018.
- Garcerá A., Martínez A., Castillo L., Elorza V., Sentandreu R. & Valentín E. (2003).** Identification and study of a *Candida albicans* protein homologous to *Saccharomyces cerevisiae* Ssr1p, an internal cell-wall protein. *Microbiol*, 149: 2137–2145.
- García R., Bermejo C., Grau C., Pérez R., Rodríguez-Pena J., François J., Nombela C. & Arroyo J. (2004).** The Global Transcriptional Response to Transient Cell Wall Damage in *Saccharomyces cerevisiae* and Its Regulation by the Cell Integrity Signaling Pathway. *J Biol Chem*, 279(15): 15183–15195.

- Gillum A. M., Tsay E. Y. H. & Kirsch D. R. (1984).** Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol Gen Genet*, 198: 179–182.
- Gola S., Martin R., Walther A., Dunkler A. & Wendland J. (2003).** New modules for PCR-based gene targeting in *Candida albicans*: rapid and efficient gene targeting using 100 bp of flanking homology region. *Yeast*, 20: 1339–1347.
- Gozalbo D., Roig P., Villamón E. & Gil M. (2004).** *Candida* and candidiasis: the cell wall as a potential molecular target for antifungal therapy. *Curr Drug Targets Infect Disord*, 4: 117–135.
- Gustin M., Albertyn J., Alexander M. & Davenport K. (1998).** MAP Kinase Pathways in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Molec Biol Rev*, 62: 1264–1300.
- Hahn J. & Thiele D. (2002).** Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Slit2 Kinase Pathway by the Stress-inducible Sdp1 Dual Specificity Phosphatase. *J Biol Chem*, 277: 21278–21284.
- Hampton M., Kettle A. & Winterbourn C. (1998).** Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*, 92: 3007–3017.
- Hashimoto T. (1991).** In vitro study of contact-mediated killing of *Candida albicans* hyphae by activated murine peritoneal macrophages in a serum-free medium. *Infect Immun*, 59(10): 3555–3561.
- Heinisch J., Lorberg A., Schmitz H. & Jacoby J. (1999).** The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microb*, 32: 671–680.
- Hiller E., Heine S., Brunner H. & Rupp S. (2007).** *Candida albicans* Sun41p, a Putative Glycosidase, Is Involved in Morphogenesis, Cell Wall Biogenesis, and Biofilm Formation. *Eukar Cell*, 6: 2056–2065.
- Hube B., Sanglard D., Odds F., Hess D., Monod M., Schafer W., Brown A. & Gow N. (1997).** Disruption of each of the secreted aspartyl proteinase genes *SAP1*, *SAP2*, and *SAP3* of *Candida albicans* attenuates virulence. *Infect Immun*, 65(9): 3529–3538.
- Ibata-Ombetta S., Idziorek T., Trinel P., Poulain D. & Jouault T. (2003).** *Candida albicans* phospholipomannan promotes survival of phagocytosed yeasts through modulation of bacterial phosphorylation and macrophage apoptosis. *J Biol Chem*, 278(15): 13086–13093.

- Inoue H., Nojima H. & Okayama H. (1990).** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96: 23–28.
- Jung U. & Levin D. (1999).** Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Mol Microbiol*, 34: 1049–1057.
- Jung U., Sobering A., Romeo M. & Levin D. (2002).** Regulation of the yeast Rlm1 transcription factor by the Mpk1 cell wall integrity MAP kinase. *Mol Microb*, 46(3): 781–789
- Kaur R., Domerque R., Zupancic M. & Cormack B. (2005).** A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Curr Opin Microbiol*, 8: 378–384
- Kohler J. & Fink G. (1996).** *Candida albicans* strains heterozygous and homozygous for mutations in mitogen-activated protein kinase signalling components have defects in hyphal development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 13223–13228.
- Krisak L., Strich R., Winters R., Hall J., Mallory M. Kreitzer D., Tuan R. & Winter E. (1994).** *SMK1*, a developmentally regulated MAP kinase, is required for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*, 8: 2151–2161.
- Krueger K., Ghosh A., Krom B. & Cihlar R. (2004).** Deletion of the *NOT4* gene impairs hyphal development and pathogenicity in *Candida albicans*. *Microbiol*, 150: 229–240.
- Kuhn D., George T., Chandra J., Mukherjee P. & Ghannoum M. (2002).** Antifungal Susceptibility of *Candida* Biofilms: Unique Efficacy of Amphotericin B Lipid Formulations and Echinocandins. *Antimicrob Agen Chem*, 46(6): 1773–1780.
- Kultz D. & Burg M. (1998).** Evolution of osmotic stress signaling via MAP kinase cascades. *J Exp Biol*, 201: 3015–3021.
- Kumamoto C. (2005).** A contact-activated kinase signals *Candida albicans* invasive growth and biofilm development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 5576–5581.
- Kumamoto C. & Vines M. (2005).** Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cell Microbiol*, 7: 1546–1554.
- Lagorce A., Berre-Anton V., Aguilar-Uscanga B., Martin-Yken H., Dagkessamanskaia A. & François J. (2002).** Involvement of *GFA1*, which encodes glutamine–fructose-6-phosphate amidotransferase, in the activation of the chitin synthesis pathway in response to cell-wall defects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*, 269: 1697–1707.

- Lagorce A., Hauser N., Labourdette D., Rodriguez C., Martin-Yken, Arroyo J., Hoheisel J. & François J. (2003).** Genome-wide Analysis of the Response to Cell Wall Mutations in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 278: 20345–20357.
- Leijh P., Barselaar M. & Furth R. (1977).** Kinetics of Phagocytosis and Intracellular Killing of *Candida albicans* by Human Granulocytes and Monocytes. *Infect Immun*, 17(2): 313–318.
- Lesage G., Shapiro J., Specht C., Sdicu A., Ménard P., Hussein S., Tong A., Boone C. & Bussey H. (2005).** An interactional network of genes involved in chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genet*, 6: 8.
- Levin D. (2005).** Cell Wall Integrity Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Mol Biol Rev*, 69: 262–291.
- Levitz S. & Diamond R. D. (1984).** Killing of *Aspergillus fumigatus* spores and *Candida albicans* yeast phase by the iron-hydrogen peroxide-iodide cytotoxic system: comparison with the myeloperoxidase-hydrogen peroxidehalide system. *Infect Immun*, 43: 1100–1102.
- Lo H., Kohler J., DiDomenico B., Loebenberg D., Cacciapuoti A. & Fink G. (1997).** Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell*, 90: 939–949.
- Lorenz M. & Fink G. (2001).** The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Nature*, 412: 83–86.
- Lorenz M. & Fink G. (2002).** Life and death in a macrophage: role of the glyoxylate cycle in virulence. *Eukaryot Cell*, 1: 657–662.
- Lorenz M., Bender J. & Fink G., (2004).** Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. *Eukaryot Cell*, 3: 1076–1087.
- Lussier M., Marie A., Shahinian S. & Bussey H. (1998).** The *Candida albicans* *KRE9* gene is required for cell wall β -1,6-glucan synthesis and is essential for growth on glucose. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 9825–9830.
- Lyall E. G., Lucas G. F. & Eden O. B. (1992).** Autoimmune neutropenia of infancy. *J Clin Pathol*, 45: 431–434.
- Magee P., Gale C., Berman J. & Davis D. (2003).** Molecular Genetic and Genomic Approaches to the Study of Medically Important Fungi. *Infect Immun*, 71(5): 2299–2309.

- Makrides S. (1996).** Strategies for Achieving High-Level Expression of Genes in *Escherichia coli*. Microb rev, 60(3): 512–538.
- Mansour M. & Levitz S. (2002).** Interactions of fungi with phagocytes. Curr Opin Microbiol, 5(4): 359–365.
- Marcilla A., Valentín E. & Sentandreu R. (1998).** The cell wall structure: developments in diagnosis and treatment of candidiasis. Internatl Microbiol, 1: 107–116.
- Martín H., Rodríguez-Pachón J., Ruiz C., Nombela C. & Molina M. (2000).** Regulatory Mechanisms for Modulation of Signaling through the Cell Integrity Slt2-mediated Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 275: 1511–1519.
- Martinez L., Ntiamoah P., Casadevall A. & Nosanchuk J. (2007).** Caspofungin reduces the incidence of fungal contamination in cell culture. Mycopath, 164: 279–286.
- Martinez-Lopez R., Monteoliva L., Diez-Orejas R., Nombela C. & Gil C. (2004).** The GPI-anchored protein CaEcm33p is required for cell wall integrity, morphogenesis and virulence in *Candida albicans*. Microbiol, 150: 3341–3354.
- Masubuchi K., Okada T., Kohchi M., Sakaitani M., Mizuguchi E., Shirai H., Aoki M., Watanabe T., Kondoh O., Yamazaki T., Satoh Y., Kobayashi K., Inoue T., Horii I. & Shimma N. (2001).** Synthesis and Antifungal Activities of Novel 1,3- β -D-Glucan Synthase Inhibitors. Part 1. Bioorg & Med Chem Let, 11: 395–398.
- Masuoka J. (2004).** Surface Glycans of *Candida albicans* and Other Pathogenic Fungi: Physiological Roles, Clinical Uses, and Experimental Challenges. Clin Microbiol Rev, 17: 281–310.
- Mendoza I., Rubio F., Rodriguez-Navarro A. & Pardo J. M. (1994).** The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 269: 8792–8796.
- Messenguy F. & Dubois E. (2000).** Regulation of arginine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: a network of specific and pleiotropic proteins in response to multiple environmental signals. Food Technol Biotechnol, 38: 277–285.
- Messenguy F. & Dubois E. (2003).** Role of MADS box proteins and their cofactors in combinatorial control of gene expression and cell development. Gene Rev, 316: 1–21.

- Molero G., Guillén M., Martínez-Solano L., Gil C., Pla J., Nombela C., Sánchez-Pérez M. & Diez-Orejas R. (2005).** The Importance of the Phagocytes' Innate Response in Resolution of the Infection Induced by a Low Virulent *Candida albicans* Mutant. *Scand J Immunol*, 62: 224–233.
- Munro C., Selvaggini S., Bruijn I., Walker L., Lenardon M., Gerssen B., Milne S., Brown A. & Gow N. (2007).** The PKC, HOG and Ca^{2+} signalling pathways co-ordinately regulate chitin synthesis in *Candida albicans*. *Mol Microb*, 63(5): 1399–1413.
- Nadal E., Casadome L. & Posas F. (2003).** Targeting the MEF2-like transcription factor Smp1 by the stress-activated Hog1 mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol*, 23: 229–237.
- Naglik J., Albrecht A., Bader O. & Hube B. (2004).** *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cell Microbiol*, 6: 915–926.
- Naglik J., Challacombe S. & Hube B. (2003).** *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev*, 67(3): 400–428.
- Nakamura T., Ohmoto T., Hirata D., Tsuchiya E. & Miyakawa T. (1996).** Genetic evidence for the functional redundancy of the calcineurin- and Mpk1-mediated pathways in the regulation of cellular events important for growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*, 251: 211–219.
- Nathan C. & Xie Q. (1994).** Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*, 78: 915–918.
- Nathan C. & Shiloh M. (2000).** Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *PNAS*, 97: 8841–8848.
- Navarro-García F., Sánchez M., Pla J. & Nombela C. (1995).** Functional Characterization of the *MKC1* Gene of *Candida albicans*, Which Encodes a Mitogen-Activated Protein Kinase Homolog Related to Cell Integrity" *Mol Cell Biol*, 15, 2197–2206
- Navarro-García F., Alonso-Monge R., Rico H., Pla J., Sentandreu R. & Nombela C. (1998).** A role for the MAP kinase gene *MKC1* in cell wall construction and morphological transitions in *Candida albicans*. *Microbiol*, 144: 411–424.
- Navarro-García F., Eisman B., Fiuza S., Nombela C. & Pla J. (2005).** The MAP kinase Mkc1p is activated under different stress conditions in *Candida albicans*. *Microbiol*, 151: 2737–2749.
- Nelson R., Shibata N., Podzorski R. & Herron M. (1991).** *Candida* Mannan: Chemistry, Suppression of Cell-Mediated Immunity, and Possible Mechanisms of Action. *Clin Microbiol Rev*, 4: 1–19.

- Newman S., Bhugra B., Holly A. & Morris R. (2004).** Enhanced Killing of *Candida albicans* by Human Macrophages Adherent to Type 1 Collagen Matrices via Induction of Phagolysosomal Fusion. *Intect Immun*, 73(2): 770–777.
- Onishi J., Meinz M., Thompson J., Curotto J., Dreikorn S., Rosenbach M., Douglas C., Abruzzo G., Flattery A., Kong L., Cabello A., Vicent F., Pelaez F., Diez M., Martin I., Bills G., Giacobbe R., Dombrowski A., Schwartz R., Morris S., Harris G., Tsipouras A., Wilson K. & Kurtz M. (1999).** Discovery of Novel Antifungal (1,3)- β -D-Glucan Synthase Inhibitors. *Ant Agent Chem*, 44: 368–377.
- Palmer G., Kelly M. & Sturtevant J. (2007).** Autophagy in the pathogen *Candida albicans*. *Microb*, 153: 51–58.
- Pardo M., Monteoliva L., Vázquez P., Martínez R., Molero G., Nombela C. & Gil C. (2004)** “*PST1* and *ECM33* encode two yeast cell surface GPI proteins important for cell wall integrity” *Microbiol*, 150, 4157–4170
- Patterson-Delafield J., Szklarek D., Martinez F. J. & Lehrer R. I. (1981).** Microbicidal cationic proteins of rabbit alveolar macrophages: amino acid composition and functional attributes. *Infect Immun*, 31: 723–731.
- Pfaller M., Diekema D., Messer S., Hollis R. & Jones R. (2003).** In vitro activities of caspofungin compared with those of fluconazole and itraconazole against 3,959 clinical isolates of *Candida* spp., including 157 fluconazole-resistant isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 47:1068–1071.
- Pfaller M. & Diekema D., (2002).** Role of Sentinel Surveillance of Candidemia: Trends in Species Distribution and Antifungal Susceptibility. *J Clin Microbiol*, 40: 3551–3557.
- Pfaller M. & Diekema D., (2004).** Rare and Emerging Opportunistic Fungal Pathogens: Concern for Resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol*, 42: 4419–4431.
- Pla J., Gil C., Monteoliva L., Navarro-Garcia F., Sanchez M. & Nombela C. (1996).** Understanding *Candida albicans* at the molecular level. *Yeast*, 12: 1677–1702.
- Pollock R. & Treisman R. (1990).** A sensitive method for the determination of protein-DNA-binding specificities. *Nucleic Acids Res*, 18: 6197–6204.
- Pollock R. & Treisman R. (1991).** Human SRF-related proteins: DNA-binding properties and potential regulatory targets. *Genes Dev*, 5: 2327–2341.

- Poraht J. (1992).** Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expr Purif*, 3(4): 263–281.
- Posas F., Casamayor A. & Arino J. (1993).** The PPZ protein phosphatases are involved in the maintenance of osmotic stability of yeast cells. *FEBS Lett*, 318: 282–286.
- Posas F., Camps M. & Arino J. (1995).** The PPZ protein phosphatases are important determinants of salt tolerance in yeast cells. *J Biol Chem*, 270: 13036–13041.
- Prigneau O., Porta A. & Maresca B. (2004).** *Candida albicans* CTN gene family is induced during macrophage infection: homology, disruption and phenotypic analysis of CTN3 gene. *Fungal Genet Biol*, 41: 783–793.
- Reinoso-Martín C., Schuller C., Schuetzer-Muehlbauer M. & Kuchler K. (2003).** The Yeast Protein Kinase C Cell Integrity Pathway Mediates Tolerance to the Antifungal Drug Caspofungin through Activation of Slt2p Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling. *Eukar Cell*, 2: 1200–1210.
- Román E., Arana D., Nombela C., Alonso-Monge R. & Pla J. (2007).** MAP kinase pathways as regulators of fungal virulence. *Trends in Microbiol*, 15: 181–190.
- Román E., Nombela C. & Pla J. (2005).** The Sho1 Adaptor Protein Links Oxidative Stress to Morphogenesis and Cell Wall Biosynthesis in the Fungal Pathogen *Candida albicans*. *Mol Cell Biol*, 25: 10611–10627.
- Rottmann M., Dieter S., Brunner H. & Rupp S. (2003).** A screen in *Saccharomyces cerevisiae* identified CaMCM1, an essential gene in *Candida albicans* crucial for morphogenesis. *Mol Microbiol*, 47: 943–959.
- Sampaio P., Correia A., Gusmão L., Amorim A. & Pais C. (2007).** Sequence analysis reveals complex mutational processes for allele length variation at two polymorphic microsatellite loci in *Candida albicans*. *A Méndez-Vilas Ed*, 1: 926–935.
- Sampaio P., Gusmão L., Alves C., Pina-Vaz C., Amorim A. & Pais C. (2003).** Highly polymorphic microsatellite for identification of *Candida albicans* strains. *J Clin Microbial*, 41: 552–557.
- Sanglard D., Hube B., Monod M., Odds F. & Gow N. (1997).** A triple deletion of the secreted aspartyl proteinase genes SAP4, SAP5, and SAP6 of *Candida albicans* causes attenuated virulence. *Infect Immun*, 65(9): 3539–3546.

- Sanger F., Nicklen S. & Coulson, A. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74: 5463–5467.
- Sanz M., Carrano L., Jiménez C., Candiani G., Trilla J., Durán A. & Roncero C. (2005).** *Candida albicans* strains deficient in *CHS7*, a key regulator of chitin synthase III, exhibit morphogenetic alterations and attenuated virulence. *Microbiol*, 151: 2623–2636.
- Sarvikivi E., Lyytikäinen O., Soll D., Pujol C., Pfaller M., Richardson M., Koukila-Kahkola P., Luukkainen P. & Saxen H. (2005).** Emergence of fluconazole resistance in a *Candida parapsilosis* strain that caused infections in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol*, 43: 2729–2735.
- Sasada M. & Johnston R. (1980).** Macrophage microbicidal activity. *J Exp Med*, 152: 85–98.
- Saville S., Lazzell A., Monteagudo C. & Lopez-Ribot J. (2003).** Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryot Cell*, 2: 1053–1060.
- Schaller M., Borelli C., Korting H. & Hube B. (2005).** Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*, 48: 365–377.
- Schmid J., Voss E. & Soll D. R. (1990).** Computer-assisted methods for assessing strain relatedness in *Candida albicans* by fingerprinting with the moderately repetitive sequence Ca3. *J Clin Microbiol*, 28: 1236–1243.
- Schmid J., Odds F. C., Wiselka M. J., Nicholson K. G. & Soll D. R. (1992).** Genetic similarity and maintenance of *Candida albicans* strains from a group of AIDS patients, demonstrated by DNA fingerprinting. *J Clin Microbiol*, 30: 935–941.
- Schmid J., Hunter P. R., White G. C., Nand A. K. & Cannon R. D. (1995a).** Physiological traits associated with success of *Candida albicans* strains as commensal colonisers and pathogens. *J Clin Microbiol*, 33: 2920–2926.
- Schmid J., Tay Y. P., Wan L., Carr M., Parr D. & McKinney W. (1995b).** Evidence for nosocomial transmission of *Candida albicans* obtained by Ca3 fingerprinting. *J Clin Microbiol*, 33: 1223–1230.
- Selvaggini S., Munro C., Paschoud S., Sanglard D. & Gow N. (2004).** Independent regulation of chitin synthase and chitinase activity in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol*, 150: 921–928.

- Shoham S. & Levitz S. (2005).** The immune response to fungal infections. *British J Haemat*, 129: 569–582.
- Shore P. & Sharrocks A. (1995).** The MADS-box family of transcription factors. *Eur J Biochem*, 229: 1–13.
- Soll D. (1997).** Gene regulation during high-frequency switching in *Candida albicans*. *Microbiol*, 143: 279–288.
- Sonneborn A., Tebarth B. & Ernst J. (1999).** Control of White-Opaque Phenotypic Switching in *Candida albicans* by the Efg1p Morphogenetic Regulator. *Infect and Immun*, 67: 4655–4660.
- Spreghini E., Davis D., Subaran R., Kim M. & Mitchell A. (2003).** Roles of *Candida albicans* Dfg5p and Dcw1p Cell Surface Proteins in Growth and Hypha Formation. *Eukaryot Cell*, 2: 746–755.
- Staib P., Krtschmar M., Nichterlein T., Hof H. & Morschhauser J. (2000).** Differential activation of a *Candida albicans* virulence gene family during infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(11): 6102–6107.
- Staleva L., Hall A. & Orlow S. (2004).** Oxidative Stress Activates *FUS1* and *RLM1* Transcription in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* in an Oxidantdependent Manner. *Mol Biol Cell*, 15: 5574–5582.
- Steele C., Leigh J., Swoboda R. & Fidel P. (2000).** Growth inhibition of *Candida* by human oral epithelial cells. *J Infect Dis*, 182(5): 1479–1485.
- Stevens D., Espiritu M. & Parmar R. (2004).** Paradoxical Effect of Caspofungin: Reduced Activity against *Candida albicans* at High Drug Concentrations. *Ant Ag Chem*, 48: 3407–3411.
- Studier F. (1991).** Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J Mol Biol*, 219(1): 37–44.
- Studier F. & Moffatt B. (1986).** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*, 189: 113–130.
- Studier F., Rosenberg A., Dunn J. & Dubendorf J. (1990).** Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol*, 185: 60–89.
- Sundstrom P. (1999).** Adhesins in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*, 2: 353–357.

Sundstrom P. (2002). Adhesion in *Candida* spp. *Cell Microbiol*, 4: 461–469.

Tavanti A., Campa D., Bertozzi A., Pardini G., Naglik J., Barale R. & Senesi S. (2006). *Candida albicans* isolates with different genomic backgrounds display a differential response to macrophage infection. *Microb Infect*, 8: 791–800.

Thompson H. L. & Wilton J. M. A. (1992). Interaction and intracellular killing of *Candida albicans* blastospores by human polymorphonuclear leukocytes, monocytes and monocyte-derived macrophages in aerobic and anaerobic conditions. *Clin Exp Immunol*, 87: 316–321.

Tietz H. J., Hopp M., Schmalreck A., Sterry W. & Czaika V. (2001). *Candida africana* sp. nov., a new human pathogen or a variant of *Candida albicans*? *Mycoses*, 44: 437–445.

Torosantucci A., Romagnoli G., Chiani P., Stringaro A., Crateri O., Mariotti S., Teloni R., Arancia G., Cassone A. & Nisini R. (2004). *Candida albicans* yeast and germ tube forms interfere differently with human monocyte differentiation into dendritic cells: a novel dimorphism-dependent mechanism to escape the host's immune response. *Infect Immun*, 72(2): 833–843.

Treisman R. (1990). The *SRE*: a growth factor responsive transcriptional regulator. *Semin Cancer Biol*, 1: 47–58.

Umeyama T., Kaneko A., Watanabe H., Hirai A., Uehara Y., Niimi M. & Azuma M. (2006). Deletion of the *CaBIG1* Gene Reduces β -1,6-Glucan Synthesis, Filamentation, Adhesion, and Virulence in *Candida albicans*. *Infect Immun*, 74(4): 2373–2381.

Vazquez-Torres A., Jones-Carson J. & Balish E. (1996). Peroxynitrite contributes to the candidacidal activity of nitric oxide-producing macrophages. *Infect Immun*, 64: 3127–3133.

Vázquez-Torres A. & Balish E. (1997). Macrophages in Resistance to Candidiasis. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(2): 170–192.

Verstrepen K. & F. Klis (2006). Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol Microbiol*, 60: 5–15.

Vilella F., Herrero E., Torre J. & Torre-Ruiz M. (2005). Pkc1 and the Upstream Elements of the Cell Integrity Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, Rom2 and Mtl1, Are Required for Cellular Responses to Oxidative Stress. *J Biol Chem*, 280(10): 9149–9159.

- Vonk A., Wieland C., Versteegen M., Verschueren I., Netea M., Joostent L., Verweij P. & Kullberg B. (2005).** Influence of endogenous pro-inflammatory cytokines on neutrophil-mediated damage of *Candida albicans* pseudohyphae, quantified in a modified tetrazolium dye assay. *Med Mycol*, 43(6): 551–557.
- Walker L., Munro C., Bruijn I., Lenardon M., McKinnon A. & Gow N. (2008).** Stimulation of Chitin Synthesis Rescues *Candida albicans* from Echinocandins. *PloS Pathog*, 4.
- Walsh T., Karlsson M., Driscoll T., Arguedas A., Adamson P., Saez-Llorens X., Vora A., Arrieta A., Blumer J., Lutsar I., Milligan P. & Wood N. (2004).** Pharmacokinetics and safety of intravenous voriconazole in children after single- or multiple-dose administration. *Antimicrob Agent Chemother*, 48:2166–2172.
- Walther A. & Wendland J. (2004).** Polarized Hyphal Growth in *Candida albicans* Requires the Wiskott-Aldrich Syndrome Protein Homolog Wal1p. *Eukar Cell*, 3(2): 471–482.
- Warenda A. & Konopka J. (2002).** Septin Function in *Candida albicans* Morphogenesis. *Mol Biol Cell*, 13: 2732–2746.
- Watanabe K., Kagaya K., Yamada T. & Fukazawa Y. (1991).** Mechanism for candidacidal activity in macrophages activated by recombinant gamma interferon. *Infect Immun*, 59: 521–528.
- Watanabe Y., Irie K. & Matsumoto K. (1995).** Yeast *RLM1* Encodes a Serum Response Factor-Like Protein That May Function Downstream of the Mpk1 (Slf2) Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. *Mol Cell Biol*, 15: 5740–5749.
- Watanabe Y., Takaesu G., Hagiwara M., Irie K. & Matsumoto K. (1997).** Characterization of a Serum Response Factor-Like Protein in *Saccharomyces cerevisiae*, Rlm1, Which Has Transcriptional Activity Regulated by the Mpk1 (Slf2) Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. *Mol Cell Biol*, 17: 2615–2623.
- West A. & Sharrocks A. (1999).** MADS-box Transcription Factors Adopt Alternative Mechanisms for Bending DNA. *J Mol Biol*, 286: 1311–1323.
- Westwater C., Balish E. & Schofield D. (2005).** *Candida albicans*-Conditioned Medium Protects Yeast Cells from Oxidative Stress: a Possible Link between Quorum Sensing and Oxidative Stress Resistance. *Eukaryot Cell*, 4: 1654–1661.
- Wilson R., Davis D. & Mitchell A. (1999).** Rapid Hypothesis Testing with *Candida albicans* through Gene Disruption with Short Homology Regions. *J Bacteriol*, 181: 1868–1874.

Yang Y. (2003). Virulence factors of *Candida* species. J Microbiol Immunol Infect, 36: 223–228.

Zhao R., Lockhart S., Daniels K. & Soll D. (2002). Roles of *TUP1* in Switching, Phase Maintenance, and Phase-Specific Gene Expression in *Candida albicans*. Eukaryot Cell, 1: 353–365.

Anexos

Extracção de DNA genómico de levedura

(adaptada de Ausubel *et al.*, 1994)

P1

- 1) Inocular 15ml de meio YEPD com uma colónia de levedura.
- 2) Crescer a 30°C e 200rpm até uma D.O._{640nm} de 3,0.
- 3) Centrifugar as células a 4°C, durante 5 minutos (min) a 5000rpm.
- 4) Ressuspender as células em 1ml de sorbitol 0,9M EDTA.Na₂ 0,1M (pH7,5).
- 5) Adicionar 4000U de liticase e incubar durante 1h a 37°C.
- 6) Centrifugar os esferoplastos a 5000rpm durante 5 min.
- 7) Ressuspender o pellet em 1ml de Tris-HCl 50mM (pH 7,4) EDTA.Na₂ 20mM.
- 8) Adicionar 60µl de SDS 10% e incubar a 65°C durante 30 min.
- 9) Adicionar 250µl de acetato de potássio 5M.
- 9) Incubar em gelo durante 1h.
- 10) Centrifugar a 10000rpm durante 10 min.
- 11) Transferir o sobrenadante para novos tubos.
- 12) Adicionar igual volume de isopropanol frio.
- 13) Centrifugar a 5000rpm durante 15 min.
- 14) Lavar o pellet 2x em 1ml de etanol 70% durante 5 min.
- 15) Deixar o pellet secar ao ar.
- 16) Ressuspender o material genético em 200µl de TE (pH7,4).

Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Smith J.A., Seidman J.G. & Struhl K. (1994). *Current protocols in molecular biology*. J. Wiley, New York.

Soluções

Tampão TE:

10mM Tris-Cl, pH7,4
1mM EDTA

Preparação de células competentes de *E. coli*¹

(adaptada de Inoue *et al.*, 1990)

- 1) Inocular 250ml de meio SOB num balão de 2l com cerca de 10 colónias.
- 2) Crescer a 18°C com vigorosa agitação (200-250 rpm) até uma D.O.₆₀₀ de 0,6.
- 3) Colocar no gelo por 10 min.
- 4) Centrifugar a 4°C durante 10 min a 2500g.
- 5) Ressuspender o pellet em 80 ml de tampão TB frio.
- 6) Colocar no gelo por 10 min.
- 7) Centrifugar a 4°C durante 10 min a 2500g.
- 8) Ressuspender gentilmente o pellet em 20ml de tampão TB frio.
- 9) Adicionar DMSO para uma concentração final de 7%.
- 10) Colocar no gelo por 10 min.
- 11) Distribuir em alíquotas de 200µl e colocar em azoto líquido.
- 12) Armazenar a -80°C.

P2

Inoue H., Nojima H. & Okayama H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96: 23-28.

¹ método de SEM: *simple and efficient method*

Soluções

SOB:

Triptona 2%
Yeast extract 0,5%
NaCl 10%

Tampão TB:

PIPES 10mM
CaCl₂ 5mM
KCl 250mM

Dissolver, ajustar pH a 6,7 com KOH e adicionar MnCl₂ para uma concentração final de 55mM; esterilizar a solução por filtração e guardar a 4°C.

Transformação de células competentes de *E. coli*¹

(adaptada de Inoue *et al.*, 1990)

P3

- 1) Descongelar uma alíquota de células competentes em banho de gelo.
- 2) Adicionar 10ng de DNA (10 a 25µl) aos 200 µl de células competentes.
- 3) Misturar gentilmente e manter em gelo durante 30 min.
- 4) Provocar um choque térmico às células, colocando o microtubo a 42°C e deixar durante 30 segundos (seg).
- 5) Adicionar 0,8ml de meio SOC e incubar 45 min, a 37°C com vigorosa agitação.
- 6) Centrifugar as células durante alguns segundos a 14000rpm.
- 7) Dissolver o pellet em 50µl de sobrenadante.
- 8) Espalhar em placa LB suplementado com o antibiótico apropriado (ampicilina).
- 9) Para *screening* por cor branco-azul, adicionar IPTG para uma concentração final de 40µg/ml e X-GAL para uma concentração final de 40µg/ml.
- 10) Incubar a 37°C durante toda a noite.

Inoue H., Nojima H. & Okayama H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96: 23-28.

¹ método de SEM: *simple and efficient method*

Soluções

SOC:

Tryptone 2%

Yeast extract 0,5%

NaCl 10%

Dissolver e autoclavar. Adicionar glucose e Mg²⁺ filtro-esterilizados, cada um para uma concentração final de 20mM.

IPTG: β-D-tiogalactopiranosídeo de isopropilo (*Invitrogen*) 40mg/ml

X-GAL: 5-bromo-4-cloro-3-idolil β-D-galactopiranosídeo (*Invitrogen*) 40mg/ml

1) Num tubo de PCR adicionar:

- a) H₂O up para um volume final de 25µl
- b) tampão de PCR10x
- c) 2,5mM MgCl₂
- d) 0,2mM de dNTPs
- e) 0,4µM de cada *primer*
- f) 100ng de DNA genómico
- g) 1U de *Taq* DNA polimerase

2) Colocar os tubos de PCR no termociclador, com o programa apropriado.

Soluções Stock

Taq DNA polymerase (Fermentas)

tampão de PCR 10x (100mM Tris-HCl, pH 8,8, 500mM KCl, 0,8% Nonidet P40) (Fermentas)

MgCl₂ 25mM (Fermentas)

dNTPs 10mM (Fermentas)

primers 100µM (STABvida), em TE

Equipamento requerido

Termociclador modelo *mycycler* da BioRad

Digestão com enzimas de restrição e análise dos fragmentos

(adaptado de Sambrook & Russel, 2001)

P5

1) Num microtubo adicionar:

- a) H₂O ultra-pura para um volume final de 20µl
- b) tampão de enzima 2x
- c) 1µl de enzima de restrição A (A e B, para digestões duplas)
- d) 10µl de DNA

2) Incubar à temperatura apropriada, durante a noite.

3) Análisar os fragmentos de digestão por electroforese em gel de agarose 1%, em tampão TAE.

4) Quando necessário o fragmento de DNA é purificado com o kit de purificação "QUIAquick® Gel Extraction Kit" (Quiagen), segundo as indicações do fabricante.

Sambrook J. & Russel D.W. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. In Cold Spring Harbor Laboratory, 3nd., New York, NY.

Nota:

3) a corrida do gel a 150V durante aproximadamente 40min

Material requerido

Sistema electroforético "SUB-CELL® GT" (BIO-RAD)

Transiluminador "Eagle Eye® II Video System"

Soluções

Tampão TAE:

40mM Tris

2mM Na₂EDTA 2H₂O

pH ~8,5

Ligação de fragmentos de DNA a plasmídios

(adaptado de Sambrook & Russel, 2001)

P6

1) Digerir o fragmento de DNA e o plasmídio com as enzimas de restrição apropriadas.

2) Purificar os fragmentos utilizando purificação "QUIAquick® Gel Extraction Kit" (Quiagen).

1) Num microtubo adicionar:

- a) H₂O ultra-pura para um volume final de 10µl
- b) Tampão 10x, ou 2x se ligação ao pGEMT-Ez
- c) DNA purificado
- d) 1µl de T4 DNA Ligase

4) Incubar durante a noite a 4°C.

Sambrook J. & Russel D.W. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. In Cold Spring Harbor Laboratory, 3nd., New York, NY.

Nota:

c) Para 50ng de plasmídio adicionar fragmento de DNA suficiente para ter a razão molar vector:insert 1:3 (quantidade de insert (ng) = (tamanho insert x 50 x 3)/ tamanho plasmídio).

Soluções Stock

Tampão 10x (300mM Tris-HCl, pH 7,8, 100mM MgCl₂, 100mM DTT, 10mM ATP) (Promega)

Tampão 2x (60mM Tris-HCl, pH 7,8, 20mM MgCl₂, 20mM DTT, 2mM ATP 10% PEG) (Promega)

T4 DNA Ligase (3U/µL) (Promega)

Transformação de *Candida albicans*

(adaptado de Braun & Johnson, 1997)

P7

- 1) Inocular 1ml de meio YEPD com uma colónia de *C. albicans*.
- 2) Crescer a 30°C com vigorosa agitação (200-250 rpm) até uma DO₆₄₀ de 4,0.
- 3) Efectuar uma diluição de 1/100 em 50ml de meio fresco e deixar crescer por duas gerações (aproximadamente 4h).
- 4) Centrifugar as células a 4°C durante 3 min a 5000rpm.
- 5) Lavar as células com 5ml de tampão LATE.
- 6) Centrifugar a 4°C durante 3 min a 5000rpm.
- 7) Dissolver o pellet em 0,5ml de tampão LATE.
- 8) Adicionar a 0,1ml de suspensão celular 10 µL de 10mg/ml de esperma de salmão e DNA a introduzir.
- 9) Incubar a 30°C por 30min.
- 10) Adicionar 700µl de tampão PLATE e vortexar por 2 seg.
- 11) Incubar durante a noite a 30°C.
- 12) Provocar um choque térmico às células, colocando o microtubo a 42°C e deixar durante 1h.
- 13) Centrifugar as células durante alguns segundos a 14000rpm.
- 14) Lavar com 1ml de tampão TE.
- 15) Ressuspender as células em 200µl de tampão TE.
- 16) Espalhar em placa de meio selectivo.
- 17) Incubar a 30°C durante 2 a 5 dias.

Braun B. R. & Johnson A. D. (1997). Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor *TUP1*. *Science*, 277: 105– 109.

Nota:

8) DNA: para transformações com produtos de PCR, 80µl de mistura de PCR; para transformações com plasmídios linearizados ou fragmentos de restrição, 2 a 10 µg de DNA digerido

Soluções

Tampão LATE:

Acetato de lítio 0,1M

Tris-Cl 10mM, pH7,5

EDTA 1mM

Dissolver e esterilizar a solução por filtração.

Tampão PLATE:

Tampão LATE

Poli(etileno)glicol 3350 40%

Dissolver e esterilizar a solução por filtração

Esperma de salmão (Sigma)

- 1) Preparar o hemocitómetro com a coverslip
- 2) Colocar uma gota da suspensão celular por baixo da lamela do hemocitómetro, por acção capilar, até o compartimento de medição estar completamente preenchido.
- 3) Com microscópio óptico, contar no mínimo 200 células utilizando diversos campos da câmara (e diferentes campos de contagem).
- 4) Calcular a média de células por cada campo de contagem.
- 5) Considerar o volume de cada campo de contagem e considerar as diluições efectuadas, calcular a concentração de células por ml de suspensão como de seguida:

$$[\text{Células}] = \text{Células} \times \text{factor diluição} / 1 \times 10^{-4}$$

Material requerido

Hemocitómetro

Microscópio óptico

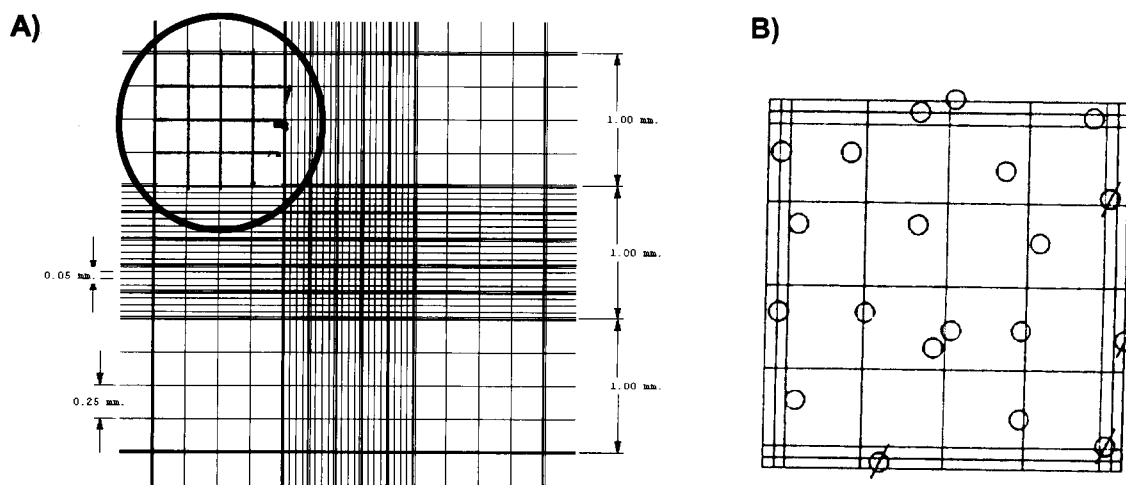


Figura 1 – Ilustração da câmara de hemocitómetro. **A)** Representação geral. O círculo indica aproximadamente o campo microscópico com a ampliação de 100x (10x ocular mais 10x objectiva). A área a sombreado representa um quadrante de contagem **B)** Uma vez que a profundidade da câmara é 0,1mm, cada quadrante de contagem tem um volume de 0,1µl; **B)** Ampliação do campo de contagem (a sombreado) de **A)**. O símbolo O indica células que devem ser contadas e o símbolo Ø indica células que não devem. Desta forma, apenas as células sobre duas margens do quadrado de contagem devem ser contadas.

Preparação da amostra

- 1) Utilizar a proteína isolada e/ou purificada como amostra.
- 2) Colocar 20µl da amostra num microtubo.
- 3) Adicionar 5µl de Tampão de aplicação 5x e desnaturar a amostra por ebulição, a 95°C por 5 min.
- 4) Fazer um pequeno *spin* do microtubo para recolher o condensado na tampa do tubo.

Electroforese do gel: Condições desnaturantes¹

- 5) Preparar um gel 12% de poliacrilamida descontínuo² utilizando o sistema Mini-Protean III electroforese.
- 6) Adicionar as amostras de proteína e o marcador.
- 7) Iniciar a electroforese a 8 ou 12 mA por cerca de 10 min e aumentar (após a frente de corrida sair do gel separador) para cerca de 15 ou 24 mA, se utilizar um ou dois géis, respectivamente.
- 8) Parar a electroforese quando a frente de corrida chegar ao fim do gel (cerca de 90 min).

Transferência de Proteína³

- 9) Transferir as proteína separadas para membranas de nitrocelulose, de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente:
- 10) Equilibrar o gel e a membrana em Towbin Buffer por 15 min.
- 11) Utilizar o sistema de transferência, por exemplo, Trans-Blot SD, junto com o aparelho, de acordo com as instruções do fabricante.
- 12) Transferir a 4°C (ou utilizar o compartimento de gelo) por 1h a 80mA, utilizando o tampão Towbin.

¹ Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685

² Ausubel F. M. *et al.* (1996) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol 2, John Wiley & Sons, Inc, USA

³ Towbin H., Staechelin T & Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76: 4350-4354.

Soluções

Tampão de aplicação 5x:

- 0,32M Tris-HCl, pH 6,8
- 10% SDS
- 25% β-mercaptoetanol
- 50% glicerol
- 0,01% azul de bromofenol

Tampão Towbin:

- 25 mM Tris
- 192 mM glicina
- 20% (v/v) etanol

Tampão de Bloqueamento:

- 5% (p/v) leite em pó magro
- PBS
- 0,05% (v/v) Tween 20

Incubação com anticorpo

13) Bloquear os locais de ligação não específicos da membrana com Tampão de bloqueamento, pelo menos 1h, sob agitação.

14) Lavar a membrana três vezes com PBS/0,05% (v/v) Tween 20, 5 min por lavagem.

15) Incubar a membrana com o anticorpo monoclonal *anti-polyHistidine peroxidase conjugated*, por 1h à temperatura ambiente, sob agitação.

16) Lavar a membrana três vezes com PBS/0,05% (v/v) Tween 20, 5 min por lavagem.

Detecção

17) Incubar a membrana com o kit de quimioluminescência *ECLTM Western Blotting Detection* por 1 min, segundo as instruções do fabricante.

18) Secar o excesso do reagente de detecção passando a membrana, gentilmente, sobre papel whatman.

19) Colocar a membrana, com a proteína para cima, entre duas folhas de um plástico adequado, de superfícies limpas, e gentilmente retirar as bolhas de ar.

20) Colocar a membrana com proteína para cima, no sistema de detecção de quimioluminescência e adquirir a imagem pelo *Imager ChemiDoc XRS* e *Quantity One software*

Nota:

15) Diluir 1:2000 o anticorpo em 30ml de Tampão de bloqueamento.

Material requerido

Mini-Protean III electrophoresis system (Bio-Rad)

Trans-Blot SD System (Bio-Rad)

Nitrocelulose membranes (Sigma)

Imager ChemiDoc XRS (Bio-Rad)

Reagentes especiais

Antibody monoclonal anti-polyHistidine peroxidase conjugated (Sigma)

ECLTM Western Blotting Detection (Amersham Biosciences)