

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

RAFAEL GARCIA LOPES

**CLONAGEM, EXPRESSÃO HETERÓLOGA E OBTENÇÃO
DE MUTANTES DA TREALASE ÁCIDA DE *Candida*
*glabrata***

**Florianópolis
2010**

RAFAEL GARCIA LOPES

**CLONAGEM, EXPRESSÃO HETERÓLOGA E OBTENÇÃO
DE MUTANTES DA TREALASE ÁCIDA DE *Candida*
*glabrata***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, visando à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Boris U. Stambuk

Florianópolis
2010

Dedico esse trabalho
a minha família,
amigos e namorada.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao Professor Dr. Boris U. Stambuk por sua orientação, conversas, puxões de orelha, , nesses quase quatro anos de parceria.

Aos doutorandos Sérgio Luis Alves Júnior e Débora Trichez, colegas de laboratório, sem os quais boa parte dessa dissertação não seria possível.

Aos professores tanto da pós-graduação quanto os da graduação, por incentivar essa minha paixão pelas ciências biológicas, em especial a Dra. Maria Risoleta Freire Marques e o Dr. Afonso Celso Dias Bainy.

Aos colegas de laboratório atual, que nesses anos juntos, sempre me ajudaram quando precisei, tratando-me com respeito e consideração (Davi, Adriane, Gabriela, Débora, Eduarda, Catarina, Sérgio, Marcelo, Júlio Cezar).

Aos grandes amigos de faculdade, que tornaram minha graduação muito mais agradável (Jacó, Marília, Tiago, Thiago, Denis, Gustavo, Hugo, Mariana, Cristina)

Aos meus amigos de longa data, que mesmo com cada um seguindo seus caminhos, a grande amizade continua, alguns sendo os irmãos que eu nunca tive (Bruno, Marta, Danilo, Rodrigo, Bernardo, Ana Letícia, Paula, Maria Júlia, Ricardo, Fernando).

Em especial a minha namorada Marília, pelo amparo nos momentos difíceis, por entender minha motivação em ser um cientista e sempre me incentivando a continuar, pelas caronas, por sacrificar nossos finais de semana, e principalmente por me ajudar a desligar do meu trabalho e relaxar. Sem sombra de dúvida, sem ela na minha vida meu mestrado seria muito menos proveitoso do que foi.

E por último e mais importante, agradeço a minha família, meu porto seguro. A minha mãe, grande companheira e incentivadora, mãe igual a ela não existe. Ao meu pai, por ter me cobrado, fez com que eu me tornasse uma pessoa mais responsável hoje. Esses dois, uso como referência para o resto da minha vida, pelas pessoas e profissionais que são. Agradeço também a minhas irmãs, por serem minha válvula de escape, por me aturarem quando estive estressado.

Muito obrigado por tudo.

RESUMO

Candida glabrata é considerado um importante patógeno fúngico emergente devido principalmente ao incremento de pacientes imunossuprimidos, e ao uso indiscriminado de compostos azólicos, resultando em altas taxas de mortalidade pela resistência inata desta levedura aos antifúngicos normalmente utilizados. Estratégias que objetivam a pronta identificação deste patógeno são extremamente importantes já que permitem a pronta implementação de um tratamento medicamentoso apropriado. A utilização de trealose por *C. glabrata* é apontada como importante metodologia diagnóstica na prática laboratorial, já que é característica marcante desta levedura a utilização de apenas glicose e trealose como fontes de carbono. Resultados prévios indicavam que esta levedura cresce em trealose graças à secreção no meio de cultura de uma trealase ácida que prontamente hidrolisa o dissacarídeo, permitindo a rápida fermentação da glicose liberada. No genoma de *C. glabrata* encontramos a ORF *CAGL0K05137g*, similar ao gene (*ATH1*) que codifica para a trealase ácida de *S. cerevisiae*. No intuito de verificar a identidade do gene postulado no genoma de *C. glabrata* como sendo da trealase ácida, utilizamos tanto estratégias de deleção da ORF do genoma, como subclonagem e expressão heteróloga dessa sequência gênica em *S. cerevisiae*. A deleção em *C. glabrata* confirmou a identidade do gene, não só pela ausência de crescimento em meios de cultura contendo trealose como fonte de carbono, como também pela perda da atividade trealase ácida periplasmática e/ou secretada pelas células. Além disso, nossos resultados indicam o envolvimento deste gene na manutenção da homeostase celular durante o estresse salino. A sequência de DNA correspondente foi também subclonada de forma a sobreexpressar este gene em *S. cerevisiae*, confirmando o gene *CgATH1* como sendo o responsável pela síntese de uma trealase ácida. A ORF clonada foi seqüenciada e comparada à ORF *CAGL0K05137g*, mostrando uma identidade de 98% entre as seqüências. Acreditamos que a caracterização molecular da trealase ácida em *C. glabrata* permitirá melhorias no diagnóstico laboratorial, bem como uma melhor compreensão do papel desta enzima, e do metabolismo de trealose, na fisiopatologia deste importante patógeno oportunista e de outros fungos de interesse médico.

Palavras-chave: *Candida glabrata*, trealose, trealase ácida, *ATH1*.

ABSTRACT

Candida glabrata is considered an important and emergent fungal pathogen due mainly to an increase in immunosuppressive patients, and to the indiscriminate use of azolic compounds, resulting in high mortality rates by the innate resistance of this yeast towards the normally used antifungals. Strategies that objectify the fast identification of this pathogen are extremely important, because they will allow the immediate implementation of an appropriate medical treatment. The utilization of trehalose by *C. glabrata* is pointed out as an important diagnostic methodology in the laboratorial practice, since it is a striking feature of the yeast to use only glucose and trehalose as carbon sources. Previous results indicate that this yeast grows in trehalose thanks to the secretion of an acid trehalase in the culture media that promptly hydrolyses the disaccharide, allowing the fast fermentation of the released glucose. In the genome of *C. glabrata* we found the ORF *CAGL0K05137g*, similar to the gene (*ATH1*) encoding for the acid trehalase of *S. cerevisiae*. In order to verifying the identity of the postulated gene in the genome of *C. glabrata* as an acid trehalase, we thus utilized strategies for the deletion of the ORF from the genome, as well as cloning and heterologous expression of this genetic sequence in *S. cerevisiae*. The deletion in *C. glabrata* confirmed the identity of the gene, not only because of absence of growth in culture media containing trehalose as a carbon source, but also to the loss of periplasmic and/or secreted acid trehalase activity by the cells. Besides, our results indicate the involvement of this gene in the maintenance of cellular homeostasis during a saline stress. The corresponding DNA sequence was also subcloned so that the gene could be overexpressed in *S. cerevisiae*, confirming the *CgATH1* gene as being responsible for the synthesis of an acid trehalase. The cloned ORF was sequenced and compared to the ORF *CAGL0K05137g*, showing 98% identity between the sequences. We believe that the molecular characterization of the acid trehalase in *C. glabrata* will allow improvements in the laboratorial diagnostic, as well as a better understanding of this enzyme's role, and of trehalose metabolism, in the physiopathology of this important opportunistic pathogen and of other fungi of medical interest.

Key-words: *Candida glabrata*, trehalose, acid trehalase, *ATH1*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1. Esquemas resumidos de três estratégias utilizadas para deleção da ORF <i>CAGL0K05137g</i>	24
Figura 4.2. Construções de diferentes estratégias para a deleção da ORF <i>CAGL0K05137g</i>	25
Figura 4.3. Confirmação da deleção da ORF <i>CAGL0K05137g</i>	30
Figura 4.4. Crescimento em micro escala de <i>C. glabrata</i> em meio rico YP contendo diferentes fontes de carbono.....	34
Figura 4.5. Crescimento em micro escala de <i>C. glabrata</i> em meio mínimo contendo diferentes fontes de carbono.....	35
Figura 4.6. Efeito do estresse salino no crescimento de <i>C. glabrata</i> em meio rico com 2% glicose.....	38
Figura 4.7. Amplificação por PCR da ORF <i>CAGL0K05137g</i> de <i>C. glabrata</i>	41
Figura 4.8. Mapa de restrição do plasmídeo pGRSd-CgATH1, e perfil de digestão dos plasmídeos obtidos com HindIII.....	43
Figura 4.9. Confirmação do mapa de restrição do plasmídeo pGRSd- <i>CgATH1</i>	45
Figura 4.10. Crescimento em micro escala de cepas de <i>S. cerevisiae</i> em meios ricos contendo diferentes fontes de carbono.....	48
Figura 4.11. Crescimento em micro escala de cepas de <i>S. cerevisiae</i> em meios sintéticos contendo diferentes fontes de carbono.....	49
Figura 4.12. Crescimento de transformantes de <i>S. cerevisiae</i> em meios sólidos contendo 2% trealose.....	51
Figura 4.13. Alinhamento das seqüências de nucleotídeos das trealases ácidas das leveduras <i>C. glabrata</i> linhagem Bg14 (este trabalho) e CBS138.....	53
Figura 4.14. Características da seqüência peptídica da trealase ácida da cepa Bg14 de <i>C. glabrata</i>	56
Figura 4.15. Análise filogenética das seqüências de aminoácidos das trealases ácidas de diversos fungos e leveduras.....	57
Figura 4.16. Alinhamento parcial das seqüências de aminoácidos da maltose fosforilase de <i>L. brevis</i> e trealase ácida de <i>C. glabrata</i>	59
Figura 4.17. Modelamento tridimensional comparativo da trealase ácida na cepa Bg14 de <i>C. glabrata</i>	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Cepas de levedura utilizadas.....	16
Tabela 3.2. Oligonucleotídeos utilizados.....	21
Tabela 3.3. Plasmídeos utilizados.....	22
Tabela 4.1. Atividade trealase ácida em linhagens de <i>C. glabrata</i>	32
Tabela 4.2 Atividade trealase ácida nas linhagens de <i>S. cerevisiae</i> transformadas.....	46

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1 <i>Candida glabrata</i>	1
1.2 Diagnóstico laboratorial de <i>C. glabrata</i>	6
1.3 Metabolização de trealose por leveduras.....	7
2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA.....	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.1 Linhagens de leveduras utilizadas.....	15
3.2 Meios e condições de cultivo.....	15
3.3 Determinação de glicose.....	16
3.4 Determinação da atividade trealase.....	17
3.5 Técnicas de Biologia Molecular, oligonucleotídeos e plasmídeos utilizados....	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1 Deleção da ORF CAGL0K05137g de <i>C. glabrata</i>	23
4.2 Clonagem do gene CgATH1 no plasmídeo pGRSd.....	40
4.3 Expressão heteróloga do gene CgATH1 em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	44
5. CONCLUSÕES E PESPECTIVAS.....	62
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Candida glabrata*

O gênero *Candida*, é constituído de um grupo heterogêneo de leveduras que usualmente existem em formas leveduriformes e/ou em forma de micélio e pseudomicélio. Esse grupo parafilético possui aproximadamente 200 espécies, das quais 20 (como exemplo, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*) são associadas à infecções humanas ou animais. Pode-se afirmar que a grande maioria das infecções fúngicas é causada por *Candida*, sendo que, em se tratando de micoses oportunistas, 72,8% ocorre por esse grupo de leveduras, com *C. albicans* sendo a espécie mais prevalente. Esse fato é parcialmente explicado pelo motivo que no trato gastrointestinal de praticamente 80% da população adulta saudável podem-se encontrar espécies do gênero *Candida* vivendo de maneira comensal (KAUR, 2005; SEGAL, 2005; BIALKOVA & SUBIK, 2006; PFALLER & DIEKEMA, 2007).

Entretanto, durante a última década, ocorreu uma mudança na prevalência relativa de espécies com o decréscimo de *C. albicans* como causa de infecção, e um acréscimo de espécies como *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* no mundo. Embora atualmente *C. glabrata* seja reconhecida como a segunda ou terceira espécie mais freqüente de isolados clínicos do globo, as infecções causadas por essa levedura no Brasil são consideradas raras em comparação com outras espécies, mesmo com a incidência geral de candidemia com valores de duas a quinze vezes maiores, quando comparados a países desenvolvidos como os Estados Unidos. As razões para essa mudança do perfil de infecções de espécies não *albicans* em nosso país não é muito bem conhecida, suspeitando-se da própria variação geográfica das espécies no vasto território brasileiro, entre outros motivos (SEGAL, 2005; COLOMBO et al., 2006; RUHNKE, 2006; PFALLER & DIEKEMA, 2007; WELLS et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2010).

Historicamente, *C. glabrata* tem sido visto como um saprófita relativamente não patogênico da microbiota normal de indivíduos saudáveis. Como citado acima, essa visão tem mudado, já que essa espécie é agora considerada um patógeno fúngico emergente junto com outras espécies não-*albicans*. Isso se deve principalmente ao aumento de pacientes imunossuprimidos, junto com um

amplo espectro de terapias antimicóticas, com o extensivo uso de drogas azólicas, como o fluconazol. Este constitui fator importante no aumento de casos envolvendo espécies com uma resistência inata relativa a esses medicamentos, incluindo *C. glabrata* (FIDEL et al., 2001; SEGAL, 2005). O uso prolongado de fluconazol é explicado, pois constitui medida profilática comum em pacientes com AIDS, pacientes transplantados, ou após quimio ou radioterapia, contribuindo para o aumento das infecções por *C. glabrata* (BADDLEY et al., 2001 PANACKAL et al., 2006; SENDID et al., 2006). É sabido também que *C. glabrata* normalmente é mais resistente ao fluconazol do que *C. albicans*, e que esta levedura apresenta uma capacidade de resistência a várias outras drogas antimicóticas (HELMERHORST et al., 2005). Essa mudança na prevalência de espécies não albicans, além do impacto na saúde de pacientes, já que *C. glabrata* é considerada a espécie de *Candida* mais letal em hospedeiros já imunocomprometidos, como em indivíduos com câncer, tem trazido também impactos econômicos para a saúde pública. Moran e colaboradores, em 2009, mostraram que entre 1996 e 2007, em um único hospital dos Estados Unidos, custou mais caro tratar de pacientes com candidemias causadas por *C. glabrata* do que com *C. albicans*.

Nos últimos cinco anos esse hemiascomiceto tem atraído o interesse de pesquisadores das mais diversas áreas, dentre as quais, os estudos de filogenia molecular, fenômenos do cariótipo, composição de parede celular, mecanismos de patogenicidade, aderência a superfícies, e ferramentas para seu diagnóstico se destacam. A essas áreas soma-se um interesse comum que advem da própria importância e impacto desse patógeno oportunista na saúde pública ao redor do mundo. Essa importância inerente do organismo, portanto, culminou no recente seqüenciamento de seu genoma haplóide através do programa Genolevures (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/elt/GAGL>) em 2004, genoma este constituído por 13 cromossomos e 12,3 Mb de seqüência (DUJON et al, 2004).

Sobre as consequências do seqüenciamento do genoma de *C. glabrata*, os estudos de filogenia molecular foram os que tiveram um dos maiores impactos. Devido a eles, essa levedura é frequente associada como um grupo irmão ao grupo de *Saccharomyces*, sendo que as características do genoma de *C. glabrata* e de vários outros hemiascomicetos indicam que aproximadamente há 100 milhões de anos um ancestral comum das leveduras do grupo *Saccharomyces*

(no momento da divergência entre os gêneros *Saccharomyces* e *Kluyveromyces*) sofreu uma duplicação do genoma (“whole genome duplication” ou WGD), seguida de significativa remodelagem no conteúdo gênico conforme as espécies se diferenciavam. Como consequência do WGD, verifica-se que aproximadamente 60% dos genes em *C. glabrata* encontram-se em regiões cromossômicas semelhantes às de *S. cerevisiae* (denominadas regiões “sintênicas” por apresentarem genes homólogos, os quais apresentam inclusive a mesma orientação cromossômica conservada), além de ser observado em média cerca de 65% de identidade entre as seqüências de aminoácidos das proteínas de *C. glabrata* e *S. cerevisiae* (DUJON et al, 2004; FISCHER et al., 2006; JAMES et al., 2006; SCANNELL et al, 2006; WOLFE, 2006).

Os pesquisadores também vêm prestando muito interesse ao fato que a árvore filogenética composta de cinco espécies (*Yarrowia lipolytica*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *C. glabrata* e *S. cerevisiae*), que é utilizada para exemplificar o fenômeno de WGD, embora com os organismos possuindo morfologia e estilos de vida semelhantes, a divergência molecular entre elas seria maior até que a de todo o grupo dos cordados (PAIN et al., 2004; DUJON, 2006).

Com os dados apresentados acima e a restrita homologia com *C. albicans*, têm levado muitos pesquisadores a propor uma nova denominação para *C. glabrata*: “*Saccharomyces glabrata*”. Entretanto, enquanto as espécies de leveduras do grupo *Saccharomyces* “senso stricto” (por exemplo, *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. bayanus*) aproveitaram a WGD para se tornarem eficientes fermentadores de açúcares, no caso de *C. glabrata* ocorreu significativa perda de genes (aproximadamente 9% menos genes comparado ao total de genes presentes em *S. cerevisiae*), genes geralmente envolvidos na utilização de fontes de carbono, no metabolismo do fosfato, nitrogênio e enxofre, e genes necessários para a biossíntese de vitaminas como tiamina (B1), piridoxina (B6) e niacina. Logicamente que estas perdas gênicas são reflexo da adaptação deste microrganismo ao seu nicho ecológico como patógeno oportunista e/ou comensal em mamíferos, onde não são encontradas fontes de carbono como a galactose, sacarose ou maltose, e as vitaminas podem ser facilmente obtidas do hospedeiro (DUJON et al, 2004; HITTINGER et al, 2004; WOLFE, 2006).

Todavia, para *C. glabrata*, além da perda gênica para sua adaptação ao nicho biológico em que está inserida e eventual patogenicidade, são necessárias outras características, como por exemplo, a aderência a materiais. Essa propriedade deve-se ao fato de existir moléculas na superfície celular, denominadas adesinas, aglutininas, ou floculinas, que geralmente incrementam a hidrofobicidade da superfície celular, permitindo a fixação da levedura a uma gama de substratos (VERSTREPEN & KLIS, 2006). Geralmente os genes que codificam para estas proteínas (genes *EPA* em *C. glabrata*) são formados por famílias gênicas com diversos membros, geralmente situados em regiões teloméricas. Outro fenótipo interessante dessa levedura relacionado à composição de sua parede celular pode ser parcialmente explicado pelas características em que essas proteínas responsáveis pela adesão celular são encontradas. É conhecido que a parede celular de *C. glabrata* incorpora 50% mais de proteínas do que a parede de *S. cerevisiae*, por exemplo. Essa alta proporção é peculiar a essa levedura, sendo encontradas em análises *in silico* 67 possíveis genes relacionados à adesão celular. A composição de parede é ainda mais contrastante quando compara-se a constituição entre *C. glabrata* e o próprio grupo *Candida*. Proteínas sabidamente relacionadas à virulência de leveduras localizadas na parede celular, de alguma forma estão enriquecidas em certas espécies de *Candida* como *C. albicans* e *C. tropicalis*, mas não em *C. glabrata* (de GROOT et al., 2008; BUTLER et al., 2009).

Desta forma, estes genes não só estão sujeitos a ampla heterogeneidade no tamanho das proteínas que eles codificam (permitindo também significativa variação antigênica), mas também a diversos mecanismos regulatórios envolvidos na sua expressão, permitindo a adesão (ou não) do microrganismo, conforme as necessidades e em resposta a estímulos ambientais. Um mecanismo bem conhecido que regula a transcrição dos genes *EPA* seria o silenciamento subtelomérico dos cromossomos nos quais os genes para aderência são encontrados, por um sistema de silenciamento homólogo ao observado em *S. cerevisiae*, *Sir3p* e *Rap1p* dependentes (CORMACK et al., 1999; VERSTREPEN et al., 2004; HALME et al., 2004; CASTANO et al., 2005; VERSTREPEN, et al., 2005).

Os estudos cromossômicos e fenômenos a ele associados em *C. glabrata* não tem se restringido apenas aos mecanismos de silenciamento subtelomérico.

Esta área também tem se desenvolvido muito nos últimos anos, por causa de descobertas importantes de fatores necessários a sua virulência estarem associados a mecanismos de recombinação, translocação e até mesmo formação de novos cromossomos, gerando cepas mais ou menos patogênicas. Recentemente foi descrito em *C. glabrata* regiões consecutivas com motivos repetidos variando entre 135 a 417 nucleotídeos, totalizando 40, batizadas de megassatélites. A essas regiões, por estarem contidas principalmente em genes relacionados à parede celular, especula-se uma possível relação com a patogenicidade, embora nada tenha sido provado ainda. Um fato intrigante é que esses megassatélites, até agora, não foram encontrados em nenhum outro hemiascomiceto, suscitando perguntas intrigantes sobre sua origem (FISCHER et al., 2006; MULLER et al., 2008; POLAKOVA et al., 2009; THIERRY et al., 2009).

Ainda com relação a patogenia de *C. glabrata*, muitos estudos tem se concentrado nos mecanismos moleculares de virulência graças ao sequenciamento do genoma dessa levedura, como explicado anteriormente. Por exemplo, em 2007 Kaur e colaboradores demonstraram, através da construção gênica e experimentação de cepas deletadas em loci específicos *YPSx* (onde x varia de 1 a 11), os quais codificam para aspartil-proteases ancoradas por cauda GPI, quais são necessários à virulência e sobrevivência de cepas de *C. glabrata* em macrófagos. Foi possível ainda, por mapeamento do genoma, verificar o agrupamento dos diversos loci em uma única região gênica. Outros exemplos recentes, como os genes homólogos a *S. cerevisiae* *PDR1*, *ERG11*, *STE12*, *SKN7* com funções relacionadas à regulação de resistência múltipla a drogas, síntese de ergosterol, regulação de genes específicos ligados ao crescimento invasivo, e regulação da resposta ao estresse oxidativo, respectivamente, são alguns dos genes extensivamente estudados em *C. glabrata*, pois, em última análise, por estarem associados a cepas altamente virulentas, as proteínas codificadas por eles tornam-se alvos terapêuticos interessantes. (CALCAGNO et al., 2003; TSAI et al., 2006; VERMITSKY et al., 2006; BERILA et al., 2009; FERRARI et al., 2009; SAIJO et al., 2010).

Além da proteína *Pdr1p* relacionada aos fenótipos de resistência a multidrogas, MDR (do inglês MultiDrug Resistance), tem se estudado também, em *C. glabrata*, as proteínas de membrana por ela reguladas. Algumas dessas proteínas, da classe das proteínas ABC ligadoras de ATP (do inglês ATP Binding

Cassette) tem sido pesquisadas, no gênero *Candida* e em outros patógenos fúngicos relevantes, como no gênero *Aspergillus*, por exemplo. Em *C. glabrata*, foram identificados 3 transportadores ABC, *CDR1*, *CDR2* e *SNQ2*, todos descritos como tendo mutações em suas regiões promotoras, levando a sua sobreexpressão e regulados por *Pdr1p*. Ultimamente essas proteínas (reguladoras e transportadoras) são os principais alvos de estudos para confecção de novas drogas, devido a sua prevalência na maioria dos patógenos fúngicos importantes (GBELSKA et al., 2006; THAKUR et al., 2008; GOFFEAU, 2008; MONK & GOFFEAU, 2008; MORSCHAUSER, 2009).

1.2 Diagnóstico laboratorial de *C. glabrata*

Dado o aumento das infecções por *C. glabrata*, e sua importância na saúde pública mundial, decorrente da alta taxa de mortalidade que apresenta pela resistência ao tratamento com fluconazol, tem motivado o desenvolvimento de metodologias rápidas para a pronta identificação desta levedura. Recentemente, numerosas técnicas baseadas no DNA têm sido desenvolvidas para a identificação de espécies de *Candida*. As técnicas de PCR (reação em cadeia da polimerase) e PCR “real time” usadas para a amplificação de DNA alvo de *Candida* são promissoras devido à simplicidade, especificidade e sensibilidade, e estão otimizadas para detecção de *Candida* em sangue ou hemocultura, cultura de raspado cutâneo, etc. (CHEN et al., 2000; DASSANAYAKE & SAMARANAYAKE, 2003; KAMIYA et al., 2005; KHAN et al., 2009). Como também revisto por Abbes e colaboradores em 2009, outras técnicas de biologia molecular são empregadas para diagnosticar corretamente infecções causadas por *C. glabrata*. Dentre elas podemos citar, o perfil de restrição clássico através de eletroforese, amplificação randômica do DNA ou RAPD (do inglês Random Amplification of DNA), eletroforese em campo pulsado ou PFGE (do inglês Pulse Field Gel Electrophoresis), “Southern Blot”, eletroforese por enzima multilocus, e marcadores microsatélite.

Contudo, estes métodos moleculares de análise e identificação de leveduras apresentam complexidades e custos que ainda restringem seu uso em laboratórios clínicos de rotina. Como citado acima, a gama de fontes de carbono que *C. glabrata* pode utilizar é bastante limitado, provavelmente devido à forma de

vida comensal a qual se adaptou, sendo capaz somente de utilizar dois açúcares, a glicose e o dissacarídeo trealose ($\text{Gli}\alpha 1 \rightarrow 1\alpha \text{Gli}$). Esse fato é interessante, já que se podem desenvolver ferramentas diagnósticas importantes, especialmente no caso da metabolização da trealose exógena. Foram então criados testes rápidos que se baseiam na habilidade desta levedura em utilizar eficientemente trealose, hidrolisando de forma rápida as moléculas do dissacarídeo em duas de glicose. A trealase, enzima responsável pela hidrólise específica da trealose é freqüentemente encontrada em várias espécies de leveduras, mas em nenhuma dessas outras espécies essa reação é aparentemente tão rápida quanto em *C. glabrata* (PELTROCHE-LLACSAHUANGA et al., 1999, LOPEZ et al., 2001, FREYDIERE et al., 2002; 2003).

Nestes testes rápidos, uma suspensão de leveduras com grande densidade celular é incubada na presença de trealose, e a glicose gerada pela ação da trealase é então detectada por reativo de cor (PELTROCHE-LLACSAHUANGA et al., 1999; FREYDIERE et al., 2002). Visando aumentar a especificidade do teste da trealase, agregou-se um teste paralelo de hidrólise do dissacarídeo maltose ($\text{Gli}\alpha 1 \rightarrow 4\text{Gli}$). Enquanto a maioria das outras espécies de *Candida* são eficientes fermentadoras deste açúcar por possuir altos níveis da enzima maltase, *C. glabrata* é incapaz de utilizar a maltose. A sensibilidade atribuída aos testes rápidos da trealase é de 94 a 98%, e sua especificidade pode ser ainda maior, de 95 a 100%, especialmente quando o teste da maltase é realizado em conjunto. Porém, o meio de cultivo utilizado para a obtenção das leveduras pode interferir no desempenho dos testes rápidos, e as primeiras formulações do CHROMagar[®] por exemplo, geravam resultados errôneos no teste rápido, reduzindo sua sensibilidade para 25% (FREYDIERE et al., 2002). Outros trabalhos observaram redução da sensibilidade em até 20% para o teste RAT (rápida assimilação da trealose) realizado com leveduras isoladas em meio Sabouraud dextrose, e a precisa explicação para esta interferência ainda não é conhecida (MURRAY & ZINCHUK & LARONE, 2005).

1.3 Metabolização de trealose por leveduras

A trealose é um dissacarídeo não redutor formado pela união de duas moléculas de glicose em uma ligação glicosídica $\alpha 1 \rightarrow 1\alpha$. Este carboidrato teve

seu nome originado provavelmente em 1858, quando começou a ser isolado de crisálidas de coleópteros da espécie *Larinus nidificans* no Oriente Médio, conhecidas como “trehala”. A ligação $\alpha 1 \rightarrow 1\alpha$ é sabidamente de baixa energia (1 kcal/mol), o que em última análise faz com que essa estrutura seja muito estável, quando em comparação com outros dissacarídeos, como a sacarose (Glic $\alpha 1 \rightarrow 2\beta$ Fru, com 27 kcal/mol). Ao passar dos anos a trealose foi identificada e caracterizada em uma gama de organismos, com exceção dos vertebrados, incluindo bactérias, fungos, leveduras, plantas e insetos, onde dissacarídeos não redutores (incluindo sacarose) são importantes formas de energia solúveis, sendo os principais responsáveis pelo armazenamento e translocação dessa energia. Podemos citar como exemplo uma parte do sucesso dos artrópodos em colonizar a Terra na vinculação ao uso da trealose como carboidrato de transporte na hemolinfa. Já ao nível celular, a trealose não funciona somente como uma reserva energética, pois outras funções podem lhe ser atribuídas, incluindo funções estruturais, de transporte e sinalização, além de fornecer proteção às membranas e proteínas contra diferentes condições de estresse como calor, congelamento, desidratação, anoxia, radicais livres e limitação de nutrientes (SINGER & LINDQUIST, 1998; ELBEIN et al., 2003; PAUL et al., 2008; ITURRIAGA et al., 2009).

Esse tipo específico de carboidrato, como a trealose e sacarose, são bem conhecidos por não participarem nas reações de Maillard, causadoras do escurecimento de alimentos. Em vista disso, a trealose tem também um atrativo nas aplicações industriais, com apenas 45% de sensação adocicada, quando comparada à sacarose. Essas propriedades do dissacarídeo trealose contribuem para seu interesse biotecnológico, por conferir um efeito protetor e estabilizador de biomoléculas (vacinas, proteínas, enzimas, membranas), células inteiras, ou mesmo de produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos (ELBEIN, 1974; THEVELEIN, 1984; COUTINHO et al., 1988; ROSER, 1991; COLAÇO et al., 1992; ELBEIN et al., 2003; PAUL et al., 2008; ITURRIAGA et al., 2009).

Com relação à proteção celular, o acúmulo de trealose em resposta ao estresse é provavelmente um mecanismo ancestral e conservado na evolução, pois é encontrado desde do domínio *Archaea* e *Bacteria*, até vegetais “superiores”, como as Angiospermas. Em *S. cerevisiae*, este carboidrato corresponde a 15-20% do peso seco da levedura, quando encontrada em

condições estressantes. Estes níveis elevados de trealose protegeriam as células contra lesões/danos provocados pelo estresse (VAN DJICK et al., 1995). Interessantemente, a presença do dissacarídeo também interfere com o correto redobramento de proteínas, o que explicaria o porquê da trealose ser rapidamente degradada após o término da condição estressante (SINGER & LINDQUIST, 1998; OCÓN et al., 2007). De fato, pesquisadores, inspirados na molécula de trealose, tem tentando desenvolver compostos que conferem maior estabilidade a proteínas (FARIA et al., 2008). Porém, ainda não é muito conhecido como a trealose atuaria de forma a proteger biomoléculas, mas três possíveis mecanismos poderiam explicar esse fenômeno: substituição da película de água, formação de camada vítrea, e estabilidade química, sendo que os processos não seriam, necessariamente, mutuamente exclusivos (JAIN & ROY, 2008; ITURRIAGA et al., 2009).

Sem sombra de dúvida, o metabolismo de trealose tem sido sugerido como um grande mecanismo para a proteção celular contra os mais diversos tipos de estresse, sendo eles oxidativos, térmicos, osmóticos, entre outros (PARRAGA et al., 2007; CAO et al., 2008; KAINO & TAKAGI, 2008; NERY et al., 2008; GARRE et al., 2009; MAHMUD et al., 2009;). Entretanto, um trabalho de Pedreño e colaboradores em 2002 mostrou que cepas de *S. cerevisiae* deletadas para os genes da via catabólica da trealose, em condições de estresse oxidativo por H₂O₂, tiveram respostas adaptativas semelhantes ao fenótipo selvagem. Isso seria um indício que o armazenamento de trealose em *S. cerevisiae* não seria o único agente protetor essencial para a defesa celular contra todas as condições estressantes.

Em leveduras, a via de síntese da trealose foi elucidada por Cabib e Leloir há mais de 50 anos. A síntese começa com a transferência do resíduo glicosil da uridina-difosfato-glicose (UDP-Gli) para a glicose 6-fosfato (Gli-6P), resultando em trealose 6-fosfato (T-6P), que é subsequente desfosforilada a trealose. Em *S. cerevisiae*, as enzimas que catalisam estas reações de biossíntese da trealose, a T-6P sintase (*Tps1p*) e T-6P fosfatase (*Tps2p*), codificadas pelos genes *TPS1* e *TPS2* respectivamente, fazem parte de um complexo com duas outras proteínas (*Tsl1p* e *Tps3p*), que estabilizam a holoenzima. Todas as subunidades do complexo são requeridas para uma atividade ótima, mas a deleção do gene *TPS1* resulta em perda total da atividade de síntese e produção de trealose (BELL et al.,

1998). A trealose-6P sintase está envolvida também na regulação de uma série de outros processos fisiológicos, incluindo o influxo da glicose na glicólise (THEVELEIN & HOHMANN, 1995). Esta via de síntese é também encontrada em várias outras leveduras (GANCEDO & FLORES, 2004).

Entretanto, a via anabólica para trealose envolvendo sintases e fosfatases, é só uma das cinco vias conhecidas para a formação do dissacarídeo. Resumidamente, ainda existem ainda o sistema *TS*, ou trealose sintase, a qual sintetiza trealose a partir de moléculas de maltose. Outras rotas existentes envolvem conjuntos enzimáticos que podem conter *TreY* e *TreZ*, uma maltooligosil-trealose-sintase e uma maltooligosil-trealose trealohidrolase respectivamente; ou ainda a *TreP*, uma trealose fosforilase que participa tanto da síntese quanto degradação do açúcar, e por último *TreT*, uma trealose glicosil-transferente-sintase. Essas cinco vias estão distribuídas em todos os Reinos, sendo, em sua grande maioria e diversidade, encontrados nos domínios *Archea* e *Bacteria*, e frequentemente mais de um sistema pode estar presente em um organismo (ELBEIN et al., 2003; AVONCE et al., 2006).

Complementarmente, o catabolismo da trealose pode ser resumido em dois sistemas, um reversível usando fosforilases, e o outro irreversível, através da hidrólise do dissacarídeo. Como descrito acima as trealoses fosforilases, comum em *Eubacteria* (AVONCE et al., 2006), podem participar tanto das vias de síntese quanto degradação da trealose.

O sistema irreversível envolve duas trealases em leveduras, uma denominada ácida e outra neutra. Estas enzimas apresentam várias diferenças no que se refere à localização, propriedades catalíticas e regulação. A trealase neutra (*Nth1p*) é citosólica e exibe atividade máxima em pH neutro (pH 6,7 a 7,0), sendo ativada por Ca^{2+} e Mn^{2+} e regulada por mecanismo de fosforilação que envolve a proteína quinase AMPcíclico-dependente (PKA), convertendo a enzima para sua forma ativa fosforilada (THEVELEIN, 1988). Já a trealase ácida (*Ath1p*) é ativa num pH ótimo entre o pH 4,5 a 5,0, sugerindo uma localização vacuolar, tendo um K_m entre 0,2 a 5 mM (AQUINO et al., 2005). Contudo, a nomenclatura das trealases com base somente no seu pH ótimo de funcionamento tem sido recentemente contestado por Sánchez-Fresneda e colaboradores (2009), que demonstraram que as trealases neutra e ácida em *C. albicans*, quando em um pH

ácido de 4,5 ou fisiológico de aproximadamente 7,0, respectivamente, conservam boa parte de sua atividade (75% *Nth1p* e 60% para *Ath1p*).

Enquanto a trealase neutra hidrolisa a reserva de trealose intracelular (KOPP et al., 1993), a trealase ácida estaria localizada no vacúolo, ou seria necessária para o crescimento da levedura utilizando trealose como fonte de carbono (NWAKA et al., 1996; NWAKA & HOLZER, 1998). De fato, em *S. cerevisiae* foi constatado que existem dois sistemas de assimilação de trealose exógena. A primeira estaria relacionada com a atividade da trealase ácida, como já citado, indicando que mais de 90% da atividade dessa enzima é extracelular. Uma segunda rota para a assimilação do dissacarídeo seria mediado por um transportador (*Agt1p*) ativo de trealose, aliado à sua hidrólise pela trealase neutra citoplasmática (MALLUTA et al 2000; JULES et al., 2004). Contudo, essa visão clássica da hidrólise do conteúdo intracelular do dissacarídeo somente pela *Nth1p* pode apresentar um desvio, conforme descrito por Jules e colaboradores em 2008. Em condições específicas de crescimento em trealose, observado em cepas de *S. cerevisiae tps1Δnth1Δnth2Δ*, foi observado que o dissacarídeo é primeiro internalizado via transporte ativo mediado por *Agt1p*, e posteriormente a hidrólise da trealose é verificada mesmo na ausência das trealases intracelulares. Essa degradação foi explicada por um mecanismo ainda desconhecido de exportação da trealose interna, e hidrólise pela trealase extracelular.

Por outro lado, ao longo do ciclo de crescimento um padrão de atividade oposto é observado entre os dois tipos de trealases. A atividade da trealase citosólica é mais alta durante crescimento exponencial com açúcares fermentáveis (glicose, manose ou galactose), com uma queda na atividade à medida que as células entram na fase estacionária, coincidindo com o início da biossíntese da trealose. Já, no caso da trealase ácida, sua principal atividade é detectada durante a fase estacionária ou em culturas que cresceram em substratos respiráveis (glicerol e etanol), indicando que esta enzima é sujeita a repressão catabólica pela glicose (SAN MIGUEL; ARGUELLES, 1994).

Porém, tanto a regulação como a localização exata da trealase ácida ainda não é bem conhecida. Há trabalhos que contestam a localização extracelular da enzima, comentando que, em *S. cerevisiae*, a mesma teria características de proteína de vacúolo, e a maior parte da atividade seria encontrada em frações vacuolares (HUANG et al., 2007). Entretanto, muito recentemente um trabalho

novamente reforçou o destino extracelular da hidrolase, usando técnicas de fluorescência e construção de híbridos em *S. cerevisiae* contendo a região gênica responsável pela destinação extracelular da trealase ácida fusionada com outra parte que transcreveria para a porção intracelular da invertase (gene *SUC2*). Essa construção híbrida foi inserida em um vetor, e posteriormente transfectado em cepas de *S. cerevisiae suc2Δ*, com seu plaqueamento em meio contendo sacarose. Foi possível, então, mostrar não só que a região sinal de trealase ácida era suficiente para endereçar a proteína fusionada para superfície celular, mas também definir exatamente a região responsável pelo sinal na porção N-terminal da trealase ácida de *S. cerevisiae* (HE et al., 2009).

Como já comentado, a função da trealase ácida em *S. cerevisiae* não é muito bem conhecida, porém tem se relacionado a presença dessa enzima em mecanismos de estresse, principalmente o estresse salino. Estudos mostram que surpreendentemente *Ath1p*, não só *Nth1p* e *Nth2p*, seriam necessárias para a recuperação e retomada do crescimento celular após um desafio com altas concentrações de sal (GARRE & MATALLANA, 2009; GARRE et al., 2009). Os mecanismos moleculares reguladores de tal fenótipo em *S. cerevisiae* são bem conhecidos para *Nth1p*, envolvendo os fatores de transcrição *Msn2p* e *Msn4p*, e elementos responsivos a estresse (STREs) encontrados na região promotora do gene. Em *C. glabrata*, foram encontradas sequências ortólogas a esses reguladores, demonstrando que, pelo menos em parte, os mecanismos que respondem a estímulos estressantes é conservado por essa via (ROETZER et al., 2008). A ativação desses fatores de transcrição estaria atrelada à cascata de fosforilação PKA dependente. Contudo, devido à ausência desses elementos responsivos na região promotora da trealase ácida, ainda não é conhecido o mecanismo responsável para tal ativação (ZHRINGER et al., 2000).

Recentemente, o metabolismo da trealose também tem levantado outros interesses, já que o metabolismo desse carboidrato parece ser importante para mecanismos patogênicos de alguns fungos. Um trabalho de Petzold e colaboradores (2006) com o basidiomiceto *Cryptococcus neoformans* demonstrou que o gene *TPS1* é altamente expresso durante os processos patobiológicos desse fungo. Outro trabalho, em *C. albicans*, relaciona a importância desse mesmo gene, mais o *TPS2*, para a patogenicidade da levedura (ZARAGOZA et al., 1998, 2002; VAN DIJCK et al., 2002). Um estudo mais recente demonstrou

que o gene para a trealase ácida em *Candida albicans* também estaria relacionado com os mecanismos patogênicos da levedura. As cepas utilizadas no trabalho eram mutantes, tendo o gene que codifica para a proteína (*ATC1*) deletado. A inoculação dessas cepas mutantes em cobaias imunodeprimidas levou a um decréscimo significativo no padrão de infecção pelas células de *C. albicans* (PEDREÑO et al., 2007). No mesmo organismo, mostrou-se que quando inoculava-se cepas *gpr1Δtps2Δ* em cobaias imunossuprimidas, as leveduras mutantes tornavam-se não virulentas (MAIDAN et al., 2009). Já em *S. cerevisiae*, mostrou-se que existe uma importância no catabolismo de trealose em cepas virulentas “*in vivo*”, de modo que a tripla deleção *ath1Δnth1Δnth2Δ* acarretava um efeito detrimental na sobrevivência das células, após uma observação de duas semanas comparando-a com sua parental. Interessantemente, quando a deleção de uma dessas trealases era revertida, especialmente a da trealase ácida, a sobrevivência da cepa aumentava (KINGSBURY et al., 2006).

Em patógenos de plantas, como *Magnaporthe grisea*, fungo de grande impacto econômico em culturas de arroz, os genes homólogos ao *TPS1* e *NTH1* de *S. cerevisiae* estão estritamente relacionados a estádios específicos da infecção do vegetal (FOSTER et al., 2003). Um outro exemplo de parasita, agora na hemolinfa de insetos, *Metarhizium anisopliae*, possui uma alta atividade trealase que lhe permite hidrolisar rapidamente a trealose (açúcar predominante neste tecido dos insetos), servindo assim como fonte rápida de energia para o crescimento do patógeno em detrimento do hospedeiro (ZHAO et al., 2006).

Até o presente existem poucos estudos analisando o metabolismo da trealose em *C. glabrata*. Estes estudos se fazem necessários, pois diferentemente de outros microrganismos, a utilização de fontes de carbono por essa levedura é bastante restrita, levando ao questionamento de quais pressões seletivas levaram a esta levedura manter a via catabólica extracelular, via pela qual foram montados os protocolos de diagnóstico laboratorial. Outro fato intrigante é que, mesmo a trealose não sendo parte considerável da dieta dos hospedeiros mamíferos, a atividade da trealase ácida secretada por *C. glabrata* é uma das mais altas encontradas até agora (ZILLI, 2006). Assim, o presente trabalho visa caracterizar molecularmente a trealase ácida deste microrganismo, objetivando um maior entendimento de sua importância na patogenicidade e homeostase celular de *C. glabrata*

2. OBJETIVOS

A levedura *C. glabrata* é um patógeno emergente com alta taxa de mortalidade e resistência inata aos antifúngicos azólicos, o que exige uma pronta identificação para adotar o regime medicamentoso apropriado. Já que a utilização de trealose por *C. glabrata* constitui a base para sua identificação, principalmente nos testes rápidos recentemente introduzidos na prática laboratorial, e também pela importância do metabolismo de trealose na infectividade de leveduras patogênicas, tínhamos como objetivo geral:

- Caracterizar molecularmente o gene da trealase ácida em *C. glabrata*.

E como objetivos específicos:

- Deletar o gene postulado com sendo da trealase ácida em *C. glabrata*.
- Observar fenótipos associados ao mutante de trealase ácida em *C. glabrata*
- Clonar por PCR e sobreexpressar o gene correspondente em linhagens de *S. cerevisiae*.
- Seqüenciar o gene clonado.
- Prever propriedades da trealase ácida clonada e seqüenciada, bem como comparar sua seqüência com outras trealases já identificadas, através ferramentas de bioinformática

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens de Levedura utilizadas

As linhagens de levedura utilizadas no presente trabalho estão descritas na Tabela 3.1. A cepa de *C. glabrata* LEMI 6099 faz parte da coleção do Laboratório Especial de Micologia Médica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP-EPM), e foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Arnaldo Lopes Colombo. A cepa Bg14 foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Brendan P. Cormack do Departamento de Biologia Molecular e Genética da Faculdade de Medicina Johns Hopkins, em Baltimore (USA). Essas leveduras foram escolhidas, não só pela auxotrofia da cepa Bg14 (vide tabela), pois, um trabalho prévio realizado no laboratório (ZILLI, 2006) demonstrou-se que elas se destacavam pela elevada concentração de trealase ácida no sobrenadante do meio. As linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas para expressar o gene da trealase ácida, ou foram utilizadas da coleção do nosso próprio Laboratório, ou foram gentilmente cedidas pelo Dr. J. François do Centre de Bioingénierie Gilbert Durand, em Toulouse, França.

Tabela 3.1. Cepas de levedura utilizadas

Espécie e Cepa	Característica ou Genótipo	Fonte
<u>C.glabrata</u>		
Bg2	Isolado clinico	Fidel et al. (1996)
Bg14	Isogênica a Bg2, mas <i>ura3Δ::Tn903 NeoR</i>	Cormack & Falkow (1999)
LEMI 6099	Isolado clinico	A. L. Colombo
RY01	Isogênica a Bg14, mas <i>ath1Δ::ScURA3</i>	Este trabalho
<u>S.cerevisiae</u>		
CEN.PK 2-1C	<i>MATa ura3-52 his3Δ1 leu2-3,112 trp1-289 MAL 2-8^c SUC2</i>	Entian & Kotter (1998)
BY4741	<i>MATa met15Δ0 his3Δ1leu2Δ0ura3Δ0</i>	EUROSCARF
BY ath1	Isogênica a BY4741, mas <i>ath1Δ::kanMX4</i>	EUROSCARF

3.2. Meios e condições de cultivo

As células de levedura foram crescidas em meio rico YP contendo 1% de extrato levedura (Sigma) e 2% de bacto-peptona (Difco), suplementado com 3% glicerol, ou 2% glicose ou trealose. Alternativamente, as cepas foram crescidas em meio mínimo YNB contendo 0,7% base nitrogenada de levedura sem aminoácidos (Sigma), as fontes de carbono mencionadas acima, e suplementados com todos os aminoácidos e bases requeridas pela levedura menos uracila (Uracil minus yeast supplements, Sigma). Os meios ricos tiveram o pH ajustado para 5,0 com ácido clorídrico, e o meio mínimo foi tamponado com 50 mM succinato-Tris, pH 5,0. Os meios sólidos eram acrescidos de 2% bacto-agar (Difco). Os meios de crescimento líquido não ocuparam mais que 1/5 do volume total do frasco para garantir aeração adequada, e as culturas foram mantidas a 28°C sob agitação orbital (160 rpm). Quando necessário foi adicionado geneticina (Sigma) aos meios de cultura, nas concentrações especificadas no texto. Alternativamente, as células foram inoculadas em placas de 96 poços com 100 µL de meio por poço e incubadas a 29°C e 161 rpm em um Tecan Infinite M200 microplate reader. Nestes crescimentos em micro escala, a densidade óptica a 570 nm foi medida a cada 15 min. Os experimentos de estresse salino foram realizados também em micro escala em meio rico YP-2% glicose acrescidos de 1,0-2,5 M de NaCl.

3.3. Determinação de glicose

A concentração de glicose foi determinada enzimaticamente utilizando-se glicose oxidase/peroxidase através de um kit enzimático comercial (Bio Técnica, Brasil) seguindo as instruções do fabricante.

3.4. Determinação da atividade trealase

A atividade trealase foi determinada nas células íntegras através da adaptação de um método para dosar atividade invertase extracelular em *S. cerevisiae* (SILVEIRA et al., 1996). As células (aproximadamente 10 mg), previamente centrifugadas (3000 g, 5 min) e lavadas duas vezes com água gelada, foram ressuspendidas em 1 ml de tampão 50 mM acetato de sódio (pH

5,0) contendo 50 mM fluoreto de sódio, e incubadas por 30 min a 30°C. A seguir 50 µl desta suspensão celular foi adicionada a 50 µl de tampão 100 mM succinato-Tris (pH 4,4), e a reação enzimática foi iniciada pela adição de 100 µl de 200 mM trealose. Após incubação por 30 min a 30°C, a reação foi interrompida através de fervura das amostras por cinco minutos. Para a dosagem da atividade enzimática nos sobrenadantes de cultura, as células foram substituídas por 50 µl das amostras de sobrenadante em análise. Após a inativação das reações enzimáticas por fervura, as amostras foram centrifugadas, e 10 µl do sobrenadante utilizadas para determinar a concentração de glicose liberada como descrito acima. As reações foram realizadas no mínimo em duplicata, e controles contendo amostras previamente fervidas foram sempre utilizados. Somente foram aceitos valores com menos de 10% de variação entre as repetições. A atividade enzimática foi expressa em unidades (U), onde uma unidade é a quantidade de enzima que produz 1 µmol de glicose min⁻¹ nas condições do ensaio (30°C e pH 4,4).

3.5. Técnicas de Biologia Molecular, oligonucleotídeos e plasmídeos utilizados

Com o intuito de deletar um gene de interesse do genoma de *C. glabrata*, foi utilizada a técnica de recombinação homóloga com regiões flanqueadoras longas (PERSON & HERNANDO & SCHWEIZER, 1998; CORMACK & FALKOW, 1999), utilizando-se os iniciadores *P1*, *P2*, *P3* e *P4* (Tabela 3.2). Com estes oligonucleotídeos foram gerados, por PCR, dois fragmentos de DNA independentes, que em seguida foram utilizados para amplificar, também por PCR, o gene *kan^R* ou *CaURA3* presente nos plasmídeos *pFA6a-kanMX6* ou *pAG60*, respectivamente (LONGTINE et al., 1998) (Tabela 3.3). As reações de PCR para obter os fragmentos de DNA foram realizadas com uma unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen), num volume final de 50 µl, contendo 1,0 µl de dNTP 10 mM; 1,5 µl de MgCl₂ 50 mM, 5,0 µl de tampão 10x concentrado da Taq DNA polimerase; 1 µl de cada iniciador *P1-P2* ou *P3-P4* (200 pmol/µl), e DNA genômico previamente extraído da levedura (AUSUBEL, 1995). O protocolo dos ciclos de reações foi o seguinte: 2 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos de [(a) 2 minutos a 92°C; b) 45 segundos a 45°C; e c) 1 minuto a 72°C], finalizando com

uma extensão de 10 minutos a 72°C. Para amplificar os marcadores de seleção foram utilizados 1,0 µl dos iniciadores externos *P1* e *P4* (200 pmol/µl), 1,0 µl dos produtos de cada reação anterior (*F1* e *F2*) contendo os fragmentos de DNA obtidos previamente por PCR, conforme descrito

acima, e 1,0 µl do plasmídeo correspondente a cada marcador, sendo que neste caso as condições do PCR foram: 5 ciclos de [a) 10 segundos a 94°C; b) 30 segundos a 40°C; c) 4 minutos a 72°C], e 25 ciclos de [a) 10 segundos a 94°C; b) 30 segundos a 55°C; c) 4 minutos a 72°C], finalizando com uma extensão de 10 minutos a 72°C. Ainda foi utilizada uma adaptação a essa técnica que lançava mão de construir o módulo de deleção adicionando mais uma etapa, e por consequência outro iniciador (*P5*), visando a amplificação do módulo contendo inicialmente apenas a região acima do gene (obtido por PCR como descrito acima), e o gene marcador.

Outra estratégia utilizada tinha como objetivo a construção de um módulo de deleção com regiões de homologia ainda maiores que as descritas acima, VLFH (do inglês Very Long Flanking Homology) (ZARAGOZA, 2003). Primeiro é necessário ter a sequência gênica de interesse clonada em um vetor. Segundo, foram utilizados iniciadores híbridos *F1VLFH* e *R1VLFH* (Tabela 3.2) para construção do módulo de deleção conforme o programa contendo: 2 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos de [(a) 2 minutos a 92°C ; b) 45 segundos a 55°C; e c) 1 minuto a 72°C], finalizando com uma extensão de 10 minutos a 72°C. Após a cotransformação plasmídeo mais vetor, recombinação *in vivo* e correta identificação, o plasmídeo é extraído da levedura hospedeira e multiplicado em bactérias DH5α competentes com posterior lise alcalina para sua purificação (ROBZYK & KASSIR, 1992; AUSUBEL, 1995). O plasmídeo em questão pode ser então utilizado como molde para uma segunda reação de PCR com os iniciadores *FCgATH1* e *RCgATH1* (Tabela 3.2), isolando assim o novo módulo de deleção. O programa para tal foi o seguinte: 2 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos de [(a) 2 minutos a 92°C; b) 45 segundos a 55°C; e c) 3 minutos a 72°C], finalizando com uma extensão de 10 minutos a 72°C. Mais uma vez as condições das duas reações de PCR, concentrações dos reagentes, iniciadores e DNA molde foram as mesmas descritas das anteriormente.

Mais uma técnica utilizada consistia em uma variação da técnica de recombinação homóloga com regiões flanqueadoras curtas, chamada de

PRODIGE (do inglês Promoter dependent disruption of genes) (EDLIND et al., 2005; VERMITSKY et al., 2006). Para tanto, foram utilizados na construção do módulo de deleção os iniciadores *PRODIGE1* (F) e *PRODIGE2* (R) (Tabela 3.2), com regiões de homologia tanto para a ORF de interesse *CAGL0K05137g* e para o plasmídeo *YEp24*, com o marcador de seleção *URA3* de *S. cerevisiae*. As concentrações de cada elemento necessário ao PCR foram iguais às condições anteriormente descritas. O programa na amplificação continha 2 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos de [(a) 2 minutos a 92°C; b) 45 segundos a 55°C; e c) 1 minuto a 72°C], finalizando com uma extensão de 10 minutos a 72°C.

Uma vez selecionados os transformantes, o DNA genômico das leveduras foi extraído conforme descrito por Ausubel (1995). Para a confirmação da deleção foram utilizados os iniciadores *VUATH1*, *VIATH1* e *VScURA3*, sendo os dois primeiros iniciadores construídos através da base de dados GENOLEVURES (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/elt/GAGL>) externamente ou internamente ao gene postulado como sendo o da trealase ácida. O terceiro foi construído a partir da seqüência do marcador de seleção *URA3* de *S. cerevisiae* no plasmídeo *YEp24* (CHRISTIANSON et al., 1992). A concentração de iniciadores, reagentes e DNA genômico, foram as mesmas das reações anteriores, com um programa que consistia de 2 minutos a 94°C seguido de 30 ciclos [(a) 2 minutos a 92°C; b) 45 segundos a 55°C; e c) 2 minutos a 72°C], finalizando com uma extensão de 10 minutos a 72°C.

A todos os produtos de PCR obtidos pelas diferentes estratégias ou confirmação de deleção, foi adicionado um tampão de amostra duas vezes concentrado composto por 20% (p/v) Ficoll 400, 0,1 M EDTA, 1,6% SDS e 0,05% de azul de bromofenol. A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1% em Tampão 90 mM Tris-borato, 2 mM EDTA, pH 8, contendo 2,5 ug de brometo de etídio/ml a 100 V em tampão 45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA, pH 8, até a migração total do azul de bromofenol. Após a corrida, as bandas de DNA no gel foram visualizadas sob luz UV, e as bandas de interesses recortadas e purificadas do gel através do kit Concert DNA Purification System (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. Em se tratando dos módulos de deleção isolados após a eletroforese, esses fragmentos de DNA lineares foram utilizados para transformar as cepas de *C. glabrata* através do método de transformação com acetato de lítio/DNA carreador/polietileno glicol (GIETZ & WOODS, 2002).

Alternativamente, o gene postulado como codificante para a trealase ácida de *C. glabrata* foi amplificado por PCR com a utilização dos iniciadores *FCgATH1* e *RCgATH1* mostrados na Tabela 3.2. Posteriormente o fragmento obtido foi clonado no plasmídeo pGRSd (Tabela 3.3) previamente tratado com fosfatase alcalina (AUSUBEL et al., 1995), utilizando a enzima T4 Ligase (Invitrogen), de forma a expressar este gene em linhagens de *S. cerevisiae* (BY4741 e BYath1, vide Tabela 3.1) deletadas ou não no gene *ATH1* (*ath1*Δ), conforme o trabalho de Jules e colaboradores em 2004, ou numa outra cepa *ura3*Δ (CEN.PK 2-1C, vide Tabela 3.1) como receptora do plasmídeo recombinante. Para verificação da inserção e correta identificação dos vetores recombinantes foram utilizadas quatro enzimas de restrição: *BamHI*, *HindIII*, *EcoRV*, e *SacI* (Invitrogen)

Finalmente, após a clonagem da ORF *CAGL0K05137g* no vetor de expressão pGRSd, como descrito acima, essa construção foi encaminhada juntamente com os iniciadores *FCgATH1*, *RCgATH1*, *F2SeqCgATH1*, *R2SeqCgATH1*, *F3SeqCgATH1*, *R3SeqCgATH1*, para o seu seqüenciamento no Centro do Genoma Humano (Universidade de São Paulo) no equipamento ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems).

Tabela 3.2. Oligonucleotídeos utilizados

Iniciador	Seqüência (5' à 3')
<i>FCgATH1</i>	GCAAGTAGGATCCGCGAGGTCTGGAAAGAGAAGTACA
<i>RCgATH1</i>	GCCAAGGATCCGTAATTATGTGTAGATATGAGCTAG
<i>P1</i>	CCTTTGTATGCGGGGGGTGT
<i>P2</i>	AATTAACCCGGGGATCCGTCGACCTGCAGCCTTCTCTTTCCAGACCTC GC
<i>P3</i>	CTGCCGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTACCTTCAAGAATGAAACTG GG
<i>P4</i>	ACGCTCAACTATAGAAAACAATGGC
<i>P5</i>	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCGGCAG
<i>PRODIGE1(F)</i>	AACTCTGTAAATAATAACAAGACAACACTGCAAGTAGCGAGGTCTGGA AAGAGAAGTACA ATGTGCGAAAGCTACATATAAGG
<i>PRODIGE2 (R)</i>	TTACTCTGCCAAGTAATTATGTGTAGATATGAGCTAGATCCCAGTTTC ATTCTTGAAGG TTAGTTTTGCTGGCCGCATC
<i>VUATH1</i>	GATTGCTACAGCATATCTATCC
<i>VIATH1</i>	TGTCATAGATAGTTACCGGT
<i>VScURA3</i>	CAGCAACAGGACTAGGATGAG
<i>F2SeqCgATH1</i>	CCTGGGGCTTTGAATAACGGCTGG
<i>F3SeqCgATH1</i>	CTTCTGATGATAGGATTGCC
<i>R2SeqCgATH1</i>	CCACCTTTATGAGCAATAGTGCCG
<i>R3SeqCgATH1</i>	GCGAATTCATCCGGATCTGT
<i>F1VLFH</i>	ACTCCTTGCAAGCCAAACTAAACTCTACTAACTTTCTGAGTTGGATGA GCCAGCTGAAGCTTCGTACGC
<i>R1VLFH</i>	TGAGTGAGGCAAGACTGACAATGAAATGTTCTTTGCTGGTCTTTGTCCC CGCATAGGCCACTAGTGGATC

^aAs seqüências são complementares às regiões acima, após e entre o gene *CAGL0K05137g* de *C. glabrata* (vide <http://cbi.labri.fr/Genolevures/elt/GAGL>), com exceção das seqüências em negrito que correspondem à seqüência palindrômica clivada por BamH1 para estratégia de clonagem do gene, e as seqüências em negrito e itálico são complementares ao plasmídeo *pAG60*, *pFA6a-kanMX6*, ou *YEp24* (CHRISTIANSON et al., 1992; LONGTINE et al., 1998; GOLDSTEIN; PAN; McCUSKER, 1999;).

Tabela 3.3. Plasmídeos utilizados

Plasmídeos	Característica ou Genótipo	Fonte
pFA6-kanMX6	<i>Amp^r ori PTEF-kan^r-TTEF</i>	M. S. Longtine
pAG60	<i>Amp^r ori PTEF-CaURA3-TTEF</i>	"
pGRSd	<i>CEN6 Amp^r URA3 PGPD-TPGK</i>	J. L. Parrou
pGRSd-CgATH1	<i>CEN6 Amp^r URA3 PGPD-CgATH1-TPGK</i>	Este trabalho
YEp24	<i>2μ Amp^r Tet^r ori URA3</i>	T. W. Christianson

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Deleção da ORF CAGL0K05137g de *C. glabrata*

Através da busca pela sequência gênica da trealase ácida de *C. glabrata* na base de dados GENOLEVURES, onde está anotado o genoma dessa levedura (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/elt/GAGL>), usando como parâmetro de comparação o gene *ATH1* da trealase de *S. cerevisiae*, foi encontrada a ORF CAGL0K05137g como sendo similar no genoma do patógeno oportunista.

Uma vez identificada por ferramentas de bioinformática a possível ORF, partiu-se para a primeira etapa de confirmação da ORF como sendo a correspondente da trealase ácida em *C. glabrata*. Optou-se primeiramente por uma estratégia de deleção baseada na técnica de recombinação homóloga com regiões flanqueadoras longas, chamada de LFH (do inglês Long Flanking Homology), conforme esquematizado na Figura 4.1 (PERSON & HERNANDO & SCHWEIZER, 1998; CORMACK & FALKOW, 1999). Primeiramente, através de amplificação por PCR foram obtidos fragmentos das regiões “upstream” (F1) e “downstream” (F2) do gene postulado para a trealase ácida em *C. glabrata* (ORF CAGL0K05137g) utilizando os iniciadores P1-P2 e P3-P4, respectivamente. Como DNA molde foi utilizado o DNA genômico da cepa Bg14 de *C. glabrata*, produzindo fragmentos F1 de aproximadamente 445 bp e F2 de 545 bp (Figura 4.2-A). Após purificação, os fragmentos F1 e F2 foram utilizados em um segundo PCR utilizando agora como DNA molde o plasmídeo *pFA6a-kanMX6* ou *pAG60*. Isso se torna possível, pois os iniciadores P2 e P3 possuíam em suas extremidades regiões de homologia aos plasmídeos em questão (Tabela 3.2) fazendo com que F1 e F2 também possuam essas regiões de homologia às regiões adjacentes ao gene marcador do plasmídeo, *kanR* (*pFA6a-kanMX6*) ou *CaURA3* (*pAG60*). No segundo PCR são adicionados os iniciadores externos P1-P4 para amplificação do módulo [F1-*kanR*-F2] ou [F1-*CaURA3*-F2]. O tamanho do módulo esperado era de 2455 bp ou 2570 bp, dependendo do marcador. Este fragmento serviria para transformar células competentes de *C. glabrata*, permitindo a deleção do gene postulado como sendo o *ATH1* pela sua substituição com o gene *kanR* ou *CaURA3* em meios seletivos adequados.

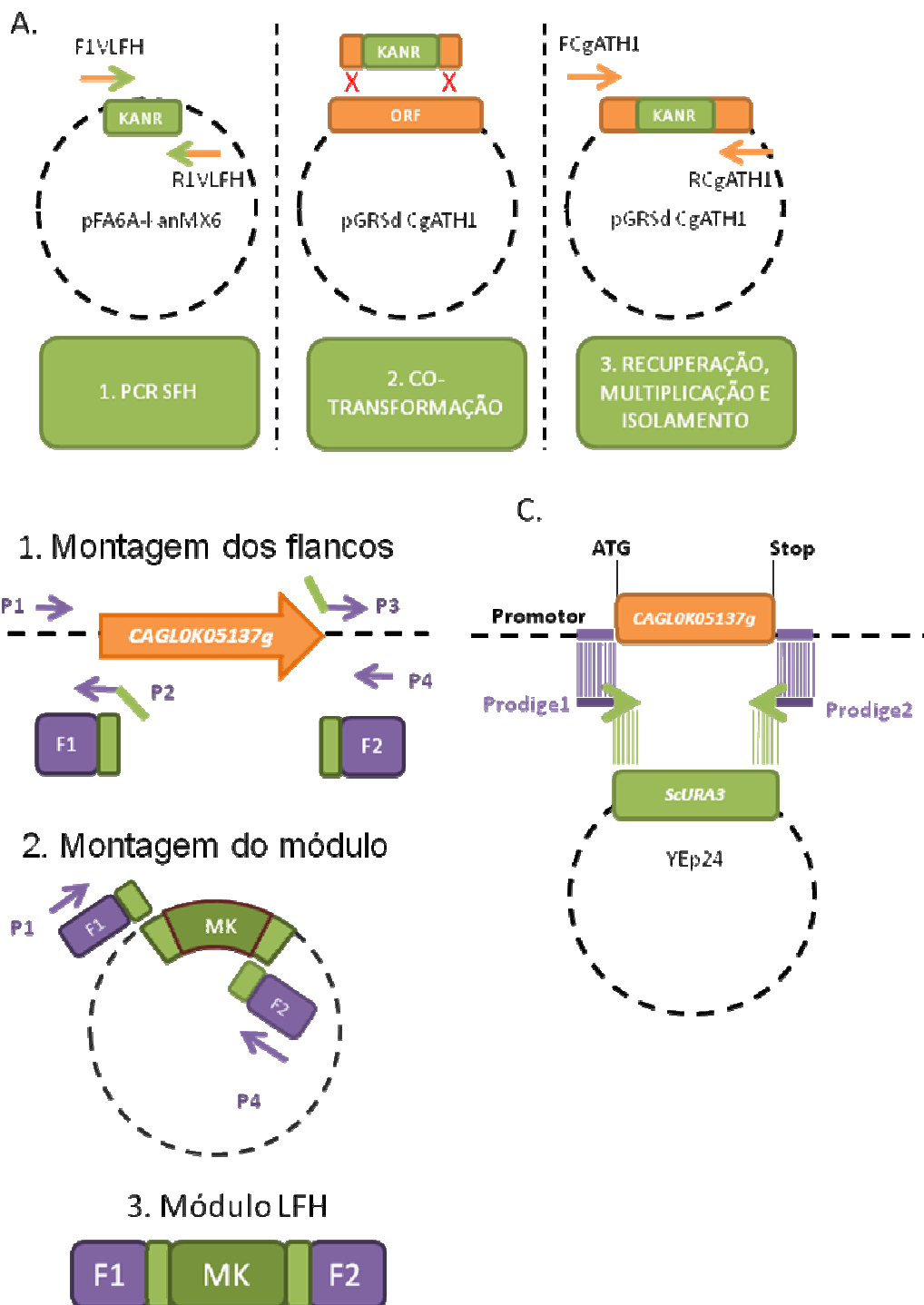


Figura 4.1. Esquemas resumidos de três estratégias utilizadas para deleção da ORF *CAGL0K05137g*. **A** – Resumo passo a passo da VLFH. **B** – Estratégia de LFH mostrando os passos necessários para a confecção do módulo. **C** – Esquema da SFH modificada batizada de PRODIGE. *P1*, *P2*, *P3*, *P4*, *F1VLFH*, *R1VLFH*, *FCgATH1*, *RCgATH1*, *PRODIGE1*, *PRODIGE2* – iniciadores (vide Tabela 3.2). MK – gene marcador. F1 e F2 – flancos de homologia. ORF – *CAGL0K05137g*. ATG – códon de iniciação. Stop – códon de parada.

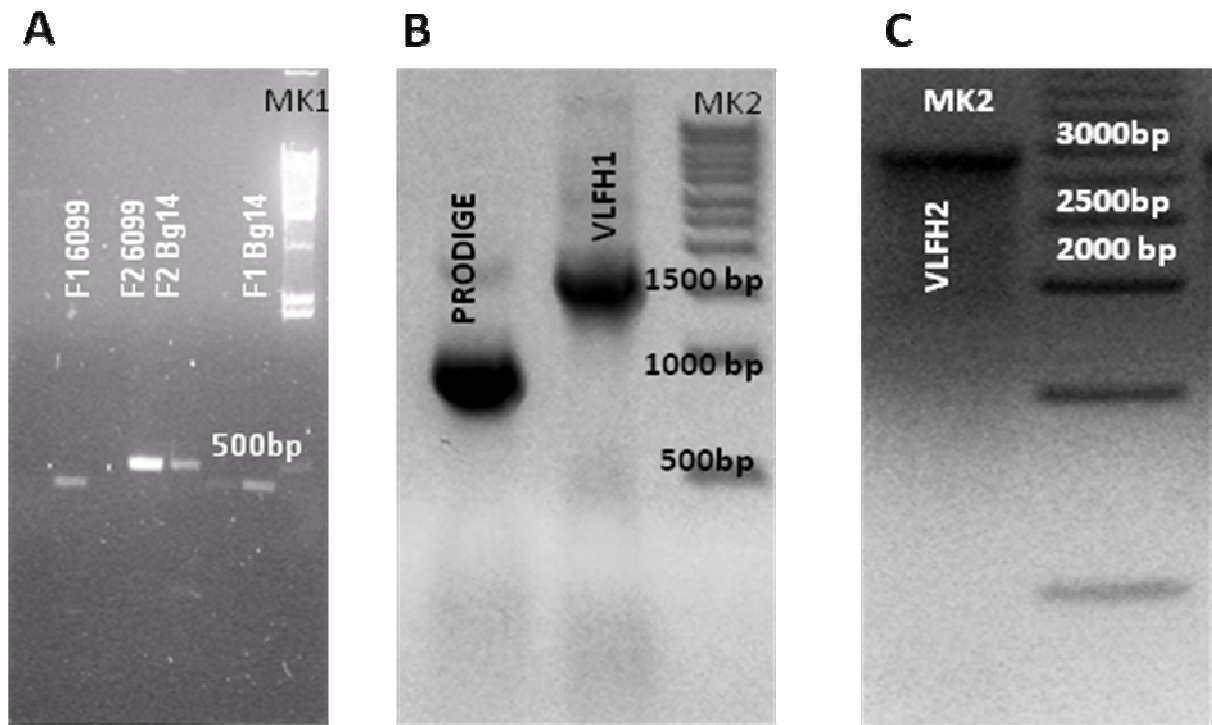


Figura 4.2. Construções de diferentes estratégias para a deleção da ORF *CAGL0K05137g*. Géis de agarose 1% mostrando módulos utilizados conforme cada método de deleção, como os flancos da estratégia LFH de 445 e 545 bp aproximadamente de duas cepas de *C. glabrata* (A), módulo PRODIGE de 924 bp e módulo VLFH1 (B), necessário a primeira etapa da construção do cassete com regiões de homologia maiores de 2615 bp, e VLFH2 (C). MK1 - Marcador de peso molecular λ -HindIII/EcoRI. MK2 – Marcador de peso molecular 1 Kb ladder da Sigma.

Essa técnica foi a primeira a ser testada, pois, embora mais laboriosa, envolvendo vários ciclos de purificações de fragmentos e reações de PCR, a manipulação gênica de leveduras como *C. glabrata* utilizando os métodos convencionais de recombinação homóloga por regiões flanqueadoras curtas (SFH, do inglês Short Flanking Homology) desenvolvida para *S. cerevisiae* (PETRACEK & LONGTINE, 2002; BATISTA, 2004), possui eficiências baixíssimas nessa levedura. Isso pode ser explicado pela alta taxa de recombinação não homóloga em *C. glabrata*, sendo que, por exemplo, para regiões flanqueadoras com 50 bp de homologia, a taxa de transformantes positivos corretos para essa levedura é menor ou igual a 2% (CORMACK & FALKOW, 1999).

Contudo, a estratégia LFH apresentou-se falha na última etapa de montagem do módulo de deleção, por razões ainda desconhecidas. Tentou-se circundar o problema incluindo mais uma etapa na construção do módulo, através da adição de mais um ciclo de PCR com um novo iniciador (*P5*, vide Tabela 3.2). Entretanto, novamente a estratégia mostrou-se infrutífera no estágio final de montagem do módulo de deleção (dados não mostrados).

Para que a deleção da *ORF CAGL0K05137g* fosse possível, outras estratégias foram elaboradas. Na literatura algumas delas eram descritas como específicas para *C. glabrata*, como por exemplo, a utilização como marca de seleção, genes que conferissem resistência a certos antibióticos, como a Zeocina, a qual *C. glabrata* apresenta notável sensibilidade (ALDERTON et al., 2006). Uma outra metodologia muito semelhante a primeira tentativa de recombinação do marcador com regiões de homologia longas, utiliza como fonte da marca de seleção um próprio gene de *C. glabrata*. No caso em questão, o gene *HIS3* é isolado por PCR e depois unido aos outros dois fragmentos flanqueadores. Essa técnica obteve de 11 a 30% de eficiência na transformação, números considerados bons quando comparados a técnica de SFH (WILLINS et al., 2002).

Porém técnicas que dependam apenas de reações em cadeia da polimerase para construir módulos de deleção em organismos como *C. glabrata* ainda são pouco utilizadas. Métodos mais trabalhosos ainda são preferidos, usualmente extrapolados de experimentos com *C. albicans*, que utilizam para construção do módulo, ferramentas clássicas de clonagem com o auxílio de enzimas de restrição. Como por exemplo, a construção e utilização de módulos com regiões flanqueadoras pertencentes ao gene de interesse, e que possuem

marcadores, auxotróficos ou de resistência a um determinado antibiótico, flanqueados por regiões bacterianas reconhecidas por recombinases, os quais podem ser reciclados para utilização em outras reações de deleção. Porém, para cada flanco correspondente ao gene de interesse, são necessárias reações de digestão, ligação e clonagem do plasmídeo que possua o marcador cercado por sítio recombinase-específicos (ALANI et al., 1987; REUSS et al., 2004).

Entretanto, essas técnicas clássicas nem sempre podem ser utilizadas já que, às vezes, não é tão simples encontrar sítios de restrição adequados. Uma proposta alternativa para circunvir esse problema consiste na construção de um cassete de deleção com regiões flanqueadoras ainda maiores que a da estratégia anterior, a qual foi batizada de VLFH (do inglês Very Long Flanking Homology) (ZARAGOZA, 2003). Essa técnica também parte do pressuposto da confecção de um gene marcador flanqueado por regiões de homologia longas, com algumas diferenças em relação à LFH, vide esquema simplificado na Figura 4.1. Primeiramente, o número de ciclos de PCR é menor, passando de 3 a 4 reações para apenas 1. Isso em tese diminuiria a chance de insucessos e tempo para padronização das reações em cadeia da polimerase. E em segundo lugar, as regiões de homologia seriam sabidamente maiores, o que poderia aumentar a chance de obter transformantes positivos.

Resumidamente, a técnica consiste, em primeiro lugar, em obter a ORF de interesse subclonada em um plasmídeo qualquer. Tendo concluído essa etapa, necessita-se fabricar um primeiro cassete de deleção com regiões flanqueadoras curtas (SFH), através de iniciadores específicos (*F1VLFH* e *R1VLFH*, vide Tabela 3.2), com regiões homólogas a ORF *CAGL0K05137g* e ao marcador *kanR* do plasmídeo *pFA6a-kanMX6* (Tabela 3.3) com um tamanho aproximado de 1645 bp.(Figura 4.2-B). Esta construção é então co-transformada em *S. cerevisiae* (sem genes de resistência a antibióticos) com o plasmídeo contendo a ORF desejada, sendo que a recombinação e construção do módulo com regiões flanqueadora mais curtas ocorrem *in vivo* em *S. cerevisiae* com boa eficiência. Esse novo plasmídeo é selecionado dentre os transformantes através de um repique para um novo meio de seleção contendo geneticina (200 µg/ml) sendo posteriormente recuperado (ROBZYK & KASSIR, 1992) e multiplicado. O módulo de deleção nesta técnica VLFH pode ser finalmente obtido por uma reação de PCR utilizando-se dos iniciadores necessários (*FCgATH1* e *RCgATH1*, vide

Tabela 3.2) para amplificar a ORF no plasmídeo e usado para transformar *C. glabrata* (seção 4.2), gerando um módulo com 2615 bp, e com 405 e 755 bp de regiões flanqueadoras (Figura 4.2-C).

Após a transformação e para a verificação do fenótipo dos mutantes, foi realizado um teste rápido de repique das colônias obtidas depois da transformação em placa com crescimento ou não, respectivamente, em meio rico com glicose contendo geneticina e em meio mínimo completo com trealose, sendo que foram testadas mais de cem colônias/transformantes. Contudo, essa técnica mostrou-se também falha, justamente na etapa de transformação. O problema provavelmente residia na escolha do gene marcador que confere resistência a kanamicina, *kanR*. Como *C. glabrata* é considerado um patógeno oportunista seria de se esperar que essa levedura apresentaria uma resistência inata ao antibiótico usado no meio seletivo. De fato, a maioria das cepas de *C. glabrata* em nossa coleção exibia tolerância a altas concentrações de geneticina (>500 µg/ml), não podendo ser utilizadas nessa estratégia. Porém, uma cepa denominada Bg2 (parental da Bg14, vide Tabela 3.1) (FIDEL et al., 1996) é descrita como sendo muito susceptível a geneticina (50 µg/ml), o que a tornava um ótimo candidato para se testar a deleção a partir do módulo de VLFH. Só que outro problema em usar um antibiótico como a geneticina, fungicida no caso de *S. cerevisiae*, é que o mesmo não se aplica a *C. glabrata*, com efeito meramente fungistático, o que ocasionava várias vezes a visualização de falsos positivos, devido a degradação natural do antibiótico na placa de seleção, formando colônias ao final dos 3 dias de incubação necessárias.

Finalmente, a última estratégia de deleção da *ORF CAGL0K05137g* de *C. glabrata*, foi uma variação da técnica de recombinação homóloga com regiões flanqueadoras curtas, chamada de PRODIGE (do inglês Promoter dependent disruption of genes), mostrada acima na Figura 4.1 (EDLIND et al., 2005; VERMITSKY et al., 2006). Resumidamente, a modificação estaria na subordinação do marcador de seleção à própria região promotora do gene de interesse. Conhecendo-se os elementos pelos quais o gene tem sua transcrição ativada, ou aumentada, pode-se então aumentar a chance de sucesso na deleção do mesmo, no momento da seleção dos transformantes. Para tanto, foram utilizados na construção do módulo de deleção os iniciadores *PRODIGE1* (F) e *PRODIGE2* (R) (Tabela 3.2), com regiões de homologia tanto para a ORF de

interesse *CAGL0K05137g* e para o plasmídeo *YEp24*, com o marcador de seleção *URA3* de *S. cerevisiae*, gerando um cassete de deleção com o tamanho de 924 bp (Figura 4.2-B).

Essa simples modificação segundo a literatura aumentaria drasticamente a eficiência da transformação. Contudo, tratava-se de uma ORF ainda não caracterizada, assim como sua região promotora e condições de transcrição e ativação da mesma, com todas as informações sobre a possível região codificante para a trealase ácida, sendo extrapoladas ou de dados moleculares e bioquímicos de revisões de sua enzima homóloga em *S. cerevisiae*, ou de dados bioquímicos prévios realizados por nosso grupo (PARROU et al., 2005; ZILLI, 2006). Através dessas informações e uma cepa de *C. glabrata* auxotrófica para uracila (Bg14) chegamos às condições ideais para a realização dessa estratégia, que além de desafiar as leveduras com sua auxotrofia, escolhemos o glicerol como fonte de carbono, por ser um meio não repressor, ou até mesmo ativador da transcrição do possível gene da trealase ácida dessa levedura.

Novamente foi realizado um teste rápido de repique em placas para verificar o fenótipo desejado dos mutantes, em meio mínimo com trealose sem uracila. Foram obtidas em um único experimento, mais ou menos 20 colônias, das quais 2 não voltaram a crescer em placa. Esse teste foi repetido mais duas vezes (dados não mostrados), e o fenótipo obtido anteriormente confirmado. Assim, a seguir passamos a confirmar ou não a deleção da ORF *CAGL0K05137g* do genoma da levedura pela reação em cadeia da polimerase (Figura 4.3).

Para a confirmação via PCR foram utilizados três iniciadores, sendo pareados dois a dois, um fora da região substituída de interesse, *VUATH1* (F), e dois pareando ou com a ORF de interesse, *VIATH1* (R), ou dentro do gene marcador, *VScURA3* (R) (Tabela 3.2). O casamento *VUATH1* + *VIATH1*, formando um fragmento de 1553 bp, confirmaria a manutenção da ORF postulada como sendo a trealase ácida no genoma de *C. glabrata*. Já o outro pareamento possível *VUATH1* + *VScURA3*, gerando um fragmento de 500 bp aproximadamente, confirmaria a deleção da ORF através da substituição completa pelo marcador *ScURA3* (Figura 4.3-B).

Os dois mutantes previamente triados como possíveis candidatos de possuir o gene da trealase ácida deletado do genoma foram confirmados através da visualização dos produtos de PCR em um gel de agarose, usando os

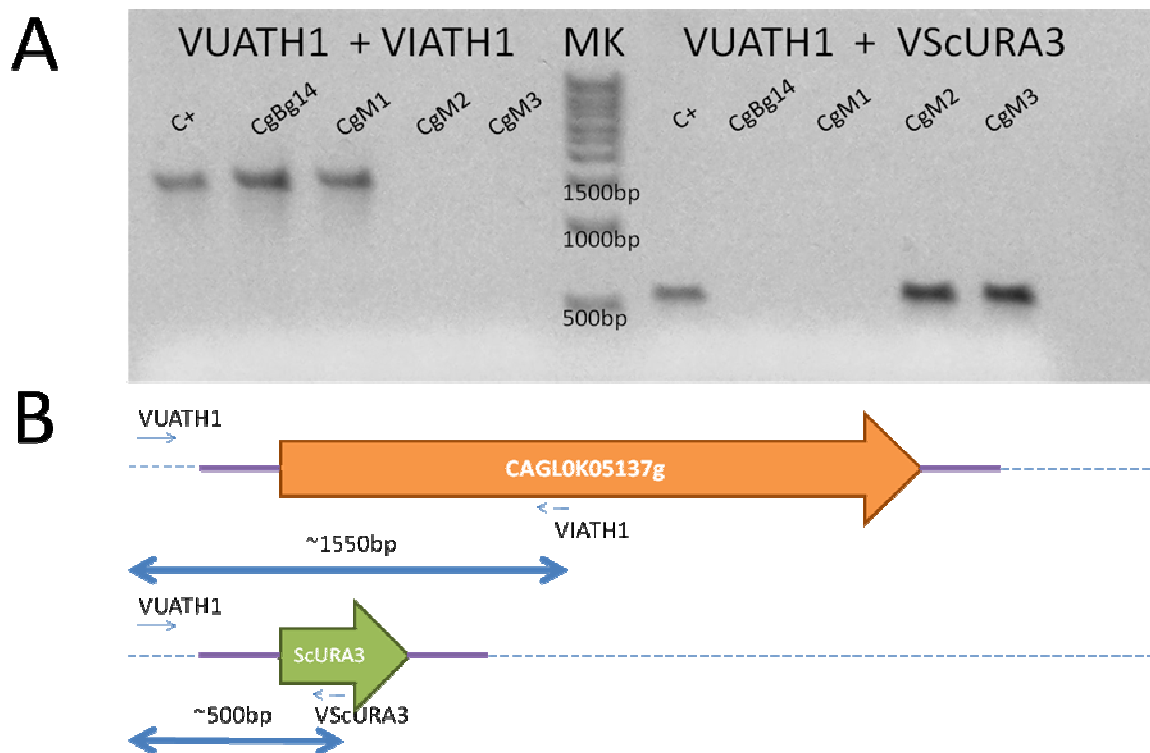


Figura 4.3. Confirmação da deleção da ORF *CAGL0K05137g*. **A** – Gel de agarose 1% mostrando a confirmação da deleção nos mutantes CgM1 e CgM2 da ORF *CAGL0K05137g* através do casamento dos primers VUATH1, VIATH1 e VScURA3 para a verificação da deleção. C+ - controle positivo da reação; CgBg14 - controle da reação de PCR da cepa parental; CgM1, CgM2, CgM3 - mutantes obtidos pela estratégia de deleção. MK – Marcador de 1 kb ladder da Sigma. **B** – Esquema demonstrando os tamanhos de banda esperados para cada pareamento dos primers, para confirmar ou não a deleção do da ORF *CAGL0K05137g*.

iniciadores discutidos acima (Figura 4.3). A esses mutantes foram dados os nomes provisórios de RY01 (mutante CgM2 mostrado na Figura 4.3) e RY02 (mutante CgM3 mostrado na Figura 4.3), sendo que o primeiro deles foi escolhido aleatoriamente para os posteriores experimentos e testes bioquímicos descritos a seguir.

Depois da confirmação por duas metodologias diferentes (crescimento em placas e PCR), decidiu-se por quantificar a atividade trealase ácida do mutante RY01 como descrito em Material e Métodos, usando como controle a cepa parental Bg14. Escolheu-se três meios ricos YP contendo glicose, trealose ou glicerol em sua composição, e os resultados para esse experimento estão mostrados na Tabela 4.1. A incubação das cepas com os respectivos meios durou trinta e seis horas, tempo mais que suficiente para consumir as fontes de carbono glicose e trealose, e obter níveis de atividade que facilitariam a quantificação enzimática. Como é possível notar, a atividade da trealase ácida do mutante é praticamente zero, especialmente quando comparados com os resultados obtidos com a cepa parental (ZILLI, 2006).. Com esse experimento tem-se mais uma prova sobre a identidade da ORF *CAGL0K05137g* como realmente sendo a sequência gênica que codifica para a trealase ácida periplasmática de *C. glabrata*.

Nessa tabela podem ainda ser feitas algumas considerações sobre as altas atividades enzimáticas encontradas na cepa parental. Esses resultados vão ao encontro dos dados que nosso grupo já obteve no passado, com uma menor atividade em células íntegras (trealase periplasmática) em relação ao sobrenadante livre de células, portanto à trealase ácida secretada no meio (ZILLI, 2006). Entre os ensaios também pode-se observar a diferença especialmente nos meios contendo glicose versus os meios com trealose e glicerol. Isso é explicado pelo efeito da repressão catabólica que a glicose exerce sobre a utilização de outras fontes de carbono (GANCEDO, 1998; CARLSON, 1999; ROLLAND et al., 2002; YIN et al, 2003). Em *S. cerevisiae*, uma das três vias principais pelas quais a repressão catabólica pela glicose acontece, depende de um complexo repressor constituído, entre outras proteínas, da *Mig1p*. Quando na presença da hexose, esse complexo é responsável por inibir vias como a utilização de fontes de carbono alternativas, e respiração, por exemplo. Em contrapartida, outro complexo, formado por algumas proteínas incluindo uma quinase denominada *Snf1p*, atua acima do complexo *MIG1* inibindo-o por fosforilação, em baixas

Tabela 4.1. Atividade trealase ácida em linhagens de *C. glabrata*

Cepas	Meios	Ativ. Preiplasmática^a (mU/mg célula)	Ativ. Sobrenadante^a (mU/mL)
CgBg14	YPD 2%	65	69
	YPT 2%	47	504
	YPG 3%	78	622
CgRY01	YPD 2%	0,3	0,2
	YPT 2%	0	0
	YPG 3%	0,3	0

^aAtividade da trealase ácida foi medida após 36 horas de incubação em cada meio.

concentrações de glicose no meio (GELADE et al., 2003; SCHNEPER et al., 2004; ZAMAN et al., 2008).

Em 1996, Petter & Kwon-Chung demonstraram que as vias de regulação do metabolismo de trealose de *C. glabrata*, são em parte semelhantes aos de *S. cerevisiae*. De fato, a regulação através de *SNF1* aparentemente ocorre em *C. glabrata*, pois segundo esses autores, foi identificado um gene homólogo desse regulador, *CgSNF1*, e demonstrado, entre outras coisas, que ao deletar esse gene específico, as leveduras não conseguiam mais utilizar trealose como fonte de carbono.

Como uma forma de confirmar a identidade da ORF, foi realizado um crescimento em micro escala com a cepa mutante para a trealase ácida (RY01) e sua parental (Bg14), como descrito em Material em Métodos. Foram utilizadas seis condições diferentes, entre dois tipos de meios: mínimos sem uracila em sua composição, e meios ricos YP, ambos com três fontes de carbono diferentes: glicose, trealose e glicerol. Para contornar o problema da auxotrofia com a uracila da cepa parental Bg14, utilizamos um plasmídeo que contivesse o gene *URA3* (pGRSd), fazendo com que assim o crescimento em meio mínimo da levedura fosse possível e servir de comparação.

Os resultados desse experimento estão mostrados na Figura 4.4 e 4.5. Pode-se observar que a cinética de crescimento de ambas as cepas para os dois tipos de meio contendo glicose na sua composição foram praticamente os mesmos, mostrando que quaisquer diferenças ali encontradas não seriam provenientes de concentração de células inoculadas, nem de diferenças no genótipo. As curvas de crescimento em trealose, tanto em meios rico quanto no meio mínimo, mostraram claramente a inabilidade da cepa mutante em crescer num meio onde a trealose é a única fonte de carbono (Fig. 4.4 e 4.5).

Os resultados correspondentes às curvas de crescimento em glicerol em meio rico apresentaram problemas, de maneira que as densidades ópticas eram muito baixas, provavelmente por que nas condições de cultivo em micro escala são impostas condições micro-aeróbicas (Fig. 4.4). De qualquer forma, o mutante RY01 sempre cresceu menos em glicerol, quando comparado com a linhagem parental. Esta diferença no fenótipo ficou mais evidente no meio mínimo sem uracila com a mesma fonte de carbono, onde o crescimento apresentou-se normal para a cepa parental, porém na cepa mutante o crescimento em glicerol é

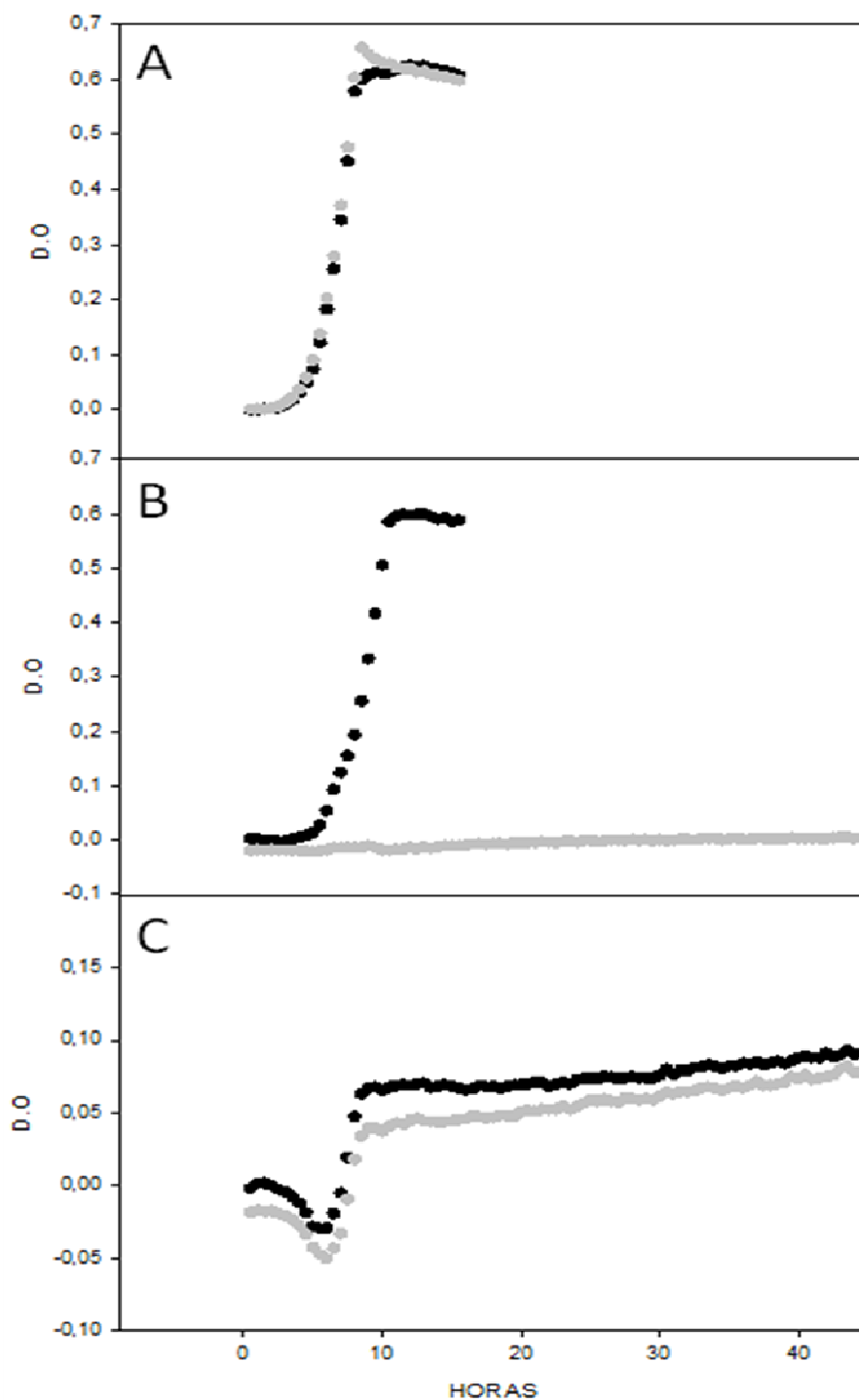


Figura 4.4. Crescimento em micro escala de *C. glabrata* em meio rico YP contendo diferentes fontes de carbono. Crescimento em meio rico YP contendo 2% glicose.(A), 2% trealose (B) ou 3% glicerol (C) de *C. glabrata*, linhagem parental Bg14 (●), e seu isogênico mutante *ath1Δ* RY01 (●).

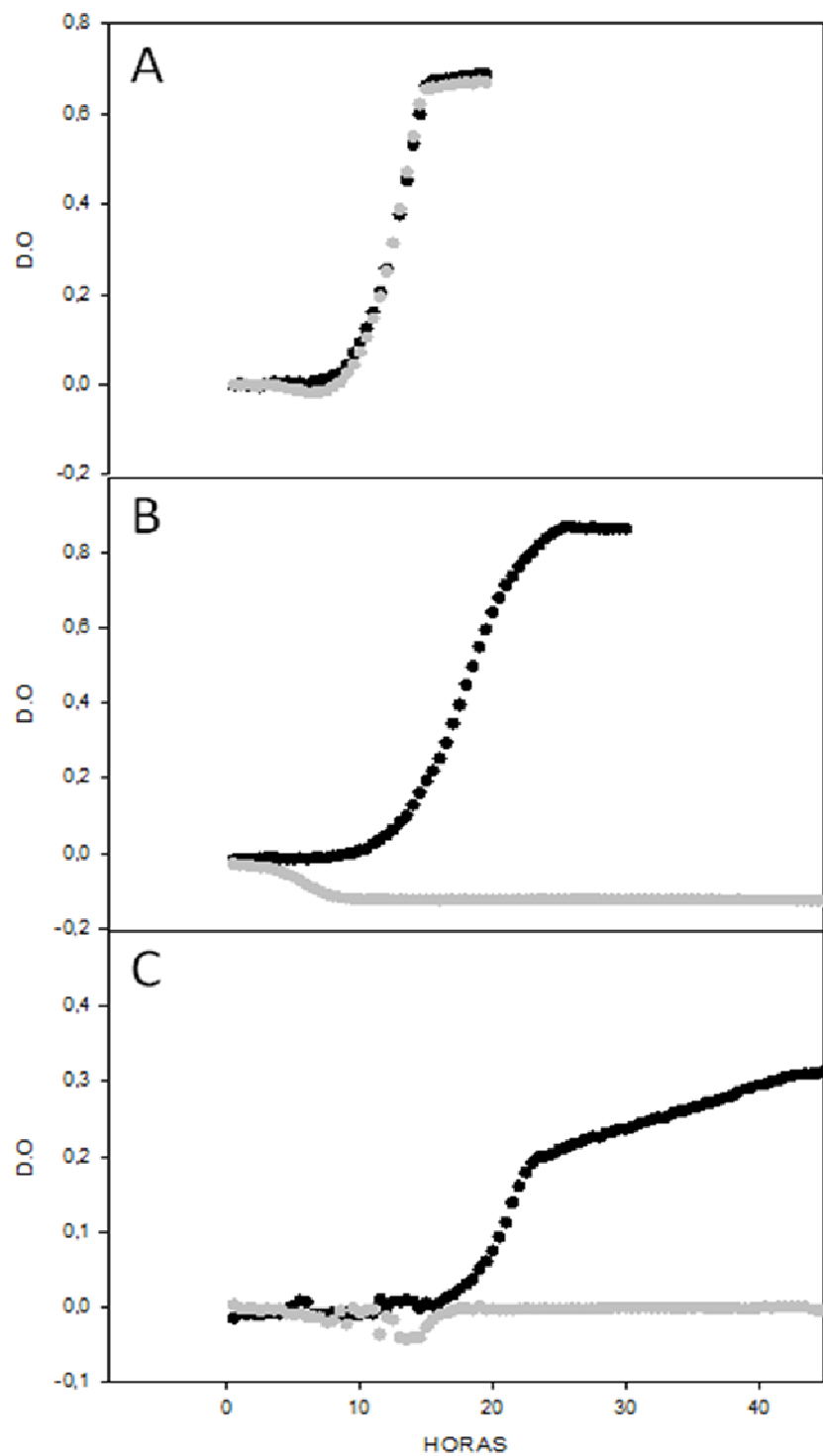


Figura 4.5. Crescimento em micro escala de *C. glabrata* em meio mínimo contendo diferentes fontes de carbono. Crescimento em meio mínimo contendo 2% glicose.(A), 2% trealose (B) ou 3% glicerol (C) de *C. glabrata*, linhagem parental Bg14 (●), e seu isogênico mutante *ath1Δ* RY01 (●).

inexistente (Fig. 4.5). Esse dado é muito interessante, pois corrobora parcialmente os dados de Nwaka e colaboradores, que em 1995, demonstraram que cepas de *S. cerevisiae ath1Δ* são incapazes de crescer quando repicadas de meios com glicose para meios contendo glicerol na sua composição. Uma hipótese para o fenótipo observado estaria na característica do glicerol ser uma fonte pobre de carbono, o que levaria a célula a precisar de outros estoques energéticos, como a trealose intracelular, para o seu crescimento (NWAKA *et al.*, 1996).

Entretanto, esse fato torna-se ainda mais estranho, pois conforme descrito anteriormente, o meio escolhido para a seleção dos transformantes pela estratégia PRODIGE, foi exatamente o mesmo meio contendo glicerol. Portanto, para chegar a quaisquer conclusões sobre a inabilidade da cepa em crescer em fontes de carbono respiráveis, mais estudos terão que ser feitos. De qualquer forma, ocorre um outro problema nesse pensamento, pois existe ainda, conforme comentado anteriormente, a presença de uma trealase citosólica em leveduras, e segundo a visão clássica, é esta trealase neutra a enzima responsável pela mobilização da trealose intracelular (THEVELEIN, 1984; KOPP *et al.*, 1993). Porém, não existem dados sobre essa proteína na levedura em estudo, e o único fato que se pode apurar é a presença de uma ORF (*CAGL0M10439g*) no banco de dados GENOLEVURES, com homologia de 79% quando comparado ao gene *NTH1* de *S. cerevisiae*.

Tendo comprovado que a ORF *CAGL0K05137g*, através de diversos experimentos, codifica para a trealase ácida de *C. glabrata*, partiu-se para um melhor entendimento da função que essa enzima exerce na levedura, além da óbvia necessidade da mesma para utilização da trealose extracelular como fonte de carbono. Buscou-se tentar relacionar a presença ou ausência da trealase ácida com situações estressantes, já que a trealose está diretamente relacionada com os mais variados estresses (GONAZALEZ-PARRAGA *et al.*, 2007; CAO *et al.*, 2008; KAINO & TAKAGI, 2008; NERY *et al.*, 2008; GARRE *et al.*, 2009; MAHMUD *et al.*, 2009;). A razão por buscar uma relação entre trealase e condições estressantes é a recente descrição da importância da *Ath1p*, em *S. cerevisiae*, tanto durante um estresse osmótico (salino) quanto para a recuperação após o mesmo (GARRE & MATALLANA, 2009; GARRE *et al.*, 2009).

Foi então elaborado um experimento relativamente simples conforme descrito em Materiais e Métodos para tentar comprovar se a trealase ácida de *C.*

glabrata também poderia estar envolvida num mecanismo de resposta a esse estresse salino. Porém, o experimento diferia dos descritos na literatura, que consistiam em desafiar as leveduras por um tempo determinado a uma concentração de sal definida, com seus respectivos controles. Após esse tempo as células eram então plaqueadas em diluições seriadas em meio sem sal, para verificar o crescimento e recuperação das diferentes linhagens de levedura. Nossa estratégia consistiu em um ensaio mais direto, no qual as células eram pré-crescidas em meio rico com glicose por 48 horas, e posteriormente inoculadas nos meios controle, e em diferentes concentrações de sal, presentes desde o começo do crescimento até o seu final.

Os resultados desse experimento estão apresentados na Figura 4.6. Primeiramente pode-se observar que os controles em YP-2% glicose sem adição de sal tanto da cepa parental como a da cepa mutante possuem curvas de crescimento semelhantes ao longo das 200 horas de incubação. Segundo, conforme a concentração de sal no meio (1,0 M - 2,5 M) aumenta, a cepa de *C. glabrata* parental cresceu em todas as concentrações, embora com fases de adaptação mais longas e densidades ópticas (D.O) máximas menores, como já demonstrado também para *S. cerevisiae* (TRAINOTTI & STAMBUK, 2001). Por outro lado, a cepa que possuía a ORF deletada (*ath1Δ*, linhagem RY01) foi incapaz de crescer na presença do estresse salino (Figura 4.6). A variação observada na fase de adaptação e D.O máxima estão diretamente relacionadas com a concentração de sal no meio, ou seja, quanto mais hipertônico fica o meio, mais demorada é a retomada do crescimento. Esse atraso é explicado pela reprogramação de rotas metabólicas e ativação de certas vias, como a da produção do osmólito compatível glicerol, para que a célula recupere o turgor, além do custo metabólico do bombeamento do soluto (Na^+) para fora da célula através de bombas de efluxo ATP-dependentes (BLOMBERG, 2000; ESTRUSCH, 2000; HOHMANN, 2002).

Cabe aqui salientar a resistência de *C. glabrata* frente ao estresse salino, tolerando concentrações de até 2,5M. Como exemplo de comparação, em *S. cerevisiae* concentrações acima de 1 M de NaCl afetam significativamente o crescimento e atividade metabólica. Já *D. hansenii*, conhecida levedura halotolerante, compartilha um padrão semelhante a *C. glabrata* em relação à alta resistência ao estresse salino. Especula-se que patógenos fúngicos,

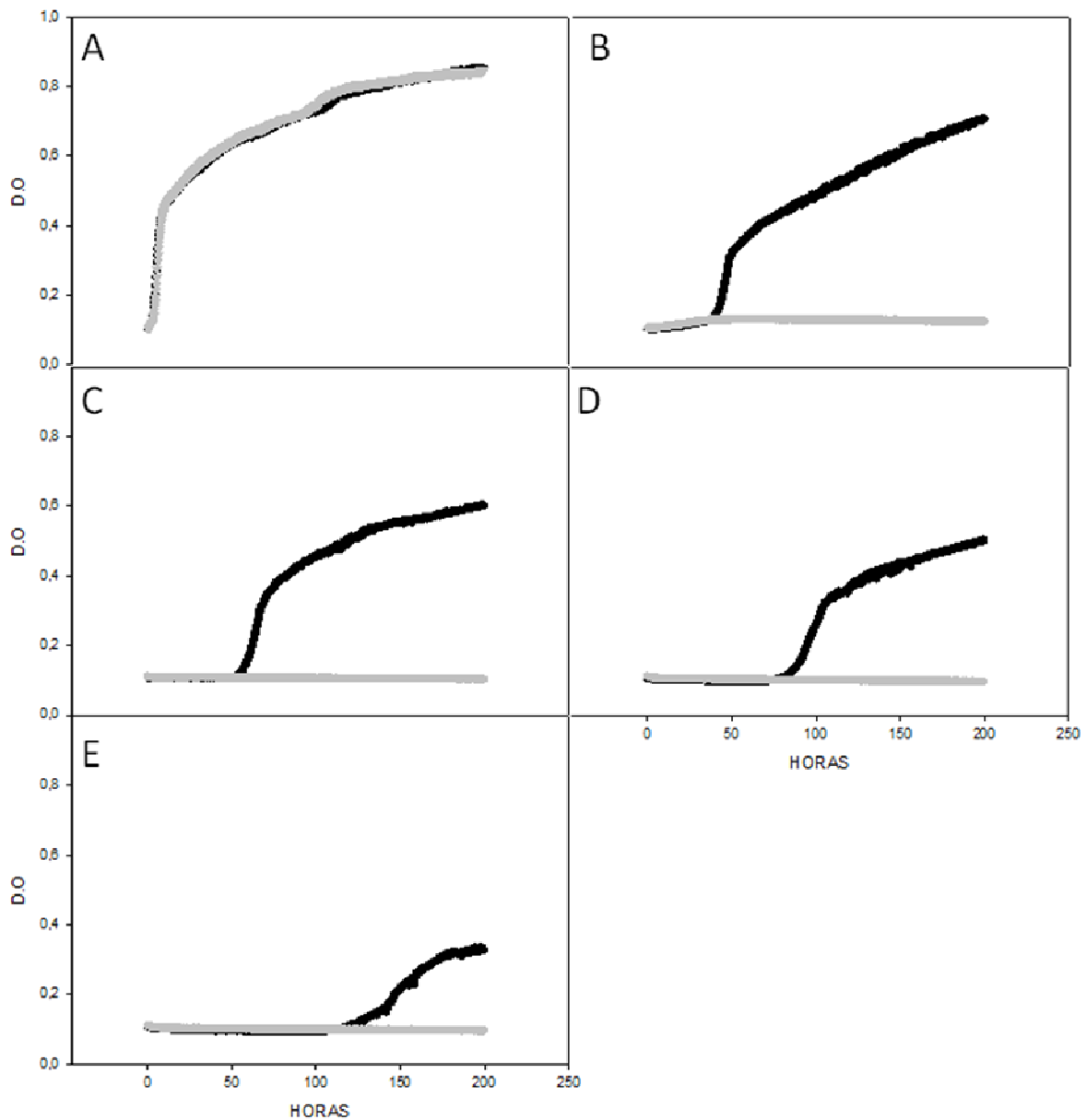


Figura 4.6. Efeito do estresse salino no crescimento de *C. glabrata* em meio rico com 2% glicose. A figura mostra o crescimento da cepa mutante RY01 (*ath1Δ*) (●) e parental Bg14 (●) de *C. glabrata* em meio rico YP com 2% glicose em condições controle (A), ou acrescido de 1,0 (B), 1,5 (C), 2,0 (D), e 2,5 M (E) de NaCl.

especialmente do gênero *Candida*, possuem mecanismos relacionados a estresse melhores adaptados do que em outras leveduras (NIKOLAOU et al., 2009).

Entretanto, a relação entre o tipo de estresse apresentado e a evidente importância da trealase ácida frente a ele ainda não está claro. Hipotetiza-se que as leveduras durante a fase de adaptação e retomada de crescimento, necessitem de energia advinda da mobilização da trealose e outros estoques energéticos celulares. Essa disponibilização do dissacarídeo em cepas *ath1Δ* estaria prejudicada, ou até mesmo inibida, pois é importante lembrar que as células antes de serem inoculadas nos meios contendo sal, foram pré-crescidas em meio rico com glicose por 48 horas (Vide seção 3.2). Após esse período de pré-crescimento, as leveduras encontram-se claramente em fase estacionária, onde é sabido que a trealase predominante é a trealase ácida extracelular (SAN MIGUEL; ARGUELLES, 1994; BASU et al., 2005).

Por outro lado, uma outra razão que é passível de especulação seria o fato da própria trealose ser um metabólito, que em altas concentrações, torna-se detrimental para a célula (SINGER & LINDQUIST, 1998; ELBEIN et al., 2003; OCÓN et al., 2007). Isso ocorre porque durante situações estressantes, como no caso do desbalanço osmótico causado pelo excesso de sal no meio, há uma indução na via anabólica da trealose, com um aumento na transcrição de *TPS1* e consequentemente *TPS2*, o que aumentaria os níveis do carboidrato celular. Mais uma vez então, faz-se necessário a degradação do dissacarídeo, permitindo que as funções celulares ocorram normalmente. Contudo, durante um estresse salino, não só a via anabólica do dissacarídeo é ativada, mas descobriu-se também que em cepas *nth1Δ* de *S. cerevisiae*, houve um acúmulo de trealose quando comparado com a cepa selvagem. Isso mostra que a via de degradação por *Nth1p* em *S. cerevisiae* também é ativada, já que na cepa parental não houve um aumento aparente no acúmulo de trealose (PARROU et al., 1997). Recentemente foi discutido por Garre e colaboradores (2009) a função que a trealase ácida poderia ter na mobilização da trealose intracelular durante condições específicas de estresse osmótico. Seus dados mostraram que, não só a trealase ácida periplasmática participa da degradação da trealose intracelular em *S. cerevisiae*, mas também propuseram um novo meio de regulação transcricional do gene através da via HOG (do inglês High Osmolarity Glycerol).

Portanto, mesmo após todos esses dados, as funções, localização e regulação da trealase ácida ainda não estão muito claras, especialmente em *C. glabrata*. Por exemplo, embora encontramos essa proteína no meio de cultura desta levedura, ainda não é conhecido os mecanismos pelo qual essa secreção ocorre. Sobre a regulação, podemos inferir sobre repressão catabólica pela glicose, onde possuímos dados que corroboram essa hipótese. Claramente demonstramos a importância da trealase ácida durante um estresse osmótico severo, contudo seus mecanismos de atuação ainda são somente especulações.

4.2 Clonagem do gene *CgATH1* no plasmídeo *pGRSd*.

O gene postulado como sendo o da trealase ácida de *C. glabrata* (*CgATH1*) foi isolado por PCR com os iniciadores *FCgATH1* e *RCgATH1*, utilizando-se como molde o DNA genômico das cepas de *C. glabrata* Bg14 e LEMI 6099 (Figura 4.7). Embora o produto de PCR teria um tamanho esperado de 3639 bp, dado foi inferido através do banco de dados do site Genolevures para a ORF CAGL0K05137g, através da visualização dos produtos de PCR no gel de agarose 1% (Figura 4.7) esse tamanho de banda mostrou-se ligeiramente menor, aproximadamente 3400 bp, nas duas cepas utilizadas. O PCR foi repetido outras vezes, e com reações ocorrendo em duplicatas, sendo que o mesmo padrão de banda continuou a ser observado (dados não mostrados). O fato de um tamanho igual de banda aparecer em duas cepas de *C. glabrata* diferentes, de laboratórios diferentes, dá alguma evidência que seja realmente o gene *ATH1*, e provavelmente a seqüência encontrada no genoma descrito da cepa CBS138 (DUJON et al., 2004) apresente um polimorfismo não encontrado nas linhagens Bg14 e LEMI 6099. De qualquer forma, o gene da cepa Bg14 foi escolhido para clonagem, pois foi a partir de seu genoma e graças a sua auxotrofia que as manipulações gênicas de deleção, mostradas acima, puderam ser feitas.

O plasmídeo utilizado como vetor para a clonagem e expressão na levedura *S. cerevisiae* foi o *pGRSd*, com 6,4 Kb e contendo o sítio de restrição BamHI entre o promotor forte (GPD prom) do gene *TDH2* (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), e a região terminadora (PGK term) do gene *PGK1* (3-Fosfoglicerato quinase) de *S. cerevisiae*. Esse sítio de restrição foi introduzido em

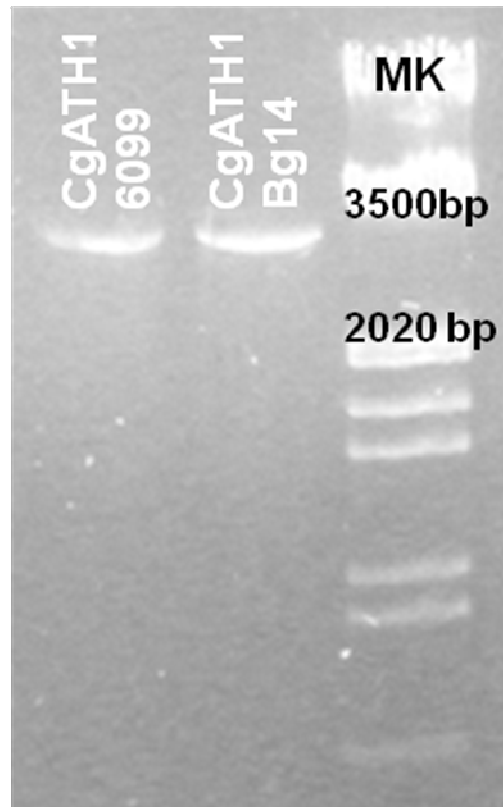


Figura 4.7. Amplificação por PCR da ORF CAGL0K05137g de *C. glabrata*. Gel de agarose 1% mostrando o fragmento de DNA amplificado por PCR correspondente ao gene *CgATH1*, com tamanho de banda de aproximadamente 3400bp, obtido a partir do DNA genômico das linhagens Bg14 e LEMI6099. MK – Marcador de peso molecular λ -HindIII/EcoRI.

ambos iniciadores (*FCgATH1* e *RCgATH1*, vide Tabela 3.2) utilizados no PCR. Desta forma, foi utilizado um protocolo padrão para clonagem do inserto no plasmídeo (ambos digeridos com BamH1) pela incubação com T4 DNA ligase. Em seguida, os plasmídeos recombinantes foram inseridos em *Escherichia coli* competentes (cepa DH5 α), as células postas para crescer e selecionados em placas com 100 μ g/ml de ampicilina, obtendo-se diversas colônias com possíveis plasmídeos recombinantes. As colônias foram retiradas das placas e crescidas em meio LB líquido (contendo ampicilina) para posterior isolamento dos plasmídeos.

Porém, depois de selecionadas várias colônias de bactérias, verificou-se por digestão com BamHI, que a ligação vetor-inserto havia sido ineficaz, e de 30 colônias transformadas, nenhuma apresentava o plasmídeo com o gene inserido nele (dados não mostrados). O problema foi logo identificado, pois ao se usar o mesmo sítio de restrição tanto no inserto como no plasmídeo, há uma diminuição drástica de eficiência do pareamento e ligação vetor-inserto, já que, preferencialmente as extremidades adesivas do plasmídeo voltariam a se parear rapidamente.

Para contornar esta situação, foi utilizada a estratégia de clonagem utilizando-se a fosfatase alcalina. As fosfatases em geral atuam retirando grupos fosfato de biomoléculas. Isso se tornou extremamente oportuno, pois para que a ligação das fitas digeridas (formação de ligações fosfo-diéster) no plasmídeo ocorra (catalisada pela DNA ligase T4), são necessárias extremidades fosfato (PO_4^{3-}) livre. Uma vez incubados com essa fosfatase, os plasmídeos digeridos ficam sem seus grupos fosfatos livres para posterior ligação, enquanto que o inserto, também hidrolisado com BamHI, permanece com sua extremidade 3' fosfatada. Assim, quando a incubação da T4 ligase mais plasmídeo e inserto ocorrer, há uma maior chance de que o inserto se ligue ao vetor de clonagem.

Entretanto, ainda existe outro problema a ser resolvido, é necessário ser feito um “screening” dos plasmídeos recombinantes, já que duas formas de entrada do inserto eram possíveis pelo uso de um único sítio de restrição: a forma invertida (PGKterm-CgATH1-GDProm) e a correta (GDProm-CgATH1-PGKterm). Para solucionar isso, foi pesquisado no mapa de restrição da ORF e do plasmídeo pGRSd (Figura 4.8-A), uma enzima capaz de gerar fragmentos de tamanhos diferentes para cada uma das duas formas de inserção. A enzima

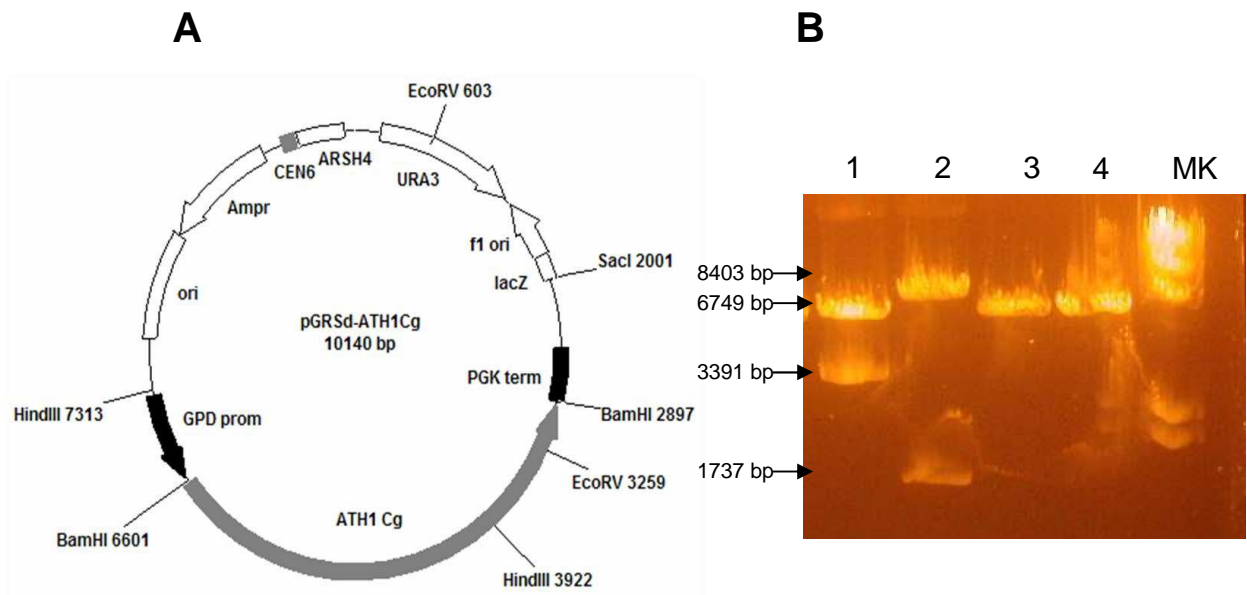


Figura 4.8. Mapa de restrição do plasmídeo pGRSd-*CgATH1*, e perfil de digestão dos plasmídeos obtidos com HindIII. **A**-Mapa do plasmídeo recombinante pGRsSd-*CgATH1* com seus componentes e sítios de restrição utilizados no trabalho. **B**-Gel de agarose 1% mostrando o perfil de digestão obtidos com HindIII dos diferentes plasmídeos: linha 1 mostra o gene *CgATH1* inserido de forma correta; linha 2 o gene *CgATH1* inserido de forma invertida; linhas 3 e 4 o plasmídeo sem inserto; MK – Marcador de peso molecular λ -HindIII/EcoRI.

utilizada foi a HindIII, que geraria fragmentos de 6749 bp e 3391 bp quando o inserto contendo *CgATH1* entra de maneira correta, e 8403 bp e 1737 bp se o inserto se liga ao plasmídeo de maneira invertida (Figura 4.8-B). Os plasmídeos considerados com o fragmento inserido de maneira correta foram a seguir tratados com diferentes enzimas de restrição (*BamHI*, *HindIII*, *EcoRV* e *SacI*, vide Figura 4.9) para confirmar o mapa de restrição esperado para o plasmídeo recombinante pGRSd- *CgATH1* (vide também a Figura 4.8-A).

4.3 Expressão heteróloga do gene *CgATH1* em *S. cerevisiae*.

Depois de ter construído o plasmídeo pGRSd-*CgATH1* e confirmada a sua estrutura, o próximo passo foi transformar cepas de *S. cerevisiae* competentes e que fossem auxotróficas para uracila (*ura3Δ*), já que o plasmídeo possui como gene marcador *URA3*, permitindo a seleção das leveduras transformantes em meio mínimo sem uracila. As cepas de leveduras utilizadas para essa transformação foram as linhagens selvagens CEN.PK2-1C e BY4741, e esta última linhagem deletada no gene *ATH1* de *S. cerevisiae* (linhagem *BYath1*, vide JULES et al., 2004, e Tabela 3.1). Inicialmente, os transformantes foram crescidos em meio rico YP-2% glicose por 60 horas, tempo que corresponde à fase estacionária das células neste meio. É nessa fase que a trealase ácida tem sua maior expressão, já que a glicose exerce um papel repressor na expressão desta enzima em *S. cerevisiae* (SAN MIGUEL; ARGUELLES, 1994), *C. albicans* (PEDREÑO et al., 2004) e em *C. utilis* (ROLIM et al., 2003). Nestas condições, verificamos um incremento significativo (~5 vezes) na atividade trealase periplasmática da cepa CEN.PK2-1C transformada com o plasmídeo pGRSd-*CgATH1*, quando comparada com a mesma linhagem transformada com o plasmídeo pGRSd controle (Tabela 4.2).

Cabe salientar que nas cepas BY4741, ou na sua correspondente deletada no gene *ATH1* (*BYath1*), não foram verificadas diferenças na atividade trealase periplasmática entre os transformantes com o plasmídeo pGRSd-*CgATH1* e o plasmídeo controle (Tabela 4.2). Entretanto, e diferentemente do que já foi reportado por JULES et al. (2004), nem a linhagem selvagem com o gene *ATH1*

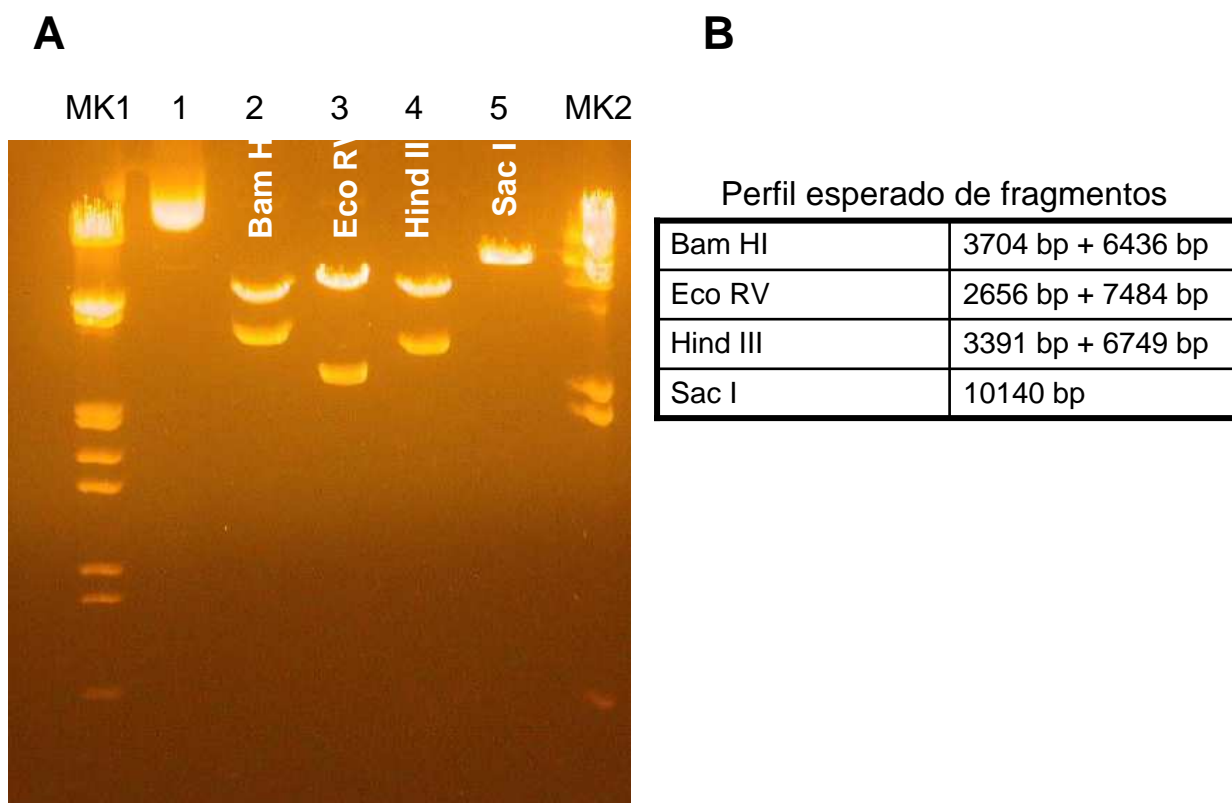


Figura 4.9. Confirmação do mapa de restrição do plasmídeo pGRSd-CgATH1. **A**-Gel de agarose 1% mostrando a digestão do plasmídeo recombinante com 4 enzimas de restrição diferentes: linha 1 - plasmídeo não digerido; linha 2 - BamHI; linha 3 - EcoRV; linha 4 - HindIII; linha 5 - SacI; MK1 – Marcador de peso molecular λ -HindIII/EcoRI; MK2 – Marcador de peso molecular λ -HindIII. **B**-Tabela mostrando o tamanho de bandas esperado para cada tratamento.

Tabela 4.2 Atividade trealase ácida nas linhagens de *S. cerevisiae* transformadas

Cepa	Plasmídeo	Atividade trealase periplasmática (mU [mg células] ⁻¹) após crescimento em: ^a		
		YP-2% gli	SC-2% gli	SC-2% tre
CEN.PK2-1C	pGRSd	2,5	0	0,1
	pGRSd- <i>CgATH1</i>	11,6	11,4	12,7
BY4741	pGRSd	4,6	— ^b	—
	pGRSd- <i>CgATH1</i>	5,0	—	—
BY <i>ath1</i>	pGRSd	0,8	—	—
	pGRSd- <i>CgATH1</i>	1,1	—	—

^aMeio rico YP até a fase estacionária, ou exponencialmente no meio sintético completo sem uracila (SC). ^bNão determinado.

normal (cepa BY4741), e nem a correspondente *BYath1*, transformadas com ambos o plasmídeo controle ou pGRSd-*CgATH1*, foram capazes de crescer em meio sintético (sem uracila) contendo trealose com única fonte de carbono (dados não mostrados). Isto indica que provavelmente estas linhagens tenham alguma mutação que impeça a utilização da trealose, apesar de apresentarem atividade trealase periplasmática, inclusive, de fato menor na *BYath1* (vide Tabela 4.2). Outros estudos seriam requeridos para entender melhor o motivo do aparente insucesso na expressão da trealase ácida de *C. glabrata* nestas linhagens BY4741 e *BYath1*, mas como nem a selvagem BY4741 consegue utilizar trealose, o problema provavelmente não está no plasmídeo contendo o gene *CgATH1*.

Para uma maior confirmação do fenótipo conferido pelo plasmídeo pGRSd-*CgATH1*, as cepas transformadas da linhagem CEN.PK2-1C foram também crescidas em meios sintéticos completos (sem uracila) contendo 2% glicose ou trealose como fonte de carbono, e coletadas na fase exponencial do crescimento. A Tabela 4.2 confirma que as células transformadas com o plasmídeo pGRSd-*CgATH1* apresentaram maior atividade trealase periplasmática do que as células contendo o plasmídeo controle nas condições testadas, inclusive durante o crescimento exponencial em glicose. Este resultado pode ser explicado pela mudança de promotores, já que no plasmídeo pGRSd o promotor *GPD* é um promotor forte, constitutivo, no lugar do próprio promotor do gene *CgATH1* ou *ATH1* de *S. cerevisiae*, normalmente reprimido pela glicose (vide Tabela 4.2, e ZILLI, 2006). Embora os transformantes com o plasmídeo pGRSd-*CgATH1* apresentassem maior atividade da trealase periplasmática (seja em meio rico YP ou meio sintético SC), não foi detectada nenhuma atividade no sobrenadante de cultura, diferentemente de *C. glabrata* (ZILLI, 2006), indicando que provavelmente alguma característica do sistema de secreção e/ou parede celular em *S. cerevisiae* impede que esta enzima seja liberada no meio.

A seguir analisamos o crescimento da linhagem CEN.PK2-1C, transformada ou não com o plasmídeo pGRSd-*CgATH1*, em meios rico e mínimo, com 3 diferentes fontes de carbono cada: glicose, trealose e glicerol. Na Figura 4.10-A e 4.11-A podemos observar que o crescimento em ambos os meios contendo 2% glicose foi semelhante tanto para a cepa transformada com pGRSd-*CgATH1*, ou somente com o plasmídeo controle. Novamente esses crescimentos serviram de controle para os outros, demonstrando que não houve diferença na

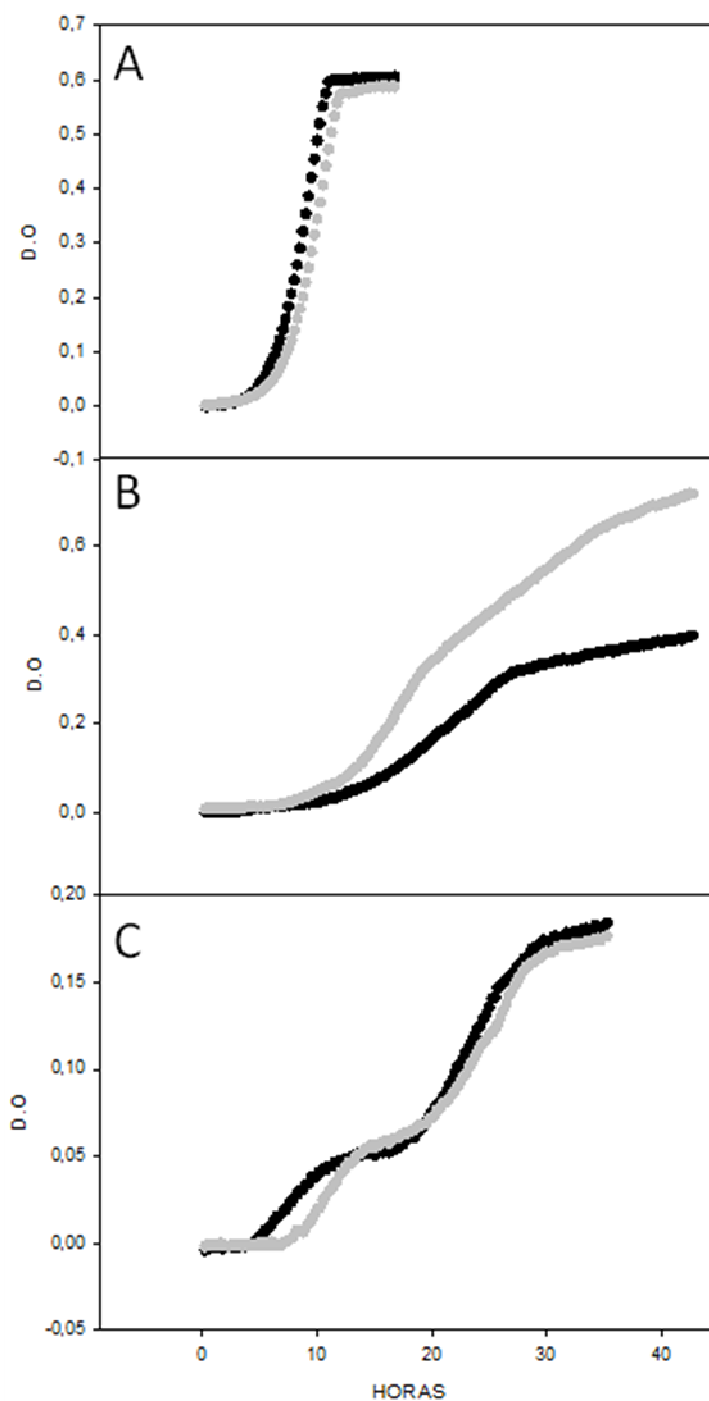


Figura 4.10. Crescimento em micro escala de cepas de *S. cerevisiae* em meios ricos contendo diferentes fontes de carbono. A figura mostra o crescimento da cepa CENPK2-1C transformada com o plasmídeo controle pGRSd (●), ou com pGRSd-CgATH1 (●) em meio rico YP contendo 2% glicose (A), 2% trealose.(B), ou 3% glicerol (C).

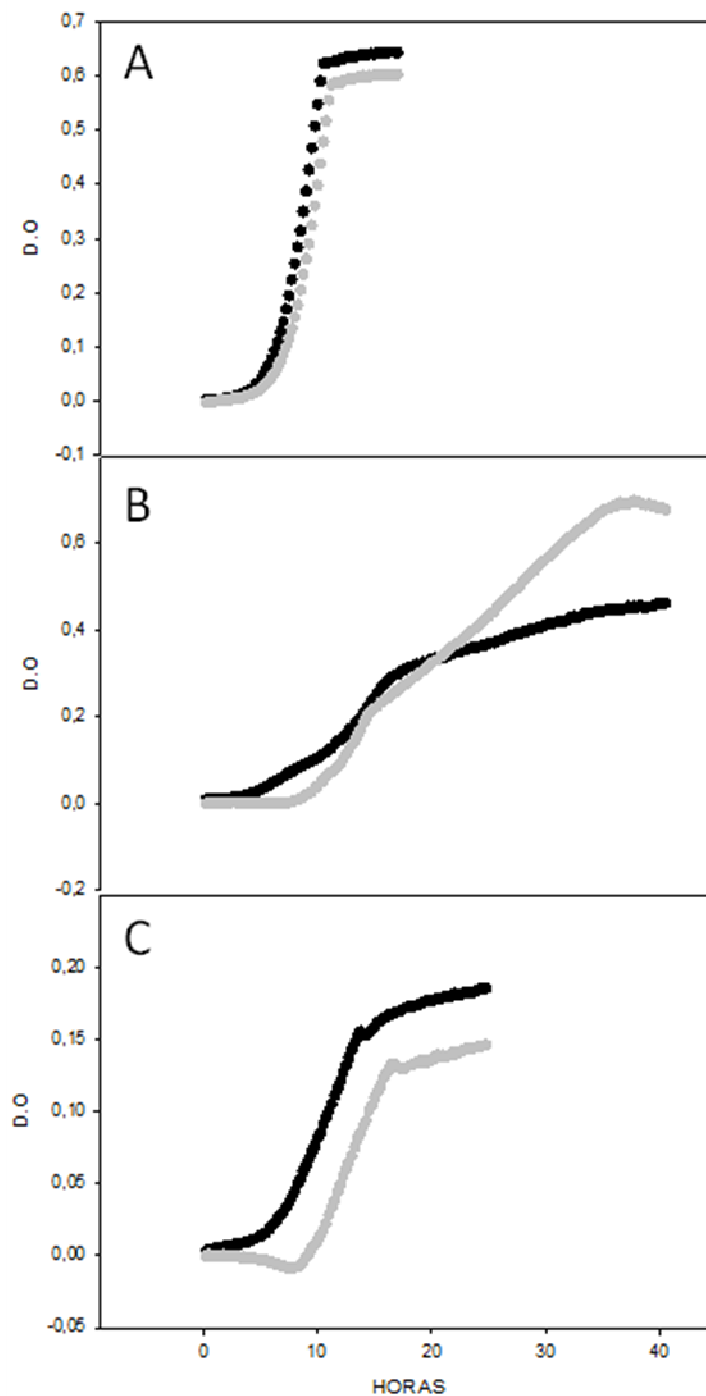


Figura 4.11. Crescimento em micro escala de cepas de *S. cerevisiae* em meios sintéticos contendo diferentes fontes de carbono. A figura mostra o crescimento da cepa CENPK2-1C transformada com o plasmídeo controle pGRSd (●), ou com pGRSd-CgATH1 (●) em meio sintético completo sem uracila contendo 2% glicose (A), 2% trealose.(B), ou 3% glicerol (C).

concentração de células inoculadas. Nos meios contendo trealose (Figura 4.10-B e 4.11-B) a diferença no crescimento das cepas é evidente, já que a cepa transformada com o plasmídeo pGRSd-*CgATH1* atinge velocidades específicas de crescimento maiores, e densidades celulares também maiores, do que as células transformadas com o plasmídeo controle sem o gene, demonstrando o envolvimento da *CaATH1* na utilização de trealose extracelular mesmo quando expressa em *S. cerevisiae*. Por outro lado, no meio rico YP com glicerol como fonte de carbono não foram observadas diferenças significativas no crescimento entre as células transformadas com o plasmídeo pGRSd-*CgATH1* e as células controle (Figura 4.10-C), embora as leveduras transformadas com o plasmídeo pGRSd-*CgATH1* curiosamente cresceram em meio mínimo com glicerol mais lentamente (Figura 4.11-C).

O crescimento da linhagem CEN.PK2-1C, transformada ou não com o plasmídeo pGRSd-*CgATH1*, foi também analisada em meios sólidos contendo trealose como fonte de carbono. Na Figura 4.12 podemos observar que células transformadas com o plasmídeo pGRSd-*CgATH1* aparentemente crescem melhor quando plaqueadas em meio rico YP contendo 2% de trealose, enquanto que o crescimento em 2% glicose foi semelhante para estas células e as transformadas com o plasmídeo controle (dados não mostrados). Diferenças mais significativas foram observadas durante o crescimento em meio sintético SC (sem uracila) contendo 2% trealose e antimicina A, um conhecido inibidor da cadeia respiratória. Como pode ser observado na Figura 4.12-B, nota-se um crescimento maior da cepa CEN.PK2-1C transformada com pGRSd-*CgATH1* na presença de antimicina A, sugerindo que o dissacarídeo possa estar sendo fermentado pelas leveduras.

Cabe lembrar que este açúcar não é fermentado por células de *S. cerevisiae*, mas sim respirado até CO₂ e água, mesmo após sobre-expressão do gene *ATH1* da própria *S. cerevisiae* no mesmo plasmídeo pGRSd (MALLUTA et al., 2000; JULES et al., 2004; MOURET; JACOBSEN; GUILLOUET, 2006). Entretanto, novos estudos serão necessários para confirmar se a trealose está, ou não, sendo fermentada pelas células de *S. cerevisiae* transformadas com o gene *CgATH1*.

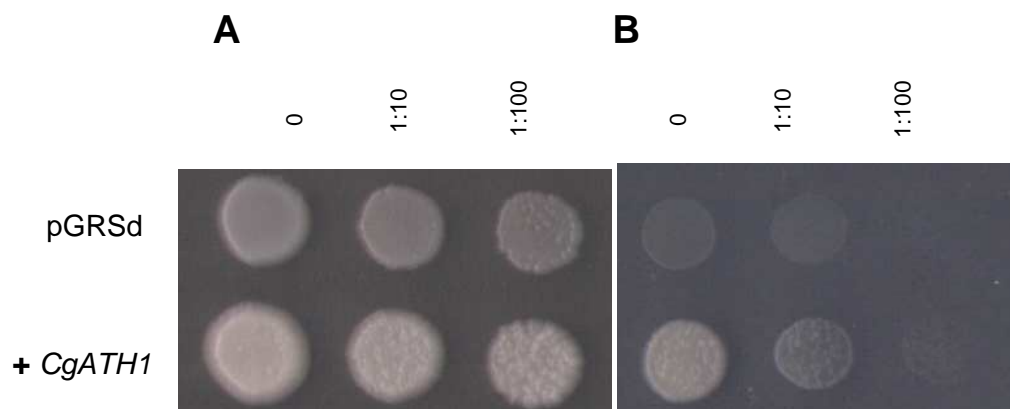


Figura 4.12. Crescimento de transformantes de *S. cerevisiae* em meios sólidos contendo 2% trealose. Diluições seriadas até 1:100 da cepa de *S. cerevisiae* CEN.PK2-1C transformada com o plasmídeo controle pGRSd, ou o plasmídeo contendo o gene *CgATH1*, foram plaqueadas em meio rico YP (**A**) ou meio sintético completo SC (sem uracila) suplementado com antimicina A (**B**), contendo 2% trealose como fonte de carbono.

4.4 Análise *in silico* do gene CgATH1

Após os testes de deleção e expressão heteróloga da ORF *CAGL0K05137g*, e tendo praticamente comprovado a identidade dessa seqüência gênica como sendo a da trealase ácida em *C. glabrata*, optou-se por seqüenciar o inserto clonado no presente trabalho, comparando-a com a ORF do banco de dados GENOLEVURES (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/elt/GAGL>), uma vez que o tamanho de aproximadamente 200 bp inferior ao previsto no banco de dados (3400 bp contra 3639 bp) levantou algumas questões sobre a identidade da ORF clonada e nos levou a realizar uma análise e seqüenciamento mais cuidadosa. Para tanto a cada novo fragmento seqüenciado do gene presente no plasmídeo pGRSd-CgATH1, um alinhamento com a seqüência contida no banco de dados era realizada, e somente após essa verificação, novos iniciadores eram confeccionados para cobrir toda a seqüência do gene clonado.

Como descrito anteriormente, a ORF escolhida na montagem do vetor pGRSd-CgATH1 foi proveniente da cepa Bg14, já que foi a levedura sobre a qual as manipulações genéticas de deleção fora realizadas (Seção 4.1). Utilizando a metodologia de seqüenciamento como descrita em Materiais e Métodos, foram necessárias três rodadas de seqüenciamento, com coberturas diferentes para cada fragmento (dados não mostrados). Ao término da estratégia, os diferentes fragmentos seqüenciados foram ordenados e montados por sobreposição, usando a seqüência armazenada no banco de dados como molde, através do programa GENEIOUS® basic 4.8.2 (Biomasters, www.geneious.com).

Uma vez tendo o resultado do seqüenciamento da ORF *CAGL0K05137g* da cepa de *C. glabrata* Bg14 partiu-se para o alinhamento da seqüência com a mesma ORF da cepa CBS138 utilizando-se o programa CLUSTALn. O resultado desse sequenciamento pode ser conferido Figura 4.13. As duas seqüências comparadas apresentaram uma homologia de 98% de seus nucleotídeos, contendo portanto 2% de poliformismos de nucleotídeo simples (SNPs), sem nenhuma interrupção na sequencia que justifica-se a diferença de tamanho observada na hora da amplificação da ORF *CAGL0K05137g* por PCR (vide Figura 4.7 acima).

CgATH1_Bg14	ATGGGGTTTAAGGACAAAATCTTTTTGGAAGGATGAGGTGCAATACAGAACACTAGCT	60			
CgATH1_CBS138	ATGGGGTTTAAGGACAAAATCTTTTTGGAAGGATGAGGTGCAATACAGAACCTAGCT	60	CgATH1_Bg14	CTGGACGCTCTCCCTGATGAATTTACTGAATTACCGGTAACCTGTCTATGACATTATCGAC	1080
	*****		CgATH1_CBS138	CTGGACGCCCTCCCTGATGAATTTACTGAATTACCGGTAACCTATCTATGACATTATCGAC	1080
	*****			*****	
CgATH1_Bg14	GTAGCAGACCAAGTGTCTAATAGGTTCTCCATCTTTTGAACCGTATATACGGGAGAC	120			
CgATH1_CBS138	GTAGCAGACCAAGTGTCTAATAGGTTCTCCATCTTTTGAACCGTATATACGGGAGAC	120	CgATH1_Bg14	CTCAACACTTCTCACAGGCAACTCTATATGAAAAGGCCAGGACGAGGATAATAAGGCC	1140
	*****		CgATH1_CBS138	TTCAACACTTCTCACAGGCAACTCTATATGAAAAGGCCAGGACGAGGATAATAAGGCC	1140
	*****			*****	
CgATH1_Bg14	GAATCTGTGCAAGATGCTGACTCGAGACCTGTGGTTAACTAATGAACTCTTTCACAT	180			
CgATH1_CBS138	GAATCTGTGCAAGATGCTGACTCGAGACCTGTGGTTAACTAATGAACTCTTTCACAT	180	CgATH1_Bg14	ATTTACATGATGTTAATCCAGATAATGTTCCATATTCAAATGCTGTGTCTACTCTACG	1200
	*****		CgATH1_CBS138	ATTTACATGATGTTAATCCAGATAATGTTCCATATTCAAATGCTGTGTCTACTCTACG	1200
	*****			*****	
CgATH1_Bg14	AGTTCTGATTTTTTTGTATTACCAGAAGAGAGAATAAGTACAAGAGTAAAATACGAAGA	240			
CgATH1_CBS138	AGTTCTGATTTTTTTGTATTACCAGAAGAGAGAATAAGTACAAGAGTAAAATACGAAGA	240	CgATH1_Bg14	TGCACCATTAAAGGAACTGAAAATAACTTCTCACCATACAACCTTTACTTCTGATGATAG	1260
	*****		CgATH1_CBS138	TGCACCATTAAAGGAACTGAAAATAACTTCTCACCATACAACCTTTACTTCTGATGATAG	1260
	*****			*****	
CgATH1_Bg14	CAGAATATACTGAATACGACACTTATACTAGGAATGTTGATTGCGTTAGTTATCTGGACG	300			
CgATH1_CBS138	CAGAATATACTGAATACGACACTTATACTAGGAATGTTGATTGCGTTAGTTATCTGGACG	300	CgATH1_Bg14	ATTGCCAGGAACCTATATGACCAACTGACTGAGGAAAATCCAAAGTTGTGATATATAAG	1320
	*****		CgATH1_CBS138	ATTGCCAGGAACCTATATGACCAACTGACTGAGGAAAATCCAAAGTTGTGATATATAAG	1320
	*****			*****	
CgATH1_Bg14	GCTATTCTGTCCACTAACTCCTACTTTAGTAGCTCCCTTGCCCTCAGCGTCACCCCTTATTT	360			
CgATH1_CBS138	GCTATTCTGTCCACTAACTCCTACTTTAGTAGCTCCCTTGCCCTCAGCGTCACCCCTTATTT	360	CgATH1_Bg14	TACACAAGTGTGTTTCTCCGAATACAACAATGACGAGCCTAATCCAATGTCAATTTA	1380
	*****		CgATH1_CBS138	TACACAAGTGTGTTTCTCCGAATACAACAATGACGAGCCTAATCCAATGTCAATTTA	1380
	*****			*****	
CgATH1_Bg14	AACAAGAAGGGAGAGTGGTGAGACCCATGAGGGAGTCCAACCTGGGTTTGCATGCGGAC	420			
CgATH1_CBS138	AACAAGAAGGGAGAGTGGTGAGACCCATGAGGGAGTCCAACCTGGGTTTGCATGCGGAC	420	CgATH1_Bg14	AAATTTGCCAGCAACATGCAAACTGCTAAGGTAATATAAATCCTTACTTTCTAAT	1440
	*****		CgATH1_CBS138	AAATTTGCCAGCAACATGCAAACTGCTAAGGTAATATAAATCCTTACTTTCTAAT	1440
	*****			*****	
CgATH1_Bg14	CCTCAAACAGAAAGTCTTCAAAGACCTGTATGATTTGCTGTCTGATTTGCAACAGCT	480			
CgATH1_CBS138	CCTCAAACAGAAAGTCTTCAAAGACCTGTATGATTTGCTGTCTGATTTGCAACAGCT	480	CgATH1_Bg14	CATAAGAGGGCATGGTATGACTTGTACAACGATGCCCTTATCGAAATCCCTCTGATAGT	1500
	*****		CgATH1_CBS138	CATAAGAGGGCATGGTATGACTTGTACAACGATGCCCTTATCGAAATCCCTCTGATAGT	1500
	*****			*****	
CgATH1_Bg14	TTTTATGATGACGAAAATATGATCTTGGGTTCTCTGCCTTTGGTGAGAACACTTACTCA	540			
CgATH1_CBS138	TTTTATGATGATGAAAATATGATCTTGGGTTCTCTGCCTTTGGTGAGAACACTTACTCA	540	CgATH1_Bg14	CTACTGGAATGACTGCAAGATCTTCGTTGTTCCACTTACTTGCACAACAAGGCAATAT	1560
	*****		CgATH1_CBS138	CTACTGGAATGACTGCAAGATCTTCGTTGTTCCACTTACTTGCACAACAAGGCAATAT	1560
	*****			** *****	
CgATH1_Bg14	AGACAACCATACGTTGCTAATGGTTACATTTGGCTCACGTATCCCAAATATGGTTTGGT	600			
CgATH1_CBS138	AGACAACCATACGTTGCTAATGGTTACATTTGGCTCACGTATCCCAAATATGGTTTGGT	600	CgATH1_Bg14	AATGTTTCAACAACAAGGGGTCTACCAGTTGGTGTGGTGGTTTATCTTCCAGACTCTAT	1620
	*****		CgATH1_CBS138	AATGTTTCAACAACAAGGGGTCTACCAGTTGGTGTGGTGGTTTATCTTCCAGACTCTAT	1620
	*****			*****	
CgATH1_Bg14	TACGCATTGGATACTCTAAATTTATATGCTGATGCTCCTGGGGCTTTGAATAACGGCTGG	660			
CgATH1_CBS138	TACGCATTGGATACTCTAAATTTATATGCTGATGCTCCTGGGGCTTTGAATAACGGCTGG	660	CgATH1_Bg14	GGTGGTATGATTTCTGGGATGCGGAGCTCTGGATGGCTCCAGCACTCCTACTTTCTTT	1680
	*****		CgATH1_CBS138	GGTGGTATGATTTCTGGGATGCGGAGCTCTGGATGGCTCCAGCACTCCTACTTTCTTT	1680
	*****			*****	
CgATH1_Bg14	CCGTTGAGAAACAGAAGATTTGCTGGGTCATTCGTCCTCGATTCTACTCCTTGAAGCC	720			
CgATH1_CBS138	CCGTTGAGAAACAGAAGATTTGCTGGGTCATTCGTCCTCGATTCTACTCCTTGAAGCC	720	CgATH1_Bg14	CCTAATATTGCTATGAACATGAACAATATAGAAATGCCACACATCAGCAAGCCATAGAA	1740
	*****		CgATH1_CBS138	CCTAATATTGCTATGAACATGAACAATATAGAAATGCCACACATCAGCAAGCCATAGAA	1740
	*****			*****	
CgATH1_Bg14	AAACTAACTCTACTAATTTCTGAGTTGGATGAGAAAGGATACACTACTGTAATTTCA	780			
CgATH1_CBS138	AAACTAACTCTACTAATTTCTGAGTTGGATGAGAAAGGATACACTACTGTAATTTCA	780	CgATH1_Bg14	AATGCTAAGCAGTATAACTATCCAGGAGCTGTTTATCCTTGGACTTCTGGTAGGTATGCT	1800
	*****		CgATH1_CBS138	AATGCTAAGCAGTATAACTATCCAGGAGCTGTTTATCCTTGGACTTCTGGTAGGTATGCT	1800
	*****			*****	
CgATH1_Bg14	TCAATCCCTGAATGGACTGATTGCAATTTACTGTTGATCTTAAACGGTACTAATGGTTT	840			
CgATH1_CBS138	TCAATCCCTGAATGGACTGATTGCAATTTACTGTTGATCTTAAACGGTACTAATGGTTT	840	CgATH1_Bg14	AACTGTACTTCTACTGGCCATGATTTGATTATGAATATCATATTAATGTTGACATTGCT	1860
	*****		CgATH1_CBS138	AACTGTACTTCTACTGGCCATGATTTGATTATGAATATCATATTAATGTTGACATTGCT	1860
	*****			*****	
CgATH1_Bg14	GATCCGCAATCTGTTTGGATTGATGATGTCATCAATATAACCAAATTTGTCGATGAAG	900			
CgATH1_CBS138	GATCCGCAATCTGTTTGGATTGATGATGTCATCAATATAACCAAATTTGTCGATGAAG	900	CgATH1_Bg14	CTTGATCATTTTCCATATATATGAATGGTGAGAGGTCGATGAGGACTATTACGT	1920
	*****		CgATH1_CBS138	CTTGATCATTTTCCATATATATGAATGGTGAGAGGTCGATGAGGACTATTACGT	1920
	*****			*****	
CgATH1_Bg14	GATGGCATCTGCTCRACAAATATGGACTGGTGAATGGTATGATCAATATTAAGAGCGAA	960			
CgATH1_CBS138	GATGGCATCTGCTCRACAAATATGGACTGGTGAATGGTATGATCAATATTAAGAGCGAA	960	CgATH1_Bg14	TTCAACAATGGCCAATGGTTAAGGATGCAGCAGTGTTTTCAAAGCCTACGTCAAATAC	1980
	*****		CgATH1_CBS138	TTCAACAATGGCCAATGGTTAAGGATGCAGCAGTGTTTTCAAAGCCTACGTCAAATAC	1980
	*****			*****	
CgATH1_Bg14	GTTTGGGCCCATAGAAAAATTCATTCTTTGGGGATTACAGATAGAAATCTCCTTAAAC	1020			
CgATH1_CBS138	GTTTGGGCCCATAGAAAAATTCATTCTTTGGGGATTACAGATAGAAATCTCCTTAAAC	1020			
	*****			*****	

Figura 4.13 Alinhamento das seqüências de nucleotídeos das trealases ácidas das leveduras *C. glabrata* linhagem Bg14 (este trabalho) e CBS138.

CgATH1_Bg14	AATGAGACTTTAGGTGAATATGAGACATATAATCTAACAGATCCGGATGAATTCGCTAAT	2040	CgATH1_CBS138	TCAGCGTTGTATTGGAAGAGAGACGATGATCTTTCTGCTACTGACGACTATTATGGTACT	2880
CgATH1_CBS138	AATGAGACTTTAGGTGAATATGAGACATATAATCTAACAGATCCGGATGAATTCGCTAAT	2040		*****	
CgATH1_Bg14	CATGTTAAACAATGGTGCCTTCACCAATGCTGGTATAAAAAACACTTTTGAATGGGCAACT	2100	CgATH1_Bg14	TACTTTACTTTGTATCCTAATGAAGAGCTTGTCCATTATATGATACTAACTAAAT	2940
CgATH1_CBS138	CATGTTAAACAATGGTGCCTTCACCAATGCTGGTATAAAAAACACTTTTGAATGGGCAACT	2100	CgATH1_CBS138	TACTTTACTTTGTATCCTAATGAAGAGCTTGTCCATTATATGATACTAACTAAAT	2940
	*****			*****	
CgATH1_Bg14	GATATTGGTACCCATTTGNGTGAAGAAGTTGATCCAAAATGGATGGAATAGCTGATAAC	2160	CgATH1_Bg14	ATTGRTGAAAACATTGCCGAAAGCAAGCAGATTACAAAATTTGACGGCTGGTGTCTCTGGA	3000
CgATH1_CBS138	GATATTGGTACCCATTTGNGTGAAGAAGTTGATCCAAAATGGATGGAATAGCTGATAAC	2160	CgATH1_CBS138	ATTGRTGAAAACATTGCCGAAAGCAAGCAGATTACAAAATTTGACGGCTGGTGTCTCTGGA	3000
	*****			****	
CgATH1_Bg14	ATACACATCCCTAGATCAGATTCTAATATTACTTTGGAATCTCCGGTATGAATAGCTCT	2220	CgATH1_Bg14	GATGTTGGCTTCTCAGCATTGGATGGAACAATTACACGCATTGGCAACCATTGCGATAAA	3060
CgATH1_CBS138	ATACACATCCCTAGATCAGATTCTAATATTACTTTGGAATCTCCGGTATGAATAGCTCT	2220	CgATH1_CBS138	GATGTTGGCTTCTCAGCATTGGATGGAACAATTACACGCATTGGCAACCATTGCGATAAA	3060
	*****			*****	
CgATH1_Bg14	GTTGAAATCAAGCAAGCTGATGTAACCTTTGATGGTCTATCCATTGGGATACATTAATGAT	2280	CgATH1_Bg14	AGTGATAATGCAAAGCTATTGATTGATTTAGGTTTCAACAGCAGCTATGTCATTAAGG	3120
CgATH1_CBS138	GTTGAAATCAAGCAAGCTGATGTAACCTTTGATGGTCTATCCATTGGGATACATTAATGAT	2280	CgATH1_CBS138	AGTGATAATGCAAAGCTATTGATTGATTTAGGTTTCAACAGCAGCTATGTCATTAAGG	3120
	*****			*****	
CgATH1_Bg14	GAATCGATTTTGAATAATGCAATTAAGATCTTTATTACTATTCTGAAAGGCAATCTGCT	2340	CgATH1_Bg14	GGTATCATCTGTGGGACAAAGACCAGCAAGAACAATTTTCATTGTGAGTCTGGCTCAC	3180
CgATH1_CBS138	GAATCGATTTTGAATAATGCAATTAAGATCTTTATTACTATTCTGAAAGGCAATCTGCT	2340	CgATH1_CBS138	GGTATCATCTGTGGGACAAAGACCAGCAAGAACAATTTTCATTGTGAGTCTGGCTCAC	3180
	*****			*****	
CgATH1_Bg14	TCAGTCTGCTATGACCTATCCAGTATTTGTTGCTGCTGCTGCTACTTATTGAACCAC	2400	CgATH1_Bg14	TCAGAAGGATCGAACAATTAATTTGCTAATATTACAGACCTGTTAGAACAATCTTCAATA	3240
CgATH1_CBS138	TCAGTCTGCTATGACCTATCCAGTATTTGTTGCTGCTGCTGCTACTTATTGAACCAC	2400	CgATH1_CBS138	TCAGAAGGATCGAACAATTAATTTGCTAATATTACAGACCTGTTAGAACAATCTTCAATA	3240
	*****			*****	
CgATH1_Bg14	GGATCATCTTCTCAGAGCTATCTATAACAAGTCCGTTCTACCTTATTGCGTCTCCCTTTT	2460	CgATH1_Bg14	ACTAAAGGTGGTYYACYATTGAATCAAATGTTAGTCTCAGACACAGTCTAATGTCACAGCA	3300
CgATH1_CBS138	GGATCATCTTCTCAGAGCTATCTATAACAAGTCCGTTCTACCTTATTGCGTCTCCCTTTT	2460	CgATH1_CBS138	ACTAAAGGTGGTYYACYATTGAATCAAATGTTAGTCTCAGACACAGTCTAATGTCACAGCA	3300
	*****			*****	
CgATH1_Bg14	GCCCAGTTTAGTGAACAGTCGGACGATAATTTCTTAACAAATGGTCTCACACAGCCAGCA	2520	CgATH1_Bg14	GAAATTGATGATGATATCCTAGCTCTGTTGAATTGGAAGGCGATGATCTGGATCAATTG	3360
CgATH1_CBS138	GCCCAGTTTAGTGAACAGTCGGACGATAATTTCTTAACAAATGGTCTCACACAGCCAGCA	2520	CgATH1_CBS138	GAAATTGATGATGATATCCTAGCTCTGTTGAATTGGAAGGCGATGATCTGGATCAATTG	3360
	*****			*****	
CgATH1_Bg14	TTCCCATTTTAACTGCAAAACGGTGGTTTCTTGCAAGTATTTTGTGGCTTAACTGGT	2580	CgATH1_Bg14	ATTCCTTACTTGCCTGATATGCATCTCTTGCAAGAGAAATTCATACCAATCTTAAAGGAT	3420
CgATH1_CBS138	TTCCCATTTTAACTGCAAAACGGTGGTTTCTTGCAAGTATTTTGTGGCTTAACTGGT	2580	CgATH1_CBS138	ATTCCTTACTTGCCTGATATGCATCTCTTGCAAGAGAAATTCATACCAATCTTAAAGGAT	3420
	*****			*****	
CgATH1_Bg14	CTAAGATATCTTACGAGGTCACGCCAAGGACTAAGAAGATCAGTAGATTACTAAAATTT	2640	CgATH1_Bg14	TAWCCTATAAAGCCAAACCAAGATATTACRAAGAGATTATCGATGATGACATTATAAAG	3480
CgATH1_CBS138	CTAAGATATCTTACGAGGTCACGCCAAGGACTAAGAAGATCAGTAGATTACTAAAATTT	2640	CgATH1_CBS138	TATCCTATAAAGCCAAACCAAGATATTACRAAGAGATTATCGATGATGACATTATAAAG	3480
	*****			**	
CgATH1_Bg14	GATCCTGTTAAGCTTCCACTATTGCCAGGTGGTATCGCCATTTCGAACTTCAAATATATG	2700	CgATH1_Bg14	TTGCTACCAAGTAACACCCTGAATTCACCATAGATTATAACTCTATACCAGGAGGTGAG	3540
CgATH1_CBS138	GATCCTGTTAAGCTTCCACTATTGCCAGGTGGTATCGCCATTTCGAACTTCAAATATATG	2700	CgATH1_CBS138	TTGCTACCAAGTAACACCCTGAATTCACCATAGATTATAACTCTATACCAGGAGGTGAG	3540
	*****			*****	
CgATH1_Bg14	GGTCAGGTATTGGACATTATCATTGATGATAACAACGGCACTATTGCTCATAAAGGTGGA	2760	CgATH1_Bg14	AAGCGAGCAAGATATGTAGTTTGGACAGTCCATGGTACTTATGACGATGATGAYGACCTG	3600
CgATH1_CBS138	GGTCAGGTATTGGACATTATCATTGATGATAACAACGGCACTATTGCTCATAAAGGTGGA	2760	CgATH1_CBS138	AAGCGAGCAAGATATGTAGTTTGGACAGTCCATGGTACTTATGACGATGATGAYGACCTG	3600
	*****			*****	
CgATH1_Bg14	GATAAACCGATCAGAATCAAGTGCCTAATCGTGATATACTGCATGACAGGAACATCACT	2820	CgATH1_Bg14	AAAGGCCAACCATCARGGAAATTTGCTCTNCAAGAATGA	3639
CgATH1_CBS138	GATAAACCGATCAGAATCAAGTGCCTAATCGTGATATACTGCATGACAGGAACATCACT	2820	CgATH1_CBS138	AAAGGCCAACCATCARGGAAATTTGCTCTNCAAGAATGA	3639
	*****			*****	
CgATH1_Bg14	TCAGCGTTGTATTGGAAGAGAGACGATGATCTTTCTGCTACTGACGACTATTATGGTACT	2880			

Figura 4.13 (continuação)

Através do programa utilizado para organizar a seqüência gênica da ORF em questão foi ainda possível extrair a seqüência peptídica da mesma, o que possibilitou, não só a comparação com outras trealases de outros fungos, mas também a previsão de características da proteína, como por exemplo a identificação de domínios trans-membrana e também a probabilidade de possuir N-glicosilações (Figura 4.14). Para essas avaliações optou-se por utilizar os programas NETNGLYC e TMHMM hospedados no Centro Biológico para Análise de Sequências (CBS, parte da Universidade Técnica da Dinamarca (DTU) (<http://www.cbs.dtu.dk/services>).

A trealase extracelular da cepa Bg14 apresenta 98% de homologia na sua seqüência de aminoácidos em relação à tradução da ORF *CAGL0K05137g* da cepa CBS138. Com relação às características previstas, essa proteína apresenta um domínio transmembrana nos resíduos de amino ácidos 81 a 103 (Figura 4.14-A), sendo essa organização muito semelhante a outras proteínas do grupo das trealases, como sua homóloga em *S. cerevisiae* (PARROU et al., 2005). Outra característica marcante nessas hidrolases, é o grande número de N-glicosilações, importantes para sua estabilidade e funcionamento, pois tratam-se de enzimas extracelulares. A tradução da seqüência gênica prevê nesse caso, aproximadamente 21 sítios de N-glicosilações (Figura 4.14-B), novamente número semelhante ao encontrado nas proteínas da mesma classe em leveduras próximas filogeneticamente.

Novamente utilizando-se de recursos de bioinformática como a ferramenta BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) foi possível ainda buscar por outras seqüências similares a da trealase ácida de outras leveduras e fungos, para efeito de comparação com a seqüência peptídica obtida da tradução do sequenciamento na cepa Bg14. Inúmeros organismos com peptídeos “trehalase-like” foram identificados, mas o optou-se por restringir a análise ao grupo dos fungos, sejam eles ou de importância médica ou pela relação filogenética com *C. glabrata* (DUJON et al, 2004; FISCHER et al., 2006; JAMES et al., 2006; SCANNELL et al, 2006; WOLFE, 2006). Ao todo foram selecionadas 29 seqüências que incluíam organismos como: *Aspergillus fumigatus*, *A. clavatus*, *A. flavus*, *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Pichia stiptis*, *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. castellii*, entre outros. Esse conjunto de seqüências foram alinhadas novamente com a ferramenta CLUSTAL, e posteriormente uma árvore filogenética foi montada (Figura 4.15) com o auxílio do programa DENDROSCOPE® (HUSON et al., 2007).

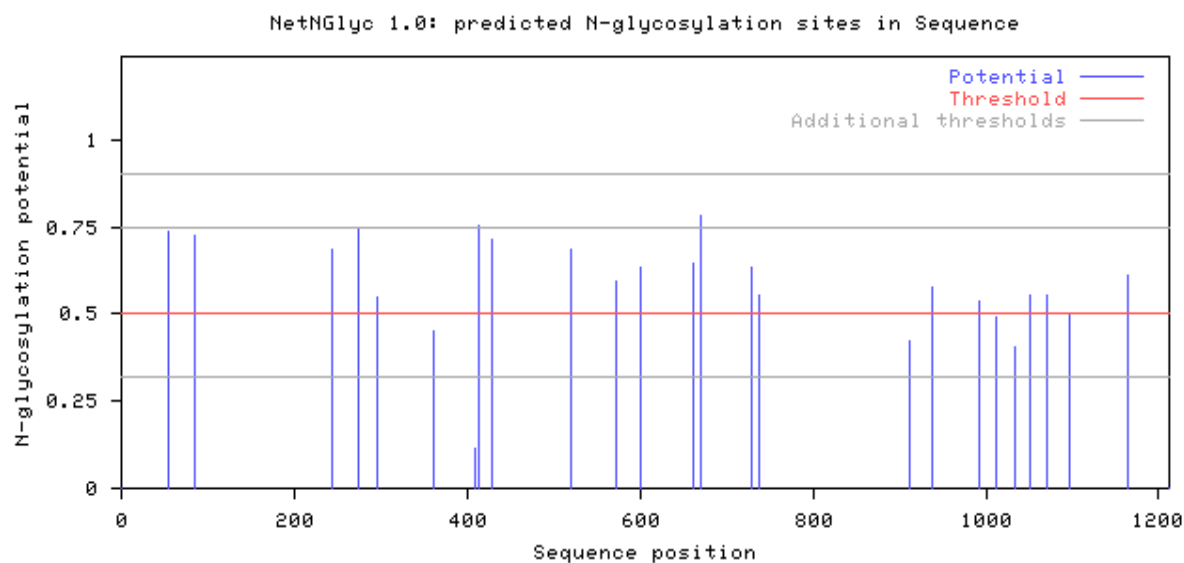
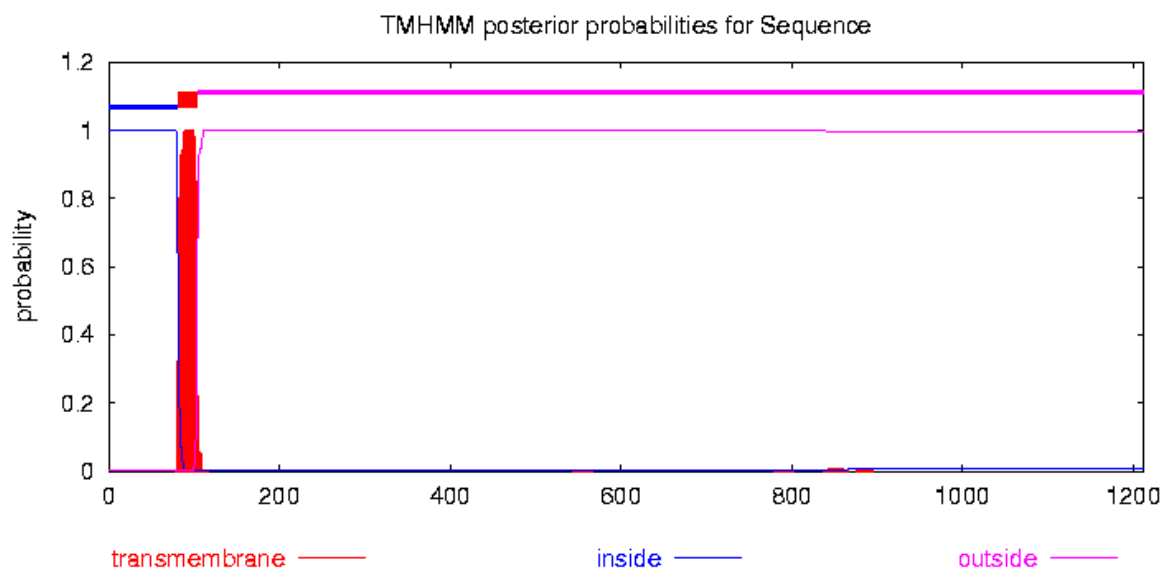


Figura 4.14. Características da seqüência peptídica da trealase ácida da cepa Bg14 de *C. glabrata*. Os gráficos mostram o número de domínios transmembrana previstos (A) e possíveis N-glicosilações da enzima (B). Figuras geradas pelos programas NETNGLYC e TMHMM hospedados no Centro Biológico para Análise de Seqüências (<http://www.cbs.dtu.dk/services>).

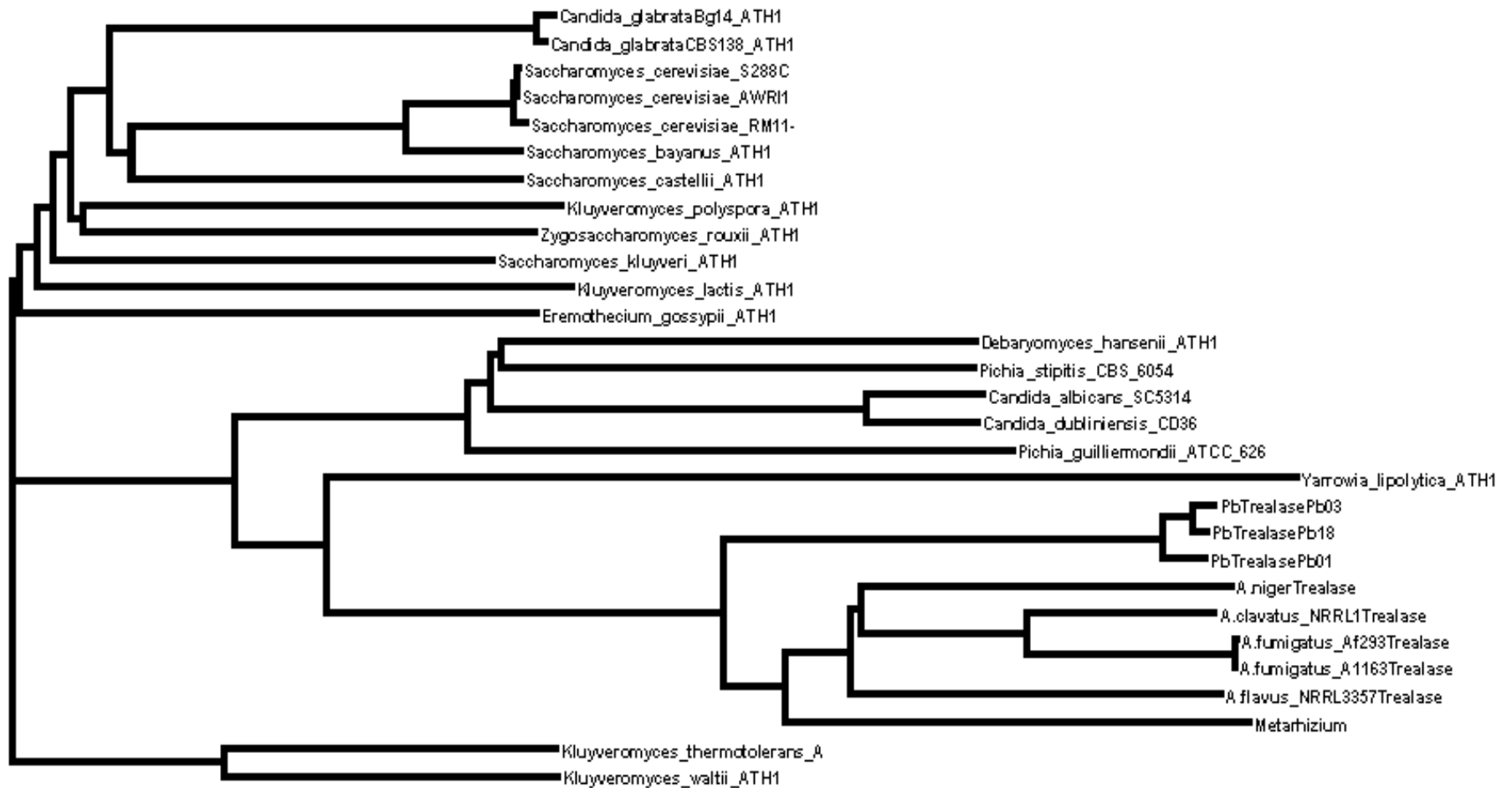


Figura 4.15 Análise filogenética das seqüências de aminoácidos das trealases ácidas de diversos fungos e leveduras. Filograma mostrando as relações filogenéticas de diversas “trehalase-like” em fungos de importância médica e proximidade filogenética com *C. glabrata*.

No filograma resultante do alinhamento observa-se a formação de vários agrupamentos conforme a identidade de cada seqüência de trealase. Primeiramente, bem marcados na parte superior da figura, estão o produto da tradução da seqüência obtida na nossa dissertação mais a sua homóloga correspondente ao banco de dados GENOLEVURES. Segundo, pode-se observar “clusters” de seqüências pertencentes ao grupo *Saccharomyces*, *Candida* e *Pichia*, e um último grupo de ascomicetos de relevância medica compreendido por trealases dos gêneros *Aspergillus* e *Paracoccidioides*. Nota-se nas seqüências de trealase de *C. glabrata* a distância e proximidade, do gênero *Candida* e *Saccharomyces*, respectivamente, confirmando outros estudos filogenéticos, onde o nome *Candida*, nada mais é do que uma característica taxonômica dada a *C. glabrata*, do que proximidade evolutiva com, por exemplo, *C. albicans* (DUJON et al, 2004; FISCHER et al., 2006; JAMES et al., 2006; SCANNELL et al, 2006; WOLFE, 2006).

Por último, já existia no banco de dados estrutural de proteínas (RCSB Protein Data Base, www.rcsb.org) uma enzima denominada de maltose fosforilase do organismo *Lactobacillus brevis*, a qual teve sua estrutura resolvida através da cristalografia conforme o método de gota pendente (EGLOFF et al., 2001). Essa fosforilase curiosamente faz parte da mesma família protéica das trealases (glicosil-hidrolases 65) (<http://pfam.sanger.ac.uk>) onde é através da comparação com sua seqüência, é possível inferir sobre a classe da enzima estudada. Após a busca no banco de dados PFAM, mostrou-se realmente que a seqüência peptídica da cepa Bg14 fazia parte da mesma família das trealases. Um fato interessante na publicação da estrutura da maltose fosforilase da bactéria, foi a resolução de seu sítio catalítico, compreendendo 10 aminoácidos-chave. Esse dado gerou uma pergunta: se o sítio catalítico, de alguma forma, poderia estar conservado em organismos tão distantes. Foi feito então um alinhamento entre as sequencias de *L. brevis* e *C. glabrata*, e surpreendentemente pode-se observar que 6 aminoácidos dos 10 estavam conservados na levedura (Figura 4.16). Os outros 4 aminoácidos estariam relacionados com a coordenação do grupamento fosfato, e portanto, ausentes na trealase do fungo. Optou-se por ir mais além na comparação do sítio catalítico da família das trealases, utilizando-se as seqüências de aminoácidos de trealases-like utilizadas para a confecção do filograma anterior. O que se observou com o alinhamento das 29 seqüências foi a conservação do sítio catalítico nas possíveis trealases dessa família protéica (dados não mostrados).

```

LbrevisMaltose_phosphorylase  ESQQGIRFNLFLS---TYYGDDAR-LNIGPKGFTGEKYGGATYWDTEA 362
CgATH1                          LLEMTARSSLFHLNANTRQYNVSTTRGLPVGVGGLSSDSYGGMVFWDADV 550
      :  *  .***:~:  *  . :* * :*  *:::~.***  .:  ***:~.

LbrevisMaltose_phosphorylase  FAFPVYLGITDPKVTRNLLMYRYKQLDGAYINAQEQLKALFPMVTFDG 412
CgATH1                          WMAPALLPFFP-NIAMNMNNYRNATHQQAIENAKQYNYPGAVYPWTSGRY 599
      :  *  . *  :  :~: *:  **  : *  ***:~.  ***:~*  .:

LbrevisMaltose_phosphorylase  IECHNEWEITFEEIHRNGDIAFA---IYNYTRYTGDDSYVLHEGAKVLTE 459
CgATH1                          ANCTSTGPCIDYEYHINVDIALASFSIYMNGAEGADEDYLRFTTWPMVKD 649
      :*  .  *  *  *  ***:~*  **  .*:~*:  .  :~:~:

LbrevisMaltose_phosphorylase  ISRFWADRVHFSKRNNQYMIHGVTGADEYENNVNNDNWDTNMLAQWTLKYT 509
CgATH1                          AAVFFKAYVKYNETLGEYETYNLTPDEFANHVNNGAFTNAGIKTLLKWA 699
      :  *:  ***:~:  .:*  :~:~.***:  ***:~*  **  :  ***:~:

```

Figura 4.16 Alinhamento parcial das seqüências de aminoácidos da maltose fosforilase de *L. brevis* e trealase ácida de *C. glabrata*. A figura mostra os 6 aminoácidos do sítio catalítico conservados para as duas enzimas, utilizando-se o alinhamento no programa CLUSTALp. E – Ácido glutâmico. D – Ácido aspártico. H – Histidina. Y – Tirosina. W – Triptofano.

Com todos esses dados sobre as características da proteína, escolhemos por ir mais adiante na caracterização *in silico* da enzima, mostrando, o modelamento comparativo de sua organização terciária com a estrutura resolvida da maltose fosforilase. Utilizou-se da ferramenta 3D-JIGSAW (BATES et al., 1999) para tanto, onde podem ser resolvido dois domínios dentro da proteína (Figura 4.17-A), um domínio N-terminal (Glyco_Hydro_65N) e outro domínio central catalítico (Glyco_Hydro_65m). Constatamos que esta proteína possui mais um domínio carboxi terminal (PARROU et al., 2005), contudo o sistema de modelamento é limitado para esse domínio, o qual não está representado na figura 4.17-A. O modelamento, ainda nos permitiu verificar a proximidade dos aminoácidos do centro catalítico através do programa RASWIN (<http://rasmol.org/>) (Figura 4.17-B), mostrando que realmente os aminoácidos apresentam-se de forma coordenada, podendo formar um “bolsão” para o seu substrato, trealose, da mesma forma que eles coordenam a maltose na enzima de *L. brevis* (EGLOFF et al., 2001).

Através de ferramentas de bioinformática, utilizando a tradução do sequenciamento obtido da cepa Bg14 de *C. glabrata*, foi possível prever características da enzima, suas relações filogenéticas, conservação do sítio catalítico e até mesmo um modelamento de sua estrutura terciária. Essas informações, juntamente com os ensaios para a compravação da ORF CAGL0K05137g como sendo a trealase ácida de *C. glabrata*, serão de grande valia para estudos posteriores no entendimento de mecanismos de ação dessa enzima na fisiopatologia da levedura, até mesmo na confecção de fármacos utilizando a trealase extracelular como alvo terapêutico

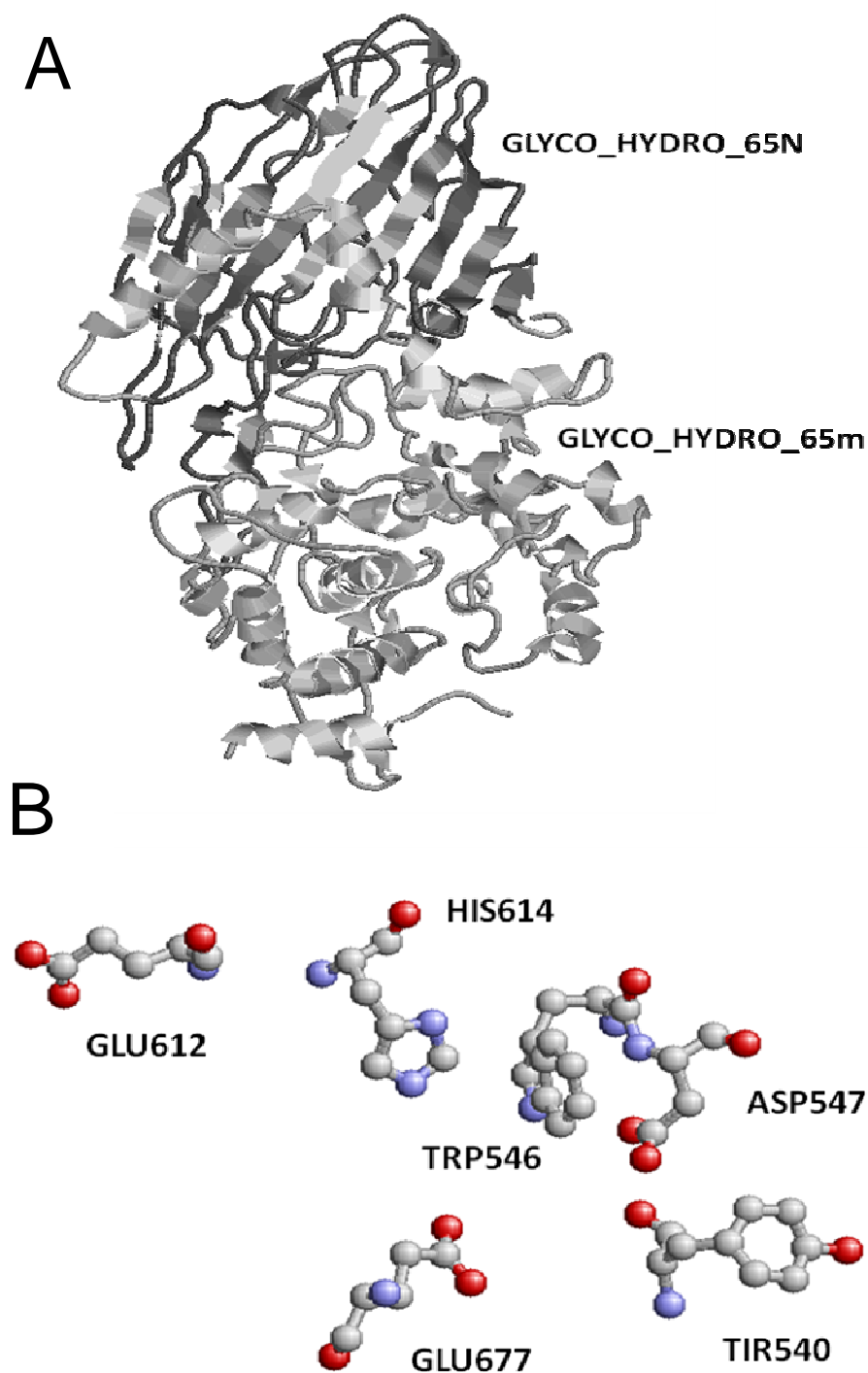


Figura 4.17 Modelamento tridimensional comparativo da trealase ácida na cepa Bg14 de *C. glabrata*. São mostrados esquemas 3D montados a partir do servidor de modelamento JIGSAW e posterior visualização e edição no programa RASWIN. **A-** Domínios N-terminal (65N) e catalítico central (65m) da trealase ácida. **B** – Sítio catalítico do domínio central mostrando seus aminoácidos conservados e suas respectivas posições. GLU – Ácido glutâmico. HIS – Histidina. TRP – Triptofano. ASP – Ácido aspártico. TIR – Tirosina.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Através de estratégias de deleção, subclonagem e expressão heteróloga, e seqüenciamento da ORF *CAGL0K05137g* de *C. glabrata*, fica claro que ela é a seqüência codificante para a trealase ácida secretada por esta levedura. Mostrou-se nesse trabalho a importância da enzima na utilização da trealose em meios contendo essa fonte de carbono, além de contribuir também para a homeostase celular durante o estresse salino. Falta ainda uma compreensão melhor do porquê essa enzima se faz necessária durante tal desafio, e procurar relacionar sua presença ou ausência em face a outros tipos de estresse, como altas temperaturas, por exemplo. Isso será possível futuramente através da utilização da cepa mutante *ath1Δ* RY01, fruto desta dissertação, podendo ser útil também em estudos de infectividade em modelos animais, para novamente tentar encontrar um papel para a trealase ácida extracelular, e do metabolismo da trealose, nas interações patógeno-hospedeiro.

Outro elemento importante no estudo do catabolismo de trealose ainda não bem compreendido não só em *C. glabrata*, como também em outras leveduras, é o estudo da expressão gênica e secreção da trealase extracelular, bem como do funcionamento de sua região promotora frente aos estímulos ambientais aos quais a levedura está submetida.

Após a análise *in silico* de características bioquímicas e estruturais da trealase ácida de *C. glabrata*, seria interessante também trabalhar com a proteína propriamente dita. Embora nosso grupo já tenha caracterizado a atividade trealase em *C. glabrata*, e parcialmente purificado a proteína, faz-se necessário uma melhor caracterização protéica. Possuindo esses dados, então seria possível elaborar estratégias na utilização dessa enzima como molde para entender os seus mecanismos de ação, e utilizá-la como base para estudos com fármacos antifúngicos. Essas informações podem ser de grande importância, pois como mostrado neste trabalho o sítio catalítico para essa grande família protéica das trealases ácidas é aparentemente bastante conservado em grupos fúngicos de interesse médico, como *Aspergillus* e *Candida*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBES, S.; AMOURI, I.; SELLAMI, H.; SELLAMI, A.; MAKNI, F.; AYADI, A. A review of molecular techniques to type *Candida glabrata* isolates. **Mycoses**. epub, 2009.
- ALANI, E.; CAO, L.; KLECKNER, N. A method for gene disruption that allows repeated use of URA3 selection in the construction of multiply disrupted yeast strains. **Genetics**. V. 116, p. 541-545, 1987.
- ALDERTON, A. J.; BURR, I.; MUHLSCHLEGEL, F. A.; TUIITE, M. F. Zeocin resistance as a dominant selective marker for transformation and targeted gene deletions in *Candida glabrata*. **Mycoses**, v. 49, p. 445-451, 2006.
- AQUINO, A. C. M. M. et al. Characterization of an acid trehalase produced by the thermotolerant fungus *Rhizopus microsporus* var. *Rhizopodiformis*: Biochemical properties and immunohistochemical localisation. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 254, p. 169-175, 2005.
- AUSUBEL, F. M. et al. **Short protocols in molecular biology**. Greene Publishing Associates, John Wiley & Sons. NY, 1995.
- AVONCE, N.; MENDOZA-VARGAS, A.; MORETT, E.; ITURRIAGA, G. Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. **BMC Evol. Biol.**, v. 109, p. 1-15, 2006.
- BADDLEY, J.W.; SMITH, A.M.; MOSER, S.A.; PAPPAS, P. G. Trends in frequency and susceptibilities of *Candida glabrata* bloodstream isolates at a University Hospital. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 39, p. 199-201, 2001.
- BASU, A. et al. Extracellular trehalose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochim, Biophys Acta**. v. 1760, p. 134-140, 2005.
- BATES, P.A.; STERNBERG, M.J.E. **Model Building by Comparison at CASP3: Using Expert Knowledge and Computer Automation**. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, v. 3, p. 47-54, 1999.

- BATISTA, A.S.; MILETTI, L.C.; STAMBUK, B.U. Sucrose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* lacking hexose transport. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol**, v. 8, p. 26-33, 2004.
- BELL, W., SUN, W.; HOHMANN, S.; WERA, S.; REINDERS, A.; DE VIRGILIO, C. WIEMKEN, A.; THEVELEIN, J. M. Composition and functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* trehalose synthase complex. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 33311-19, 1998.
- BERILA, N.; BORECKA, S.; DZUGASOVA, V.; BOJNANSKY, J.; SUBIK J. Mutations in the CgPDR1 and CgERG11 genes in azole-resistant *Candida glabrata* clinical isolates from Slovakia. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 33, p. 574-578, 2009.
- BIALKOVA, A.; SUBIK, J. Biology of the pathogenic yeast *Candida glabrata*. **Folia Microbiol. (Praha)**, v. 51, p. 3-20, 2006.
- BLOMBERG, A. Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to saline conditions: questions, some answers, and a model. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 182, p. 1-8, 2000.
- BUTLER, G. et al. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. **Nature**, v.459, p. 657-662, 2009
- CALCAGNO, A. M. et al. *Candida glabrata* STE12 is required for wild-type levels of virulence and nitrogen starvation induced filamentation. **Mol. Microbiol.**, v.50, p. 1309-1318, 2003.
- CAO, Y. Y., et al. Trehalose is an important mediator of Cap1p oxidative stress response in *Candida albicans*. **Biol. Pharm. Bull.** v. 31, p. 421-425, 2008.
- CARLSON, M. Glucose repression in yeast. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 2, p. 202-207, 1999.

- CASTAÑO, I., et al. Telomere length control and transcriptional regulation of subtelomeric adhesins in *Candida glabrata*. **Mol. Microbiol.**,v.55, p.1246-1258, 2005.
- CHEN, Y. C. et al. Identification of medically important yeast using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 2302-10, 2000.
- CHRISTIANSON, T. W.; SIKORSKI, R.S.; DANTE, M.; SHERO, J.H.; HIETER, P. Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. **Gene**, v. 110, p. 119-122, 1992.
- COLAÇO, C.; SEN, S.; THANGEVALU, M.; PINDER, S. ROSER, B. Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology. **Biotechnol.**, v. 10, p. 1007-1011, 1992.
- COLOMBO, A. L. et al. Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers. **J. Clin. Microbiol**, v.44, p. 2816-2823, 2006.
- CORMACK, B.P., GHORI, N.; FALKOW, S. An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. **Science**, v.285, p. 578-582,1999
- CORMACK, B.P.; FALKOW, S. Efficient homologous and illegitimate recombination in the opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata*. **Genetics**, v. 151, p. 979-987, 1999.
- COUTINHO, C. et al. Trehalose as cryoprotectant for preservation of yeast strains. **J. Biotechnol.**, v.7, p. 23-32, 1988
- DASSANAYAKE, R. S.; SAMARANAYAKE, L. P. Amplification-based nucleic acid scanning techniques to assess genetic polymorphism in *Candida*. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 29, p 1-24, 2003

- de GROOT, P. W. et al. The cell wall of the human pathogen *Candida glabrata*: differential incorporation of novel adhesion-like wall proteins. **Eukaryot. Cell**, v. 7, p. 1951-1964, 2008.
- DUJON, B. et al. Genome evolution in yeast. **Nature**, v. 430, p. 35-44, 2004.
- DUJON, B. Yeasts illustrate the molecular mechanisms of eukaryotic genome evolution. **Trends Genet.**, v. 22, p. 375-387, 2006.
- EDLIND, T.D.; HENRY, K.W.; VERMITSKY, J.P.; EDLIND, M.P.; RAJ, S.; KATIYAR, S.K. Promoter-dependent disruption of genes: simple, rapid, and specific PCR-based method with application to three different yeast. **Curr. Genet.**, v. 48, p. 117-125, 2005.
- EGLOFF, M.P.; UPPENBERG, J.; HAALCK, L.; van TILBEURGH, H. Crystal structure of Maltose Phosphorylase from *Lactobacillus brevis*: Unexpected Evolutionary Relationship with Glucoamylases. **Structure**, v. 9, p. 689-697, 2001.
- ELBEIN, A. D. The metabolism of α,α -trehalose. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, v. 30, p. 227-256, 1974.
- ELBEIN, A. D. et al. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. **Glycobiol.**, v. 13, p. 17-27, 2003.
- ESTRUCH, F. Stress-controlled transcription factors stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 24, p. 469-486, 2000.
- FERRARI, S. et al. Gain of function mutations in CgPDR1 of *Candida glabrata* not only mediate antifungal resistance but also enhance virulence. **PLoS Pathog.**, v. 5, 2009.

- FARIA, T.Q.; MINGOTE, A.; SIOPA, F.; VENTURA, R.; MAYCOCK, C.; SANTOS, H. Design of new enzymes stabilizers inspired by glycosides of hypertermophilic microorganisms. **Carbohydr. Res.**, v. 343, p. 3025-3033, 2008.
- FIDEL, P.L.; CUTRIGHT, J.L.; TAIT, L.; SOBEL, J.D. A murine model of *Candida glabrata* vaginitis. **J. Infect. Dis.**, v. 173, p. 425-431, 1996.
- FIDEL, P. L. et al. *Candida glabrata*, review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, p. 80-96, 2001.
- FISCHER, G. et al. Highly Variable Rates of Genome Rearrangements between Hemiascomycetous Yeast Lineages. **PLoS Genet.**, v.2, p. e32, 2006.
- FOSTER, A.J.; JENKINSON, J.M.; TALBOT, N.J. Trehalose synthesis and metabolism are required at different stages of plant infection by *Magnaporthe grisea*. **The EMBO Journal**, v. 22, p. 225-235, 2003.
- FREYDIERE, A. M.; PARANT, F.; NOEL-BARON, F.; CREPY, M.; TRENY., A.; RABERIN, H.; DAVIDSON, A.; ODDS, F.C. Identification of *Candida glabrata* by a 30-second trehalase test. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 3602-5, 2002.
- FREYDIERE, A. M.; ROBERT, R.; PLOTON, C.; MAROT-LEBLOND, A.; MONERAU, F.; VANDENESCH, F. Rapid identification of *Candida glabrata* with a new commercial test GLABRATA RTT. **J. Clin. Microbiol.**, v. 4, p. 3861-3, 2003.
- GANCEDO, J.M. Yeast carbon catabolite repression. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 62, p. 334-361, 1998.
- GANCEDO, C.; FLORES, C. L. The importance of a functional trehalose biosynthetic pathway for the life of yeasts and fungi. Mini Review. **FEMS Yeast Research**, v. 4, p. 351-359, 2004

- GARRE, E.; MATALLANA, E. The three trehalases Nth1p, Nth2p and Ath1p participate in the mobilization of intracellular trehalose required for recovery from saline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v. 155, p. 3092-3097, 2009.
- GARRE, E.; PEREZ-TORRADO, R.; GIMENO-ALCANIZ, J.V.; MATALLANA, E. Acid trehalase is involved in intracellular trehalose mobilization during postdiauxic growth and severe saline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Res.**, v. 9, p. 52-62, 2009.
- GBELSKA, Y.; KRIJGER, J.J.; BREUNIG, K.D. Evolution of gene families: the multidrug resistance transporter genes in five related yeas species. **FEMS Yeast Res.**, v. 6, p. 345-355, 2006.
- GELADE, R.; VAN DE VELDE, S.; VAN DJICK, P.; THEVELEIN, J.M. Multi-level response of the yeast genome to glucose. **Genome Biol.**, v. 4, 2003.
- GIETZ, R.D.; WOODS, R.A. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/ polyethylene glycol method. **Methods Enzymol.**, v. 350, p. 87-96, 2002.
- GOFFEAU, A. Drug resistance: the fight against fungi. **Nature**, v. 452, p. 541-542, 2008.
- GOLDSTEIN, A. L.; PAN, X.; McCUSKER, J. H. Heterogous URA 3MX cassetes for gene replacement in *Sccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 15, p. 507-511, 1999.
- GONZALEZ-PARRAGA, P.; SANCHEZ-FRESNEDA, R.; MARTINEZ-ESPARZA, M.; ARGUELLES, J.C. Stress responses in yeast: what rules apply? **Arch. Microbiol.**, v. 189, p. 293-296, 2008.
- HALME, A. et. Al. Genetic and epigenetic regulation of the FLO gene family generates cell-surface variation in yeast. **Cell.**, v. 116, p. 406-15, 2004.

- HE, S.; BYSTRICKY, K.; LEON, S.; FRANCOIS, J.M.; PARROU, J.L. The *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar acid trehalase is targeted at the cell surface for its physiological function. **FEBS J.**, v. 276, p. 5432-5446, 2009.
- HELMERHORST, E.J.; VENULEO, C.; BERI, A.; OPPENHEIM, F.G. *Candida glabrata* is unusual with respect to its resistance to cationic antifungal proteins. **Yeast**, v. 22, p. 705-714, 2005.
- HITTINGER, C. T.; ROKAS,A.; CAROL, S. B. Parallel inactivation of multiple GAL pathway genes and ecological diversification in yeasts. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 101, p. 14144-9, 2004.
- HOHMANN, S. Osmotic adaptation in yeast – control of the yeast osmolyte system. **Int. Rev. Cytol.**, v. 215, p. 149-187, 2002.
- HUANG, J. et al. The transmembrane Domain of Acid Trehalase Mediates Ubiquitin-independent Multivesicular Body Pathway Sorting. **Mol. Biol. Cell**, v.18, p.2511-2524,2007.
- HUSON, D.H.; RICHTER, D.C; RAUSCH, C.; DEZULIAN, T.; FRANZ, M.; RUPP, R. Dendroscope: An interactive viewer for large phylogenetic trees. **BMC Bioinformatics**, v. 8, 2007.
- ITURRIAGA, G.; SUAREZ, R.; NOVA-FRANCO, B. Trehalose metabolism: from osmoprotection to signaling. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 10, p. 3793-3810, 2009.
- JAIN, N.K.; ROY, I. Role of trehalose in moisture-induced aggregation of bovine serum albumin. **Eur J. Pharm Biopharm.**, v. 69, p. 824-834, 2008.
- JAMES, T. Y. et al. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. **Nature**, v. 443, p. 818-822, 2006.
- JULES, M. et al. Two distinct pathways for trehalose assimilation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.70, p.2771-78, 2004.

- JULES, M. et al. New insights into trehalose metabolism by *Saccharomyces cerevisiae*: NTH2 Encodes a Functional Cytosolic trehalase, and Deletion of TPS1 Reveals Ath1p-Dependent Trehalose Mobilization. **Appl. Environ. Microbiol. B.** v. 74, p.605-614, 2008.
- KAINO, T.; TAKAGI, H. Gene expression profiles and intracellular contents of stress protectants in *Saccharomyces cerevisiae* under ethanol and sorbitol stresses. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** V. 79, p. 273-283, 2008.
- KAMIYA, A. et al. Epidemiological study of *Candida* species in cutaneous candidiasis based on PCR using a primer mix specific for the DNA topoisomerase II gene. **J. Dermatol. Science**, v.37, p. 21-28, 2005.
- KHAN, Z.; MUSTAFA, A.S.; ALAM F.F. Real-time LightCycler polymerase chain reaction and melting temperature analysis for identification of clinically important *Candida* spp. **J. Microbiol. Immunol Infect.**, v. 42, p. 290-295, 2009.
- KAUR, R. et al. A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 8, p. 378-84, 2005.
- KAUR, R.; MA, B.; CORMACK, B.P. A family of glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl proteases is required for virulence of *Candida glabrata*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 104, p. 7628-7633, 2007.
- KINGSBURY, J.M.; GOLDSTEIN, A.L.; McCUSCKER, J.H. Nitrogen and Carbon Transport, Regulation and Metabolism Genes for *Saccharomyces cerevisiae* survival in vivo. **Eukar. Cell**, v. 5, p. 816-824, 2006.
- KOPP, M., MÜLLER, H.; HOLZER, H. Molecular analysis of neutral trehalase gene from *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 4766-4774, 1993.

- LONGTINE, M. S. et al. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast.**, v.14, p. 953-61, 1998.
- LOPEZ, J.; DALLE, F.; MANTELIN, P.; MOIROUX, P.; NIERLICH, A.P.; CUISENIER, B.; VAGNER, O.; BONNIN, A. Rapid identification of *Candida glabrata* based on trehalose and sucrose assimilation using Rosco Diagnostic Tablets. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 1172-4, 2001.
- MAHMUD, S.A.; NAGAHISA, K.; HIRASAWA, T.; YOSHIKAWA, K.; ASHITANI, K.; SHIMIZU, H. Effect of trehalose accumulation on response to saline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 26, p. 17-30, 2009.
- MAIDAN, M.M.; DE ROP, L.; RELLOSO, M.; DIEZ-OREJAS, R.; THEVELEIN, J.M.; VAN DJICK, P. Combined inactivation of the *Candida albicans* GPR1 and TPS2 genes results in avirulence in a mouse model for systemic infection. **Infect. Immun.**, v. 76, p. 1686-1694, 2008.
- MALUTTA, E. F.; DECKER, P.; STAMBUK, B.U. The Kluyver effect for trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Basic Microbiol.**, v. 40, p. 199-205, 2000.
- MONK, B.C.; GOFFEAU, A. Outwitting multidrug resistance to antifungals. **Science**, v. 321, p. 367-369, 2008.;
- MORAN, C.; GRUSSEMEYER, C.A.; SPALDING, J.R.; BENJAMIN, D.K.; REED, S.D. Comparison of costs, length of stay, and mortality associated with *Candida glabrata* and *Candida albicans* bloodstream infections. **Am. J. Infect. Control**, epub, 2009.
- MORSCHSAUSER, J. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. **Fungal Genet. Biol.**, epub, 2009

- MOURET, J. R.; JACOBSEN, J. N.; GUILLOUET, S. E. Kinetic analysis of a trehalase-overexpressing strain grown on trehalose: a new tool for respiro-fermentative transition studies in *Saccharomyces cerevisiae*. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.42, p. 363-8, 2006.
- MULLER, H. et al. Genomic polymorphism in the population of **Candida glabrata**: gene copy number variation and chromosomal translocations. **Fungal Genet. Biol.**, v. 46, p. 264-276, 2009.
- MURRAY, M.P.; ZINCHUK, R.; LARONE, D.H. CHROMagar Candida as the sole primary medium for isolation of yeast and as a source medium for the Rapid-Assimilation-of Trehalose Test. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p.1210-12, 2005.
- NASCIMENTO, A. et al. Species distribution and susceptibility of Candida species in a Brazilian public tertiary hospital. **BMC Research Notes**, v. 3, p.1, 2010.
- NERY, D. C. M. et al. The role of trehalose and its transporter in protection against reactive oxygen species. **Biochem. Biophys. Acta**, 2008.
- NIKOLAOU, E.; AGRAFIOTI, I.; STUMPF, M.; QUINN, J.; STANSFIELD, I.; BROWN, A.J. Phylogenetic diversity of stress signalling pathways in fungi. **BMC Evol Biol.**, v. 9, 2009.
- NWAKA, S. et al. Phenotypic features of trehalase mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett.**, v. 360, p. 286-290, 1996.
- NWAKA, S.; MECHLER, B.; HOLZER, H. Deletion of the ATH1 gene in *Saccharomyces cerevisiae* prevents growth on trehalose. **FEBS Lett.**, v. 386, p. 235-238, 1996.
- NWAKA S, HOLZER H. Molecular biology of trehalose and the trehalases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.**, v. 58, p. 197-237, 1998.

- OCÓN, A.; HAMPP, R.; REQUENA, N. Trehalose turnover during abiotic stress in arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytol.**, v. 174, p. 879-891, 2007.
- PAIN, A.; BENTLEY, S.; PARKHILL, J. Eukaryotes: not beyond compare. **Nat. Reviews Microbiol.**, v. 2, p. 856-858, 2004.
- PANACKAL, A. A. et al. Clinical significance of azole antifungal drug cross-resistance in *Candida glabrata*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, p. 1740-3, 2006.
- PARROU, J.L.; TESTE, M.A.; FRANCOIS, J. Effects of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic evidence for a stress-induced recycling of glycogen and trehalose. **Microbiology**, v. 143, p. 1891-1900, 1997.
- PARROU, J. L.; JULES, M.; BELTRAN, G., FRANÇOIS, J. Acid trehalase in yeast and filamentous fungi: localization, regulation and physiological function. **FEMS Yeast Res.**, v.5, p. 503-511, 2005.
- PAUL, M.J.; PRIMAVESI, L.F.; JHURREEA, D.; ZHANG, Y. Trehalose metabolism and signaling. **Annu .Rev. Plant Biol.**, v. 59, p. 417-441, 2008.
- PEDREÑO, Y.; GIMENO-ALCANIZ, J.V.; MATAALLANA, E.; ARGUELLES, J.C. Response to oxidative stress caused by H₂O₂ in *Saccharomyces cerevisiae* mutants deficient in trehalase genes. **Arch. Microbiol.**, v. 177, p. 494-499, 2002.
- PEDREÑO, Y. et al. The ATC1 gene encodes a cell wall-linked acid trehalase required for growth on trehalose in *Candida albicans*. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 40852-40860, 2004.
- PEDREÑO, Y. et al. Disruption of the *Candida albicans* ATC1 gene encoding a cell-linked acid trehalase decreases hypha formation and infectivity without affecting resistance to oxidative stress. **Microbiology**, v. 153, p. 1372-81, 2007.

- PELTROCHE-LLACSAHUANGA, H.; SCHNITZLER, N.; LUTTICKEN, R.; HAASE G. Rapid identification of *Candida glabrata* by using a dipstick to detect trehalase-generated glucose. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 202-5, 1999.
- PERSON, B.M.; HERNANDO, Y.; SCHWEIZER, M. Construction of PCR-ligated long flanking homology cassettes for use in the functional analysis of six unknown open reading frames from the left and right arms of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome XV. **Yeast**, v. 14, p. 391-399, 1998.
- PETRACEK, M.E.; LONGTINE, M.S. PCR-based engineering of yeast genome. **Methods Enzymol.**, v. 350, p. 445-469, 2002.
- PETTER, R.; KWON-CHUNG, K.J. Disruption of the *SNF1* gene abolishes trehalose utilization in the pathogenic yeast *Candida glabrata*. *Infect. Immun.*, v. 64, p. 5269-5273, 1996.
- PETZOLD, E. W. et al. Characterization and Regulation of the Trehalose Synthesis Pathway and Its Importance in the Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. **Inf. Immun.**, v.74, p.5877-5887, 2006.
- PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 20, p. 133-163, 2007.
- POLAKOVA, S. et al. Formation of new chromosomes as a virulence mechanism in yeast *Candida glabrata*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 106, p. 2688-2693, 2009.
- REUSS, O.; VIK, A.; KOTTER, R.; MORSCHAUSER, J. The *SAT1* flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*. **Gene**, v. 341, p. 119-127, 2004.
- ROBZYK, K.; KASSIR, Y. A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast. **Nucleic Acids Res.**, v. 20, p. 3790, 1992.

- ROETZER, A. et al. *Candida glabrata* environmental stress response involves *Saccharomyces cerevisiae* Msn2/4 orthologous transcription factors. **Mol. Microbiol.**, v. 69, p. 603-620, 2008.
- ROLIM, M. F. et al. Shared control of maltose and trehalose utilization in *Candida utilis*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 36, p. 839-837, 2003.
- ROLLAND, F.; WINDERICKX, J.; THEVELEIN, J.M. Glucose-sensing and signaling mechanisms in yeast. **FEMS Yeast Res.**, v. 2, p. 183-201, 2002.
- ROSER B. J. Trehalose, a new approach to premium dried foods. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 2, p. 166-169, 1991.
- RUHNKE, M. Epidemiology of *Candida albicans* infections and role of non-*Candida-albicans* yeasts. **Curr. Drug. Targets.**, v. 7, p. 495-504, 2006.
- SAIJO, T. et al. Skn7p is involved in oxidative stress response and virulence of *Candida glabrata*. *Mycopathologia*, v. 169, p. 81-90, 2010.
- SAN MIGUEL, P.F.; ARGUELLES, J.C. Differential changes in the activity of cytosolic and vacuolar trehalases along the growth cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1200, p. 155-160, 1994.
- SANCHEZ-FRESNEDA, R. et al. On the biochemical classification of yeast trehalases: *Candida albicans* contains two enzymes with mixed features of neutral and acid trehalase activities. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 383, p. 98-102, 2009.
- SCANNEL, D. R. et al. Multiple rounds of speciation associated with reciprocal gene loss in polyploid yeasts. **Nature.**, v. 440, P. 341-5, 2006.
- SCHNEPER, L.; DUVEL, K.; BROACH, J.R. Sense and sensibility: nutritional response and signal integration in yeast. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 7, p. 624-630, 2004.

- SEGAL, E. Candida, still number one – what we know and where are we going from there? **Mycoses**, v. 48, 2005.
- SENDID, B. et al. Candidaemia and antifungal therapy in a French University Hospital: rough trends over a decade and possible links. **BMC Infect. Dis.**, v. 6, p. 80, 2006
- SILVEIRA, M.C.F.; CARVAJAL, E.; BON, E. P. S. Assay for in vivo yeast invertase activity using NaF. **Anal. Biochem.**, v. 238, p. 26-28, 1996.
- SINGER, M. A.; LINDQUIST, S. Thermo tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. **Tibtech. Rev.**, v. 16, p. 460-8, 1998.
- THAKUR, J.K. et al. A nuclear receptor-like pathway regulating multidrug resistance in fungi. **Nature**, v. 452, p. 604-609, 2008.
- THEVELEIN, J. M. Regulation of trehalose mobilization in fungi. **Microbiol. Rev.**, v. 48, p.42-59, 1984.
- THEVELEIN, J. M. Regulation of trehalase activity by phosphorylation-dephosphorylation during developmental transitions in fungi. **Exp. Mycol.**, v.12, p.1-12, 1988.
- THEVELEIN, J. M.; HOHMANN, S. Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast? **Trends Biochem. Sci.**, v.20, p.3-10, 1995.
- THIERRY, A.; DUJON, B.; RICHARD, G.F. Megasatellites: a new class of large tandem repeats discovered in the pathogenic yeast *Candida glabrata*. **Cell Mol. Life Sci.**, epub, 2009.
- TRAINOTTI, N. & STAMBUK, B. U. NaCl stress inhibits maltose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotech. Letters**. v. 23, p. 1703-1707, 2001.

- TSAI, H. F. et al. *Candida glabrata* PDR1, a transcriptional regulator of a pleiotropic drug resistance network, mediates azole resistance in clinical isolates and petite mutants. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 50, p.1384-92, 2006
- VAN DIJCK, P.; COVALIZZA, D.; SMET, P.; THEVELEIN, J.M. Differential importance of trehalose in stress resistance in fermenting and nonfermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 6, p. 109-115, 1995.
- VAN DIJCK, P.; DE ROP L.; SZLUFCHIK, K.; VAN AEL, E.; THEVELEIN, J.M. Disruption of the *Candida albicans* TPS2 gene encoding trehalose-6-phosphate phosphatase decreases infectivity without affecting hypha formation. **Infec. Immun.**, v. 70, p. 1772-1782, 2002
- VERMITSKY, J.P. et al. Pdr1 regulates multidrug resistance in *Candida glabrata*: gene disruption and genome-wide expression studies. **Mol. Microbiol.**, v. 61, p. 704-722, 2006.
- VERSTREPEN, K. J.; REYNOLDS, T. B.; FINK, G. R. Origins of variation in the fungal cell surface. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 533-40, 2004.
- VERSTREPEN, K. J. et al. Intragenic tandem repeats generate functional variability. **Nat. Genet.**, v. 37, p. 986-90, 2005.
- VERSTREPEN, K.J.; KLIS, F. M. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. **Mol. Microbiol.**, v. 60, p. 5-15, 2006.
- WELLS, C. L. et al. *Candida glabrata* colonizes but does not often disseminate from the mouse caecum. **J. Med. Microbiol.**, v. 56, p.688-693, 2007.
- WILLINS, D.A.; SHIMER, G.H.; COTTAREL, G. A system for deletion and complementation of *Candida glabrata* genes amenable to high-throughput application. **Gene**, v. 292, p. 141-149, 2002.

- WOLFE, K. H. Comparative genomics and genome evolution in yeasts. **Philos Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 361, p.403-12, 2006.
- YIN, Z. et al. Glucose triggers different global responses in yeast, depending on the strength of the signal, and transiently stabilizes ribosomal protein mRNAs. **Mol. Microbiol.**, v. 48, p. 713-724, 2003.
- ZAHRINGER, H.; THEVELEIN, J.M.; NWAKA, S. Induction of neutral trehalase Nth1 by heat and osmotic stress is controlled by STRE elements and Msn2/Msn4 transcription factors: variations of PKA effect during stress and growth. **Mol. Microbiol.**, v. 35, p. 397-406, 2000.
- ZAMAN, S.; LIPPMAN, S.I.; ZHAO, X.; BROACH, J.R. How *Saccharomyces* responds to nutrients. **Annu. Rev. Genet.**, v. 42, p. 27-81, 2008.
- ZARAGOZA, O.; BLAZQUES, M.A.; GANCEDO, C. Disruption of the *Candida albicans* TPS1 gene encoding trehalose-6-phosphate synthase impairs formation of hypha and decreases infectivity. **J. Bacteriol.**, v.180, p. 3809-3815, 1998.
- ZARAGOZA, O. et al. Disruption in *Candida albicans* of the TPS2 gene encoding trehalose-6-phosphate phosphatase affects cell integrity and decreases infectivity. **Microbiol.**, v.148, p.1281-1290, 2002.
- ZARAGOZA, O. Generation of disruption cassettes in vivo using PCR product and *Sacharomyces cerevisiae*. **J. Microbiol. Methods**, v. 52, p. 141-145, 2003.
- ZHAO, H. et al. Identification of an Extracellular Acid Trehalase and Its Gene Involved in Fungal Pathogenesis of *Metarhizium anisopliae*. **J. Biochem.**, v. 140, p.319-327, 2006.
- ZILLI, D. M. W. **Catabolismo da trealose extracelular e caracterização bioquímica da trealase ácida de *Candida glabrata***, 2006, 93 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.