

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA MANUTENÇÃO DA HOMEOSTASE DE COBRE NO PATÓGENO HUMANO *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS*****RODRIGO DA SILVA SANTOS**

**Endereço atual/Current address:** Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Campus II, Caixa Postal 131, Goiânia, 74001-970, Goiás, Brasil/Laboratory of Molecular Biology, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Goiás, Campus II, PO Box 131, Goiânia, 74001-970, Goiás, Brazil; e-mail: rdssantos@gmail.com

**Dissertação de Mestrado/Master Dissertation:** Programa de Pós-Graduação de Biologia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil/Postgraduate Program in Biology, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 74001-970, Goiás, Brazil

**Defendida/Defended:** 30.V.2009

**Autores colaboradores/Contributing authors:** Alexandre Melo Bailão e Mônica Santiago Barbosa, Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás; George S. Deepe Jr., Faculdade de Medicina, University of Cincinnati, Cincinnati, Ohio, Estados Unidos/Alexandre Melo Bailão and Mônica Santiago Barbosa, Laboratory of Molecular Biology, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Goiás; George S. Deepe Jr., College of Medicine, University of Cincinnati, Cincinnati, Ohio, USA

**Orientadora/Advisor:** Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil/Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil

**RESUMO:** O fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, um patógeno humano com ampla distribuição na América Latina, causa a paracoccidioidomicose quando propágulos da fase miceliana atingem os pulmões do hospedeiro. O sucesso da infecção depende da aquisição de micronutrientes essenciais como o cobre, o qual é requerido como cofator por uma diversidade de enzimas importantes em processos biológicos essenciais, tais como respiração, crescimento e aquisição de ferro. Estudos prévios demonstraram que um transportador de cobre de alta afinidade (PbCTR3) é uma molécula altamente expressa e provavelmente necessária para o estabelecimento da infecção por *P. brasiliensis*. No presente estudo, foram isoladas e caracterizadas as sequências genômica e do cDNA que codificam para PbCTR3 deste patógeno. O cDNA apresenta 582 pares de bases e codifica para uma proteína com 193 aminoácidos, com massa molecular predita de 21,5 kDa e pI 8.6. A sequência genômica apresenta quatro exons interrompidos por três íntrons. Análises *in silico* foram realizadas no banco de dados do genoma estrutural de *P. brasiliensis*, no qual genes envolvidos na manutenção da homeostase de cobre foram identificados e utilizados para a elaboração de um modelo de fatores envolvidos neste processo em *P. brasiliensis*. O comportamento transcricional do gene *Pbctr3* e de genes envolvidos na manutenção da homeostase de cobre foram analisados por qRT-PCR em tempo real durante a exposição de células leveduriformes de *P. brasiliensis* à depleção de cobre e ferro. Foi demonstrada alteração significativa no nível de transcrição dos genes na ausência de cobre assim como na ausência combinada dos dois metais. qRT-PCR em tempo real foi utilizado para analisar, em diferentes tempos, a expressão de *Pbctr3* e de *Pbcrp*, que codifica uma proteína responsiva ao cobre, em células leveduriformes de *P. brasiliensis* derivadas de pulmão e baço infectados. A expressão de *Pbctr3* e *Pbcrp* foi super-regulada durante a infecção experimental. Tomados em

conjunto, esses resultados sugerem a importância de *Pbctr3* e do sistema de absorção cobre/ferro durante o processo infeccioso deste patógeno.

**PALAVRAS-CHAVE:** Cobre, expressão gênica e infecção, *Paracoccidioides brasiliensis*.

**ANALYSIS OF THE EXPRESSION OF THE GENES INVOLVED IN THE MAINTENANCE OF COPPER HOMEOSTASIS IN THE HUMAN PATHOGEN *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS***

**ABSTRACT:** The fungus *Paracoccidioides brasiliensis*, a human pathogen widely distributed in Latin America, causes paracoccidioidomycosis when its mycelia reaches the host lungs. The success of this infection depends on the acquisition of essential micronutrients such as copper, which is required as a cofactor by a variety of enzymes that are important in essential biological processes, such as respiration, growth, and iron acquisition. Previous studies had shown that a high affinity copper transporter (*PbCTR3*) is a highly expressed molecule that is probably necessary for the establishment of *P. brasiliensis* infection. In the present study we isolated and characterized the genomic and cDNA sequences coding for *PbCTR3* of this pathogen. The cDNA presents 582 base pairs and codes for a protein with 193 amino acids, with predicted molecular mass of 21.5 kDa and pI 8.6. The genomic sequence presents four exons interrupted by three introns. *In silico* analyses were performed in the database of the structural genome of *P. brasiliensis*, in which genes involved in the maintenance of copper homeostasis were identified and used to design a model of the factors involved in this process in *P. brasiliensis*. The transcriptional behavior of the gene *Pbctr3* and the genes involved in the maintenance of copper homeostasis were analyzed by real time qRT-PCR during exposure of yeast cells of *P. brasiliensis* to copper and iron depletion. We demonstrated a significant change in the transcription level of the genes in the absence of copper as well as in the absence of both metals. qRT-PCR was used to analyze, at different times, the expression of *Pbctr3* and *Pbcrp*, which codes a protein responsive to copper, in yeast cells of *P. brasiliensis* derived from infected lungs and spleen. The expression of *Pbctr3* and *Pbcrp* was super-regulated during the experimental infection. Taken together, these results suggest the importance of *PbCtr3* and the system of copper/iron absorption during the infection process of this pathogen.

**KEY WORDS:** Copper, gene expression and infection, *Paracoccidioides brasiliensis*.