

Universidade de Brasília
Instituto de Biologia
Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular

Expandindo o estudo genético de *Fonsecaea pedrosoi*: O uso de marcadores e transformação biobalística para inativação do gene de triptofano sintase (*trpB*)

Expanding the Toolbox for Functional Genomics in *Fonsecaea pedrosoi*: The Use of Split-Marker and Biolistic Transformation for Inactivation of Tryptophan Synthase (*trpB*) Gene

Luísa Dan Favilla

Brasília

2023

Universidade de Brasília
Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular

Expandindo o estudo genético de *Fonsecaea pedrosoi*: O uso de marcadores e transformação biobalística para inativação do gene de triptofano sintase (*trpB*).

Expanding the Toolbox for Functional Genomics in *Fonsecaea pedrosoi*: The Use of Split-Marker and Biolistic Transformation for Inactivation of Tryptophan Synthase (*trpB*) Gene

Dissertação de Mestrado apresentado
para obtenção do título de Mestre
no programa de pós-graduação
de Biologia Molecular
– Instituto de Biologia
– Universidade de Brasília

AUTORA: LUÍSA DAN FAVILLA

ORIENTADORA: ANAMÉLIA LORENZETTI BOCCA

Brasília

2023

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a minha família, em especial os meus pais que sempre me proveram tudo o que eu precisava, e me aguentaram por muitas noites chegando em casa exausta depois de longos dias no laboratório.

Agradeço imensamente as minhas melhores amigas Andressa e Laura, e seus companheiros Helena e Pedro, quem eu sei que são pessoas com quem eu sempre posso contar.

Aos amigos que o curso de Biologia me deu: Carolina, Hannah, Helena, Juliana, Lara, Letícia Marcus, Rodrigo, Dora, Thiago e Yasmin, pelos momentos de descontração e pelo companheirismo partilhado pela vida acadêmica.

Aos meus amigos do Discord, com quem posso relaxar, falar besteira e jogar.

Ao Victor por ter me ajudado a organizar as fotos das minhas placas.

A minha orientadora, Anamélia Lorezenti Bocca, por sempre ser tão compreensiva.

A professora Larissa Fernandes Matos, por ter aceitado me orientar no PIBIC, ainda na graduação, e por ter me ensinado tanto no laboratório.

A todos os membros do laboratório, pelos almoços, fofocas e cafezinhos pós almoço que certamente duravam mais tempo do que deveriam.

A Luísa, Thaís e Tatiana por todo o suporte em meus experimentos, e por serem pessoas incríveis com quem posso desabafar; em especial a minha xará com quem estou a maioria do tempo no laboratório, trabalhando, brincando e brigando (um dia teremos nossos 5 minutos de porrada).

Aos pós doutorandos Clara e Pedro, pelas piadas de gosto duvidoso e pelo suporte.

Ao Rafael por ser um ponto de apoio de todo o laboratório, e por ter me ajudado com as análises estatísticas e experimentos.

Ao meu companheiro, Gabriel, por toda ajuda emocional e na escrita, que foi imensamente importante para terminar essa dissertação.

E por último, mas não menos importante, agradeço a Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação Universidade de Brasília (FUB), por ter financiado esse projeto e minha bolsa de mestrado, tornando a sua conclusão possível.

Sumário

1. Introdução	1
2. Objetivos	6
3. Justificativa	7
4. Materiais e Métodos	8
4.1 Condições de Cultivo das Linhagens de <i>F. pedrosoi</i>	8
4.2 Pesquisa <i>In Silico</i> das Enzimas Relacionadas à Biossíntese de Triptofano em <i>F. pedrosoi</i> e Avaliação da Expressão do Gene <i>trp</i>	8
4.3 Construção do Cassete de Deleção <i>trpB</i> por PCR de Dupla Junta (DJ-PCR)	9
4.4 Transformação biobalística e seleção de mutantes de <i>trpB</i> por meio seletivo	10
4.5 Avaliação da Estabilidade Mitótica dos Mutantes de <i>trpB</i> por meio Seletivo	11
4.6 Extração de DNA	11
4.7 Confirmação por PCR da Deleção de <i>trpB</i>	12
4.8 <i>Southern Blot</i>	12
4.9 Avaliação da Concentração de Triptofano Requerida para o Crescimento de $\Delta trpB$	12
4.10 Medida de Crescimento do Diâmetro das Colônias	12
4.11 Quantificação da Taxa de Germinação	13
4.12 Quantificação de CFU ou UFC (Unidades Formadoras de Colônias)	13
4.13 Determinação da Concentração de Ácido 5-Fluoroantrálico (5-FAA) para Seleção de <i>trp</i> ⁻ ... Contra Seleção de <i>trp</i> ⁺	13
4.14 Estratégia de reposição genômica	14
4.15 Análise Estatística	15
5. Resultados	16
5.1 Análise <i>In Silico</i> da Via Biossintética de Triptofano em <i>F. pedrosoi</i>	16
5.2 Estratégia e Confirmação da Disrupção do gene <i>trpB</i> em <i>F. pedrosoi</i>	22
5.3 Reconstituição do Gene de <i>trpB</i> na Cepa Mutante 2. Δ TrpB de <i>F. pedrosoi</i>	25
5.4 O Suprimento Externo de Triptofano é Necessário para o Crescimento do $\Delta trpB$ de <i>F. pedrosoi</i>	29
5.5 A Deleção de <i>trpB</i> Causa Retardo de Crescimento e Defeitos de Viabilidade em <i>F. pedrosoi</i> ...	30
5.6 A Deleção do Alelo de <i>trpB</i> Induz Resistência a 5-FAA em <i>F. pedrosoi</i>	35
6. Discussão	37
7. Conclusão	42

8. Referências	43
Anexo I Registro CIBio	51
Anexo II Artigo Publicado	52

Índice de figuras

Figura 1. Distribuição mundial de casos de Cromoblastomicose	2
Figura 2. Imagens da morfologia micro e macroscópica de <i>F. pedrosoi</i>	4
Figura 3. Estratégia para obtenção e confirmação do reconstituído do mutante <i>trpB</i> de <i>F. pedrosoi</i>	15
Figura 4. Via biosintética putativa de triptofano para <i>F. pedrosoi</i>	17
Figura 5. Domínios conservados de <i>F. pedrosoi</i> , enzimas necessárias para a biossíntese de triptofano	18
Figura 6. PCR em tempo real para avaliação da expressão dos genes da via biosintética de triptofano de <i>F. pedrosoi</i> : <i>trpB</i> , <i>trpC</i> , <i>trpD</i> e <i>trpE</i> . Em resposta a incubação em meio mínimo (Czapek Dox) por 3h a 28°C.	19
Figura 7. Múltiplos alinhamentos de sequências de triptofano sintase	21
Figura 8. Construção do cassete de deleção de <i>trpB</i> por DJ-PCR/Hyg ^R e estratégia do marcador de cisão.	22
Figura 9. Análise do fenótipo mutante após crescimento em meio seletivo	23
Figura 10. <i>F. pedrosoi</i> em meio seletivo para observação da estabilidade mitótica	23
Figura 11. PCR de confirmação da recombinação homóloga do cassete de deleção de <i>trpB</i>	24
Figura 12. Deleção de <i>trpB</i> por recombinação homóloga do marcador seletivo Hyg ^R e confirmação por Southern Blot.	25
Figura 13. Obtenção e confirmação do reconstituído do mutante <i>trpB</i> de <i>F. pedrosoi</i>	26
Figura 14. Estratégia para obtenção e confirmação do reconstituído do mutante <i>trpB</i> de <i>F. pedrosoi</i>	28
Figura 15. Crescimento em meios seletivos das linhagens de <i>F. pedrosoi</i> , escolhidas para testes de fenótipos.	29
Figura 16. Determinação da concentração mínima necessária para o crescimento do mutante de <i>trpB</i> de <i>F. Pedrosoi</i>	30
Figura 17. Crescimento do diâmetro das colônias de WT, $2.\Delta trpB$, $22.\Delta trpB+trpB$ e $25.\Delta trpB+trpB$	31
Figura 18. Porcentagem de germinação dos conídios em 24 e 48h.	33
Figura 19. Quantificação de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)	34
Figura 20. Deleção de <i>trpB</i> em <i>F. pedrosoi</i> induz resistência a 5-FAA	35

Figura 21. Avaliação do uso do 5-FAA na concentração de 0,5 mg/mL como agente 36
de seleção para mutantes *trp⁻*, e para contra seleção de cepas que apresentam via de síntese do
triptofano ativa, em alta densidade celular (5×10^5) de WT e $\Delta trpB$.

Índice de tabelas

Tabela 1. Oligonucleotídeos usados nesse trabalho **10**

Tabela 2. Genes da biossíntese de triptofano e funções proteicas putativas de *F. pedrosoi* em **16**
comparação a outros fungos.

Lista de Siglas e Abreviaturas

°C - Graus Celsius

5-FAA - Ácido 5-Fluoroantralínico

AMP^R - Marcador de resistência de Ampicilina

CBM – Cromoblastomicose

CD - Meio mínimo, Czapek Dox

CFU ou UFC – Colony Forming Units ou Unidades formadoras de colônias

DIG - Digoxigenina

DJ-PCR – PCR de dupla junta

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

EC – Enzyme Commission

EtOH - Álcool etílico

g - Gramas

GATase – N-terminal glutamina amidotransferase classe I

gDNA - DNA genômico

h - Horas

HygB - Higromicina B

Hyg^R - Marcador de resistência de Higromicina B

IGPS – indol-3-glicerolfosfato sintase

ISHAM - International Society for Human and Animal Mycology

Kb - Kilobases

LB – Meio para bactérias

L-trp - L-triptofano

M - Molar

Min - Minutos

MM - Micro molar

NaCl – Cloreto de Sódio

NaOAc - Ácido acético

NAT^R - Marcador de resistência de Nourseotricina

NCBI – National Center for Biotechnology Information

OMS - Organização Mundial da Saúde

ORF - Open Reading Frame

Pb - Pares de base

PCR - Reação em Cadeia de Polimerase

PD - Caldo batata dextrose (Difco)

PRAI – C-terminal fosforibosil-antranilato isomerase

RNA - Ácido Ribonucléico

RNase A – Ribonuclease A

Rpm - Rotações por minuto

SAB - Meio Sabouraud Dextrose

StuI - Enzima de restrição

TAE - Tampão Tris-Acetato-EDTA

TrpD – Antranilato fosforibosil transferase

U - Unidade

WT - Wild Type, Cepa selvagem

Resumo

A cromoblastomicose (CBM) é uma doença causada por vários fungos demáceos de diferentes gêneros, sendo que *Fonsecaea* o mais comum isolado clinicamente. Métodos de transformação genética foram descritos recentemente; no entanto, ferramentas moleculares para o estudo funcional de genes têm sido pouco relatadas para esses fungos. Neste trabalho, foi demonstrado que a deleção de genes e a geração do mutante por recombinação homóloga são possíveis para *Fonsecaea pedrosoi* pelo uso de duas abordagens: uso de PCR de dupla junta para construção de cassete, seguido pela entrega do marcador dividido por transformação biobalística. Por meio de análises *in silico*, identificamos que *F. pedrosoi* apresenta o aparato enzimático completo necessário para a biossíntese do triptofano (*trp*). O gene que codifica uma triptofano sintase *trpB* – que converte o indole 3 glicerol fosfato e a serina em triptofano – foi interrompido. O mutante auxotrófico $\Delta trpB$ pode crescer com suprimento externo de L-triptofano, mas a germinação, a viabilidade dos conídios e o crescimento radial são defeituosos em comparação com as cepas selvagens e reconstituídas. O uso de 5-FAA para seleção de fenótipos *trp* e para contra-seleção de cepas portadoras do gene *trp* também foi demonstrado. As ferramentas moleculares para o estudo funcional dos genes, aliadas às informações genéticas dos bancos de dados genômicos, aumentam significativamente nosso entendimento da biologia e da patogenicidade dos agentes causadores da CBM.

Palavras-chave: substituição gênica por recombinação homóloga; PCR de dupla junta; transformação por biobalística; mutante nulo; *trpB*; biossíntese de triptofano; *Fonsecaea*; cromoblastomicose

Abstract

Chromoblastomycosis (CBM) is a disease caused by several dematiaceous fungi from different genera, and *Fonsecaea* is the most common which has been clinically isolated. Genetic transformation methods have recently been described; however, molecular tools for the functional study of genes have been scarcely reported for those fungi. In this work, we demonstrated that gene deletion and generation of the null mutant by homologous recombination are achievable for *Fonsecaea pedrosoi* by the use of two approaches: use of double-joint PCR for cassette construction, followed by delivery of the split-marker by biolistic transformation. Through *in silico* analyses, we identified that *F. pedrosoi* presents the complete enzymatic apparatus required for tryptophan (trp) biosynthesis. The gene encoding a tryptophan synthase *trpB* — which converts indole 3 glicerol fosfate and serine in triptophan — was disrupted. The $\Delta trpB$ auxotrophic mutant can grow with external trp supply, but germination, viability of conidia, and radial growth are defective compared to the wild-type and reconstituted strains. The use of 5-FAA for selection of trp- phenotypes and for counter-selection of strains carrying the trp gene was also demonstrated. The molecular tools for the functional study of genes, allied to the genetic information from genomic databases, significantly boost our understanding of the biology and pathogenicity of CBM causative agents.

Keywords: gene replacement by homologous recombination; double-joint PCR; biolistic transformation; knockout mutant; *trpB*; tryptophan biosynthesis; Fonsecaea; chromoblastomycosis

1. Introdução

As doenças tropicais negligenciadas são uma categoria de enfermidades classificadas pela organização mundial da saúde (OMS) como mazelas endêmicas de climas tropicais ou subtropicais, que não possuem muito investimento para o seu tratamento e pesquisa pelos governos mundiais, por afetarem grupos de pessoas de menor poder político, como populações mais pobres e vulneráveis em todo o mundo, mas em especial em países subdesenvolvidos como os africanos, sulamericanos e asiáticos. [5] A cromoblastomicose (CBM) foi adicionada a esta lista em 2017, pela OMS [3]. A CBM é uma doença cosmopolita, já foi descrita em todos os continentes, com exceção da Antártida, tendo uma maior prevalência em países de clima tropical e subtropical [1,2,4], prosperando em regiões onde o acesso ao saneamento básico, água potável e assistência médica é escasso [5]. Autores citam em especial o Brasil, Venezuela, Costa Rica, México, África do Sul, Madagascar, Índia, China, Malásia, Austrália e Japão como regiões de alta incidência [1,2,4,5,10]. Ademais, há relatos em regiões de clima temperado como a Rússia, Finlândia, República Tcheca, Romênia e Polônia [4]. No entanto, a falta de centros de vigilância nacionais para essa doença torna impossível a aferição do verdadeiro impacto e incidência da CBM no mundo [5], e os melhores esforços que existem hoje para compilar as informações disponíveis sobre essa doença são as revisões da literatura existente.

Em um estudo avaliando a literatura disponível em um período de 106 anos, totalizando 7.740 pacientes, foi averiguado que a maioria dos casos relatados se encontram na América do Sul (2.619 casos), seguida pela África (1.875 casos), América Central e México (1.628 casos), Ásia (1.390 casos), Oceania (168 casos), Europa (35 casos) e Estados Unidos e Canadá (25 casos) [5] (Figura 1). Já foram feitas descrições de casos raros onde a CBM é associada a outras Doenças Tropicais Negligenciadas (NTD) (micetoma, hanseníase, filariose e leishmaniose) indicando a existência de áreas de co-endemismo, onde essas populações mais carentes são expostas a esses patógenos ambientais e possuem o agravante de serem grupos marginalizados, que sofrem com a desnutrição, más práticas de higiene e a falta de acesso a equipamentos de proteção individual em seu trabalho [5,8]. O Brasil é considerado uma região endêmica para várias micoses desta categoria (paracoccidiodomicose, doença de Jorge Lobo, micetoma e esporotricose) [4].

A CBM é observada em todos os estados brasileiros, com incidência estimada de um caso a cada 196 mil habitantes, contudo essa distribuição não é uniforme, em regiões hiperendêmicas essa prevalência é consideravelmente maior [10]. Dentre as áreas de maior abundância de casos pode se citar os estados do Pará, Rondônia e Amazônia (região Amazônica), Maranhão (Nordeste), Mato-Grosso (Centro-Oeste), Rio Grande do Sul e Paraná (Sul) [5]; O Rio de Janeiro é uma zona de baixa ocorrência de CBM [3]. Apesar do diagnóstico da CBM não necessitar de técnicas e instrumentos laboratoriais avançados e caros os sistemas de saúde em todo o mundo carecem de preparo e informação, negligenciando essa mazela, e tornando o tempo de diagnóstico muito longo, assim agravando a

possibilidade de tratamento e cura [5]. Se as lesões não forem diagnosticadas e tratadas, a cronicidade pode ser observada, levando à fibrose tecidual e comprometimento da circulação linfática; além disso, existe o risco da perda da capacidade funcional dos membros, desenvolvimento de tumores malignos da pele e infecções secundárias [1,2,5,12-14]. No Brasil, as micoses não possuem notificação compulsória, o que dificulta a análise da real incidência e impacto desta doença.

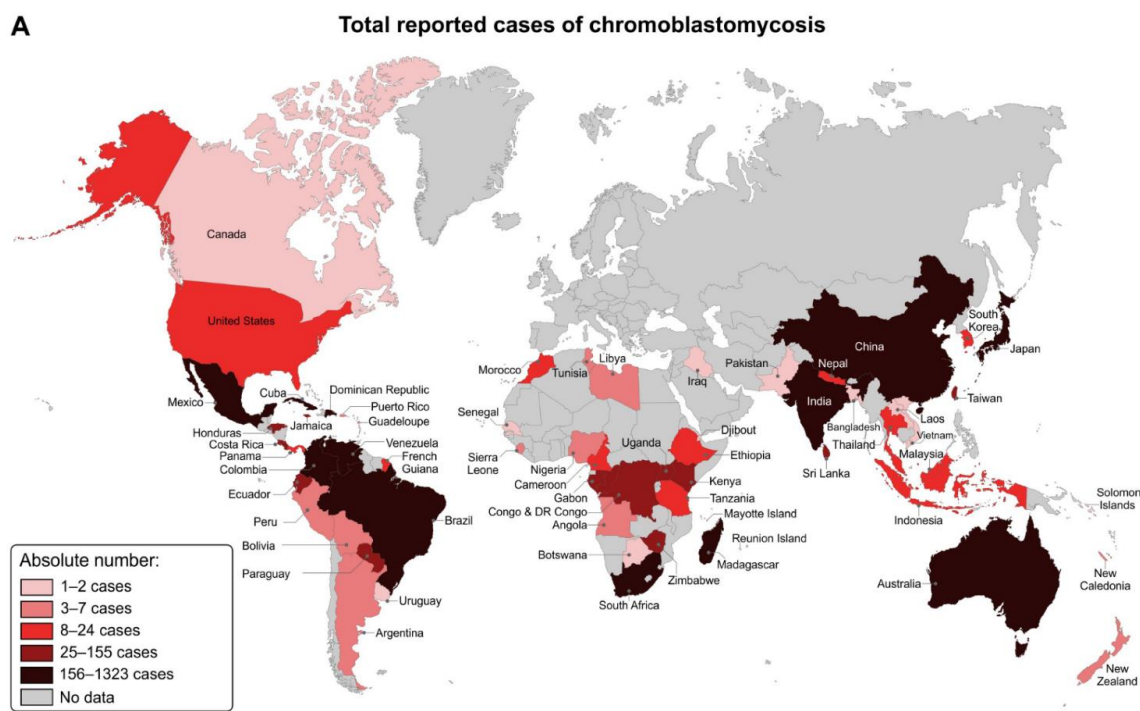


Figura 1. Distribuição mundial de casos de Cromoblastomicose. (A) Distribuição geográfica de casos de CBM no mundo, de um estudo analisando a literatura médica publicada entre 1914 e 2020, total de 7.740 pacientes. Retirado de Santos *et. al* (The global Burden of Chromoblastomycosis, 2021) [5]

A cromoblastomicose é uma micose subcutânea, crônica e progressiva causada por fungos melanizados [1-5, 10]. Seu primeiro caso publicado é datado de 1914, por um médico Alemão que residia no Brasil, Max Rudolph, ele descreve 6 casos da doença, a qual ele dá o nome de ‘figueira’, acometendo trabalhadores rurais da cidade de Estrela do Sul, Minas Gerais. [2, 4]. Em seus registros ele enfatiza o isolamento de uma cultura de fungo negro, encontrado na maioria dos seus pacientes. Pedroso e Gomes observaram casos anteriores de CBM em 1911, em São Paulo, porém eles só publicaram sobre esses 4 casos reportados em 1920, os quais eles atribuíram a causa ao organismo *Phialophora verrucosa*. Mais tarde foi constatado, por outro estudo, que o fungo pertencia a uma nova espécie chamada *Hormodendrum pedrosoi*, que foi renomeada para *Fonsecaea pedrosoi* por Negróni [4]. Em 1922, Terra e colaboradores cunharam o termo cromoblastomicose para se referir a doença, que

possuía muitos nomes, mas só setenta anos depois esse termo foi oficializado pela Sociedade Internacional de Micologia Humana e Animal (ISHAM), em 1992 [4].

Os agentes etiológicos predominantes da CBM mudam de uma região para outra; no entanto, *Fonsecaea pedrosoi* é considerada a mais prevalente em todo o mundo [3,6-11], seguido por *Cladophialophora carrionii* [2]; sendo o primeiro, o alvo de nosso estudo, um fungo que possui três conformações celulares, hifa, conídio e muriforme correspondendo as formas saprófita, reprodutiva e patológica, respectivamente. No Brasil os principais agentes são espécies do gênero *Fonsecaea* em especial nas áreas de floresta densa e úmida da região Amazônica [10], considerada o principal foco endêmico da CBM [1]. Os indivíduos são infectados muitas vezes em suas atividades de trabalho rurais, através de lesões transcutâneas que inoculam propágulos saprofíticos fúngicos (fragmentos de hifas e conídeos) no tecido humano [1,2,4]. A maioria das pessoas que contraem essa doença são adultos do gênero masculino [1,2,4,5,6,8], provavelmente pela maior incidência de homens exercendo trabalhos braçais no meio externo agrícola, sem uso de aparatos de proteção, e assim possuindo um maior fator de risco, além disso, é discutido o possível efeito inibitório dos hormônios femininos no crescimento fúngico [1]. O Maranhão é um ponto natural de cinco agentes etiológicos da doença, é sugerido que a colheita de cocos de babaçu (*Orbignya phalerata*) para a fabricação de produtos de beleza, atividade realizada por grande parte da população rural local, é responsável pelo grande quadro de infecções na região [10].

As lesões causadas por essa micose são polimórficas, podendo se assemelhar ao quadro clínico de diversas outras doenças [10], sendo os sintomas mais descritos a dor local e coceira. O diagnóstico de cromoblastomicose pode ser alcançado por uma simples análise histológica, onde se possa visualizar a presença de células muriformes [1,2,5]. A CBM é uma doença de difícil tratamento com progressão lenta, que desafia as terapias antifúngicas usuais levando a relapsos frequentes, visto que os agentes causadores não respondem bem aos medicamentos. Para contornar essas limitações, métodos físicos alternativos são necessários. [14] Até hoje não existe uma padronização terapêutica, muitas vezes são utilizadas uma combinação de técnicas; uso de antifúngicos, como o Intraconazol, e a remoção cirúrgica das lesões nas áreas afetadas pelo patógeno [2,3].

Fonsecaea pedrosoi é um ascomiceto pertencente da ordem Chaetothyriales [2, 4], ele é um fungo demácio, filamentosos, e suas três formas celulares são dependentes do ambiente. Seu nicho natural abrange o solo, madeira e vestígios de plantas em decomposição, no meio externo ele se apresenta em sua forma micelial, composta por hifas e conídios [1,3,8]. Connant foi o primeiro a demonstrar que os agentes da CBM existem na natureza, em 1937, posteriormente vários outros estudos confirmaram a presença desses patógenos no meio ambiente [4]. Embora *F. pedrosoi* seja encontrado geralmente em regiões de floresta úmidas de climas tropicais e subtropicais, nem todos os agentes

etiológicos da CBM possuem essa característica, a exemplo de *C. carrionii* que é predominante de climas semiáridos [2,4,8]. Dentro do tecido infectado, *F. pedrosoi* é capaz de diferenciar-se em células grandes, esféricas, septadas, altamente pigmentadas, de paredes espessas, e resistentes à resposta imune; denominadas células muriformes ou escleróticas [1-4,30-33]. Qualquer uma dessas formas fúngicas pode dar origem as outras, exceto a transição da conformação de muriformes para conídios [1]. Muitos são os fatores envolvidos nas modificações morfológicas desse fungo, incluindo temperatura, pH, condições aeróbicas e nutrientes disponíveis [1]. A transição dimórfica é provavelmente o principal evento morfogenético necessário para CBM; porém o mecanismo molecular e os fatores do hospedeiro que promovem a diferenciação celular ainda não estão claros [1,34].

Para patógenos humanos, a capacidade de infectar e induzir a doença depende da expressão de fatores de virulência e secreção de produtos metabólicos no tecido hospedeiro. O fator de virulência mais bem descrito nas espécies de *Fonsecaea* é a melanina [15-21]. Vários estudos relataram que este pigmento desempenha uma variedade de papéis nas interações patógeno-hospedeiro, melhorando sobrevivência e promovendo resistência à resposta imune [22-25]. Os mecanismos que *F. pedrosoi* usa para induzir e manter a reação inflamatória granulomatosa no hospedeiro ainda estão sob investigação [26-30]. Em cultura, as células escleróticas são difíceis de serem obtidas e os protocolos de crescimento são demorados e laboriosos, o que agrava ainda mais o seu estudo; felizmente novos métodos, mais simples e eficientes estão sendo desenvolvidos. O cultivo das outras formas pode ser alcançado utilizando os meios Sabouraud e Caldo Batata Dextrose, o fungo possui crescimento lento e é geralmente mantido em cultivo por 7 a 14 dias; as colônias em ágar são arredondadas, muito pigmentadas, escuras e aveludadas [1,2,4].

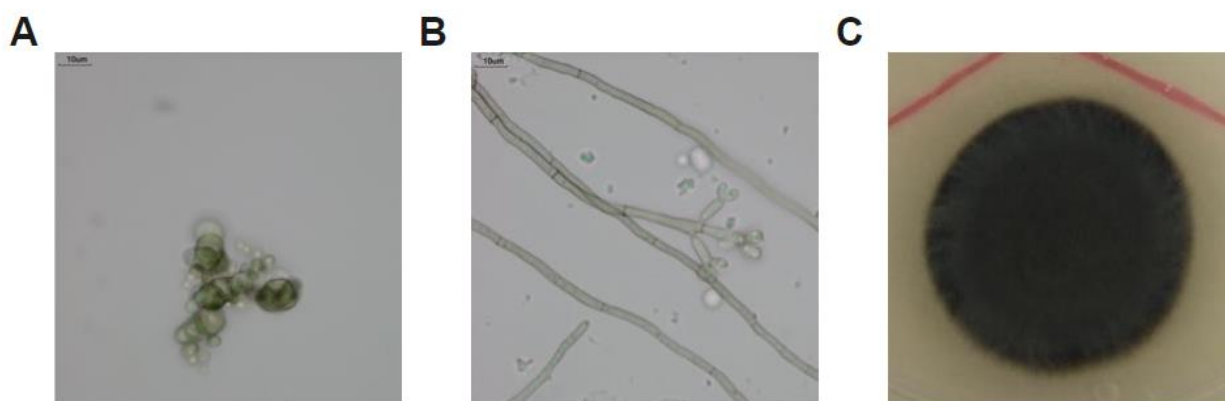


Figura 2. Imagens da morfologia micro e macroscópica de *F. pedrosoi* (A) Células muriformes (B) Hifas e conídios (C) Colônia de CBS 271.37 em Sabouraud ágar. Figuras A e B de Vitoria Merçon Dias.

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa tem trabalhado para desenvolver ferramentas moleculares para o estudo funcional de genes em *F. pedrosoi*. Fomos os primeiros a publicar duas transformações genéticas em detalhe (biobalística e transformação mediada por *Agrobacterium*), bem

como vetores carregando genes de resistência a drogas como marcadores de seleção dominante para a construção de cassetes de deleção [35]. Nossos avanços lançaram as bases para a comunidade científica explorar a biologia e os mecanismos de patogenicidade utilizados por *F. pedrosoi*. No presente trabalho, demos um passo adiante no desenvolvimento de técnicas moleculares úteis e versáteis para a realização de estudos genéticos de *F. pedrosoi*.

Vários organismos são capazes de sintetizar triptofano, incluindo bactérias, plantas e fungos [36-39]. Para todos os organismos vivos, o triptofano não é apenas um aminoácido que constrói proteínas. Também é necessário para vários processos fisiológicos, servindo como substrato para a síntese de metabólitos secundários. Seu papel foi recentemente explorado como modulador da resposta imune e manutenção da microbiota intestinal humana [40,41]. A maquinaria enzimática para o anabolismo do triptofano está ausente em animais e humanos; no entanto, os organismos produtores compartilham uma organização semelhante, de acordo com as espécies estudadas até agora [42-47]. Normalmente, compreende quatro ou cinco enzimas diferentes em fungos, algumas delas com características multifuncionais, dependendo da espécie. O ácido corísmico da via do chiquimato é o substrato inicial para gerar o L-triptofano [37,47,48]. A última reação é catalisada pela enzima triptofano sintase [43,47,48].

Neste trabalho, identificamos e analisamos *in silico* as enzimas possíveis para a biossíntese de L-triptofano por *F. pedrosoi*. Dos genes envolvidos na via biossintética do triptofano, nenhum foi previamente estudado em *F. pedrosoi*; assim, escolhemos *trpB* (um gene putativo da triptofano sintase) para gerar um mutante nulo. Além disso, descrevemos em detalhes a construção de um cassete de deleção de maneira rápida e fácil (por PCR de dupla junta) [49] que pode ser entregue diretamente por transformação biobalística, em conídios, sem etapas de clonagem. Finalmente, caracterizamos o fenótipo do mutante nulo *trpB* e propusemos novas ferramentas moleculares para a manipulação genética de *F. pedrosoi*. Tomados em conjunto, nossos dados evidenciam que a substituição de genes por transformação biobalística é uma abordagem viável para estudos genéticos funcionais e um avanço no conhecimento acerca desse patógeno fúngico humano e outras espécies intimamente relacionadas.

2. Objetivos

Objetivo Principal:

Deleção genética da triptofano sintase em *Fonsecaea pedrosoi*.

Objetivos Secundários:

1. Validação da técnica de PCR de dupla junta e biobalística na transformação gênica de *F. pedrosoi*.
2. Demonstração da seleção de mutantes auxotróficos para a via de trp entre os transformantes utilizando meios seletivos.
3. Caracterização fenotípica do mutante de $\Delta trpB$ e do reconstituído.
4. Validação do uso de 5-FAA para a contra seleção de mutantes trp^- em *F. pedrosoi*.

3. Justificativa

A validação do método de PCR de dupla-junta aliada a inserção por biobalística é de grande valia, devido ao seu protocolo mais simples e rápido em comparação a técnica de *Agrobacterium*, que é muito utilizada. Além da caracterização do mutante resultante, que possui potencial como marcador genético, e da validação do uso de 5-FAA como mais uma técnica de contra-seleção para esses mutantes, assim expandindo o arcabouço de métodos e técnicas possíveis para o estudo de *Fonsecaea* spp., que são importantes agentes patogênicos mundiais.

4. Materiais e Métodos:

4.1 Condições de Cultivo das Linhagens de *F. pedrosoi*

A linhagem de *F. pedrosoi* utilizada em todos os experimentos foi a CBS 271.37, cedida pela Dra. Vania A. Vicente da Universidade do Paraná e da Coleção Biológica do Paraná. Ela foi cultivada e mantida em meio Sabouraud dextrose ágar (SAB) (para 1L: 10g de peptona, 40g dextrose, 15g ágar; pH: 5,6; esterilizado em autoclave a 120°C / 15 min), incubada a 28°C por 7 dias. Mutantes com a deleção do gene *trpB* foram cultivados no mesmo tipo de meio, com suplementação de 1000µg/mL (para as placas de transformação) e de 500µg/mL (para cultivo normal) de L-triptofano (L-trp) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), retirada de uma solução estoque preparada a uma concentração de 10mg/mL com água ultrapura e filtrada com filtros de porosidade de 0,45 µm, para esterilização. Para obtenção de conídios, *F. pedrosoi* foi cultivado em caldo batata dextrose (PD) (Difco) por 10 dias a 28°C e 200 rpm de agitação. Posteriormente filtrado com lã de vidro estéril, e lavado 3 vezes com solução salina (0,9% NaCl), centrifugado a 4000 rpm por 5 min. A quantidade de conídios foi contada utilizando a câmara de Neubauer e a concentração de conídios ajustada de acordo com o experimento. Para o crescimento de *Escherichia coli* DH5a foi utilizado meio LB (para 1L: 10g de peptona, 10g extrato de levedura, 5g de cloreto de sódio).

4.2 Pesquisa *In Silico* das Enzimas Relacionadas à Biossíntese de Triptofano em *F. pedrosoi* e Avaliação da Expressão do Gene *trp*

A via anabólica de triptofano em *F. pedrosoi* foi analisada com base em dados fornecidos por outros estudos de *Aspergillus fumigatus* [48], *Cryptococcus neoformans* [50] e *Saccharomyces cerevisiae* [47]. A ferramenta BLASTp foi usada para pesquisar possíveis sequências de enzimas de *F. pedrosoi* no EnsemblFungi (<https://fungi.ensembl.org/index.html>, acessado em 20 de junho de 2020). Também calculamos a porcentagem de identidade entre as sequências de aminoácidos de *A. fumigatus* e *F. pedrosoi* usando <http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html> (acessado em 20 de junho de 2020). Para identificar os domínios conservados das possíveis enzimas da biossíntese de triptofano em *F. pedrosoi*, foi utilizado a pesquisa em Pfam (<https://pfam.xfam.org/search/sequence>, acessado em 20 de junho de 2020) e, com base em KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>, acessado em 20 de junho de 2020), foi aplicada a nomenclatura enzimática (CE). O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado utilizando ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>, acessado em 20 de junho de 2020) para identificar a região de conexão entre os domínios catalíticos α e β de TrpB. Avaliamos a expressão dos genes após o crescimento de uma linhagem WT em meio mínimo (Czapeck dox-CD) [31] e CD+L-trp (500µg/mL) como controle da PCR em tempo real, usando o método $\Delta\Delta CT$ e *gapdh* (Gliceraldeído-

3-Fosfato Desidrogenase, Z517_04938, do banco de dados genômico de *F. pedrosoi*) como gene normalizador doméstico. Resumidamente, a cepa WT foi cultivada em caldo PD por 7 dias a 28°C sob agitação (150 rpm). Após esse período, a massa fúngica foi coletada, lavada duas vezes com solução salina e inoculada em CD e CD+L-trp por 3 h a 28°C/150 rpm. A biomassa fúngica foi precipitada por centrifugação a 4000 rpm por 5 min e o pellet foi lavado duas vezes com solução salina. O sobrenadante foi descartado, e a solução de lise (RLT) do RNEasy®Plant RNAExtraction Kit (Qiagen) e 100µL de esferas de vidro lavadas com ácido (600µm) foram adicionadas ao pellet, que foi submetido à lise usando o equipamento Precellys (Bertin) em três ciclos de 6500 rpm por 1 min intercalados por incubação em gelo por 2 min. Em seguida, a extração do RNA total seguiu as instruções do fabricante. O cDNA foi gerado usando um kit de DNA de alta capacidade (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e a PCR em tempo real foi realizada usando o kit *SYBR Green Master Mix* (Thermo Fisher Scientific) em 7500 Fast Real-time PCR System. Pelo menos um iniciador de todos os alvos abrangeu uma junção exon-exon.

4.3 Construção do Cassete de Deleção *trpB* por PCR de Dupla Junta (DJ-PCR)

Os cassetes de deleção foram construídos pelo método de ligação utilizando múltiplas PCRs, conhecido pelo método de PCR de dupla-junta (DJ-PCR), descrito por Kim e colaboradores [49]. Utilizando o DNA genômico da cepa selvagem (CBS 271.37) como modelo. Todos os oligonucleotídeos usados neste trabalho estão descritos na Tabela 1. Primeiramente, PCR regular foi usado para amplificar quatro fragmentos do cassete: regiões flanqueadoras ORF 5' e 3' de *trpB*, usando, respectivamente, Fp128 + Fp129 (915 pb), Fp130 + Fp131 (947 pb), o DNA genômico da cepa de tipo selvagem (WT) (CBS 271.37) foi usado como modelo (Figura 8A). Os oligonucleotídeos Fp90 + Fp15 foram utilizados para amplificar o fragmento 5' de Higromicina B (HybB), marcador de resistência (Hyg^R) e a combinação Fp16 + Fp91 para 3'Hyg^R usando pSilent-1 [51] como molde para as reações. Os produtos 5' e 3'Hyg^R foram fragmentos de 1109 bp e 987 bp, respectivamente (amplicons não mostrados na Figura 8).

A segunda etapa consistiu em duas PCRs independentes sobrepostas usando uma combinação dos produtos previamente obtidos: a sequência 5'*trpB* flanqueadora foi fundida a 5'Hyg^R para produzir a 5'*trpB* + 5'Hyg^R de 2024 bp (Figura 8). A outra reação constituiu um produto de 1934 pb correspondente a 3' *trpB* +3' Hyg^R (Figura 8). O OneTaq 2×Master Mix with Standard Buffer (NEB) foi utilizado para todas as amplificações, seguindo as recomendações do fornecedor. Uma vez obtidos os dois cassetes finais, eles foram usados diretamente para a transformação genética de *F. pedrosoi*, utilizando a técnica de biobalística.

Tabela 1. Oligonucleotídeos usados neste trabalho

Nome	Alvo	Uso	Sequência 5' - 3'
Fp15	Hyg ^R	DJ-PCR/ Confirmação da deleção	CGTCTGCTGCTCCATACAAGC
Fp16	Hyg ^R	DJ-PCR/ Confirmação da deleção	CATATGCGCGATTGCTGATCC
Fp90	Hyg ^R	DJ-PCR	CCGCGACGTTAACTGATATT
Fp91	Hyg ^R	DJ-PCR	GTGGAGCCAAGAGCGGATT
Fp118	3' <i>trpB</i>	Confirmação da deleção	GTCCCGGTGTCTACTATGAA
Fp119	5' <i>trpB</i>	Confirmação da deleção	ATCGGTGTACAAGGCAAGC
Fp120	ORF <i>trpB</i>	Confirmação da deleção	AGGGAGTGGTGATTGGTAGT
Fp121	ORF <i>trpB</i>	Confirmação da deleção	CAGTGTGATTCAGGTCCTCT
Fp128	5' <i>trpB</i>	DJ-PCR	GGGCATATGTTCTTCCAGGAC
Fp129	5' <i>trpB</i>	DJ-PCR	AATATCAGTTAACGTCGCGGGTCAAGGTTGAAAGGGA
Fp130	3' <i>trpB</i>	DJ-PCR	AATCCGCTCTTGGCTCCACACGGCGTCAACCTCAAGATA
Fp131	3' <i>trpB</i>	DJ-PCR	CACAGCTCGACGGATAGGATA
Fp217	<i>trpB</i>	RT-PCR	CTCATCCCTTCCCGACGAT
Fp218	<i>trpB</i>	RT-PCR	CCACCGACACAAGCAATCAC
Fp219	<i>trpC</i>	RT-PCR	TGCCCTTCTCGTCCGGTGTAT
Fp220	<i>trpC</i>	RT-PCR	CCGCATCCAATCCAAACTTC
Fp221	<i>trpD</i>	RT-PCR	GAAGTCGTGCGGAAGAGGAA
Fp222	<i>trpD</i>	RT-PCR	CGTGGTCGAGATGTTGAATGTC
Fp223	<i>trpE</i>	RT-PCR	TTCCTCTGCCCTACCAACCA
Fp224	<i>trpE</i>	RT-PCR	ACGTGCGCCTCATATCCTGT
Fp225	<i>gapdh</i>	RT-PCR	AAGGGTGGTGCGAAGAAGGT
Fp226	<i>gapdh</i>	RT-PCR	GGGATGTCGGGCTTGTATGA

4.4 Transformação biobalística e seleção de mutantes de *trpB* por meio seletivo

A transformação por biobalística foi executada como anteriormente descrito em Florencio e colaboradores [35]. O fungo foi inoculado em Caldo Batata Dextrose e mantido a 28 °C, sob agitação de 170 rpm, por 7 dias. Os conídios foram purificados através do processo de filtração utilizando lã de vidro e quantificados usando a câmara de Neubauer. Em seguida, 1×10^9 conídios foram inoculados em 100mL de SAB líquido por 24h sob agitação de 170 rpm, para germinação. Os conídios germinantes foram centrifugados, lavados com solução salina (NaCl 0,9 %) e distribuídos igualmente em membrana de celofane estéril sobre placas de meio SAB agar suplementado com triptofano (1000µg/mL). Cinco microgramas de cada fragmento construído acima foram precipitados em partículas de tungstênio M10 (0,7µm de diâmetro, Biorad, Hercules, CA, USA). Em seguida as placas foram geneticamente transformadas usando o Biolistics PDS-1000/He Particle Delivery System (Biorad), seguindo as instruções do fabricante. Placas bombardeadas foram embaladas em folhas de alumínio e incubadas a 25°C por 24h. No próximo dia, as células foram raspadas com o auxílio de espátulas de metal

(esterilizadas por flambagem) e solução salina, as células transformadas foram coletadas e distribuídas em placas de Petri de vidro estéreis com meio SAB agar com L-trp (1000µg/mL) e HygB (50µg/mL) (invitrogen, Waltham, MA, USA). Depois de 21 dias de incubação a 25°C, as colônias resultantes do processo de transformação gênica foram replicadas, utilizando palitos estéreis, em uma série de 4 placas de meio seletivo: SAB agar, SAB agar com 50µg/mL de HygB (SAB + HygB), SAB agar suplementado com 1000µg/mL de L-trp (SAB+L-trp), e SAB agar contendo L-trp (1000µg/mL) e HygB (50µg/mL) conjuntamente (SAB+L-trp+HygB). Onde foram incubadas a 25°C por 10 dias até a avaliação visual das colônias no meio seletivo.

4.5 Avaliação da Estabilidade Mitótica dos Mutantes de *trpB* por Meio Seletivo

Para avaliar a estabilidade mitótica das cepas, as linhagens WT e $\Delta trpB$ foram cultivadas no mesmo meio utilizado para a seleção dos transformantes (SAB+L-trp + HygB) e incubadas a 25°C. A cada sete dias as colônias que foram crescidas em placas não seletivas (SAB+L-trp) foram transferidas para novas placas de SAB+ L-trp + HygB e SAB + L-trp. Esse procedimento foi repetido até a conclusão de três passagens. Os níveis de HygB e L-trp foram respectivamente de 50µg/mL e 1000µg/mL. Os transformantes mitoticamente estáveis e incapazes de crescer em meio sem suplementação de triptofano foram selecionados para extração de DNA genômico e confirmação da deleção genética por PCR.

4.6 Extração de DNA

Os transformantes selecionados, assim como, a cepa de CBS 271.37 passaram por processamento para extração de DNA genômico. Os cultivos retirados de meio SAB+L-Trp foram colocados em microtubos de 1,5mL contendo pérolas de vidro estéreis acid-washed, depois foram adicionados 250µL de tampão TENTs (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, Triton 2% e SDS 1%) e as amostras foram levadas ao freezer -80°C por 10 min para congelar. Depois do congelamento, as amostras foram colocadas em Tissuelyser (nome do aparelho, marca) na potência máxima por 6min, intercalados por 2min no gelo, a cada 2min. Após a quebra física do fungo, são adicionados 250 µL de fenol clorofórmio. As amostras foram agitadas vigorosamente por 30 segundos e centrifugadas a 13.000 rpm por 5 min. A fase superior aquosa é transferida para um novo tubo, onde são adicionados 25 µL de NaOAc 3M e 500 µL de EtOH 100%. Depois, o tubo foi agitado e centrifugado a 13.000 rpm por 15 min para precipitação do DNA, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 100 µL de EtOH 70%, as amostras foram centrifugadas mais uma vez por 5min, na mesma velocidade. Após o descarte do sobrenadante, foram adicionados 50 µL de água ultrapura + RNase A 150 µg/mL e os tubos foram incubados no banho seco a 37°C overnight, para dissolução dos

precipitados e degradação de RNA. Após a extração as amostras foram quantificadas utilizando o nanofotômetro e armazenadas em freezer -20°C, para posterior utilização.

4.7 Confirmação por PCR da Deleção de *trpB*

Para confirmar a deleção do gene *trpB* nos transformantes escolhidos foram realizadas quatro PCRs focadas nas seguintes sequências: o lócus do gene de *trpB*, ambas as partes dos cassetes de deleção, e as regiões flanqueadoras do gene de *trpB*. A reação Fp120 + Fp121, usando DNA genômico da cepa WT como modelo, foi o controle positivo, cujo produto é um fragmento de 570 pb do gene de *trpB*. As combinações Fp119 + Fp15 e Fp118 + Fp16 amplificam, respectivamente, a região 5' (2,5 kb para $\Delta trpB$, sem amplificação para WT) e a região 3' (2,4 kb para $\Delta trpB$, sem amplificação para WT) do lócus de *trpB* substituída pelo cassete de Hyg^R. O comprimento total *trpB* juntamente com as regiões flanqueadoras foi acessado pela reação Fp118 + Fp119 (4,6 kb para $\Delta trpB$, 5,1 kb para WT) (Figura 11). gDNA de *F. pedrosoi* WT foi usado como controle para as reações.

4.8 Southern Blot

Os dois transformantes dos quais a deleção de *trpB* foi confirmada pela PCR e a cepa WT de *F. pedrosoi* foram escolhidos para confirmação pela técnica de Southern Blot. Vinte microgramas de gDNA foram digeridos por restrição, durante a noite, com a enzima StuI (3U/μg de gDNA) a 37°C e submetidos a eletroforese em gel de 1,0% TAE 1×agarose. O gel foi transferido para uma membrana de nylon carregada (GE Healthcare) por transferência capilar. A sonda foi amplificada com os oligonucleotídeos Fp128 + Fp129 (correspondente à região flanqueadora 5' do cassete de deleção *trpB*) produzindo um fragmento de 915 pb marcado com digoxigenina, seguindo as instruções do fornecedor (PCR DIG Probe SynthesisKit, Roche, Basel, Suíça). Os procedimentos de hibridização, lavagem e detecção foram todos feitos de acordo com as instruções do fabricante (*DIG Easy Hyb Granules*, *DIG Wash and Block Solution Set*, *Anti-Digoxigenin-AP*, *Fab fragments e CDP-Star ready-to-use*, Roche). O equipamento ImageQuant LAS 4000 (GE) foi utilizado para a leitura do sinal. Um fragmento de hibridização de 5,7 kb era esperado para $\Delta trpB$ e um de 3,1 kb para o controle não deletado.

4.9 Avaliação da Concentração de Triptofano Requerida para o Crescimento de $\Delta trpB$

A concentração mínima necessária de L-triptofano, para suplementação do meio de cultura e manutenção do crescimento dos mutantes auxotróficos de *F. pedrosoi* foi determinada incubando as

cepas WT e mutante (*2. ΔtrpB*) em SAB ágar suplementado com diferentes concentrações do aminoácido (0, 20, 50, 100, 250, 500 e 1000µg/mL), a 28°C por 10 dias. O crescimento radial das colônias foi utilizado para comparar as cepas.

4.10 Medida de Crescimento do Diâmetro das Colônias

Para quantificar o crescimento das colônias de *2.ΔtrpB*, *22.ΔtrpB + trpB*, *25.ΔtrpB + trpB* e WT, as cepas foram inoculadas pontualmente com a mesma quantidade de conídios (10^3) na superfície de SAB ágar contendo 500µg/mL de L-trp (SAB + L-trp). As placas foram incubadas a 28°C ou 37°C. Os diâmetros das colônias foram medidos a cada 3 dias durante 3 semanas. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata. Os dados coletados foram analisados por meio do programa *GraphPad Prism*. A análise de efeitos mistos e o teste de comparações múltiplas de Dunnett foram usados para comparar as variações entre os grupos controle (WT) e teste.

4.11 Quantificação da Taxa de Germinação

Após crescimento em caldo PD, conídios de *2.ΔtrpB*, *22.ΔtrpB + trpB*, *25.ΔtrpB + trpB*, WT foram coletados, contados em câmara de Neubauer e então inoculados em 10 mL de caldo SAB + L-trp (500µg/mL de L-trp) na concentração de 10^6 conídios/mL. As culturas foram incubadas sob agitação contínua (200 rpm) a 28°C ou 37°C por 24 e 48 h. Após a incubação, a suspensão de conídios foi agitada em vórtex e 100µL foram coletados para inspeção microscópica. Cem conídios selecionados aleatoriamente das amostras da mesma cultura foram contados para distinguir entre conídios germinados e não germinados. Os conídios com tubo germinativo foram considerados germinados e os inchados, não germinados. O experimento foi realizado em triplicata, repetido duas vezes, e os dados foram analisados por meio do programa *GraphPad Prism*. *Two-way* ANOVA e o teste de comparações múltiplas de Dunnett foram usados para comparar as variações entre os grupos teste e o controle (WT).

4.12 Quantificação de CFU ou UFC (Unidades Formadoras de Colônias)

Para o ensaio de viabilidade as cepas (*2.ΔtrpB*, *22.ΔtrpB + trpB*, *25.ΔtrpB + trpB* e WT) previamente cultivadas em caldo PD+L-trp tiveram seus conídios coletados e contados em câmara de Neubauer. Quinhentos conídios de cada cepa foram espalhados em placas em triplicata de SAB + L-trp ágar independentes (500µg/mL de L-trp), incubadas a 28 ou 37°C por 10 dias, e então o número de colônias foi contado (UFC). O experimento foi realizado em triplicata e repetido duas vezes. Os dados foram analisados usando o programa *GraphPad Prism*. *Two-way* ANOVA e o teste de comparações múltiplas de Dunnett foram usados para comparar as variações entre os grupos controle (WT) e de teste.

4.13 Determinação da Concentração de Ácido 5-Fluoroantrálico (5-FAA) para Seleção de trp^- e Contra Seleção de trp^+

Os meios de cultura foram suplementados com ácido 5-fluoroantrálico (5-FAA) (Sigma-Aldrich) para a contra-seleção da via de triptofano. A solução estoque (100 mg/mL) foi preparada em etanol absoluto. Uma vez que a concentração usada para contra seleção de mutantes auxotróficos de triptofano é muito variável entre diferentes espécies fúngicas [52-55], o intervalo de 0,25 a 3,0 mg/mL foi testado para *F. pedrosoi*. Os conídios das cepas WT e $2.\Delta trpB$ foram obtidos conforme descrito anteriormente e a densidade foi ajustada. Cinco microlitros de cada diluição seriada (1×10^7 a 1×10^3 /mL) foram pipetados em ágar SAB contendo 500µg/mL L-trp e 5-FAA. O mesmo procedimento foi feito para avaliar a suscetibilidade ao 5-FAA das cepas reconstituídas. O crescimento fúngico foi observado após 13 dias de incubação a 25°C. O experimento foi repetido quatro vezes. Para simular o uso do 5-FAA como agente selecionador de mutantes trp^- , uma alta densidade de conídios (5×10^5) das cepas WT e $\Delta trpB$ foi espalhada em placas em 4 condições diferentes. As placas SAB ágar, SAB + L-trp(500µg/mL), SAB + L-trp + HygB (500µg/mL de L-trp e 100µg/mL de HygB), e SAB + L-trp + 5-FAA (500µg /mL de L-trp e 0,5 mg/mL de 5-FAA) foram incubados a 25°C e inspecionados a cada 3 dias até o 22º dia de crescimento.

4.14 Estratégia de reposição genômica

A construção do plasmídeo pFpNAT + $trpB$ para reconstituição de $2.\Delta trpB$ foi realizada da seguinte forma: Primeiramente, o fragmento de 5,1 kb correspondente ao gene $trpB$ foi amplificado a partir do genoma da cepa WT com os primers Fp119 e Fp118 (Figura 3A). O produto foi então submetido a dupla digestão por NdeI e SacI para gerar um fragmento de 4,7 kb. Esse fragmento foi então clonado no plasmídeo pFpNAT [35], previamente aberto com NdeI e SacI, utilizando a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) (Figura 3). A ligação foi transformada em *E. coli* DH5α termo competentes, e colônias que cresceram em meio LB contendo 100µg/mL de Ampicilina foram selecionadas para extração de plasmídeo. A clonagem do fragmento de 4,7 kb correspondente ao gene $trpB$ foi confirmada por digestão NdeI/SacI (Figura 3) e o plasmídeo foi denominado pFPNAT+ $trpB$ (8,9 kb). As regiões flanqueadoras resultantes da ORF de $trpB$ foram de 923 e 1,263 pb para 5' e 3', respectivamente. O pFPNAT+ $trpB$ não linearizado foi transformado em conídios $2.\Delta trpB$ para obtenção das cepas reconstituídas. As condições para a transformação biobalística foram as mesmas descritas anteriormente para a obtenção do mutante $trpB$ [35,56]. Para selecionar os transformantes trp^+ , placas de SAB ágar foram suplementadas com 500µg/mL de L-trp e 100µg/mL de Nourseotricina (Nat). Após 21 dias de crescimento a 28°C, as colônias foram transferidas para placas de ágar SAB + Nat para detectar os transformantes prototróficos de triptofano, que então, foram selecionados para extração de gDNA. A amplificação por PCR com Fp120 e Fp121 foi realizada, produzindo um fragmento de 570 pb de $trpB$

(Figura 3B). Também foi testado se o marcador HygR usado para a deleção do gene foi preservado no locus de *trpB* após a transformação de pFpNAT+*trpB*, plaqueando as colônias em SAB ágar + 100µg/mL Nat + 50µg/mL HygB.

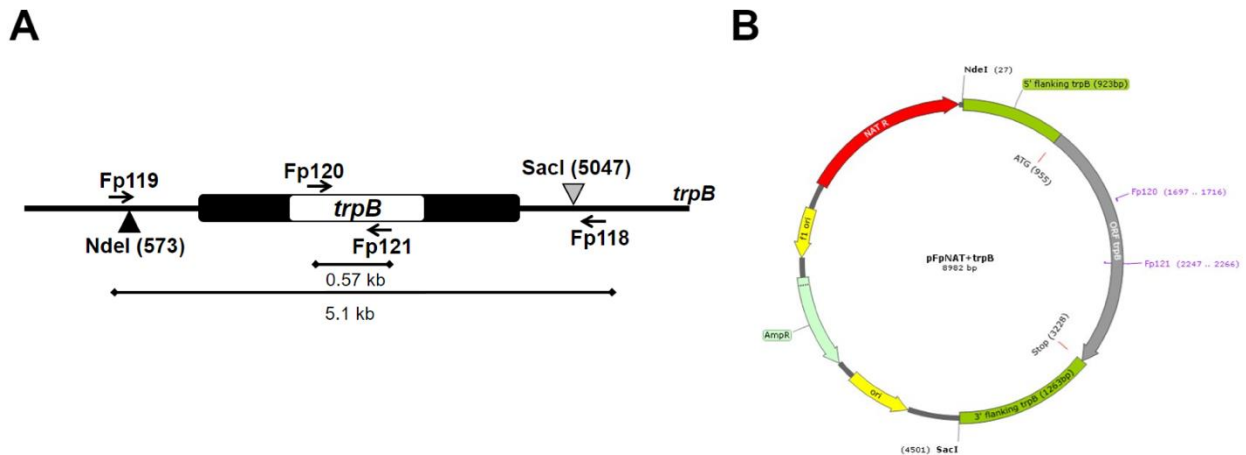


Figura 3. Estratégia para obtenção e confirmação do reconstituído do mutante *trpB* de *F. pedrosoi*. (A) Representação esquemática do locus *trpB* indicando a posição dos sítios de restrição NdeI e SacI e os oligonucleotídeos usados nas PCRs. (B) Mapa do plasmídeo pFpNAT+*trpB* obtido após a clonagem do fragmento de *trpB* de 4,7 kb em sítios de restrição NdeI e SacII. NAT^R: Marcador de resistência de Nourseotricina, AMP^R: Marcador de resistência de Ampicilina.

4.15 Análise Estatística

Todos os dados foram analisados utilizando-se o programa *GraphPad Prism* versão 6.01 para Windows (Programa GraphPad). Para a análise dos dados experimentais de CFU e Taxa de Germinação, *two-way* ANOVA e o teste de comparações múltiplas de Dunnett foram usados para comparar as variações entre os grupos controle (WT) e de teste. Para o teste de Crescimento do Diâmetro das Colônias, a análise de efeitos mistos e o teste de comparações múltiplas de Dunnett foram usados para comparar as variações entre os grupos controle (WT) e teste.

5. Resultados:

5.1 Análise *In Silico* da Via Biossintética de Triptofano em *F. pedrosoi*

Tabela 2. Genes da biossíntese de triptofano e funções proteicas putativas de *F. pedrosoi* em comparação a outros fungos.

Enzymatic Function	Protein Name /Gene ID				<i>F. pedrosoi</i> transcript ID ^e	% Amino acid identity ^f
	<i>S. cerevisiae</i> ^a	<i>C. neoformans</i> ^b	<i>A. fumigatus</i> ^c	<i>F. pedrosoi</i> ^d		
Anthranilate synthase component I-Chorismate aminase [EC:4.1.3.27]	Trp2 YER090W	Trp2 CNAG_06679	TrpE Afu6g12580	TrpEZ517_08726	KIW78887	70.98
Anthranilate synthase component II-Glutamine amidotransferase/Phosphoribosyl-anthranilate isomerase/Indoleglycerol phosphate synthase [EC:4.1.3.27 4.1.1.48]	Trp3 YKL211C	Trp3 CNAG_04501	TrpC Afu1g13090	TrpCZ517_05805	-KIW79193	66.49
Anthranilate phosphoribosyl transferase [EC:2.4.2.18]	Trp4 YDR354W	Trp4 CNAG_00811	TrpD Afu4g11980	TrpDZ517_01180	-KIW85788	63.84
Phosphoribosylanthranilate isomerase [EC:5.3.1.24]	Trp1 YDR007W	Trp3 CNAG_04501	TrpC Afu1g13090	TrpCZ517_05805	-KIW79193	66.49
Tryptophan synthase [EC:4.2.1.20]	Trp5 YGL026C	Trp5 CNAG_00649	TrpB Afu2g13250	TrpBZ517_07968	-KIW78135	78.39

^a Sequence ID from *S. cerevisiae* genome database: <https://www.yeastgenome.org> accessed on 20 June 2020;

^b sequence ID from *C. neoformans* H99 strain: <https://fungi.ensembl.org> accessed on 20 June 2020; ^c sequence ID from *A. fumigatus* Af293 strain: <http://www.aspergillusgenome.org> accessed on 20 June 2020; ^d sequence ID from *F. pedrosoi* CBS271.37 strain <https://fungi.ensembl.org> accessed on 20 June 2020; ^e transcript ID from *F. pedrosoi* CBS271.37 strain <https://fungi.ensembl.org> accessed on 20 June 2020; ^f percentage of identity between *A. fumigatus* and *F. pedrosoi* protein sequences: pairwise alignments were done in <https://www.ebi.ac.uk> accessed on 20 June 2020 and identity calculation was performed at <http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html> accessed on 20 June 2020.

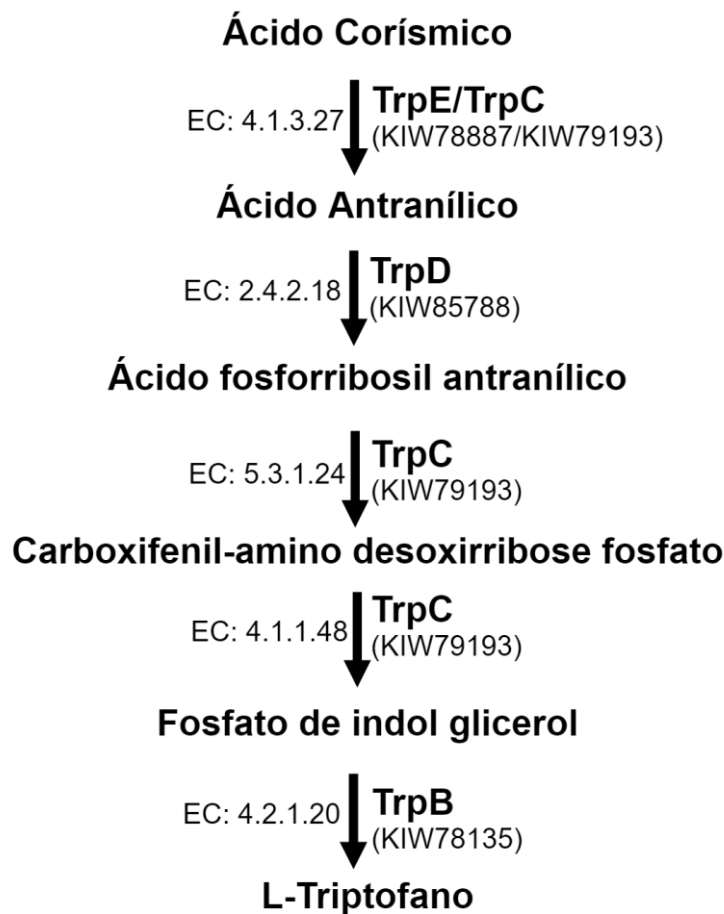


Figura 4. Via biosintética de triptofano putativa de *F. pedrosoi*. As identidades dos transcritos correspondentes estão indicadas entre parêntesis abaixo dos nomes das proteínas. Os números da *Comissão Enzimática* (EC) estão apresentados no lado esquerdo de cada passo da via.

Por meio de uma busca *in silico* pelas sequências enzimáticas da via de biossíntese do triptofano, propusemos uma estratégia de como esse processo pode ocorrer em *F. pedrosoi* (Figura 4). Na base de dados do genoma de *F. Pedrosoi*, encontramos quatro genes que codificam enzimas que atuam na biossíntese de triptofano em cinco etapas (*trpB*, *trpC*, *trpD* e *trpE*) conforme mostrado na Tabela 2. Pela análise KEGG, observamos componentes da via bem conservados entre as espécies *F. pedrosoi*, *S. cerevisiae* [37,47], *A. fumigatus* [48] e *C. neoformans* [50]. Observamos uma alta porcentagem de identidade entre as sequências primárias de *F. pedrosoi* *TrpB*, *TrpC*, *TrpD* e *TrpE* e os de *A. fumigatus* (>63%).

Além disso, usando a ferramenta de pesquisa Pfam, todos os domínios conservados de cada enzima na via do triptofano foram detectados (Figura 5).

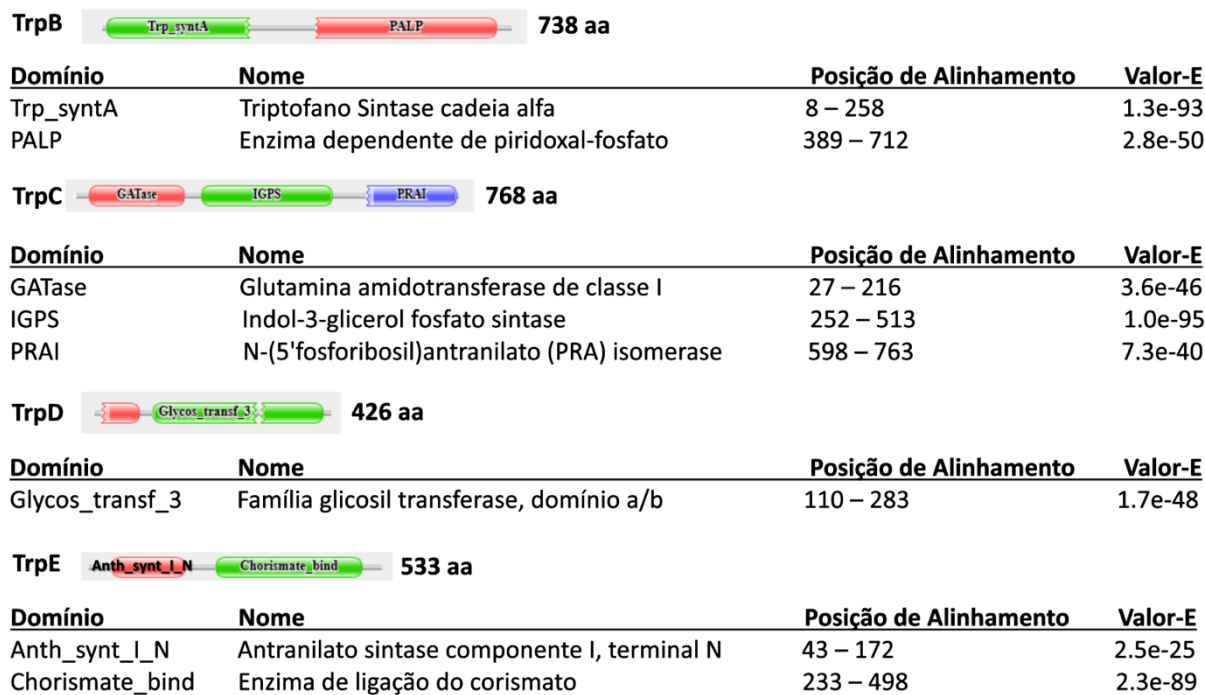


Figura 5. Domínios conservados de *F. pedrosoi*, enzimas necessárias para a biossíntese de triptofano. Os domínios foram encontrados utilizando a ferramenta de pesquisa pfam (<https://pfam.xfam.org/search/sequence>) nas sequências traduzidas de transcritos identificados na base de dados do genoma de *F. pedrosoi*. As posições de cada domínio e os valores de E estão apresentados na figura.

A seguir, foi avaliada a expressão dos genes após incubação da linhagem do *Fonsecaea pedrosoi* selvagem por 3 h em meio mínimo em comparação com o meio mínimo suplementado com 500µg/mL de L-trp (controle) por PCR em tempo real; no entanto, não foi detectada modulação genética dos genes *trp* em resposta às condições analisadas (Figura 6).

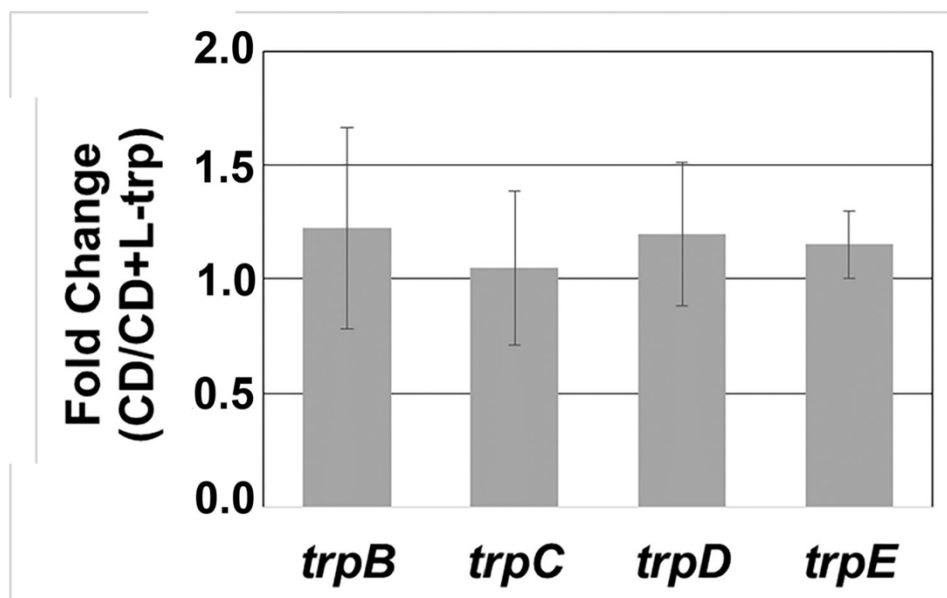


Figura 6. PCR em tempo real para avaliação da expressão dos genes da via biosintética de triptofano de *F. pedrosoi* : *trpB*, *trpC*, *trpD* e *trpE*. Em resposta a incubação em meio mínimo (Czapek Dox) por 3h a 28°C. Razão de expressão (Fold Change). Barras representam o desvio padrão da média de três replicatas biológicas. *gapgh* foi escolhido como gene controle.

Em todas as espécies produtoras de triptofano, a biossíntese começa com o corismato, que é o produto da via do chiquimato. A primeira etapa é realizada por *TrpE/TrpC*, na qual o corismato e a glutamina são convertidos em antranilato. O antranilato, por sua vez na presença de fosforibosil fosfato é convertido em fosforibosil antranilato pela *TrpD* (Antranilato fosforibosil transferase). Na terceira etapa, ocorre a síntese de carboxifenil-aminodesoxirribose fosfato [37]. Em *S. cerevisiae*, a fosforibosil-antranilatoisomerase é codificada por TRP1 [47]. No entanto, em *F. pedrosoi*, o ortólogo TRP1 não é encontrado, e esta etapa é realizada por *Trp3^{TrpC}*, como é o caso de *C. neoformans* e *A. fumigatus* [48,50]. A *TrpC* é uma enzima trifuncional encontrada em várias outras espécies fúngicas [37,57], e participa em três etapas dessa via. Na sequência de *TrpC* de *F. pedrosoi*, encontramos os três domínios catalíticos necessários para a síntese de indol 3-glicerolfosfato: N-terminal glutamina amidotransferase classe I (GATase), indol-3-glicerolfosfato sintase (IGPS) e C-terminal fosforibosil-antranilato isomerase (PRAI) (Figura 7). As duas últimas etapas da biossíntese do triptofano são realizadas pela triptofano sintase (*Trp5^{TrpB}*) [37,43,47]. Na sequência putativa de *TrpB* de *F. pedrosoi*, encontramos dois domínios de assinatura conservados: a cadeia alfa da triptofano sintase (posições 8–258 aa) e o

sítio de ligação do piridoxal-fosfato na cadeia beta da triptofano sintase (posições 389–712 aa). Entre esses domínios, há uma região conectora mal-conservada de 83 aa, localizado entre um resíduo de tirosina (Y) e prolina (P) que forma o canal necessário para acoplar as reações (Figura 7).

Figura 7. Múltiplos alinhamentos de seqüências de triptofano sintase. As análises das seqüências de *F. pedrosoi* (KIW78135), *Aspergillus nidulans* (AAF91181.1), *Neurospora crassa* (XP_963281.1), *Saccharomyces cerevisiae* (CAA24635.1) e *Coprinopsis cinerea* (P16578.3) foi realizada com a ferramenta CLUSTALW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>). A região de ligação delimitada por Tirosina (Y) e Prolina (P), entre os domínios catalíticos α e β estão em negrito. Os números de acesso das seqüências depositadas no NCBI estão em parêntesis.

5.2 Estratégia e Confirmação da Disrupção do gene *TrpB* em *F. pedrosoi*

Para expandir e disponibilizar uma caixa de ferramentas moleculares mais versátil para futuros estudos genéticos e funcionais em *F. pedrosoi*, escolhemos o gene *trpB* para construir o cassete de deleção. O cassete de disrupção foi obtido usando a abordagem descrita por [49] chamada de PCR de dupla junta. Ela consiste em etapas sucessivas de PCR para a fusão dos fragmentos flangeadores do gene de interesse aos fragmentos 5' e 3' relacionados ao marcador seletivo. Dois produtos foram obtidos como esperado (Figura 8B) e foram facilmente transformados em conídios de *F. pedrosoi* (cepa CBS271.37) por biobalística de acordo com os parâmetros previamente definidos.

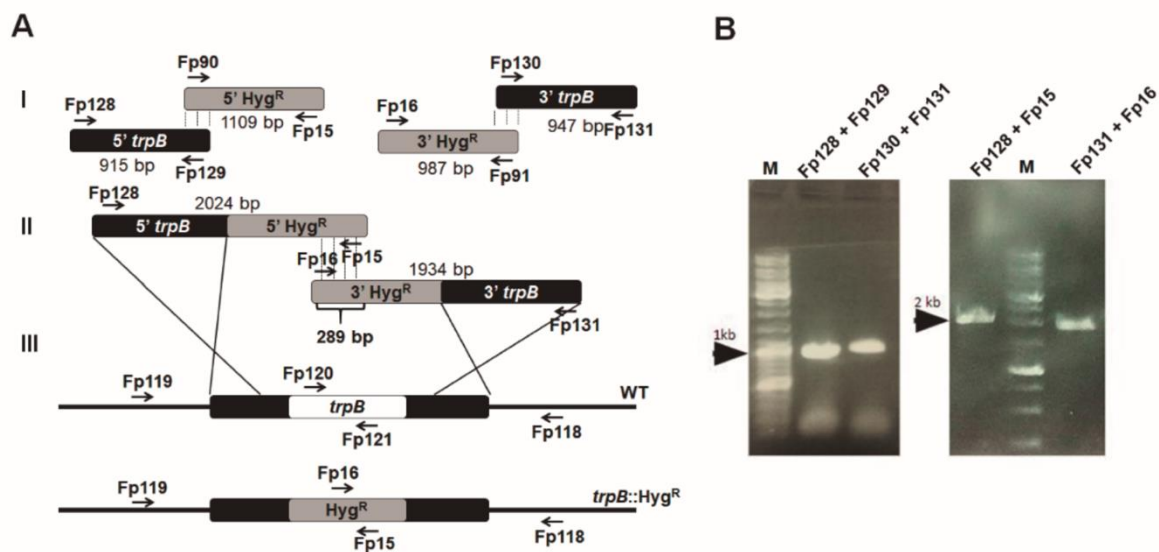


Figura 8. Construção do cassete de deleção de *trpB* por DJ-PCR/ Hyg^R e estratégia do marcador de cisão. (A) A primeira etapa de PCRs gerou quatro fragmentos, correspondendo às regiões franqueadoras 5' e 3' de *trpB* e o marcador seletivo Hyg^R . *TrpB* 5' e 3' foram amplificadas com as reações de Fp128+Fp129, e Fp130+Fp131, respectivamente. Hyg^R 5' e 3' foram obtidos por Fp90+Fp15 e Fp16+Fp91, respectivamente (amplicons não mostrados na figura B). A segunda reação produziu dois fragmentos sobrepostos: 5' *trpB*/ Hyg^R (Fp128+Fp15) e 3' *trpB*/ Hyg^R (Fp16+Fp131) que foram diretamente introduzidos em esporos de *F. pedrosoi*. (B) Os produtos da construção do cassete de deleção por DJ-PCR passaram por eletroforese em gel de agarose TAE 1x, a fim de checar os tamanhos esperados. O comprimento dos amplicons estão exibidos em (A). M: Marcador de peso molecular.

Três experimentos independentes foram conduzidos. Em primeiro lugar, de 49 transformantes resistentes a HygB, 4 foram incapazes de crescer na ausência de triptofano (SAB). A segunda transformação gerou 18 mutantes Hyg^R, e 2 mutantes não cresceram em SAB (Figura 9). Esses dois mutantes, denominados 1 e 2.Δ*trpB*, foram escolhidos para PCR e Southern blotting (Figuras 11 e 12). No terceiro experimento, recuperamos 146 colônias de Hyg^R, e 9 mutantes apresentaram o fenótipo de auxotrofia para triptofano. Assim, observamos que a taxa de recombinação homóloga para *trpB* em *F. pedrosoi* variou de 6 para 11%. Todos os mutantes auxotróficos *trp* exibiram estabilidade mitótica após três passagens no meio não seletivo (SAB + L-*trp*) (Figura 10).

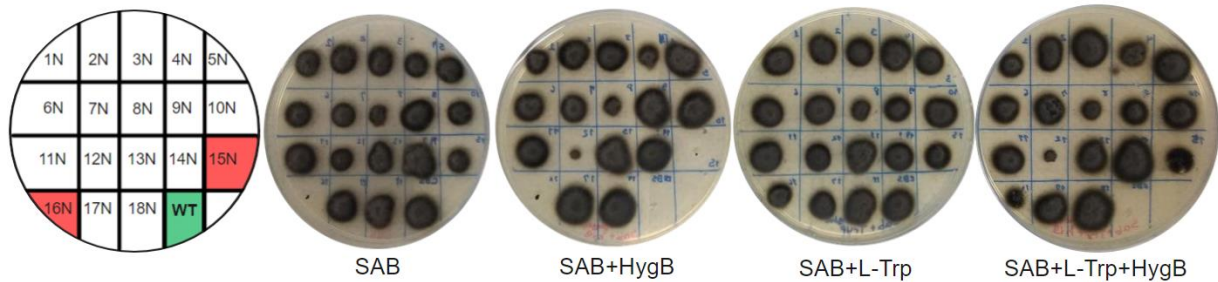


Figura 9. Análise do fenótipo mutante após crescimento em meio seletivo. Os mutantes foram incubados em 4 condições diferentes: SAB; SAB + HygB (50 µg/mL); SAB + L-trypt (1000 µg/mL); SAB + L-trypt (1000 µg/mL) + HygB (50 µg/mL), a 25°C por 10 dias. As cepas 15N e 16N foram as selecionadas para confirmação da deleção por PCR. WT corresponde a cepa CBS 271.37 de *F. pedrosoi*.

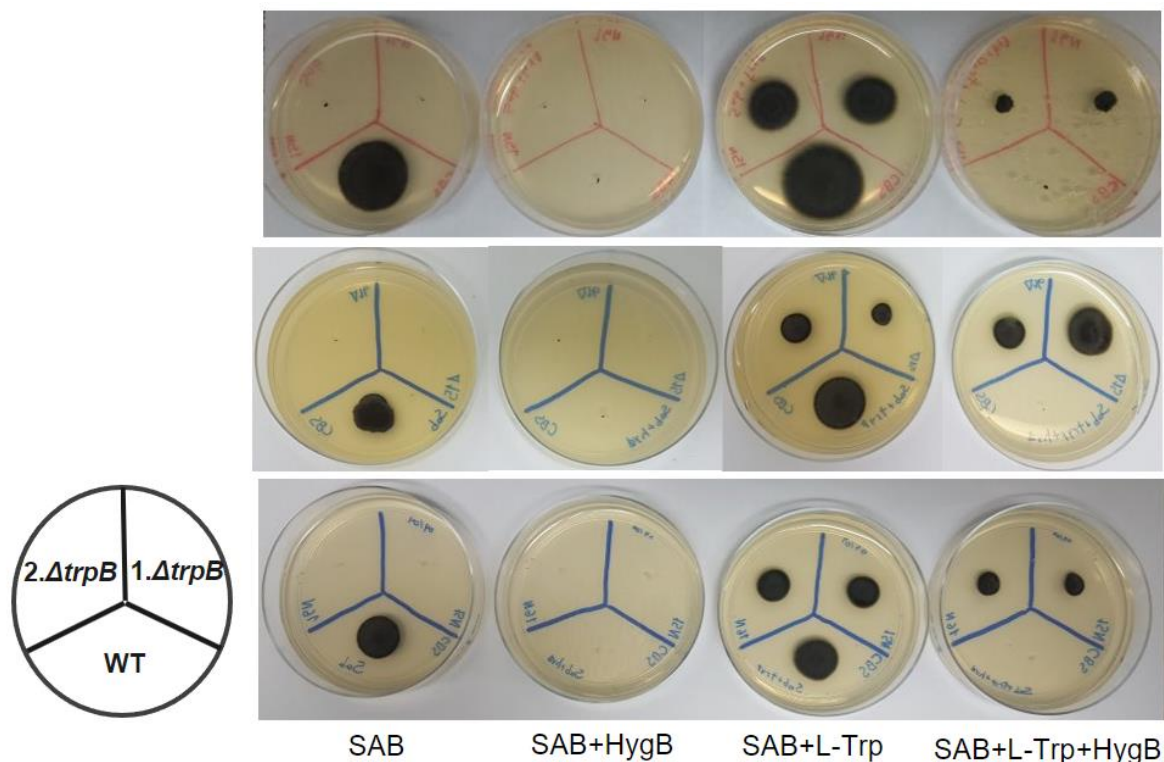


Figura 10. *F. pedrosoi* em meio seletivo para observação da estabilidade mitótica. Os três repiques foram retirados do meio não seletivo (SAB+L-*Trp*) a cada passagem. Concentrações de triptofano e Higromicina B usadas em SAB foram de 1000 µg/mL e 50 µg/mL, respectivamente. A cada repique as placas foram incubadas a 28° C por 7 dias. WT corresponde à linhagem selvagem, CBS 271.37; 1.Δ*trpB* e 2.Δ*trpB* correspondem aos mutantes selecionados (figura 9) 15N e 16N, respectivamente.

A substituição do gene foi confirmada inicialmente por PCR usando duas combinações de oligonucleótidos. Para ambos os mutantes auxotróficos de triptofano (1 e 2.Δ*trpB*), amplificamos os produtos esperados (Figura 11). Para confirmar que não houve integração ectópica do cassete de deleção no genoma desses dois mutantes, foi realizado um Southern blot. Através da sonda *trpB*-específica (região flanqueadora 1 + 2 do cassete de deleção), visualizamos o padrão de hibridação esperado após a digestão do gDNA por restrição com *StuI*, nas cepas mutantes 2.Δ*trpB* (5,7 kb) e WT (3,1 kb). Apesar de 1.Δ*trpB* exibir o fragmento de 5,7 kb, também foi detectado um fragmento de hibridação de 6,0 kb, indicando um rearranjo genômico após a inserção de *Hyg^R* (Figura 12). Depois de confirmar que 2.Δ*trpB* é um mutante nulo para o alelo *trpB*, ele foi usado nos experimentos seguintes.

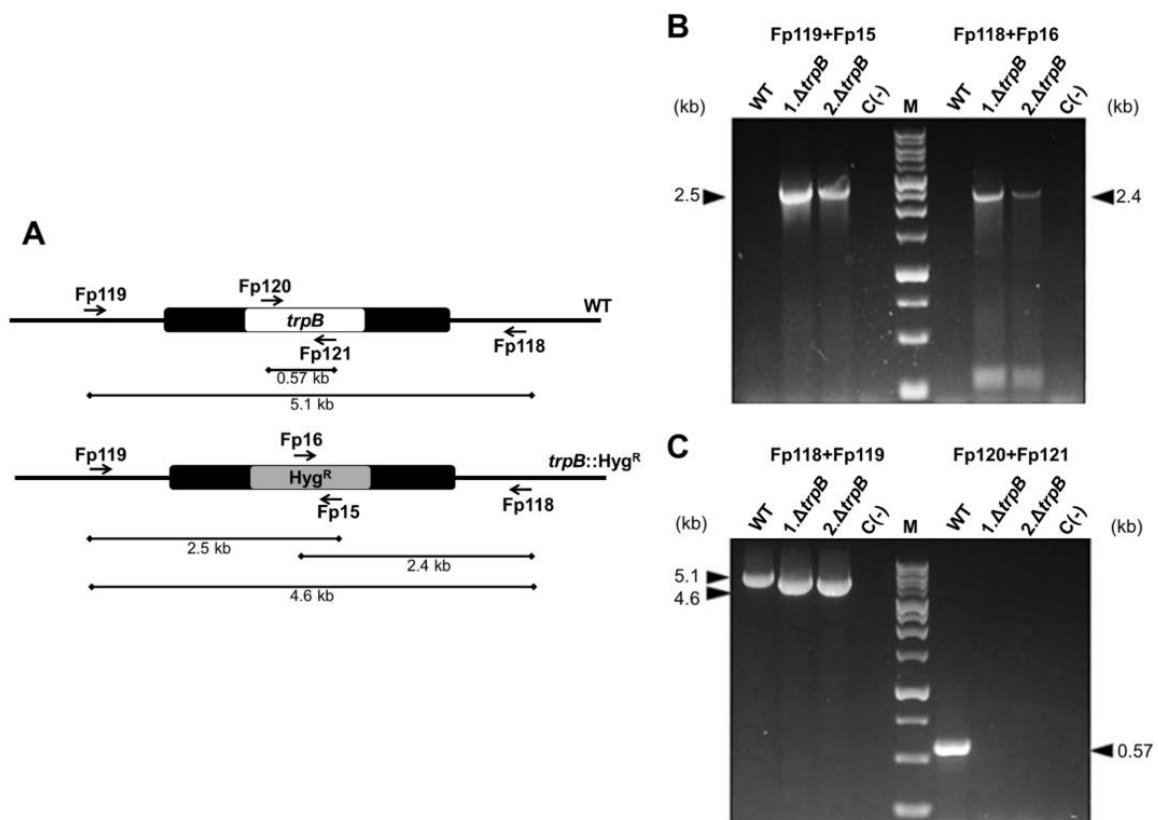


Figura 11. PCR de confirmação da recombinação homóloga do cassete de deleção de *trpB*. (A) Esquema representando a posição na sequência de DNA, dos oligonucleótidos usados para confirmar a inserção de *Hyg^R* no locus *trpB* de *F. pedrosoi*. (B) Produtos obtidos a partir da amplificação de 5' e 3' do locus de *trpB* confirmando a inserção do cassete de *Hyg^R*. (C) A esquerda, está apresentada a amplificação do fragmento inteiro, gerando um produto de 4,6kb para *trpB::hph* substituído e 5,1kb relacionado ao alelo intacto. A direita, está o produto dos oligonucleótidos internos específico para o locus de *trpB*, indicado pela banda de 570pb somente presente na cepa WT. Os tamanhos esperados das amplificações estão descritos na imagem. M: Marcador de peso molecular, WT: Cepa selvagem de *F. pedrosoi*, C (-): Controle negativo, H₂O.

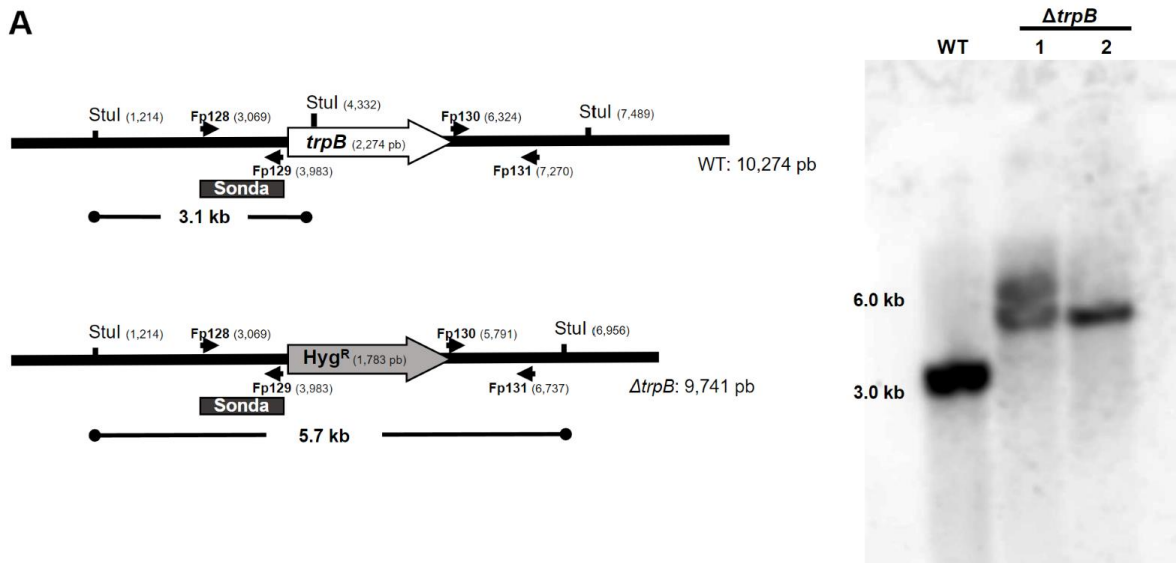


Figura 12. Deleção de *trpB* por recombinação homóloga do marcador seletivo *Hyg^R* e confirmação por Southern Blot. (A) Padrão de restrição de *StuI* no locus de *trpB* nas sequências genéticas do WT e mutantes. (B) Southern blot do gDNA extraído de: WT, 1. *ΔtrpB* e 2. *ΔtrpB* digeridos com a enzima de restrição *StuI* e sondados com o fragmento de PCR marcado com DIG de 914pb. A região de anelamento da sonda é mostrada com uma linha sólida. As indicações 1. *ΔtrpB* e 2. *ΔtrpB* correspondem aos dois mutantes deletados de *trpB*, enquanto WT é a cepa CBS 271.37.

5.3 Reconstituição do Gene de TrpB na Cepa Mutante 2.*ΔTrpB* de *F. pedrosoi*

Para garantir que o fenótipo auxotrófico de triptofano observado foi devido à deleção do *trpB*, como prova de conceito, reintroduzimos o gene *trpB* no genoma do mutante *ΔtrpB* (Figura 13A). Dos 370 transformantes resistentes a Nat recuperados, 12 recuperaram a capacidade de produzir triptofano e foram designados como cepas reconstituídas *ΔtrpB*+*trpB* (Figura 13B). A reinserção do *trpB* também foi confirmada por PCR, usando um par de oligonucleotídeos que amplificou um fragmento de 570 pb do gene (Figura 14B). Como foi selecionado o fenótipo *trp*+*Hyg^RNat^R* (Figura 13B), é confirmado que a inserção de *trpB* não ocorreu no locus original.

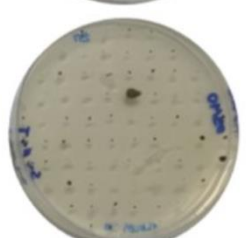
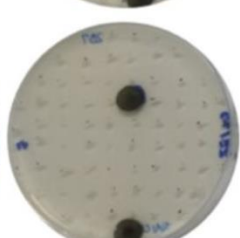
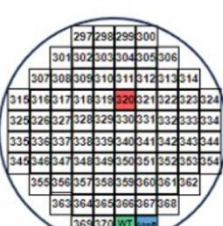
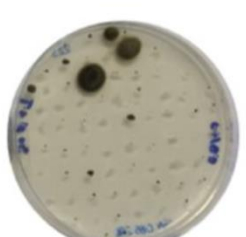
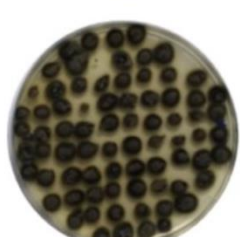
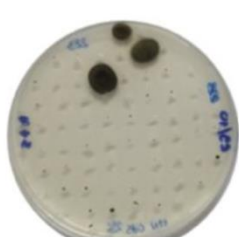
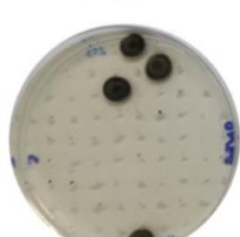
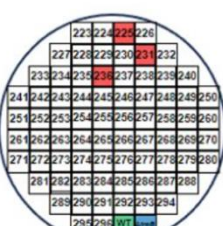
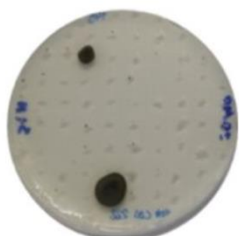
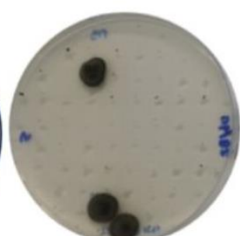
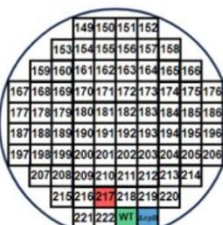
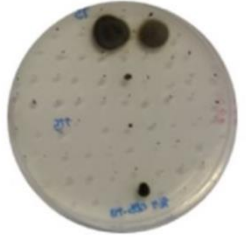
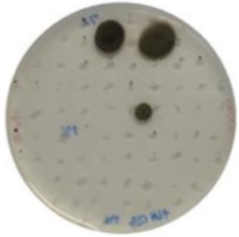
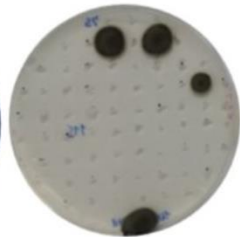
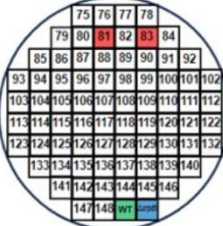
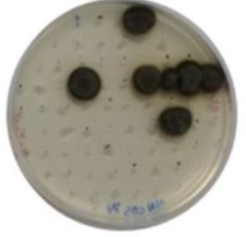
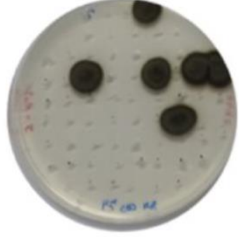
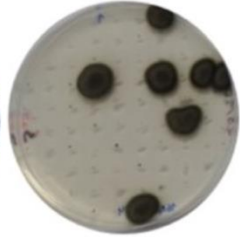
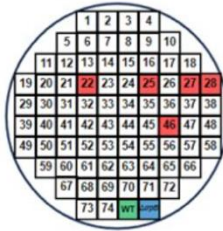
A

SAB

SAB+NAT

SAB+L-trp

SAB+L-trp+NAT



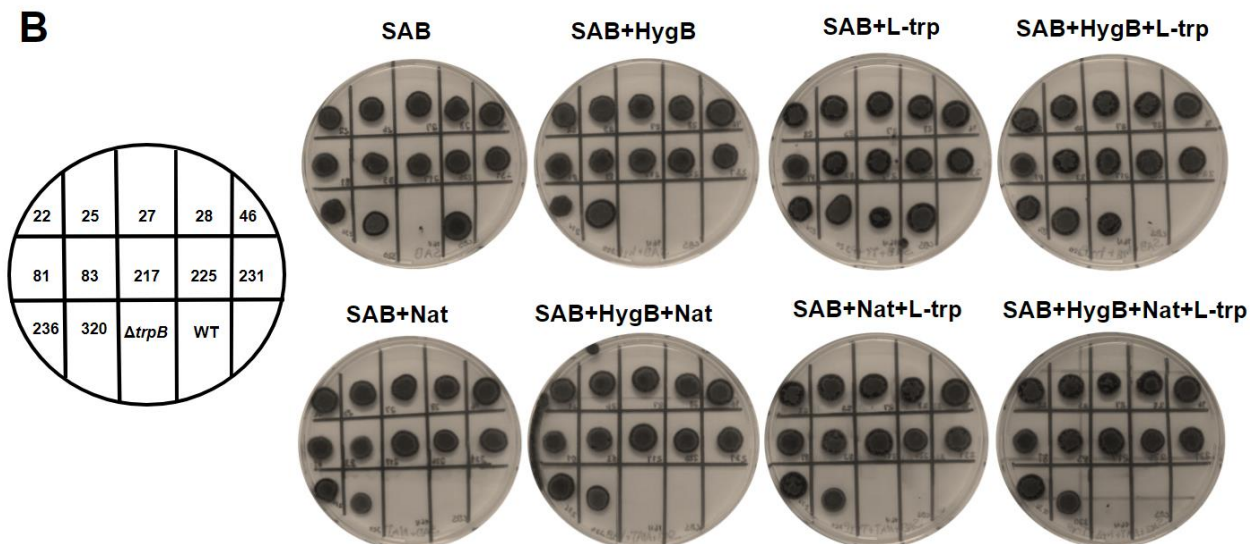


Figura 13. Obtenção e confirmação do reconstituído do mutante *trpB* de *F. pedrosoi* utilizando meio seletivo. (A) Foram obtidos 370 transformantes depois da técnica de biobalística, essas cepas foram inoculadas por ponto em meios SAB ágar, SAB+Nat, SAB+L-trp, SAB+Nat+L-trp e os transformantes escolhidos com base em sua capacidade de crescer sem a suplementação de triptofano e na presença de Nourseotricina (Nat). As indicações em vermelho, verde e azul são referentes aos transformantes escolhidos, a cepa WT e ao mutante $2.\Delta trpB$, respectivamente. L-trp (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Nat (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). (B) Cepas reconstituídas de *F. pedrosoi* recuperaram o fenótipo prototrófico de triptofano e mantiveram a marca de seleção Hyg^R . Os doze transformantes selecionados após transformação biobalística de $2.\Delta trpB$ com pFpNAT+*trpB* foram capazes de crescer na ausência de triptofano após integração ectópica de *trpB* no genoma. As cepas foram inoculadas em Sabouraud ágar (SAB), suplementado ou não com 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de triptofano (L-trp), 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Higromicina B (HygB) e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Nourseotricina (Nat) e incubadas a 28° C por 7 dias. As cepas $2.\Delta trpB$ e WT (CBS 271.37) foram usadas como controles e foram inoculadas nos espaços indicados.

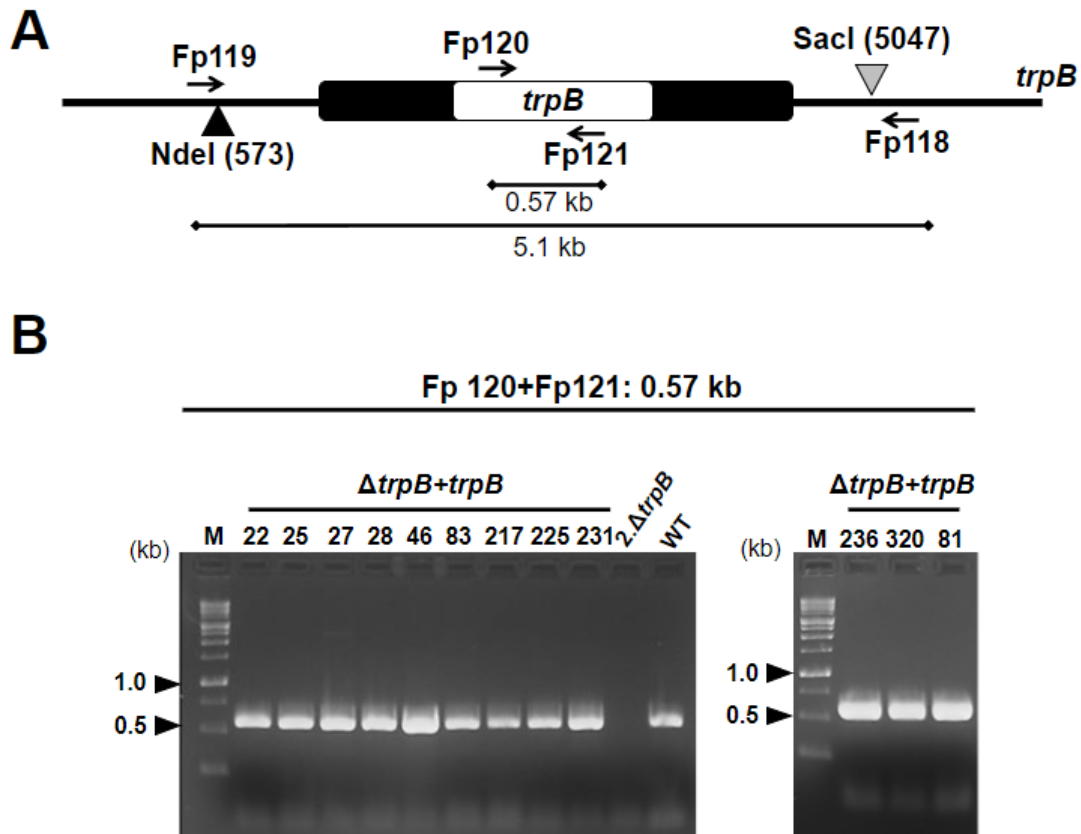


Figura 14. Estratégia para obtenção e confirmação do reconstituído do mutante *trpB* de *F. pedrosoi*. (A) Representação esquemática do locus *trpB* indicando a posição dos sítios de restrição NdeI e SacI e os oligonucleotídeos usados nas PCRs. (B) Confirmação de 12 cepas reconstituídas (*trpBΔ + trpB*) após amplificação por PCR usando oligonucleotídeos internos específicos de *trpB* (Fp120+Fp121). Os tamanhos dos produtos estão indicados na imagem. M: Marcador de peso molecular, WT: CBS 271.37.

Dentre os 12 reconstituídos, confirmados por PCR (figura 13B) foram escolhidos aleatoriamente 2 transformantes (*22.ΔtrpB + trpB*, *25.ΔtrpB + trpB*) para a realização dos testes de fenótipo, juntamente às linhagens selvagem e mutante. Todas as cepas (*2.ΔtrpB*, *22.ΔtrpB + trpB*, *25.ΔtrpB + trpB* e WT) utilizadas nos experimentos seguintes tiveram a presença de marcadores seletivos e o auxotrófico para triptofano confirmado após crescimento em ágar SAB suplementado com antibióticos (Nat e Hyg) e L-trp (500μg/mL) (Figura 15).

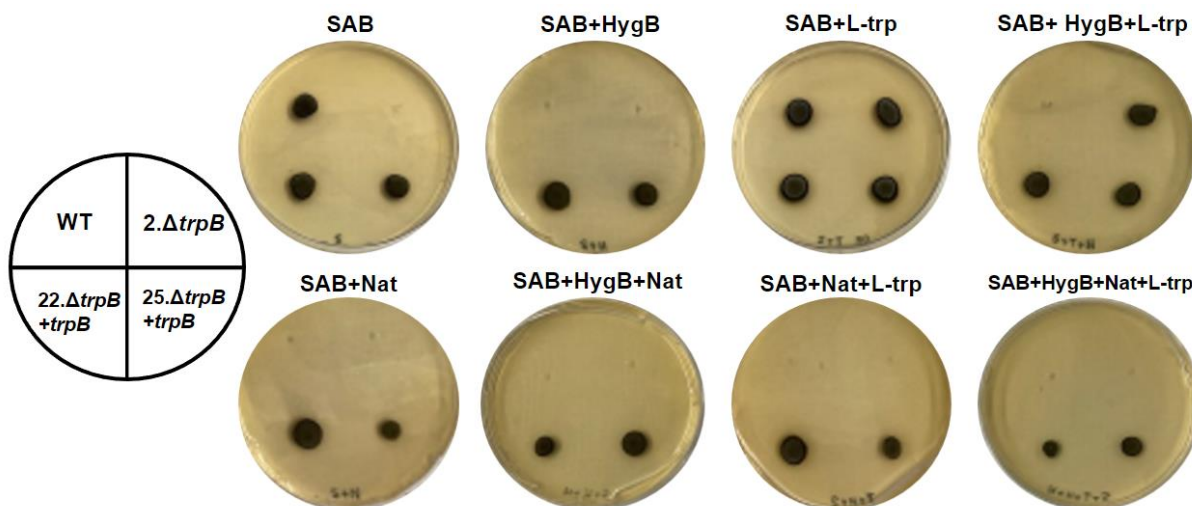


Figura 15. Crescimento em meios seletivos das linhagens de *F. pedrosoi*, escolhidas para testes de fenótipos. Placas de SAB ágar suplementadas ou não com: 500µg/mL de L-triptofano (L-trp), 50µg/mL de Higromicina B (HygB) e 50µg/mL de Nourseotricina. O mutante auxotrófico ($2.\Delta trpB$), as duas cepas reconstituídas independentemente ($22.\Delta trpB+trpB$ e $25.\Delta trpB+trpB$) e a linhagem selvagem CBS.271.37 (WT), foram inoculadas por ponto e mantidas em incubação a 28°C por 7 dias.

5.4 O Suprimento Externo de Triptofano é Necessário para o Crescimento do $\Delta trpB$ de *F. pedrosoi*

Para definir a menor quantidade de triptofano necessária para sustentar o crescimento do mutante auxotrófico de *F. pedrosoi*, várias concentrações foram testadas. Os níveis mínimos requeridos de L-trp por diferentes mutantes deletados de *trp* em outros fungos são muito variáveis, de 10µg/mL para *S. cerevisiae* [52] a 2000µg/mL para *Nodulisporium* [58]. Avaliamos o crescimento em ágar do $\Delta trpB$ em SAB suplementado com 20, 50, 100, 250, 400, 500 e 1000µg/mL de L-trp. Após 10 dias de incubação a 28°C, detectamos colônias de pigmentação escura em todas as placas fornecidas com L-trp acima de 250µg/mL. Assim, o mutante $\Delta trpB$ de *F. pedrosoi* requer níveis intermediários de L-trp para crescer e sintetizar melanina (Figura 16) em comparação com outros fungos, mas é incapaz de crescer na ausência de uma fonte externa desse aminoácido.

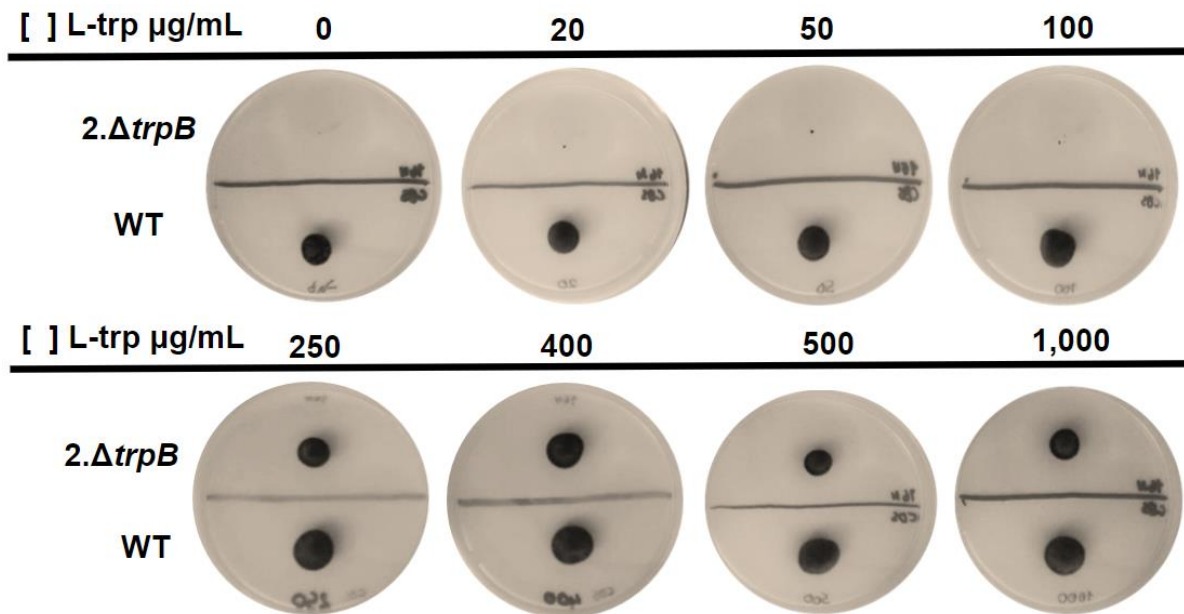
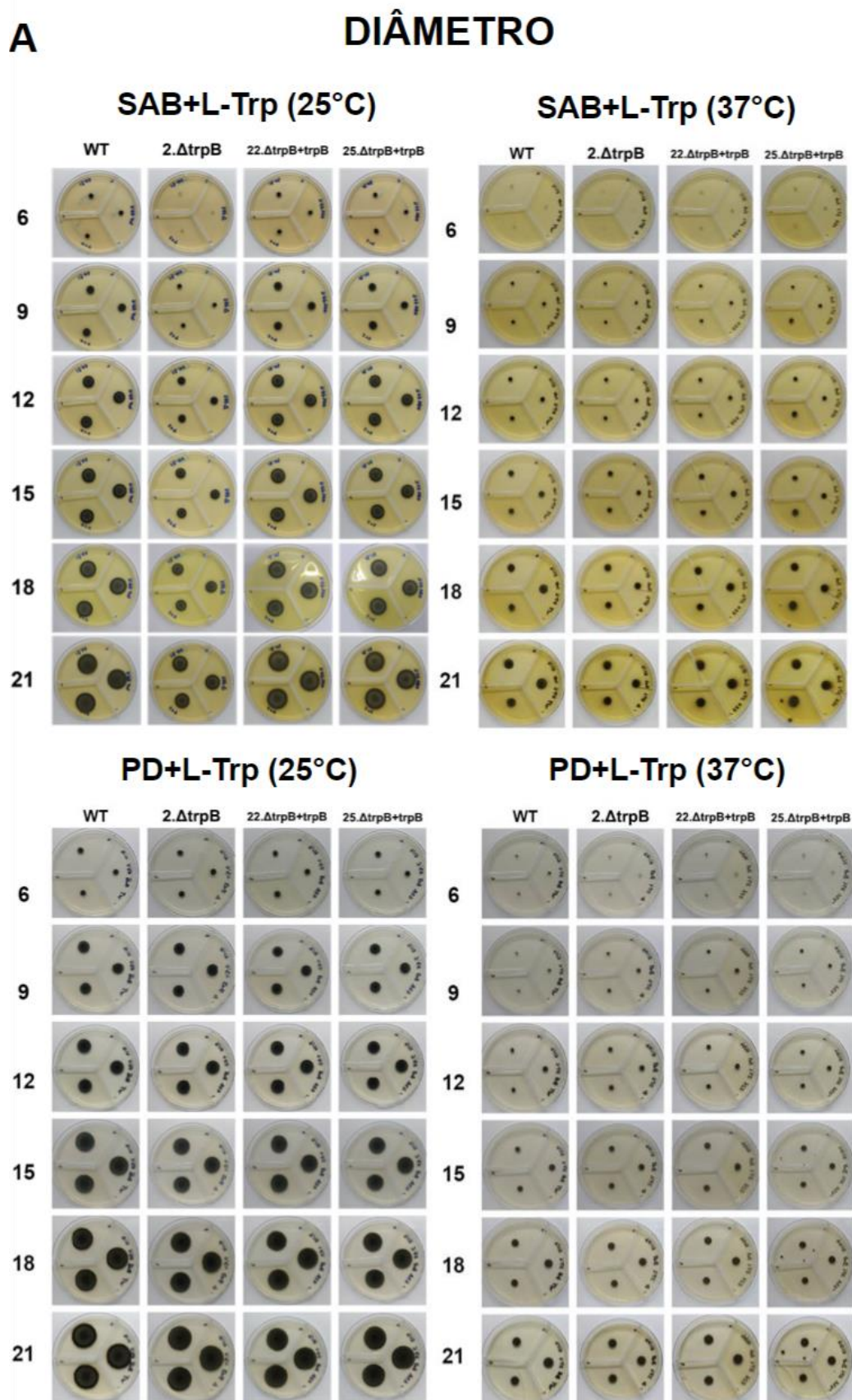


Figura 16. Determinação da concentração mínima necessária para o crescimento do mutante de *trpB* de *F. pedrosoi*. As cepas *2. ΔtrpB* e WT foram inoculadas em SAB ágar, suplementado ou não com diferentes quantidades de triptofano (L-trp) (0, 20, 50, 100, 250, 400, 500, 1000 $\mu\text{g/mL}$). WT representa a linhagem CBS 271.37. As placas foram incubadas a 28°C por 10 dias.

5.5 A Deleção de *trpB* Causa Retardo de Crescimento e Defeitos de Viabilidade em *F. pedrosoi*

Para avaliar se a exclusão do *trpB* afeta o ciclo de vida de *F. pedrosoi*, medimos o crescimento radial das colônias em ágar SAB suplementado com 500 $\mu\text{g/mL}$ de L-trp durante 21 dias a 25 e 37°C. O mutante (*2. ΔtrpB*) apresentou atraso no crescimento em relação às cepas WT e reconstituídas (*22. ΔtrpB + *trpB** e *25. ΔtrpB + *trpB**) a 25°C, no dia 6 as colônias de ΔtrpB possuem o mesmo tamanho que as demais, porém a área da gota inoculada é mais clara, denotando uma menor quantidade de células, e nos posteriores dias as suas medidas de diâmetro são inferiores as outras cepas (Figura 17 A, B); entretanto, a 37°C esse retardo de crescimento não foi tão evidente ao longo do período avaliado (Figura 17 A,B,C). Notavelmente, a taxa de crescimento de todas as cepas (WT, ΔtrpB e cepas reconstituídas) é mais lenta a 37°C do que a observada a 25°C. Em PD ágar suplementado não é observado a diferença de crescimento da linhagem *2. ΔtrpB* , como é vista nas placas SAB 25°C (Figura 17 B,D,E).



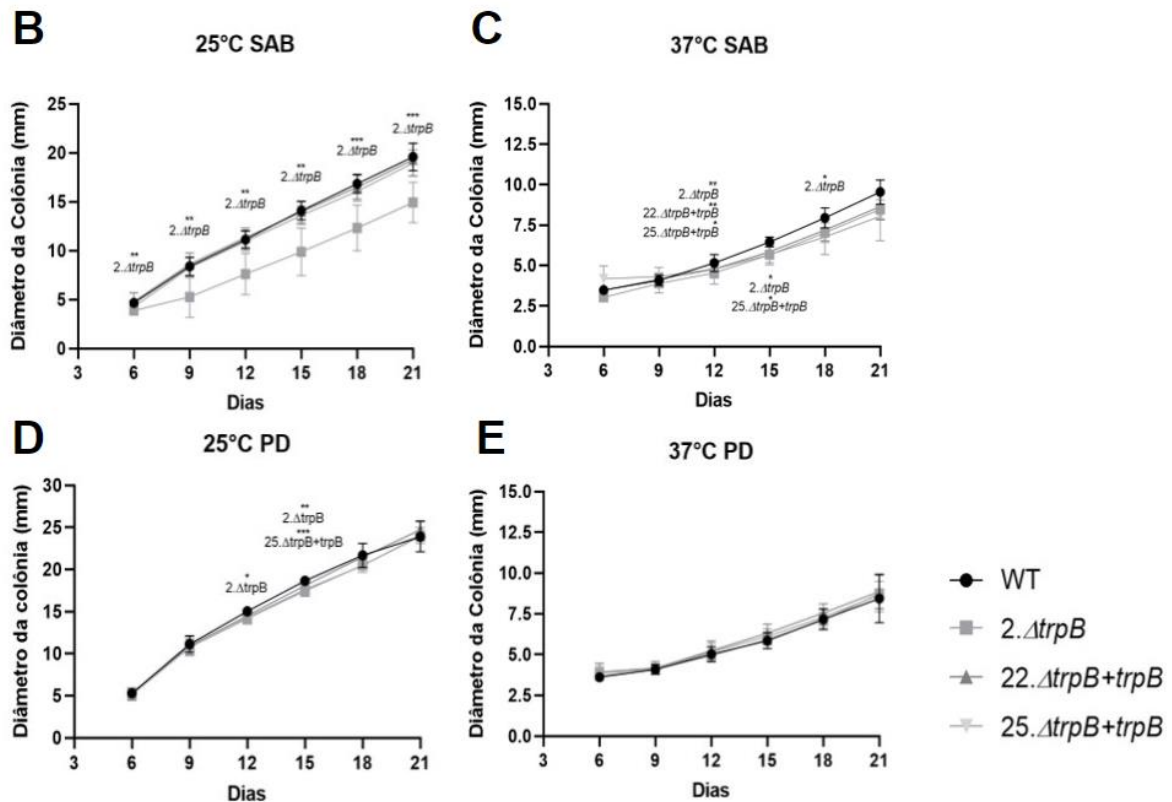


Figura 17. Crescimento do diâmetro das colônias de WT, *2.ΔtrpB*, *22.ΔtrpB+trpB* e *25.ΔtrpB+trpB*. Após inoculação em gota de 10^3 conídios, $2\mu\text{L}$ de volume, em placas de SAB e PD ágar, suplementadas com $500\mu\text{L/mL}$ de L-triptofano. As placas foram incubadas a 25°C e 37°C , por 21 dias. Fotos e medições do diâmetro das colônias foram tiradas a cada 3 dias. (A) Fotos representando um dos experimentos realizados. (B) Medidas do diâmetro das colônias em SAB a 25°C . (C) SAB a 37°C . (D) PD a 25°C . (E) PD a 37°C . Os testes estatísticos utilizados foram a análise de efeitos-mistos e pós teste de múltiplas comparações de Dunnett. $P < 0,0332$, $P < 0,0021$, e $P < 0,0002$ estão indicados como *, **, ***, respectivamente.

Também foi determinado se os conídios do *ΔtrpB* possuem a capacidade de produzir tubos germinativos e se eles são viáveis (Figura 18). Após 24 h a 28°C em caldo SAB, cerca de 25% dos conídios das linhagens WT e reconstituída germinaram, enquanto o *ΔtrpB* não atingiu 20% de germinação de conídios. Após 48 h de incubação a 28°C , o defeito de germinação permaneceu para o mutante em comparação com as outras cepas (WT e *25.ΔtrpB + trpB*), mas a porcentagem de tubos germinativos aumentou para cerca de 38% (Figura 18). Diferentemente do que observamos a 28°C , não detectamos diferenças estatísticas na germinação de conídios entre mutantes e as demais linhagens a 37°C .

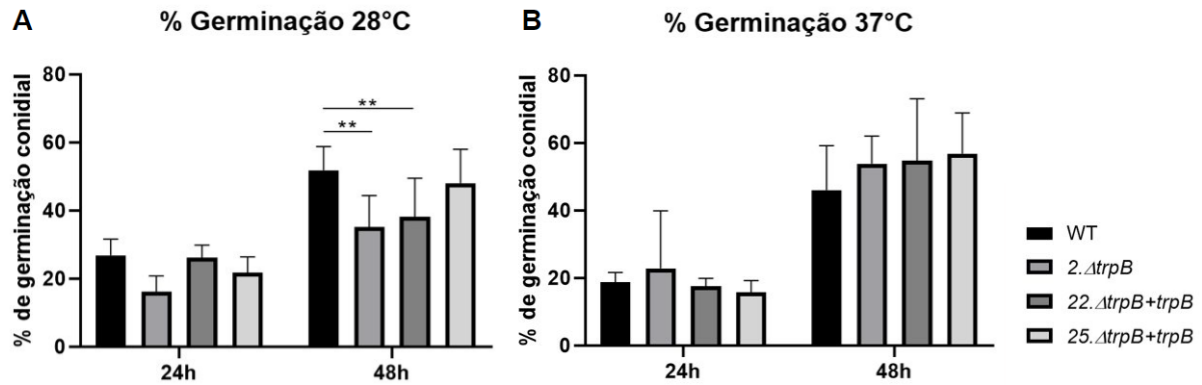


Figura 18. Porcentagem de germinação dos conídios em 24 e 48h. Após crescimento em caldo PD+L-Trp, conídios de *2.ΔtrpB*, *22.ΔtrpB + trpB*, *25.ΔtrpB + trpB*, WT foram coletados, contados e inoculados em 10 mL de caldo SAB + L-trp (500μg/mL de L-trp) na concentração de 10⁶ conídios/mL. Foram então incubados sob agitação a (A) 28°C e (B) 37°C, nos tempos de 24 e 48h, 100 conídios foram escolhidos aleatoriamente para avaliação de seu estado germinativo. O experimento foi realizado em triplicata, repetido duas vezes. Two-way ANOVA e o teste de comparações múltiplas de Dunnett foram usados para comparar as variações entre os grupos teste e o controle (WT). P < 0,0021 foi indicado como **.

Por fim, foi analisada a capacidade dos conídios em produzir colônias viáveis (UFC) em ágar SAB suplementado com 500μg/mL de triptofano. Conforme pode ser observado na Figura 19C, detectamos uma diferença estatística no número de colônias recuperadas no ágar SAB quando comparado o *ΔtrpB* com as demais cepas nas duas temperaturas testadas. A 28°C, uma média de 103% de conídios WT resultou em colônias viáveis em comparação com 51% de *ΔtrpB*, 86% de *22.ΔtrpB + trpB* e 77% de *25.ΔtrpB + trpB*. A diferença na viabilidade a taxa de *ΔtrpB* também foi detectada a 37°C, na qual apenas 41% das UFC foram recuperadas para *ΔtrpB*; enquanto isso, as cepas WT e reconstituídas ficaram na faixa de 60% (Figura 19C). Em conjunto, nossos dados indicam que *ΔtrpB* tem um atraso no crescimento radial e uma taxa de germinação conidial reduzida a 28°C. Também mostramos que a viabilidade diminuída dos conídios de *ΔtrpB* não é um fenótipo dependente da temperatura. As cepas reconstituídas apresentaram fenótipos semelhantes ao WT nos testes avaliados, indicando que os defeitos detectados no mutante estão relacionados à ausência de *trpB*. Na figura 19A é possível ver o atraso no crescimento das colônias de *2.ΔtrpB* em comparação as outras linhagens, no nono dia de incubação as colônias do mutante *trp-* a 25°C ainda não são visíveis; a 37°C o crescimento de *F. pedrosoi* é mais lento e não é possível observar crescimento em nenhuma das linhagens no dia 9, mas no dia 21 as colônias de *2.ΔtrpB* são visivelmente menores que as de WT e dos reconstituídos (Figura 19B).

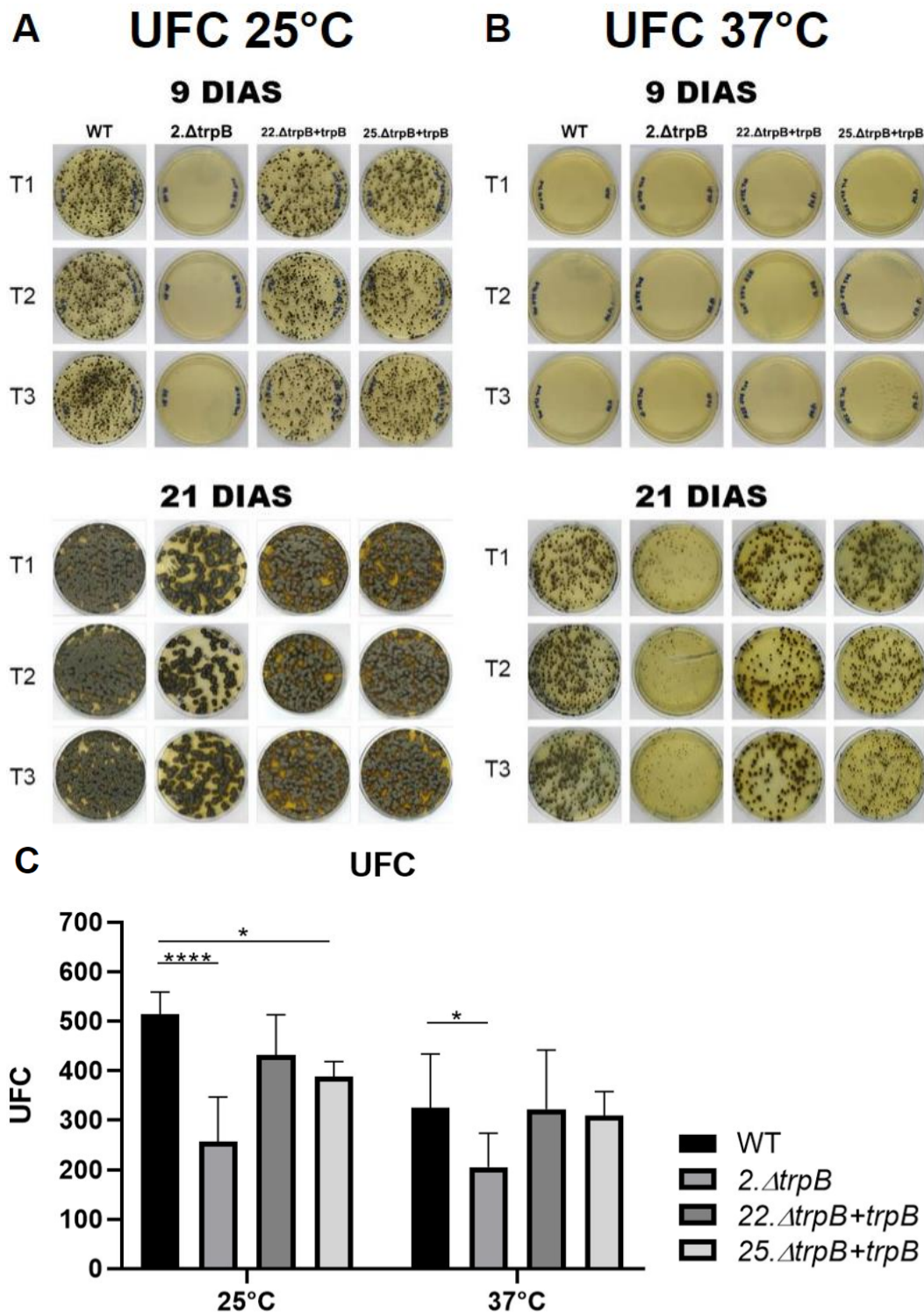


Figura 19.

Quantificação de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) Quinhentos conídios de cada cepa (2.ΔtrpB, 22.ΔtrpB + trpB, 25.ΔtrpB + trpB e WT) foram espalhados em placas em triplicata de SAB + L-trp ágar independentes (500μg/mL de L-trp). Incubadas a 28 ou 37°C por 10 dias, e então o número de colônias foi contado (UFC). (A) Fotos das placas representando um dos experimentos na marca de 9 e 21 dias, incubadas a temperatura de 25°C e (B) 37°C, (T1, T2 e T3 representam as triplicatas intra-experimentais). (C) Quantificação das UFCs. O experimento foi realizado em triplicata e repetido duas vezes. Os dados foram analisados por Two-way ANOVA e o pós teste de comparações múltiplas de Dunnett para comparar as variações entre os grupos controle (WT) e de teste; $P < 0,0332$ e $P < 0,0001$ estão representados por * e ****, respectivamente.

5.6 A Deleção do Alelo de *trpB* Induz Resistência a 5-FAA em *F. pedrosoi*

Em leveduras, mutantes para genes de biossíntese de triptofano são resistentes a 5-FAA [52]. Esse antimetabólito, ao ser assimilado, é convertido no produto tóxico 5-fluorotriptofano. Em nosso trabalho, decidimos avaliar se a deleção de *trpB* em *F. pedrosoi* confere resistência ao 5-FAA, a fim de ampliar as ferramentas de manipulação genética para seleção e contra-seleção de mutantes. Para tanto, observamos diluições seriadas de WT e $2.\Delta trpB$ em placas de SAB+L-*trp* suplementadas com quantidades crescentes de 5-FAA (0,25; 0,5; 1,0; 2,0; e 3,0 mg/mL). A linhagem mutante de *trpB* de *F. pedrosoi* tem maior resistência ao 5-FAA em comparação com a cepa WT. Após 13 dias de incubação a 28°C, observamos que o mutante *trpB* tolera 0,5 mg/mL de 5-FAA em baixa densidade de conídios (10^2), enquanto o WT cresce apenas em inoculação em ponto de 10^5 e 10^4 conídios no volume de 5µL. Nenhuma das cepas cresceu em placas com concentrações >0,75 mg/mL de 5-FAA (Figura 20A). A reintrodução do alelo de *trpB* restaurou a suscetibilidade do $\Delta trpB$ ao nível WT (Figura 20B).

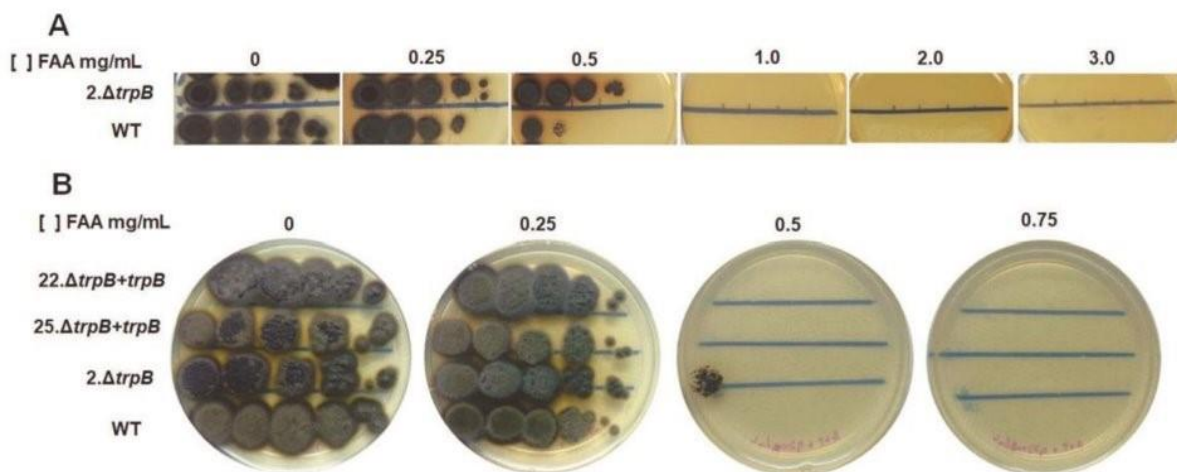


Figura 20. Deleção de *trpB* em *F. pedrosoi* induz resistência a 5-FAA. As cepas foram cultivadas em caldo PD suplementado com 500 µg/mL de triptofano (L-*trp*) por 7 dias a 28°C. Os conídios foram purificados, contados e diluídos em série para $2 \times 10^8 - 10^3$ /mL. Cinco µL de cada diluição foram pipetados em SAB + 500 µg/mL de L-*trp*, suplementado com concentrações crescentes de 5-FAA (0, 0,25, 0,5, 1, 2 e 3 mg/mL) em (A) e (0, 0,25, 0,5, 0,75mg/mL) em (B). (A) Diluições seriadas de conídios $2.\Delta trpB$ e WT (CBS 271.37) foram pipetadas e as placas incubadas a 28 °C por 13 dias. O mutante *trpB* tolera até 0,5 mg/mL de 5-FAA em baixa densidade de conídios (10^2), enquanto WT cresce apenas até as concentrações de 10^5 e 10^4 conídios. Nenhuma das cepas foi capaz de crescer em concentrações de 5-FAA acima de 0,75 mg/mL. (B) A suscetibilidade ao 5-FAA requer uma via de biossíntese de triptofano funcional. Os transformantes reconstituídos ($22.\Delta trpB + trpB$ e $25.\Delta trpB + trpB$) recuperaram a sensibilidade ao 5-FAA de $\Delta trpB$ para os níveis de WT após incubação por 7 dias a 28 °C. As imagens são representativas de três experimentos independentes.

A fim de analisar o uso de 5-FAA como um agente para selecionar mutantes auxotróficos de triptofano, nós semeamos cepas mutantes WT e $\Delta trpB$ em diferentes placas de ágar como segue: SAB ágar, SAB + L-*trp*, SAB + L-*trp* + HygB e SAB + L-*trp* + 5-FAA. Além disso, para simular uma transformação genética e avaliar a taxa de mutantes *trpB* espontâneos para auxotrofia, uma alta

densidade de conídios (5×10^5) foi espalhada nas placas. Como esperado, nas placas SAB apenas a cepa WT foi capaz de crescer, enquanto na condição SAB + L-trp + HygB apenas a cepa $\Delta trpB$ cresceu, pois a resistência a HygB é garantida pela presença do gene *hph* (marcador de resistência Hyg^R). Curiosamente, na condição de SAB + L-trp + 5-FAA, apenas colônias $\Delta trpB$ foram observadas e nenhuma colônia WT foi detectada nessas placas (Figura 21). Este experimento demonstra que é possível utilizar 0,5 mg/mL de 5-FAA como único agente seletivo para identificação de mutantes auxotróficos do triptofano, ampliando o leque de aplicações relacionadas ao locus de *trpB* e estabelecendo-o como um potencial marcador de transformação genética. Em conjunto, nossos resultados indicam que o meio suplementado com 5-FAA pode ser uma abordagem interessante para a seleção de mutantes auxotróficos de triptofano. Além disso, o 5-FAA pode ser aplicado como um seletor de transformantes no caso de *trp*⁻ como cepa receptora em combinação com o uso de *trpB* como marcador seletivo na transformação genética de *F. pedrosoi*.

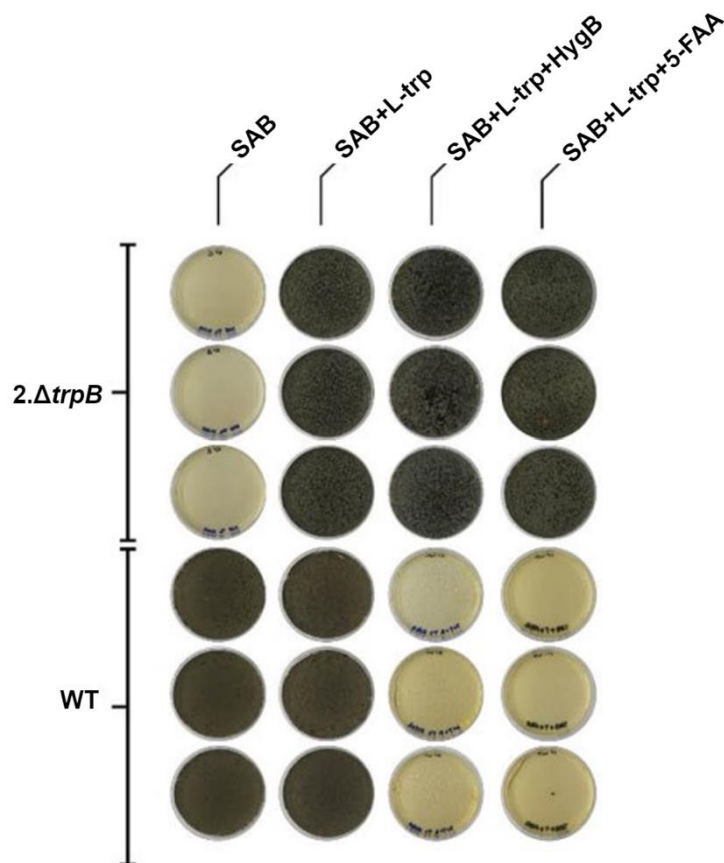


Figura 21. Avaliação do uso do 5-FAA na concentração de 0,5 mg/mL como agente de seleção para mutantes *trp*⁻, e para contra seleção de cepas que apresentam via de síntese do triptofano ativa, em alta densidade celular (5×10^5) de WT e $\Delta trpB$. As placas SAB ágar, SAB+L-trp, SAB+L-trp+HygB e SAB+L-trp+5-FAA inoculadas com 5×10^5 conídios, incubadas a 25°C e inspecionadas a cada três dias até o vigésimo segundo dia de crescimento. As placas SAB ágar foram suplementadas com 500µg/mL de L-trp, 100µg/mL de HygB e 0,5mg/mL de 5-FAA. WT representa a cepa selvagem (CBS 271.37) e a figura retrata um experimento, realizado em triplicata.

6. Discussão:

Primeiro, a maquinaria enzimática para a biossíntese de triptofano em *F. pedrosoi* foi avaliada *in silico*. As enzimas em *F. pedrosoi* foram identificadas e se apresentam de forma semelhante a outros fungos filamentosos [48,50]. Ao contrário de *S. cerevisiae*, *F. pedrosoi* possui quatro das cinco enzimas necessária para transformar o corismato em triptofano [47]. Como relatado para outros ascomicetos e basidiomicetos, uma única ORF TRP1 codificando uma PRA isomerase monofuncional (PRAI) não foi encontrada em *F. pedrosoi*. Em vez disso, ela é fundida com *trpC^{TRP3}*, gerando uma enzima tri-funcional com o arranjo de N- para C- terminais de glutamina amidotransferase (GATase), indol-3-glicerol fosfato sintase (IGPS) e PRAI [47,48,50,59,60]. As análises mostraram que *F. pedrosoi* codifica todos os domínios catalíticos necessários para a síntese de triptofano; essa constatação abre perspectivas e lança novas ferramentas para uma análise detalhada e exploração funcional desta via essencial para a sobrevivência dos fungos. Curiosamente, em *C. neoformans*, TRP3^{tpC} e TRP5^{tpB} são genes essenciais [50], mas o mesmo não pode ser dito de outros fungos dos quais mutantes auxotróficos foram previamente isolados [53,58,61-63].

Os quatro transcritos da via biossintética de *trp* (*trpB*, *trpC*, *trpD* e *trpE*) foram detectados por RT-PCR após a biomassa da cepa WT ter sido incubada por 3 h em meio mínimo (Czapek-Dox) e meio mínimo suplementado com L-*trp* (Czapek-Dox + L-*trp*). Não foi possível detectar expressão diferencial desses genes dependendo do meio de cultura e tempo de incubação utilizados, é plausível que o tempo de incubação tenha sido muito curto, e insuficiente para depletar as reservas de triptofano celulares e por isso não foi observado modulação genética, novos testes não foram realizados; No entanto, os mecanismos de regulação da via do triptofano merecem ser elucidados em um futuro trabalho. Como os genes *trp* são marcadores seletivos adequados para transformação genética em outros fungos, associado ao fato de que seus mutantes inativados são facilmente detectados em placas de transformação genética, decidimos avaliar a abordagem DJ-PCR para construir o cassete de deleção e a técnica de biobalística para entregar o DNA em *F. pedrosoi*. Então, como prova de conceito da metodologia, caracterizamos funcionalmente o gene putativo da triptofano sintase (*trpB*) neste patógeno fúngico humano.

A triptofano sintase é conservada entre bactérias, archaea, fungos e plantas, e está ausente em mamíferos; entretanto, apenas os fungos apresentam as duas subunidades fundidas em uma única ORF em uma ordem α - β [37,64]. Por esta razão, nesses microrganismos, a enzima é um homodímero, ao contrário das bactérias, onde é uma enzima tetramérica com uma organização β - α [45]. A possível sequência da proteína *TrpB* de *F. pedrosoi* apresenta ambos os domínios catalíticos para α e β : cadeia alfa da triptofano sintase, enzima dependente de piridoxal-fosfato e a região que os interliga [45]. *FpTrpB* possui a região conectora mais longa (83 aa) localizada entre um resíduo de tirosina (Y) e um de prolina (P), descrito até agora entre espécies fúngicas (variando de 40 a 69 aa) [44,63-65]. A definição da estrutura tridimensional de triptofano sintases ocorreu após a conclusão dos estudos de

cristalografia de raios-X na enzima de *S. thyphimurium* [66]. A região do conector forma um canal necessário para a transferência mecânica da indole entre os dois sítios catalíticos, e em fungos, é mais longa do que em outros organismos para permitir o dobramento adequado das subunidades α e β e assim, catalisar suas respectivas reações [46,67]. A deleção de um segmento de 18 aminoácidos dessa região em *S. cerevisiae* inativa a enzima e a reinserção de um fragmento não relacionado restaura sua atividade [67]. *TrpB* de *F. pedrosoi* compartilha todas as características já descritas para outros fungos; entretanto, uma análise mais detalhada de sua estrutura tridimensional pode elucidar se um maior comprimento da região do túnel promove algum efeito nas propriedades catalíticas enzimáticas.

Em 2018, nosso grupo relatou, por meio de duas técnicas eficientes (biobalística e transformação mediada por *Agrobacterium*), a inserção e expressão de DNA exógeno no genoma de *F. pedrosoi*. Também exploramos três marcadores de resistência a drogas (NAT, HYG e NEO) para seleção de mutantes. Dando continuidade aos nossos esforços para disponibilizar e melhorar novas ferramentas moleculares para a manipulação genética de um agente causador de CBM, neste estudo, desenvolvemos uma abordagem estável, rápida e eficiente para alcançar a disrupção genética direcionada por transformação biobalística em *F. pedrosoi*. Utilizamos o marcador Hyg^R para substituir *trpB* e construímos um cassete de deleção usando a técnica de PCR de dupla junta. Esta técnica já foi empregada com sucesso para outros fungos [49,68–70]; no entanto, este trabalho mostra pela primeira vez seu uso na construção de cassetes para a disrupção de gene em *F. pedrosoi*. DJ-PCR baseia-se em apenas duas rodadas sucessivas de ampliações de DNA e não requer etapas demoradas de construção de vetores, como é o caso da transmissão mediada por *Agrobacterium*, transformação na qual é necessária a inserção do cassete de deleção no vetor portador de T-DNA. Outra vantagem de construir os cassetes de exclusão genética por DJ-PCR é que produtos amplificados podem ser diretamente usados na transformação genética do fungo por eletroporação ou biobalística. Como a recombinação homóloga dentro dos fragmentos do marcador seletivo também é necessária para a recuperação mutante, a chance de obter transformantes mitoticamente instáveis é reduzida com o uso da estratégia recombinação cruzada, evitando inserções genômica indesejadas [69]. Considerando que a recombinação não homóloga mediada pela via NHEJ é mais comum em fungos filamentosos do que a recombinação homóloga (HR) [71], essa estratégia contribui para gerar uma maior frequência de integração direcionada. Em nosso conhecimento, este é o primeiro relato da utilização do método DJ-PCR seguido de transformação biobalística para obtenção de mutantes nulos em *F. pedrosoi*.

Três experimentos independentes produziram uma eficiência de 6 a 11% na recombinação de cruzamento triplo de para promover a substituição de *trpB*. Dois outros genes foram deletados com sucesso em nosso laboratório, com taxa de HR de 2 e 5%. Nossos dados estão de acordo com aqueles previamente descritos para outros fungos filamentosos, em que se observa uma baixa eficiência de integração do alvo em um locus específico [71]. Para outros ascomicetos, esta taxa é bastante variável: *A. fumigatus* tem uma eficiência de HR de 5–10% [72,73], enquanto em *N. crassa* varia de 2 a 23%

[74,75]. Mesmo dentro da mesma espécie, pode ser observada uma eficiência variável, como observamos para *F. pedrosoi*. Este fato pode ser atribuído ao contexto do locus gênico, tamanho da região flanqueadora escolhida para construir o cassete de deleção e o método de entrega do DNA [71]. Para contornar esse problema, em muitos fungos, especialmente ascomicetos, diversos trabalhos passados já inativaram o maquinário da via de NHEJ, responsável pela integração aleatória de DNA exógeno em sítios genômicos ectópicos. A abordagem mais comum é desativar os genes *ku70* ou *ku80*, criando cepas recipientes deficientes em NHEJ, o que melhorou significativamente a frequência de recuperação de mutantes inativados [71,76]. Para evitar que integrações ectópicas, durante o processo de reinserção genética de mutantes nulos, interfira na virulência e outras características do fungo, alguns autores já relataram regiões genômicas consideradas seguras para integrações genéticas, como o porto seguro para *C. neoformans* [77,78] ou o locus *RPS10* em *Candida albicans* [79]. Embora ainda não tenhamos avaliado uma região potencialmente segura para reconstituição gênica em *Fonsecaea* spp., esta ferramenta será de grande relevância quando descrita.

trpB não é um gene essencial em *F. pedrosoi*; entretanto, sua ausência afeta diretamente seu ciclo de vida. Nossos resultados mostram que o mutante *trpB* de *F. pedrosoi* é extremamente dependente de uma fonte externa de triptofano. Suplementação do meio de cultura de no mínimo 250 µg/mL deste aminoácido é necessária para sustentar o crescimento vegetativo micelial e a esporulação, todavia a suplementação do dobro dessa concentração, 500 µg/mL (nível de L-trp usado em todos os testes de fenótipo), não foi suficiente para manter o nível da germinação, viabilidade e taxa de crescimento semelhantes aos da cepa WT. Não avaliamos se os fenótipos WT da cepa $\Delta trpB$ podem ser resgatados em quantidades mais altas de L-*trpB*, conforme relatado para *A. nidulans* [63]. Em *A. nidulans* $\Delta trpB$, embora 10 µM (2 µg/mL) de triptofano já conseguirem desencadear germinação de conídios e 100 µM (20 µg/mL) manterem o crescimento vegetativo em meio sólido, apenas concentrações mais altas de L-trp (10 mM/2000 µg/mL) induzem a produção de conidiósporos. No entanto, mesmo a suplementação de 50 mM (10.000 µg/mL) de triptofano não foi suficiente para gerar ascósporos viáveis e cleistotécios maduros [63].

Os mutantes auxotróficos de trp de levedura requerem baixos níveis de triptofano exógeno, para *S. cerevisiae* 20 µg/mL (0,1 mM), *Hansenulla* 30 µg/mL (0,15 mM) e *Candida guilliermondii* 40 µg/mL (0,2 mM) [52,53,55]. O oposto é visto alguns fungos filamentosos, tais como *F. pedrosoi* que demandam quantidades 10 a 100 vezes maiores deste aminoácido, alguns exemplos são, *Aspergillus niger* (1 mM), *Metarhizium anisopliae* (5 mM) e *Nodulosporium sp* (10 mM) [58,61,62,80]. Eckert e colegas sugeriram que o aumento da demanda por triptofano pode ser devido a sua capacidade limitada de absorver o aminoácido pela fonte externa [63]. É amplamente conhecido que a maquinaria anabólica e catabólica do triptofano, permeases e transportadores, são finamente sintonizados pelos níveis intracelulares de aminoácidos aromáticos [48,50,64,81]. Em espécies fúngicas filamentosas, o fator de transcrição Cpc (controle da via cruzada) regula a síntese de aminoácidos aromáticos, incluindo o

triptofano [59,63,82-84]. A alta disponibilidade de triptofano exógeno também pode promover a repressão das etapas iniciais da biossíntese de aminoácidos aromáticos, pela sinalização da alta concentração de um deles (L-trp), possivelmente prejudicando o crescimento dos mutantes *trp* devido à diminuição da síntese de fenilalanina e tirosina. Para contornar esse defeito, o fornecimento de fenilalanina juntamente com o triptofano melhorou o crescimento de mutantes *trp* de *N. crassa* [85]. Uma investigação mais aprofundada pode esclarecer se CpcA desempenha o mesmo papel em *F. pedrosoi* e se a adição de fontes externas de aminoácidos aromáticos beneficiaria o crescimento micelial. Interessantemente, detectamos, através de uma busca em BLASTP *in silico*, uma sequência similar para CpcA no genoma de *F. pedrosoi* abrindo perspectivas para sua futura caracterização.

Mutantes auxotróficos e genes anabólicos que complementam os defeitos de biossíntese têm sido amplamente utilizados como poderosas ferramentas moleculares no sistema da transformação genética fúngica, uma vez que a detecção dos transformantes prototróficos é rápida, fácil e não requer antibióticos de alto custo [76,86,87]. A utilização de mutantes auxotróficos também apresenta desvantagens a serem consideradas. No mutante auxotrófico de *URA3* de *C. albicans*, os autores identificaram que a integração ectópica do gene *URA3* afeta diferentes características do fungo, incluindo a virulência [79]. As enzimas que codificam *trp* têm sido aplicadas como marcadores seletivos de vários fungos [53,54,59,61,80,88] e neste trabalho, propomos o uso de *trpB* como um novo marcador seletivo em *F. pedrosoi*. Mostramos a complementação do mutante $\Delta trpB$ de *F. pedrosoi* com a cópia selvagem do gene, que apesar de ter sido inserido aleatoriamente no genoma, os mutantes se tornaram prototróficos e recuperaram as características da cepa WT.

Avaliamos a suscetibilidade de *F. pedrosoi* ao 5-FAA. Nossos resultados mostraram que este antimetabólito pode ser usado como um marcador de contra-seleção na transformação genética em experimentos usando *trp*⁻ como cepa receptora. Essa estratégia já é amplamente utilizada para leveduras [50,52,53,55]; entretanto, até onde sabemos, não existem dados para fungos filamentosos. Devido à incapacidade da cepa WT crescer em meio de cultura suplementado com 0,5 mg/mL de 5-FAA, essa é uma ferramenta viável e interessante para encontrar facilmente mutantes *trp*⁻ (seleção positiva) e para identificação de transformantes complementados com *trpB* (contra seleção) em *F. pedrosoi*. A metodologia de contra-seleção é realmente útil para a reciclagem de marcadores seletivos para múltiplas estratégias de deleção de genes na mesma cepa hospedeira, e pode ser empregado para selecionar mutações pontuais em genes relacionados à via de biossíntese [88].

Considerando tudo isso, o mutante *trpB*, apesar de algumas características defeituosas observadas em condições de teste, ele ainda é viável como cepa receptora e pode ser utilizado para gerar outras cepas deletadas; além disso, o gene *trpB* pode ser uma alternativa aos antibióticos como um agente seletivo marcador para genômica funcional em *F. pedrosoi*.

Como o triptofano é um aminoácido essencial para o desenvolvimento e sobrevivência dos fungos, e mamíferos o adquirem de fontes alimentares, alguns autores sugerem que seu aparelho de biossíntese pode ser um alvo terapêutico seletivo atraente [89]. Em *C. neoformans*, um inibidor da antranilato sintase (6-diazo-5-oxo-L-norleucina) foi eficiente em promover a morte de células *in vitro* [50]. Embora o papel da *TRP3* e *TRP5* não tenha sido avaliado na patogenicidade de *C. neoformans* [50], em *A. fumigatus*, mutantes nulos de *aroC* (corismato mutase) e *trpA* assumem papéis importantes em modelos de infecção por aspergilose pulmonar e sistêmica [90]. Considerando que *F. pedrosoi* requer níveis mais altos de triptofano para sobreviver (250 µg/mL) do que aquele alcançado no soro humano (cerca de 14 µg/mL) [91], e que os mamíferos não produzem este aminoácido, a busca por inibidores específicos das enzimas da biossíntese do triptofano torna-se uma estratégia potencial a ser explorada contra *Fonsecaea* spp. e outros patógenos microbianos [89,92,93].

7. Conclusão:

Em conclusão, este trabalho foi a primeira inativação gênica bem-sucedida do principal agente causador da CBM, o *F. pedrosoi*. Foi demonstrado que o uso de marcadores divididos para integração homóloga aliada à transformação por técnica da biobalística são viáveis para obter mutantes $\Delta trpB$. O gene *trpB* pode ser explorado como um marcador seletivo alternativo e atraente para complementação do mutante auxotrófico *trpB*. Além disso, mostramos o emprego do 5-FAA como seleção positiva de mutantes *trp-* e como uma nova abordagem para facilitar a identificação da complementação de mutantes nulos em *F. pedrosoi*. Nossos dados ampliam o arcabouço de métodos disponíveis para estudos do genoma funcional e da estrutura molecular, utilizando-se de técnicas tradicionais para melhorar o conhecimento não só da biologia de *F. pedrosoi*, mas também de outros agentes etiológicos da CBM. Notavelmente, os estudos funcionais de genes em fungos do gênero *Fonsecaea* spp. estão muito atrás em comparação com outras espécies de fungos, contribuindo ainda mais para o fato de que permanecem muitas lacunas em nosso conhecimento desses agentes e da doença que eles causam. Assim, a CBM continua a ser tratada como uma doença tropical negligenciada que afeta muitas pessoas ao redor do mundo.

8. Referências:

1. Santos A.L.S., Palmeira V.F., Rozental S., Kneipp L.F., Nimrichter L., Alviano D.S., Rodrigues M.L., Alviano C.S. Biology and Pathogenesis of *Fonsecaea pedrosoi*, the Major Etiologic Agent of Chromoblastomycosis. *FEMS Microbiol. Rev.* 2007;31:570–591. doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00077.x. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
2. Queiroz-Telles F., Esterre P., Perez-Blanco M., Vitale R., Salgado C.G., Bonifaz A. Chromoblastomycosis: An Overview of Clinical Manifestations, Diagnosis and Treatment. *Med. Mycol.* 2009;47:3–15. doi: 10.1080/13693780802538001. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
3. Coelho R.A., Brito-Santos F., Figueiredo-Carvalho M.H.G., Silva J.V.D.S., Gutierrez-Galhardo M.C., do Valle A.C.F., Zancopé-Oliveira R.M., Trilles L., Meyer W., Freitas D.F.S., et al. Molecular Identification and Antifungal Susceptibility Profiles of Clinical Strains of *Fonsecaea* spp. Isolated from Patients with Chromoblastomycosis in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018;12:1–15. doi: 10.1371/journal.pntd.0006675. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
4. Brito A.C.D., Bittencourt M.D.J.S. Chromoblastomycosis: An Etiological, Epidemiological, Clinical, Diagnostic, and Treatment Update. *An. Bras. Dermatol.* 2018;93:495–506. doi: 10.1590/abd1806-4841.20187321. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
5. Santos D.W.C.L., de Azevedo C.d.M.P.E.S., Vicente V.A., Queiroz-Telles F., Rodrigues A.M., de Hoog G.S., Denning D.W., Colombo A.L. The Global Burden of Chromoblastomycosis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2021;15:1–26. doi: 10.1371/journal.pntd.0009611. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
6. Bonifaz A., Carrasco-Gerard E., Saul A. Chromoblastomycosis: Clinical and Mycologic Experience of 51 Cases. *Mycoses.* 2001;44:1–7. doi: 10.1046/j.1439-0507.2001.00613.x. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
7. Esterre P., Andriantsimahavandy A., Ramarcel E.R., Pecarrere J.-L. Forty Years of Chromoblastomycosis in Madagascar: A Review. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1996;55:45–47. doi: 10.4269/ajtmh.1996.55.45. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
8. Agarwal R., Singh G., Ghosh A., Verma K.K., Pandey M., Xess I. Chromoblastomycosis in India: Review of 169 Cases. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2017;11:e0005534. doi: 10.1371/journal.pntd.0005534. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
9. Attapattu M.C. Chromoblastomycosis—A Clinical and Mycological Study of 71 Cases from Sri Lanka. *Mycopathologia.* 1997;137:145–151. doi: 10.1023/A:1006819530825. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
10. Gomes R.R., Vicente V.A., Azevedo C.M.P.S.d., Salgado C.G., da Silva M.B., Queiroz-Telles F., Marques S.G., Santos D.W.C.L., de Andrade T.S., Takagi E.H., et al. Molecular Epidemiology of Agents of Human Chromoblastomycosis in Brazil with the Description of Two Novel Species. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016;10:1–20. doi: 10.1371/journal.pntd.0005102. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
11. Silva J.P., De Souza W., Rozental S. Chromoblastomycosis: A Retrospective Study of 325 Cases on Amazonic Region (Brazil) *Mycopathologia.* 1998;143:171–175. doi: 10.1023/A:1006957415346. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
12. Queiroz-Telles F., de Hoog S., Santos D.W.C.L., Salgado C.G., Vicente V.A., Bonifaz A., Roilides E., Xi L., de Maria Pedrozo e Silva Azevedo C., da Silva M.B., et al. Chromoblastomycosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2017;30:233–276. doi: 10.1128/CMR.00032-16. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

13. Gimenes V.M.F., Criado P.R., Martins J.E.C., Almeida S.R. Cellular Immune Response of Patients with Chromoblastomycosis Undergoing Antifungal Therapy. *Mycopathologia*. 2006;162:97–101. doi: 10.1007/s11046-006-0041-x. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
14. Ameen M. Chromoblastomycosis: Clinical Presentation and Management. *Clin. Exp. Dermatol.* 2009;34:849–854. doi: 10.1111/j.1365-2230.2009.03415.x. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
15. Alviano C.S., Farbiarz S.R., De Souza W., Angluster J., Travassos L.R. Characterization of *Fonsecaea pedrosoi* Melanin. *J. Gen. Microbiol.* 1991;137:837–844. doi: 10.1099/00221287-137-4-837. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
16. Alviano D.S., Franzen A.J., Travassos L.R., Holandino C., Rozental S., Ejzemberg R., Alviano C.S., Rodrigues M.L. Melanin from *Fonsecaea pedrosoi* Induces Production of Human Antifungal Antibodies and Enhances the Antimicrobial Efficacy of Phagocytes. *Society*. 2004;72:229–237. doi: 10.1128/IAI.72.1.229-237.2004. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
17. Cunha M.M.L., Franzen A.J., Alviano D.S., Zanardi E., Alviano C.S., De Souza W., Rozental S. Inhibition of Melanin Synthesis Pathway by Tricyclazole Increases Susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* against Mouse Macrophages. *Microsc. Res. Tech.* 2005;68:377–384. doi: 10.1002/jemt.20260. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
18. Cunha M.M., Franzen A.J., Seabra S.H., Herbst M.H., Vugman N.V., Borba L.P., de Souza W., Rozental S. Melanin in *Fonsecaea pedrosoi*: A Trap for Oxidative Radicals. *BMC Microbiol.* 2010;10:80. doi: 10.1186/1471-2180-10-80. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
19. Bocca A.L., Brito P.P.M.S., Figueiredo F., Tosta C.E. Inhibition of Nitric Oxide Production by Macrophages in Chromoblastomycosis: A Role for *Fonsecaea pedrosoi* Melanin. *Mycopathologia*. 2006;161:195–203. doi: 10.1007/s11046-005-0228-6. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
20. Pinto L., Granja L.F.Z., Alviano D.S., da Silva M.H., Alviano C.S., Ejzemberg R. Activation of the Human Complement System by Pigmented and Hypopigmented Mycelia of the Fungus *Fonsecaea pedrosoi*. *Mycoses*. 2011;54:474–480. doi: 10.1111/j.1439-0507.2010.01956.x. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
21. Pinto L., Granja L.F.Z., Almeida M.A.d., Alviano D.S., Silva M.H.D., Ejzemberg R., Rozental S., Alviano C.S. Melanin Particles Isolated from the Fungus *Fonsecaea pedrosoi* Activates the Human Complement System. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2018;8:113. doi: 10.1590/0074-02760180120. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
22. Gómez B.L., Nosanchuk J.D. Melanin and Fungi. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2003;16:91–96. doi: 10.1097/00001432-200304000-00005. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
23. Chongkae S., Nosanchuk J.D., Pruksaphon K., Laliem A., Pornsuwan S., Youngchim S. Production of Melanin Pigments in Saprophytic Fungi in Vitro and during Infection. *J. Basic Microbiol.* 2019;59:1092–1104. doi: 10.1002/jobm.201900295. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
24. Xiao X., Li Y., Lan Y., Zhang J., He Y., Cai W., Chen Z., Xi L., Zhang J. Deletion of PksA Attenuates the Melanogenesis, Growth and Sporulation Ability and Causes Increased Sensitivity to Stress Response and Antifungal Drugs in the Human Pathogenic Fungus *Fonsecaea monophora*. *Microbiol. Res.* 2021;244:126668. doi: 10.1016/j.micres.2020.126668. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
25. Li M., Huang H., Liu J., Zhang X., Li Q., Li D., Luo M., Wang X., Zeng W., Sun J., et al. Deletion C-Terminal Thioesterase Abolishes Melanin Biosynthesis, Affects Metabolism and Reduces the Pathogenesis of *Fonsecaea monophora*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2022;16:1–25. doi: 10.1371/journal.pntd.0010485. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

26. Siqueira I.M., Wüthrich M., Li M., Wang H., Las-Casas L.d.O., de Castro R.J.A., Klein B., Bocca A.L. Early Immune Response against *Fonsecaea Pedrosoi* Requires Dectin-2-Mediated Th17 Activity, Whereas Th1 Response, Aided by Treg Cells, Is Crucial for Fungal Clearance in Later Stage of Experimental Chromoblastomycosis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2020;14:e0008386. doi: 10.1371/journal.pntd.0008386. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
27. Wüthrich M., Wang H., Li M., Lerksuthirat T., Hardison S.E., Brown G.D., Klein B. *Fonsecaea pedrosoi*-Induced Th17-Cell Differentiation in Mice Is Fostered by Dectin-2 and Suppressed by Mincle Recognition. *Eur. J. Immunol.* 2015;45:2542–2552. doi: 10.1002/eji.201545591. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
28. Castro R.J.A.D., Siqueira I.M., Jerônimo M.S., Basso A.M.M., Veloso Junior P.H.D.H., Magalhães K.G., Leonhardt L.C., Oliveira S.A.M.D., Bürgel P.H., Tavares A.H., et al. The Major Chromoblastomycosis Etiologic Agent *Fonsecaea pedrosoi* Activates the NLRP3 Inflammasome. *Front. Immunol.* 2017;8:1572. doi: 10.3389/fimmu.2017.01572. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
29. Machado A.P., Regis Silva M.R., Fischman O. Local Phagocytic Responses after Murine Infection with Different Forms of *Fonsecaea pedrosoi* and Sclerotic Bodies Originating from an Inoculum of Conidiogenous Cells. *Mycoses.* 2011;54:202–211. doi: 10.1111/j.1439-0507.2009.01792.x. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
30. Siqueira I.M., de Castro R.J.A., Leonhardt L.C.d.M., Jerônimo M.S., Soares A.C., Raiol T., Nishibe C., Almeida N., Tavares A.H., Hoffmann C., et al. Modulation of the Immune Response by *Fonsecaea pedrosoi* Morphotypes in the Course of Experimental Chromoblastomycosis and Their Role on Inflammatory Response Chronicity. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2017;11:e0005461. doi: 10.1371/journal.pntd.0005461. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
31. Alviano C.S., Farbiarz S.R., Travassos L.R., Angluster J., de Souza W. Effect of Environmental Factors on *Fonsecaea pedrosoi* Morphogenesis with Emphasis on Sclerotic Cells Induced by Propranolol. *Mycopathologia.* 1992;119:17–23. doi: 10.1007/BF00492225. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
32. Alviano D.S., Kneipp L.F., Lopes A.H., Travassos L.R., Meyer-Fernandes J.R., Rodrigues M.L., Alviano C.S. Differentiation of *Fonsecaea pedrosoi* Mycelial Forms into Sclerotic Cells Is Induced by Platelet-Activating Factor. *Res. Microbiol.* 2003;154:689–695. doi: 10.1016/j.resmic.2003.09.002. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
33. Dong B., Tong Z., Li R., Chen S.C.A., Liu W., Liu W., Chen Y., Zhang X., Duan Y., Li D., et al. Transformation of *Fonsecaea pedrosoi* into Sclerotic Cells Links to the Refractoriness of Experimental Chromoblastomycosis in BALB/c Mice via a Mechanism Involving a Chitin-Induced Impairment of IFN- γ Production. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018;12:1–31. doi: 10.1371/journal.pntd.0006237. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
34. Las-Casas L.d.O., Marina C.L.F., de Castro R.J.A., Coelho L.C., Bão S.N., de Hoog G.S., Vicente V.A., Fernandes L., Bocca A.L. Pathogenicity and Growth Conditions Modulate *Fonsecaea* Extracellular Vesicles' Ability to Interact With Macrophages. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2022;12:1–14. doi: 10.3389/fcimb.2022.879018. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
35. Florencio C.S., Brandão F.A.S., Teixeira M.d.M., Bocca A.L., Felipe M.S.S., Vicente V.A., Fernandes L. Genetic Manipulation of *Fonsecaea pedrosoi* Using Particles Bombardment and Agrobacterium Mediated Transformation. *Microbiol. Res.* 2018;207:269–279. doi: 10.1016/j.micres.2018.01.001. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
36. Lynch J.H., Dudareva N. Aromatic Amino Acids: A Complex Network Ripe for Future Exploration. *Trends Plant Sci.* 2020;25:670–681. doi: 10.1016/j.tplants.2020.02.005. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

37. Hutter R., Niederberger P., DeMoss J.A. Tryptophan Biosynthetic Genes in Eukaryotic Microorganisms. *Annu. Rev. Microbiol.* 1986;40:55–77. doi: 10.1146/annurev.mi.40.100186.000415. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
38. Bentley R., Haslam E. The Shikimate Pathway—A Metabolic Tree with Many Branches. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1990;25:307–384. doi: 10.3109/10409239009090615. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
39. Herrmann K.M., Weaver L.M. The Shikimate Pathway. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1999;50:473–503. doi: 10.1146/annurev.arplant.50.1.473. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
40. Comai S., Bertazzo A., Brughera M., Crotti S. Tryptophan in Health and Disease. *Adv. Clin. Chem.* 2020;95:165–218. doi: 10.1016/bs.acc.2019.08.005. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
41. Ren W., Bin P., Yin Y., Wu G. Impacts of Amino Acids on the Intestinal Defensive System. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2020;1265:133–151. doi: 10.1007/978-3-030-45328-2_8. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
42. Yanofsky C. Comparison of Regulatory and Structural Regions of Genes of Tryptophan Metabolism. *Mol. Biol. Evol.* 1984;1:143–161. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040307. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
43. Burns D.M., Horn V., Paluh J.Y.C. Evolution of the Tryptophan Synthetase of Fungi. Analysis of Experimentally Fused *Escherichia Coli* Tryptophan Synthetase Alpha and Beta Chains. *Biochemistry.* 1990;265:2060–2069. doi: 10.1016/S0021-9258(19)39940-5. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
44. Burns D.M., Yanofsky C. Nucleotide Sequence of the *Neurospora Crassa* Trp-3 Gene Encoding Tryptophan Synthetase and Comparison of the Trp-3 Polypeptide with Its Homologs in *Saccharomyces Cerevisiae* and *Escherichia Coli*. *J. Biol. Chem.* 1989;264:3840–3848. doi: 10.1016/S0021-9258(19)84927-X. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
45. Dunn M.F., Niks D., Ngo H., Barends T.R.M., Schlichting I. Tryptophan Synthase: The Workings of a Channeling Nanomachine. *Trends Biochem. Sci.* 2008;33:254–264. doi: 10.1016/j.tibs.2008.04.008. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
46. Fleming J.R., Schupfner M., Busch F., Baslé A., Ehrmann A., Sterner R., Mayans O. Evolutionary Morphing of Tryptophan Synthase: Functional Mechanisms for the Enzymatic Channeling of Indole. *J. Mol. Biol.* 2018;430:5066–5079. doi: 10.1016/j.jmb.2018.10.013. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
47. Braus G.H. Aromatic Amino Acid Biosynthesis in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*: A Model System for the Regulation of a Eukaryotic Biosynthetic Pathway. *Microbiol. Rev.* 1991;55:349–370. doi: 10.1128/mr.55.3.349-370.1991. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
48. Choera T., Zelante T., Romani L., Keller N.P. A Multifaceted Role of Tryptophan Metabolism and Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity in *Aspergillus Fumigatus*-Host Interactions. *Front. Immunol.* 2018;8:1–11. doi: 10.3389/fimmu.2017.01996. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
49. Kim M.S., Kim S.Y., Yoon J.K., Lee Y.W., Bahn Y.S. An Efficient Gene-Disruption Method in *Cryptococcus neoformans* by Double-Joint PCR with NAT-Split Markers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009;390:983–988. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.10.089. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
50. Fernandes J.D.S., Martho K., Tofik V., Vallim M.A., Pascon R.C. The Role of Amino Acid Permeases and Tryptophan Biosynthesis in *Cryptococcus neoformans* Survival. *PLoS ONE.* 2015;10:1–22. doi: 10.1371/journal.pone.0132369. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

51. Nakayashiki H., Hanada S., Quoc N.B., Kadotani N., Tosa Y., Mayama S. RNA Silencing as a Tool for Exploring Gene Function in Ascomycete Fungi. *Fungal Genet. Biol.* 2005;42:275–283. doi: 10.1016/j.fgb.2005.01.002. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
52. Toyn J.H., Gunyuzlu P.L., Hunter White W., Thompson L.A., Hollis G.F. A Counterselection for the Tryptophan Pathway in Yeast: 5-Fluoroanthranilic Acid Resistance. *Yeast.* 2000;16:553–560. doi: 10.1002/(SICI)1097-0061(200004)16:6<553::AID-YEA554>3.0.CO;2-7. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
53. Foureau E., Clastre M., Millerioux Y., Simkin A.J., Cornet L., Dutilleul C., Besseau S., Marais E., Melin C., Guillard J., et al. A TRP5/5-Fluoroanthranilic Acid Counter-Selection System for Gene Disruption in *Candida guilliermondii*. *Curr. Genet.* 2012;58:245–254. doi: 10.1007/s00294-012-0377-3. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
54. Cheon S.A., Han E.J., Kang H.A., Ogrydziak D.M., Kim J.Y. Isolation and Characterization of the TRPI Gene from the Yeast *Yarrowia lipolytica* and Multiple Gene Disruption Using a TRP Blaster. *Yeast.* 2003;20:677–685. doi: 10.1002/yea.987. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
55. Cheon S.A., Choo J., Ubiyvovk V.M., Park J.-N., Kim M.W., Oh D.-B., Kwon O., Sibirny A.A., Kim J.-Y., Kang H.A. New Selectable Host-Marker Systems for Multiple Genetic Manipulations Based on TRP1, MET2 and ADE2 in the Methylotrophic Yeast *Hansenula polymorpha*. *Yeast.* 2009;26:507–521. doi: 10.1002/yea.1701. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
56. Abe F., Hiraki T. Mechanistic Role of Ergosterol in Membrane Rigidity and Cycloheximide Resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 2009;1788:743–752. doi: 10.1016/j.bbamem.2008.12.002. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
57. Käfer E. The Anthranilate Synthetase Enzyme Complex and the Trifunctional Trpc Gene of *Aspergillus*. *Can. J. Genet. Cytol.* 1977;19:723–738. doi: 10.1139/g77-079. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
58. Ireland C., Peekhaus N., Lu P., Sangari R., Zhang A., Masurekar P., An Z. The Tryptophan Synthetase Gene TRP1 of *Nodulisporium* Sp.: Molecular Characterization and Its Relation to Nodulisporic Acid a Production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008;79:451–459. doi: 10.1007/s00253-008-1440-3. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
59. Dörnte B., Kües U. Paradoxical Performance of Tryptophan Synthase Gene Trp1 + in Transformations of the Basidiomycete *Coprinopsis cinerea*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016;100:8789–8807. doi: 10.1007/s00253-016-7693-3. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
60. Yelton M.M., Hamer J.E., de Souza E.R., Mullaney E.J., Timberlake W.E. Developmental Regulation of the *Aspergillus nidulans* TrpC Gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1983;80:7576–7580. doi: 10.1073/pnas.80.24.7576. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
61. Goosen T., van Engelenburg F., Debets F., Swart K., Bos K., van den Broek H. Tryptophan Auxotrophic Mutants in *Aspergillus niger*: Inactivation of the TrpC Gene by Cotransformation Mutagenesis. *MGG Mol. Gen. Genet.* 1989;219:282–288. doi: 10.1007/BF00261189. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
62. Horng J.S., Linz J.E., Pestka J.J. Cloning and Characterization of the TrpC Gene from an Aflatoxigenic Strain of *Aspergillus parasiticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1989;55:2561–2568. doi: 10.1128/aem.55.10.2561-2568.1989. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
63. Eckert S.E., Kübler E., Hoffmann B., Braus G.H. The Tryptophan Synthase-Encoding TrpB Gene of *Aspergillus nidulans* Is Regulated by the Cross-Pathway Control System. *Mol. Gen. Genet.* 2000;263:867–876. doi: 10.1007/s004380000250. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

64. Zalkin H.Y.C. Yeast Gene TRP5: Structure, Function, Regulation. *J. Biol. Chem.* 1982;257:1491–1500. doi: 10.1016/S0021-9258(19)68220-7. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
65. Skrzynia C., Binniger D.M., Alspaugh J.A., Pukkila P.J. Molecular Characterization of TRP1, a Gene Coding for Tryptophan Synthetase in the Basidiomycete *Coprinus Cinereus*. *Gene.* 1989;81:73–82. doi: 10.1016/0378-1119(89)90338-7. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
66. Hyde C.C., Ahmed S.A., Padlan E.A., Miles E.W., Davies D.R. Three-Dimensional Structure of the Tryptophan Synthase Alpha 2 Beta 2 Multienzyme Complex from *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 1988;263:17857–17871. doi: 10.1016/S0021-9258(19)77913-7. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
67. Crawford I.P., Clarke M., Van Cleemput M., Yanofsky C. Crucial Role of the Connecting Region Joining the Two Functional Domains of Yeast Tryptophan Synthetase. *J. Biol. Chem.* 1987;262:239–244. doi: 10.1016/S0021-9258(19)75917-1. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
68. Liang L., Li J., Cheng L., Ling J., Luo Z., Bai M., Xie B. A High Efficiency Gene Disruption Strategy Using a Positive-Negative Split Selection Marker and Electroporation for *Fusarium oxysporum*. *Microbiol. Res.* 2014;169:835–843. doi: 10.1016/j.micres.2014.03.004. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
69. Kück U., Hoff B. New Tools for the Genetic Manipulation of Filamentous Fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010;86:51–62. doi: 10.1007/s00253-009-2416-7. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
70. Shen B., Xiao J., Dai L., Huang Y., Mao Z., Lin R., Yao Y., Xie B. Development of a High-Efficiency Gene Knockout System for *Pochonia chlamydosporia*. *Microbiol. Res.* 2015;170:18–26. doi: 10.1016/j.micres.2014.10.001. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
71. Krappmann S. Gene Targeting in Filamentous Fungi: The Benefits of Impaired Repair. *Fungal Biol. Rev.* 2007;21:25–29. doi: 10.1016/j.fbr.2007.02.004. [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
72. Da Silva Ferreira M.E., Kress M.R.V.Z., Savoldi M., Goldman M.H.S., Härtl A., Heinekamp T., Brakhage A.A., Goldman G.H. The *AkuBKU80* Mutant Deficient for Nonhomologous End Joining Is a Powerful Tool for Analyzing Pathogenicity in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot. Cell.* 2006;5:207–211. doi: 10.1128/EC.5.1.207-211.2006. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
73. Krappmann S., Sasse C., Braus G.H. Gene Targeting in *Aspergillus Fumigatus* by Homologous Recombination Is Facilitated in a Nonhomologous End- Joining-Deficient Genetic Background. *Eukaryot. Cell.* 2006;5:212–215. doi: 10.1128/EC.5.1.212-215.2006. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
74. Ishibashi K., Suzuki K., Ando Y., Takakura C., Inoue H. Nonhomologous Chromosomal Integration of Foreign DNA Is Completely Dependent on MUS-53 (Human Lig4 Homolog) in *Neurospora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006;103:14871–14876. doi: 10.1073/pnas.0604477103. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
75. Ninomiya Y., Suzuki K., Ishii C., Inoue H. From The Cover: Highly Efficient Gene Replacements in *Neurospora* Strains Deficient for Nonhomologous End-Joining. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004;101:12248–12253. doi: 10.1073/pnas.0402780101. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
76. Jiang D., Zhu W., Wang Y., Sun C., Zhang K.-Q., Yang J. Molecular Tools for Functional Genomics in Filamentous Fungi: Recent Advances and New Strategies. *Biotechnol. Adv.* 2013;31:1562–1574. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.08.005. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

77. Arras S.D.M., Chitty J.L., Blake K.L., Schulz B.L., Fraser J.A. A Genomic Safe Haven for Mutant Complementation in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS ONE*. 2015;10:1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0122916. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
78. Fan Y., Lin X. An Intergenic “Safe Haven” Region in *Cryptococcus neoformans* Serotype D Genomes. *Fungal Genet. Biol.* 2020;144:103464. doi: 10.1016/j.fgb.2020.103464. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
79. Brand A., MacCallum D.M., Brown A.J.P., Gow N.A.R., Odds F.C. Ectopic Expression of URA3 Can Influence the Virulence Phenotypes and Proteome of *Candida albicans* but Can Be Overcome by Targeted Reintegration of URA3 at the RPS10 Locus. *Eukaryot. Cell*. 2004;3:900–909. doi: 10.1128/EC.3.4.900-909.2004. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
80. Staats C.C., Junges A., Fitarelli M., Furlaneto M.C., Vainstein M.H., Schrank A. Gene Inactivation Mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in the Filamentous Fungi *Metarhizium anisopliae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007;76:945–950. doi: 10.1007/s00253-007-1043-4. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
81. Wang P.-M., Choera T., Wiemann P., Pisithkul T., Amador-Nogues D., Keller N.P. TrpE Feedback Mutants Reveal Roadblocks and Conduits toward Increasing Secondary Metabolism in *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet. Biol.* 2016;89:102–113. doi: 10.1016/j.fgb.2015.12.002. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
82. Carsiotis M., Jones R.F. Cross-Pathway Regulation: Tryptophan-Mediated Control of Histidine and Arginine Biosynthetic Enzymes in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 1974;119:889–892. doi: 10.1128/jb.119.3.889-892.1974. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
83. Tian C., Kasuga T., Sachs M.S., Glass N.L. Transcriptional Profiling of Cross Pathway Control in *Neurospora crassa* and Comparative Analysis of the Gcn4 and CPC1 Regulons. *Eukaryot. Cell*. 2007;6:1018–1029. doi: 10.1128/EC.00078-07. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
84. Braus G.H., Sasse C., Krappmann S. Amino Acid Acquisition, Cross-Pathway Control, and Virulence in *Aspergillus*. *Med. Mycol.* 2006;44:91–94. doi: 10.1080/13693780600898029. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
85. Perkins D.D., Radford A., Newmeyer D., Björkman M. Chromosomal Loci of *Neurospora crassa*. *Microbiol. Rev.* 1982;46:426–570. doi: 10.1128/mr.46.4.426-570.1982. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
86. Prabha V.L., Punekar N.S. Genetic Transformation in *Aspergilli*: Tools of the Trade. *Indian J. Biochem. Biophys.* 2004;41:205–215. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
87. Meyer V. Genetic Engineering of Filamentous Fungi—Progress, Obstacles and Future Trends. *Biotechnol. Adv.* 2008;26:177–185. doi: 10.1016/j.biotechadv.2007.12.001. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
88. Olmedo-Monfil V., Cortés-Penagos C., Herrera-Estrella A. Three Decades of Fungal Transformation: Key Concepts and Applications. *Methods Mol. Biol.* 2004;267:297–313. doi: 10.1385/1-59259-774-2:297. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
89. Amich J., Bignell E. Amino Acid Biosynthetic Routes as Drug Targets for Pulmonary Fungal Pathogens: What Is Known and Why Do We Need to Know More? *Curr. Opin. Microbiol.* 2016;32:151–158. doi: 10.1016/j.mib.2016.06.003. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
90. Sasse A., Hamer S.N., Amich J., Binder J., Krappmann S. Mutant Characterization and in Vivo Conditional Repression Identify Aromatic Amino Acid Biosynthesis to Be Essential for *Aspergillus fumigatus* Virulence. *Virulence*. 2016;7:56–62. doi: 10.1080/21505594.2015.1109766. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
91. Geisler S., Mayersbach P., Becker K., Schennach H., Fuchs D., Gostner J.M. Serum Tryptophan, Kynurenine, Phenylalanine, Tyrosine and Neopterin Concentrations in 100


- Healthy Blood Donors. *Pteridines*. 2015;26:31–36. doi: 10.1515/pterid-2014-0015. [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
92. Dias M.V.B., Canduri F., da Silveira N.J.F., Czekster C.M., Basso L.A., Palma M.S., Santos D.S., de Azevedo W.F. Molecular Models of Tryptophan Synthase from *Mycobacterium tuberculosis* Complexed with Inhibitors. *Cell Biochem. Biophys*. 2006;44:375–384. doi: 10.1385/CBB:44:3:375. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
93. Naz S., Farooq U., Ali S., Sarwar R., Khan S., Abagyan R. Identification of New Benzamide Inhibitor against α -Subunit of Tryptophan Synthase from *Mycobacterium tuberculosis* through Structure-Based Virtual Screening, Anti-Tuberculosis Activity and Molecular Dynamics Simulations. *J. Biomol. Struct. Dyn*. 2019;37:1043–1053. doi: 10.1080/07391102.2018.1448303. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]




DECLARAÇÃO

Declaro para o fim de inscrição no Edital PIBIC/AF 2018/2019, que o plano de trabalho: **Deleção de genes em *Fonsecaea pedrosoi*: padronização do protocolo para obtenção de mutantes**, referente ao projeto de pesquisa, “ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *Fonsecaea pedrosoi*, O AGENTE CAUSADOR DA CROMOBLASTOMICOSE, NA INTERAÇÃO PATÓGENO - HOSPEDEIRO E NA MORFOGÊNESE UTILIZANDO RNA-SEQ”, coordenado pelo(a) Prof(a). Dr(a). **Larissa Fernandes Matos**, foi registrado pela CIBio do Departamento de Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas, desta Universidade, visto que o projeto será desenvolvido nos Laboratórios: Imunologia Aplicada e Biologia Molecular, localizados neste Departamento.

Em 24 de Abril de 2018



Prof. Dr. Vicente de Paulo Martins
Universidade de Brasília - UnB
Instituto de Ciências Biológicas - IB
Departamento de Biologia Celular - CEL



Dr. Vicente de Paulo Martins

Presidente da CIBio
UnB/IB/Biologia Celular
Mat: 1059831

Article

Expanding the Toolbox for Functional Genomics in *Fonsecaea pedrosoi*: The Use of Split-Marker and Biolistic Transformation for Inactivation of Tryptophan Synthase (*trpB*) Gene

Luísa Dan Favilla ^{1,2}, Tatiana Sobianski Herman ^{1,3}, Camila da Silva Goersch ^{1,4}, Rosangela Vieira de Andrade ⁵, Maria Sueli Soares Felipe ⁵, Anamélia Lorenzetti Bocca ^{1,2,3}  and Larissa Fernandes ^{1,4,6,*} 

- ¹ Laboratory of Applied Immunology, Institute of Biology, Campus Darcy Ribeiro, University of Brasília, Asa Norte, Federal District, Brasília 70910-900, Brazil
- ² Graduate Program in Molecular Biology, Institute of Biology, Campus Darcy Ribeiro, University of Brasília, Asa Norte, Federal District, Brasília 70910-900, Brazil
- ³ Graduate Program in Molecular Patology, Faculty of Medicine, Campus Darcy Ribeiro, University of Brasília, Asa Norte, Federal District, Brasília 70910-900, Brazil
- ⁴ Graduate Program in Microbial Biology, Institute of Biology, Campus Darcy Ribeiro, University of Brasília, Asa Norte, Federal District, Brasília 70910-900, Brazil
- ⁵ Graduate Program of Genomic Sciences and Biotechnology, Catholic University of Brasília, Campus Asa Norte, Asa Norte, Federal District, Taguatinga 70790-160, Brazil
- ⁶ Centro Metropolitano, Faculty of Ceilândia, Campus UnB Ceilândia, University of Brasília, Ceilândia Sul, Federal District, Brasília 72220-275, Brazil
- * Correspondence: larissaf@unb.br



Citation: Favilla, L.D.; Herman, T.S.; Goersch, C.d.S.; de Andrade, R.V.; Felipe, M.S.S.; Bocca, A.L.; Fernandes, L. Expanding the Toolbox for Functional Genomics in *Fonsecaea pedrosoi*: The Use of Split-Marker and Biolistic Transformation for Inactivation of Tryptophan Synthase (*trpB*) Gene. *J. Fungi* **2023**, *9*, 224. <https://doi.org/10.3390/jof9020224>

Academic Editors: Alexandre Melo Bailão, Fabio Gsaller and Gregory M. Gauthier

Received: 3 January 2023

Revised: 27 January 2023

Accepted: 31 January 2023

Published: 8 February 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Chromoblastomycosis (CBM) is a disease caused by several dematiaceous fungi from different genera, and *Fonsecaea* is the most common which has been clinically isolated. Genetic transformation methods have recently been described; however, molecular tools for the functional study of genes have been scarcely reported for those fungi. In this work, we demonstrated that gene deletion and generation of the null mutant by homologous recombination are achievable for *Fonsecaea pedrosoi* by the use of two approaches: use of double-joint PCR for cassette construction, followed by delivery of the split-marker by biolistic transformation. Through in silico analyses, we identified that *F. pedrosoi* presents the complete enzymatic apparatus required for tryptophan (*trp*) biosynthesis. The gene encoding a tryptophan synthase *trpB*—which converts chorismate to *trp*—was disrupted. The $\Delta trpB$ auxotrophic mutant can grow with external *trp* supply, but germination, viability of conidia, and radial growth are defective compared to the wild-type and reconstituted strains. The use of 5-FAA for selection of *trp*⁻ phenotypes and for counter-selection of strains carrying the *trp* gene was also demonstrated. The molecular tools for the functional study of genes, allied to the genetic information from genomic databases, significantly boost our understanding of the biology and pathogenicity of CBM causative agents.

Keywords: gene replacement by homologous recombination; double-joint PCR; biolistic transformation; knockout mutant; *trpB*; tryptophan biosynthesis; *Fonsecaea*; chromoblastomycosis

1. Introduction

Chromoblastomycosis (CBM) is a chronic, progressive subcutaneous endemic mycosis prevalent in tropical and subtropical countries, caused by different black yeast-like fungi [1–5]. The predominant etiological agents change from one region to another; however, *Fonsecaea pedrosoi* is considered the most prevalent one worldwide [3,6–11]. After mechanical implantation of fungal saprophytic propagules into the subcutaneous tissue, the host develops CBM [1,2,4]. If lesions are undiagnosed and untreated, chronicity can be observed, leading to tissue fibrosis and lymphatic circulation impairment. In addition to the loss of limb functional capacity, malignant skin tumors and secondary infections can

occur [1,2,5,12–14]. CBM is a difficult-to-treat disease with slow progression, challenging the usual antifungal therapies and leading to frequent relapses, as the causative agents do not respond well to the drugs. To bypass those limitations, alternative physical methods are required to remove the lesions [14].

For human pathogens, the capacity to infect and induce the disease depends on expression of virulence factors and secretion of metabolic products in host tissue. The best-described virulence factor in *Fonsecaea* species is melanin [15–21]. Several studies reported that this pigment plays a variety of roles in host–pathogen interactions, improving fungal survival, and promoting resistance to host immune response [22–25]. The mechanisms that *F. pedrosoi* elicits to infect and maintain the granulomatous inflammatory reaction in the host are still under investigation [26–30]. Inside infected tissue, this pathogen is able to differentiate into sclerotic cells, which are large, spherical, highly pigmented, thick-walled, and resistant to immune response [1,30–33]. The dimorphic transition is probably the main morphogenetic event required for CBM; the molecular mechanism and host factors that promote cell differentiation are not yet clear [1,34].

In recent years, our research group has worked to develop molecular tools for the functional study of genes in *F. pedrosoi*. We were the first to publish two genetic transformation systems in detail (biolistics and *Agrobacterium*-mediated transformation), as well as vectors carrying drug-resistance genes as markers of dominant selection for the construction of deletion cassettes [35]. Our advances have laid the foundation for the scientific community to explore the biology and the mechanisms of pathogenicity used by *F. pedrosoi*. In the present work, we took a step further in developing a useful and versatile molecular toolbox to perform genetic studies of *F. pedrosoi*.

Several organisms are capable of synthesizing tryptophan, including bacteria, plants, and fungi [36–39]. For all living organisms, tryptophan is not just an amino acid that builds proteins. It is also necessary for various physiological processes, serving as a substrate for secondary metabolite synthesis. Its role has recently been explored as a modulator of the immune response and maintenance of the human gut microbiota [40,41].

The enzymatic machinery for tryptophan anabolism is absent in animals and humans; however, they share a similar organization among the studied species so far [42–47]. Usually, it comprises four or five different enzymes in fungi, some of them with multifunctional characteristics, depending on the species. Chorismic acid from the shikimate pathway is the initial substrate to generate L-tryptophan [37,47,48]. The last reaction is catalyzed by tryptophan synthase enzyme [43,47,48]. In this work, we identified and in silico analyzed the putative enzymes for L-tryptophan biosynthesis by *F. pedrosoi*. Of the genes involved in the tryptophan biosynthetic pathway, none have been previously studied in *F. pedrosoi*; thus, we chose *trpB* (a putative tryptophan synthase gene) to generate a null mutant. In addition, we described in detail the construction of a deletion cassette in a quick and easy way (by double-joint PCR) [49] that can be directly delivered by biolistic transformation, without cloning steps, into conidia. Finally, we characterized the *trpB* null mutant phenotype and proposed new molecular tools for genetic manipulation of *F. pedrosoi*. Taken together, our data evidence that gene replacement by biolistic transformation is a feasible approach for functional genetic studies to advance the knowledge of this human fungal pathogen and other closely related species.

2. Materials and Methods

2.1. Strains and Growth Conditions of *F. pedrosoi*

F. pedrosoi CBS 271.37 was kindly provided by Dr. Vania A. Vicente from the University of Paraná and Paraná Network of Biological Collections. It was used in all experiments and maintained on Sabouraud dextrose agar (SAB) (for 1L: 10 g peptone, 40 g glucose, 15 g agar; pH: 5.6; autoclaved at 120 °C/15 min) at 28 °C for 7 days. Mutants carrying the *trpB* deletion were cultivated on the same media with the addition of 500 µg/mL of L-tryptophan (L-trp) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) from a 10 mg/mL stock solution prepared in ultrapure water, 0.45 µm filtered, and sterilized. For conidia purification,

F. pedrosoi was grown in potato dextrose (PD) broth (Difco) for 10 days at 28 °C under 200 rpm of agitation. The culture was vortexed for 1 min, filtered through sterile glass wool, and centrifuged at 4000 rpm for 5 min. The pelleted conidia were resuspended in saline solution (0.9% NaCl), and the density was adjusted after counting in a Neubauer chamber. Potato dextrose agar (PDA) consisted of the PD broth with an addition of 1.5% of bacteriological agar. LB medium (1% peptone, 1% yeast extract, and 0.5% sodium chloride) was used for growing *Escherichia coli* DH5 α in cloning experiments.

2.2. In Silico Search for Enzymes Related to Tryptophan Biosynthesis in *F. pedrosoi* and Evaluation of The *trp* Gene's Expression

We analyzed the *F. pedrosoi* tryptophan anabolic pathway based on data provided by other studies of *Aspergillus fumigatus* [48], *Cryptococcus neoformans* [50], and *Saccharomyces cerevisiae* [47]. We used the BLASTp tool to search for *F. pedrosoi* putative enzyme sequences on EnsemblFungi (<https://fungi.ensembl.org/index.html>, accessed on 20 June 2020). We also calculated the percentage of identity between *A. fumigatus* and *F. pedrosoi* amino acid sequences using <http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html> (accessed on 20 June 2020). To identify the conserved domains of *F. pedrosoi* tryptophan biosynthesis putative enzymes, Pfam search was employed (<https://pfam.xfam.org/search/sequence>, accessed on 20 June 2020) and, based on KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>, accessed on 20 June 2020), the enzymatic nomenclature (EC) was applied. Multiple alignment of the sequences was performed by ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>, accessed on 20 June 2020) to identify the connecting region between α and β catalytic domains of TrpB. We evaluated the expression of the genes after the growth of a WT strain on minimal medium (Czapeck dox-CD) [31] and CD+L-trp (500 μ g/mL) as control by real-time PCR using the $\Delta\Delta^{CT}$ method and *gapdh* (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase, Z517_04938, from *F. pedrosoi* genomic database) as housekeeping normalizer. Briefly, the WT strain was grown in PD broth for 7 days at 28 °C under agitation (150 rpm). After this period, the fungal mass was collected, washed twice with saline solution, and inoculated in CD and CD+L-trp for 3 h at 28 °C/150 rpm. The fungal biomass was precipitated by centrifugation at 4000 rpm for 5 min and the pellet was washed twice with saline solution. The supernatant was discarded, the lysis solution (RLT) from the RNEasy[®] Plant RNA Extraction Kit (Qiagen) and 100 μ L of acid-washed glass beads (600 μ m) were added to the pellet, which was subjected to lysis using the Precellys equipment (Bertin) in three cycles of 6500 rpm for 1 min intercalated by incubation on ice for 2 min. Then, the total RNA extraction followed as per the manufacturer's instructions. cDNA was generated using a high-capacity cDNA kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and real-time PCR was performed using SYBR Green kit Master Mix (Thermo Fisher Scientific) in a 7500 Fast Real-time PCR System. At least one primer of all targets spanned an exon–exon junction.

2.3. Construction of *trpB* Deletion Cassette by Double-Joint PCR (DJ-PCR)

The *trpB* deletion cassette was constructed using double-joint PCR (DJ-PCR), described by Kim and colleagues [49]. All oligonucleotides used in this work are described in Table 1. Firstly, regular PCR was used to amplify four fragments of the cassette: 5' and 3' flanking ORF regions of *trpB*, using, respectively, Fp128 + Fp129 (915 bp), Fp130 + Fp131 (947 bp), and genomic DNA from the wild-type (WT) strain (CBS 271.37) as template (Figure S1A). The oligonucleotides Fp90 + Fp15 were used to amplify the 5' fragment of the Hygromycin B (HygB)-resistance marker (Hyg^R) and the combination Fp16 + Fp91 for 3' Hyg^R using pSilent-1 [51] as the template for the reactions. The products 5' and 3' Hyg^R were 1109 bp and 987 bp, respectively (amplicons not shown in Figure S1). The second step consisted of two independent overlapping PCRs using a combination of previously obtained products: 5' *trpB* flanking was fused to 5' Hyg^R to produce the 5' *trpB* + 5' Hyg^R of 2024 bp (Figure S1A,B). The other reaction yielded a product of 1934 bp corresponding to 3' *trpB* + 3' Hyg^R (Figure S1A,B). The OneTaq 2 \times Master Mix with Standard Buffer (NEB) was used for all amplifications, following the supplier's recommendations. Once the two fragments were obtained, they were directly used for genetic transformation of *F. pedrosoi*.

Table 1. *F. pedrosoi* tryptophan biosynthesis genes and putative protein function in comparison to other fungi.

Enzymatic Function	Protein Name /Gene ID				<i>F. pedrosoi</i> transcript ID ^e	% Amino acid identity ^f
	<i>S. cerevisiae</i> ^a	<i>C. neoformans</i> ^b	<i>A. fumigatus</i> ^c	<i>F. pedrosoi</i> ^d		
Anthranilate synthase component I-Chorismate aminase [EC:4.1.3.27]	Trp2 YER090W	Trp2 CNAG_06679	TrpE Afu6g12580	TrpEZ517_08726	KIW78887	70.98
Anthranilate synthase component II-Glutamine amidotransferase/Phosphoribosyl-anthranilate isomerase/Indoleglycerol phosphate synthase [EC:4.1.3.27 4.1.1.48]	Trp3 YKL211C	Trp3 CNAG_04501	TrpC Afu1g13090	TrpCZ517_05805	-KIW79193	66.49
Anthranilate phosphoribosyl transferase [EC:2.4.2.18]	Trp4 YDR354W	Trp4 CNAG_00811	TrpD Afu4g11980	TrpDZ517_01180	-KIW85788	63.84
Phosphoribosylanthranilate isomerase [EC:5.3.1.24]	Trp1 YDR007W	Trp3 CNAG_04501	TrpC Afu1g13090	TrpCZ517_05805	-KIW79193	66.49
Tryptophan synthase [EC:4.2.1.20]	Trp5 YGL026C	Trp5 CNAG_00649	TrpB Afu2g13250	TrpBZ517_07968	-KIW78135	78.39

^a Sequence ID from *S. cerevisiae* genome database: <https://www.yeastgenome.org> accessed on 20 June 2020; ^b sequence ID from *C. neoformans* H99 strain: <https://fungi.ensembl.org> accessed on 20 June 2020; ^c sequence ID from *A. fumigatus* Af293 strain: <http://www.aspergillusgenome.org> accessed on 20 June 2020; ^d sequence ID from *F. pedrosoi* CBS271.37 strain <https://fungi.ensembl.org> accessed on 20 June 2020; ^e transcript ID from *F. pedrosoi* CBS271.37 strain <https://fungi.ensembl.org> accessed on 20 June 2020; ^f percentage of identity between *A. fumigatus* and *F. pedrosoi* protein sequences: pairwise alignments were done in <https://www.ebi.ac.uk> accessed on 20 June 2020 and identity calculation was performed at <http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html> accessed on 20 June 2020.

2.4. Biolistics Transformation and Selection of *trpB* Mutant

The biolistics transformation was performed as previously described by [35]. Five micrograms of each fragment constructed above were precipitated on tungsten particles M10 (0.7 µm diameter, Biorad, Hercules, CA, USA). Next, 1×10^9 conidia of *F. pedrosoi* were spread on SAB agar supplied with tryptophan (1000 µg/mL) and were genetically transformed using the Biolistics PDS-1000/He Particle Delivery System (Biorad), following the manufacturer's instructions. Bombarded plates were wrapped with aluminum foil and incubated at 25 °C for 24 h. On the next day, cells were scraped and inoculated on SAB agar with L-trp (1000 µg/mL) and HygB (50 µg/mL) (Invitrogen, Waltham, MA, USA). After 21 days of incubation at 25 °C, the colonies were replicated on a series of four selective media plates: SAB agar, SAB agar with 50 µg/mL of HygB (SAB + HygB), SAB agar supplemented with 1000 µg/mL of L-trp (SAB + trp), and SAB agar containing both L-trp (1000 µg/mL) and HygB (50 µg/mL) (SAB + L-trp + HygB). To evaluate mitotic stability, WT and $\Delta trpB$ strains were cultured on the same medium used for the selection of transformants (SAB + L-trp + HygB) and incubated at 25 °C. Every seven days, the colonies that had grown in the non-selective plate (SAB + L-trp) were transferred to new plates of SAB + L-trp + HygB and SAB + L-trp. The procedure was repeated until four passages were completed. Hygromycin B and L-trp levels were 50 µg/mL and 1000 µg/mL, respectively. The transformants that were mitotically stable and were unable to grow in the absence of tryptophan were selected for genomic DNA extraction and PCR confirmation of *trpB* deletion.

2.5. PCR Confirmation of *trpB* Deletion

A PCR was used to confirm *trpB* gene deletion of chosen transformants. Reaction Fp120 + Fp121, using genomic DNA from the WT strain as template, was the positive control, the product of which is a 570 bp of *trpB*. The combinations Fp119 + Fp15 and

Fp118 + Fp16 amplify, respectively, the 5' region (2.5 kb for $\Delta trpB$ and no amplification for WT) and 3' region of the *trpB* locus replaced by the Hyg^R cassette (2.4 kb for $\Delta trpB$ and no amplification for WT). The *trpB* full-length locus was accessed by Fp118 + Fp119 reaction (4.6 kb for $\Delta trpB$ and 5.1 kb for WT) (Figure S2). gDNA of *F. pedrosoi* WT was used as a control for the reactions.

2.6. Southern Blotting

Two transformants in which the *trpB* deletion was confirmed by the PCR and the WT strain of *F. pedrosoi* had their gDNA extracted. Twenty micrograms of gDNA were overnight restriction digested with *Stu*I (3U/ μ g of gDNA) at 37 °C and electrophoresed in a 1.0% TAE 1 \times agarose gel. The gel was blotted onto a charged nylon membrane (GE Healthcare) by capillary transfer. The probe was amplified with oligonucleotides Fp128 + Fp129 (corresponding to the 5' flanking region of the *trpB* deletion cassette) producing a 915 bp fragment labeled with digoxigenin, following the supplier's instructions (PCR DIG Probe Synthesis Kit, Roche, Basel, Switzerland). The hybridization, washing, and detection procedures were all done according to the manufacturer's instructions (DIG Easy Hyb Granules, DIG Wash and Block Solution Set, Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments and CDP-Star ready-to-use, Roche). ImageQuant LAS 4000 (GE) equipment was used to read the signal. A 5.7 kb hybridization fragment was expected for $\Delta trpB$ and a 3.1 kb for the undeleted control.

2.7. Evaluation of Tryptophan Concentration Required for $\Delta trpB$ Growth

The minimum concentration of L-tryptophan required to promote the *trpB* auxotrophic mutants' growth was determined by incubating both WT and mutant strains ($2.\Delta trpB$) on SAB agar supplemented with different concentrations of the amino acid (0, 20, 50, 100, 250, 500, and 1000 μ g/mL), at 28 °C for 10 days. The radial growth of the colonies was used to compare the strains.

2.8. Radial Growth Measurement

To quantify colony growth, $2.\Delta trpB$, $22.\Delta trpB + trpB$, $25.\Delta trpB + trpB$, and WT strains were point-inoculated with same amount of conidia (10^3) onto the surface of SAB agar containing 500 μ g/mL of L-trp (SAB + L-trp). The plates were incubated at 28 °C or 37 °C. Colonies' diameters were measured every 3 days for 3 weeks. Two independent experiments were carried out in triplicate. Data collected were analyzed using the program GraphPad Prism. Mixed-effects analysis and Dunnett's multiple comparisons test were used to compare variations between the control (WT) and test groups.

2.9. Evaluation of Conidia Germination

After growth on PD broth, conidia from $2.\Delta trpB$, $22.\Delta trpB + trpB$, $25.\Delta trpB + trpB$, and WT strains were collected, counted on a Neubauer chamber, and then inoculated in 10 mL of SAB + L-trp broth (500 μ g/mL of L-trp) at the concentration of 10^6 conidia/mL. The cultures were incubated under continuous agitation (200 rpm) at 28 °C or 37 °C for 24 and 48 h. After incubation, the conidial suspension was vortexed and 100 μ L were collected for microscopic inspection. One hundred randomly selected conidia from the samples of the same culture were counted to distinguish between germinated and non-germinated conidia. Conidia with a germ tube were considered germinated, and swollen ones were considered non-germinated. The experiment was performed in triplicate, repeated twice, and the data were analyzed using the program GraphPad Prism. Two-way ANOVA and Dunnett's multiple comparisons test were used to compare variations between the control (WT) and test groups.

2.10. Conidial Viability Assay

For the viability assay, strains ($2.\Delta trpB$, $22.\Delta trpB + trpB$, $25.\Delta trpB + trpB$, and WT) previously grown on PD broth had the conidia collected and counted in a Neubauer chamber. Five hundred conidia of each strain were spread on three independent SAB + L-trp agar

plates (500 µg/mL of L-trp), incubated at 28 or 37 °C for 10 days, and then the number of colonies was counted (CFU). The experiment was performed in triplicate and repeated twice. Data were analyzed using the program GraphPad Prism. Two-way ANOVA and Dunnett's multiple comparisons test were used to compare variations between the control (WT) and test groups.

2.11. Determination of 5-Fluoroanthranilic Acid (5-FAA) Concentration for Selection of *trp*⁻ and Counter-Selection of *trp*⁺

Culture media were supplemented with 5-fluoroanthranilic acid (5-FAA) (Sigma-Aldrich) for tryptophan pathway counter-selection. The stock solution (100 mg/mL) was prepared in absolute ethanol. Since the concentration used for counter-selection of auxotrophic tryptophan mutants is very variable among different fungal species [52–55], we decided to test the interval from 0.25 to 3.0 mg/mL for *F. pedrosoi*. Conidia from the WT and $\Delta trpB$ strains were obtained as previously described, and density was adjusted. Five microliters of each serial dilution (1×10^7 to 1×10^3 /mL) were spotted on SAB agar containing 500 µg/mL L-trp and 5-FAA. The same procedure was done to evaluate the susceptibility of reconstituted strains to 5-FAA. Fungal growth was observed after 13 days of incubation at 25 °C. The experiment was repeated four times. In order to simulate the use of 5-FAA as agent to select *trp*⁻ mutants, a high density of conidia (5×10^5) of the WT and $\Delta trpB$ strains was spread on a set of conditions. The plates SAB agar, SAB + L-trp (500 µg/mL), SAB + L-trp + HygB (500 µg/mL of L-trp and 100 µg/mL of HygB), and SAB + L-trp + 5-FAA (500 µg/mL of L-trp and 0.5 mg/mL of 5-FAA) were incubated at 25 °C and inspected every 3 days until the 22nd day of growth.

2.12. Gene Replacement Strategy

Construction of plasmid pFpNAT + *trpB* for reconstitution of $\Delta trpB$ was carried out as follows: First, the 5.1 kb fragment corresponding to the *trpB* gene was amplified from the WT genome with primers Fp119 and Fp118 (Figure S3A). The product was subjected to double digestion by NdeI and SacI to generate a 4.7 kb fragment. This fragment was then cloned into the plasmid pFpNAT [35], previously opened with NdeI and SacI, using the enzyme T4 DNA ligase (Invitrogen) (Figure S3B). The ligation was transformed into thermo-competent *E. coli* DH5 α , and colonies that grew in LB medium containing 100 µg/mL of Ampicillin were selected for plasmid extraction. Cloning of the 4.7 kb fragment corresponding to the *trpB* gene was confirmed by NdeI / SacI digestion (Figure S3) and the plasmid was named pFPNAT+*trpB* (8.9 kb). The resulting flanking regions of *trpB* ORF were 923 and 1,263 bp for 5' and 3', respectively. Non-linearized pFPNAT+*trpB* was transformed on $\Delta trpB$ conidia to obtain the reconstituted strains. The conditions for biolistic transformation were the same as those previously described for obtaining the *trpB* mutant [35,56]. To select *trp*⁺ transformants, SAB agar plates were supplied with 500 µg/mL of L-trp and 100 µg/mL of Nourseotricin (Nat). After 21 days of growth at 28 °C, colonies were transferred to SAB + Nat agar plates to detect the tryptophan prototrophic transformants, which were selected for gDNA extraction. PCR amplification with Fp120 and Fp121 that produced a 570 bp fragment of *trpB* was performed (Figure S3C). We also tested whether the Hyg^R marker used for the gene deletion was preserved in the *trpB* locus after the transformation of pFpNAT+*trpB* by plating the colonies on SAB agar + 100 µg/mL Nat + 50 µg/mL HygB.

3. Results

3.1. Biosynthesis of Tryptophan in *F. pedrosoi*—An In Silico Analysis

By an in silico search for the enzyme sequences of the tryptophan biosynthesis pathway, we propose how this process may occur in *F. pedrosoi* (Figure 1). In the *F. pedrosoi* genome database, we found four genes encoding enzymes that work in the five-step tryptophan biosynthesis (*trpB*, *trpC*, *trpD*, and *trpE*) as shown in Table 1. By KEGG analysis, we observed well-conserved pathway components among the species *F. pedrosoi*, *S. cerevisiae* [37,47],

A. fumigatus [48], and *C. neoformans* [50]. We observed a high identity percentage between the primary sequences of *F. pedrosoi* TrpB, TrpC, TrpD, and TrpE and those of *A. fumigatus* (>63%). In addition, using the Pfam search tool, we detected all conserved domains of each enzyme in the tryptophan pathway (Figure S4). We evaluated the expression of the genes after incubation of WT strain for 3 h on minimal medium in comparison to the minimal medium supplemented with 500 µg/mL of L-trp (control) by real-time PCR; however, we did not detect a genetic modulation of *trp* genes in response to the conditions analyzed (Figure S5).

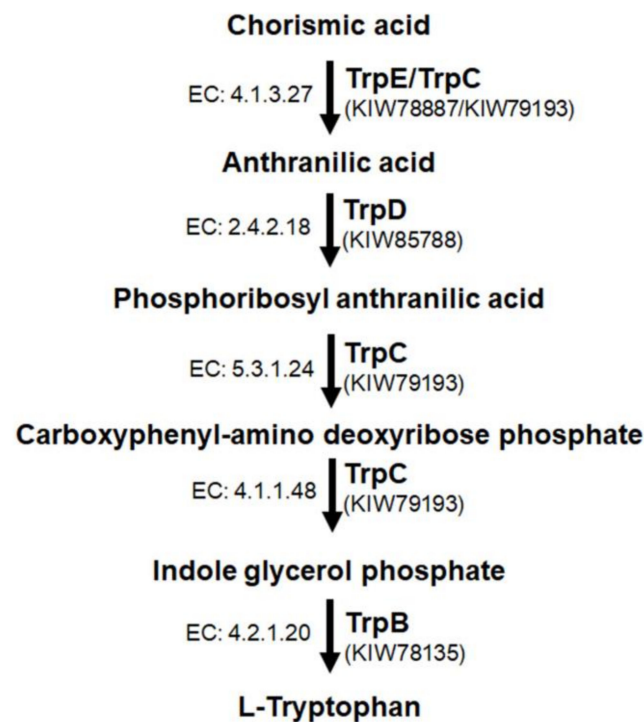


Figure 1. Putative tryptophan biosynthesis pathway in *F. pedrosoi*. The corresponding transcript IDs are indicated in parenthesis below their protein names. The *Enzyme Commission* (EC) numbers are depicted on the left side of each step of the pathway.

In all tryptophan-producing species, biosynthesis begins with chorismate, which is the product of the shikimate pathway. The first step is carried out by TrpE/TrpC, in which chorismate and glutamine are converted to anthranilate. Anthranilate, in turn—in the presence of phosphoribosyl phosphate—is converted to phosphoribosyl anthranilate by TrpD (Anthranilate phosphoribosyl transferase). In the third step, carboxyphenyl-amino deoxyribose phosphate synthesis occurs [37]. In *S. cerevisiae*, phosphoribosyl-anthranilate isomerase is encoded by TRP1 [47]. However, in *F. pedrosoi*, the TRP1 orthologue is not found, and this step is performed by Trp3^{TrpC}, as is the case for *C. neoformans* and *A. fumigatus* [48,50]. TrpC is a trifunctional enzyme found in several other fungal species [37,57], and it participates in three steps of this pathway. In the *F. pedrosoi* TrpC sequence, we found the three catalytic domains required for indole 3-glycerol phosphate synthesis: N-terminal glutamine amidotransferase class-I (GATase), Indole-3-glycerol phosphate synthase (IGPS), and C-terminal phosphoribosyl-anthranilate isomerase (PRAI) (Figure S6). The last two stages of tryptophan biosynthesis are performed by tryptophan synthase (Trp5^{TrpB}) [37,43,47]. In the *F. pedrosoi* TrpB putative sequence, we found two conserved signature domains: the tryptophan synthase α chain (positions 8–258 aa) and tryptophan synthase β chain pyridoxal-phosphate attachment site (positions 389–712 aa). Between those domains, there is a poorly conserved connector region of 83 aa, located between a residue of tyrosine (Y) and proline (P) that forms the channel necessary to couple the reactions (Figure S6).

3.2. Gene Disruption and Reconstitution in *F. pedrosoi*

To expand and make available a more versatile molecular toolbox for further genetic functional studies in *F. pedrosoi*, we chose the *trpB* gene to construct the deletion cassette. The disruption cassette was obtained using the approach described by [49] called double-joint PCR. It consists of successive PCR steps for fusing flanking fragments of the gene of interest to the 5' and 3' fragments related to the selective marker. Two products were obtained as expected (Figure S1B), and were readily co-transformed into *F. pedrosoi* spores (strain CBS271.37) by biolistics according to the parameters we previously defined.

Three independent experiments were conducted. Firstly, from 49 transformants resistant to HygB, 4 were unable to grow in the absence of tryptophan (SAB). The second transformation generated 19 mutants Hyg^R, and 2 mutants did not grow in SAB. These two mutants, named 1 and 2.Δ*trpB*, were chosen for PCR and Southern blotting (Figures S2 and 2). In the third experiment, we recovered 146 colonies of Hyg^R, and 9 mutants showed the tryptophan auxotrophic phenotype. Thus, we observed that the rate of homologous recombination for *trpB* in *F. pedrosoi* varied from 6 to 11%. All *trp* auxotrophic mutants exhibited mitotic stability after three passages in the non-selective medium (SAB + L-*trp*).

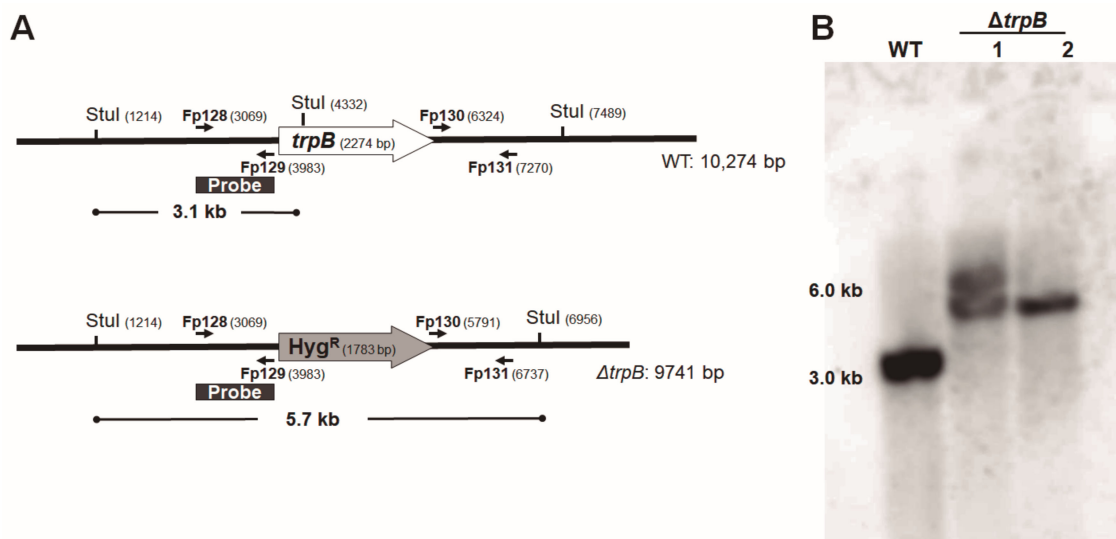


Figure 2. *trpB* deletion by homologous recombination of Hyg^R selective marker and confirmation by Southern blotting. (A) StuI restriction pattern of *trpB* locus in the genetic background of WT and mutant. (B) Southern blotting of the gDNA extracted from: WT, 1.Δ*trpB*, and 2.Δ*trpB* digested with restriction enzyme StuI probed with a 914 bp DIG-labeled PCR fragment. The annealing region of the probe is indicated as a solid line. The indications 1.Δ*trpB* and 2.Δ*trpB* correspond to two different null mutants for *trpB*, while the WT is the CBS 271.37.

Gene replacement was confirmed initially by PCR using two combinations of oligonucleotides. For both auxotrophic tryptophan mutants (1 and 2.Δ*trpB*), we amplified the expected products (Figure S2). To confirm there was no ectopic integration of the deletion cassette on those two mutants' genome, a Southern blot was performed. Through a *trpB*-specific probe (1 + 2 flanking region of the deletion cassette), we visualized the expected hybridization pattern after StuI restriction digestion of gDNA on the 2.Δ*trpB* mutant (5.7 kb) and WT (3.1 kb) strains. Despite 1.Δ*trpB* displaying the 5.7 kb fragment, a 6.0 kb hybridization fragment was also detected, indicating a genomic rearrangement after the Hyg^R insertion (Figure 2). After confirming 2.Δ*trpB* is a null mutant for the *trpB* allele, it was used in the following experiments. To ensure the observed tryptophan auxotrophic phenotype was due to *trpB* deletion, as a proof-of-concept, we reintroduced the *trpB* gene into the Δ*trpB* mutant genome (Figure S3). Of 360 recovered Nat-resistant transformants, 12 recovered the ability to produce tryptophan, and were designated Δ*trpB* + *trpB* reconstituted strains. Reinsertion of *trpB* was also confirmed by PCR, using oligonucleotides

that amplified a 570 bp fragment of the gene (Figure S3C). As we selected the phenotype trp^+ Hyg^R Nat^R (Figure S3D), we considered *trpB* insertion to have not occurred in the original locus. All the strains (*2.ΔtrpB*, *22.ΔtrpB + trpB*, *25.ΔtrpB + trpB*, and WT) used on the following experiments had the presence of selective markers and the auxotroph for tryptophan confirmed after growth in SAB agar supplemented with antibiotics (Nat and Hyg) and L-*trp* (500 μg/mL) (Figure 3).

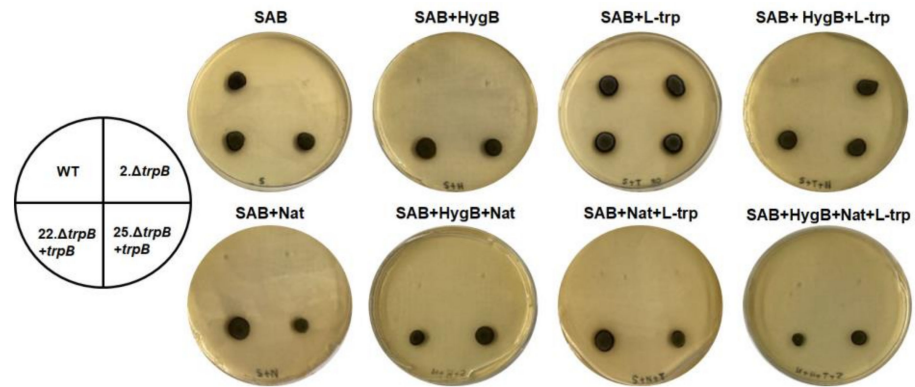


Figure 3. Radial growth of *F. pedrosoi* tryptophan auxotrophic mutant (*2.ΔtrpB*), reconstituted transformants (*22.ΔtrpB + trpB* and *25.ΔtrpB + trpB*), and WT on Sabouraud agar (SAB) supplemented or not with 500 μg/mL L-tryptophan (L-*trp*) and 50 μg/mL Hygromycin B (HygB). The *2.ΔtrpB* corresponds to the null mutant for *trpB*, while *22.ΔtrpB + trpB* and *25.ΔtrpB + trpB* are two independent reconstituted strains for *trpB* and the WT is the CBS 271.37. The plates were incubated at 28 °C for 7 days.

3.3. External Supply of Tryptophan Is Required for Proper Growth of *F. pedrosoi* $\Delta trpB$

To define the lowest amount of tryptophan necessary to support the growth of the *F. pedrosoi* auxotrophic mutant, various concentrations were tested. The minimum L-*trp* required by different *trp* mutants from other fungi are very variable, from 10 μg/mL for *S. cerevisiae* [52] to 2000 μg/mL for *Nodulisporium* [58]. We evaluated growth of $\Delta trpB$ in SAB agar supplemented with 20, 50, 100, 250, 400, 500, and 1000 μg/mL of L-*trp*. After 10 days of incubation at 28 °C, we detected darkly pigmented colonies in all L-*trp*-supplied plates above 250 μg/mL. Thus, *F. pedrosoi* $\Delta trpB$ requires intermediate levels of L-*trp* to grow and synthesize melanin (Figure 4) in comparison to other fungi, but is unable to grow in the absence of an external source of this amino acid.

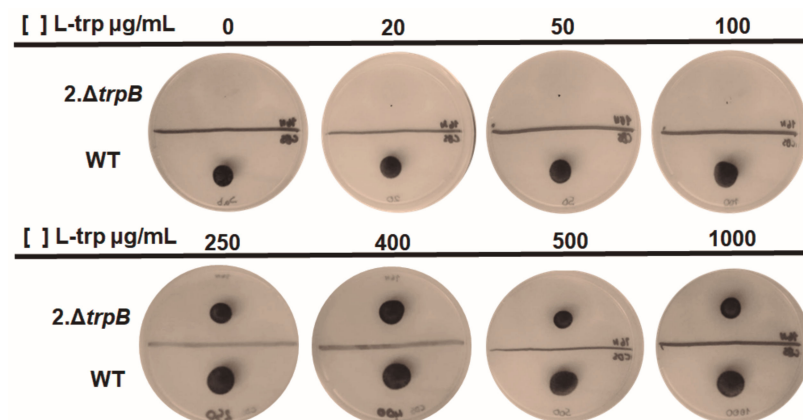


Figure 4. Determination of the minimum tryptophan level required for growth of *F. pedrosoi* *trpB* mutant. The *2.ΔtrpB* and WT strains were inoculated on SAB agar, supplemented or not with different amounts of tryptophan (L-*trp*) (0, 20, 50, 100, 250, 400, 500, and 1000 μg/mL). The WT is the CBS 271.37. The plates were incubated at 28 °C for 10 days.

3.4. Deletion of *trpB* Causes Growth Delay and Viability Defects

To assess whether *trpB* deletion affects the *F. pedrosoi* life cycle, we measured the radial growth of colonies in SAB agar supplemented with 500 µg/mL of L-trp over 21 days at 28 and 37 °C. The mutant (*2.ΔtrpB*) showed a growth delay in relation to WT and reconstituted strains (*22.ΔtrpB + trpB* and *25.ΔtrpB + trpB*) at 28 °C; however, at 37 °C this growth retardation was not so evident over the evaluated period (Figure 5A,B). Notably, the growth rate of all strains (WT, *ΔtrpB*, and reconstituted strains) is slower at 37 °C than observed at 28 °C. We also determined if *ΔtrpB* conidia had the ability to produce germ tubes and if they are viable (Figure 5C,D). After 24 h at 28 °C on SAB broth, about 25% of WT and reconstituted strains' conidia were germinated, while *ΔtrpB* failed to reach 20% of conidia germination. After 48 h of incubation at 28 °C, the germination defect remained for the mutant in comparison to the other strains (WT and *25.ΔtrpB + trpB*), but the percentage of germ tubes increased to close to 38% (Figure 5C,D). Differently from what we observed at 28 °C, we did not detect statistical differences in conidia germination among mutant and the other strains at 37 °C. Finally, we analyzed the ability of conidia to produce viable colonies (CFU) on SAB agar supplemented with 500 µg/mL tryptophan. As can be seen in Figure 5E, we detected a statistical difference in the number of colonies recovered on SAB agar when compared *ΔtrpB* to the other strains at both temperatures tested. At 28 °C, an average of 103% of WT conidia resulted in viable colonies compared to 51% of *ΔtrpB*, 86% of *22.ΔtrpB + trpB*, and 77% of *25.ΔtrpB + trpB*. The difference in viability rate of *ΔtrpB* was also detected at 37 °C, in which only 41% of CFU were recovered for *ΔtrpB*; meanwhile, the WT and reconstituted strains were in the range of 60% (Figure 5E). Taken together, our data indicate that *ΔtrpB* has a radial growth delay and a reduced conidial germination rate at 28 °C. We also show that decreased viability of *ΔtrpB* conidia is not a temperature-dependent phenotype. The reconstituted strains displayed phenotypes similar to the WT in the evaluated tests, indicating that the defects detected in the mutant are related to the absence of *trpB*.

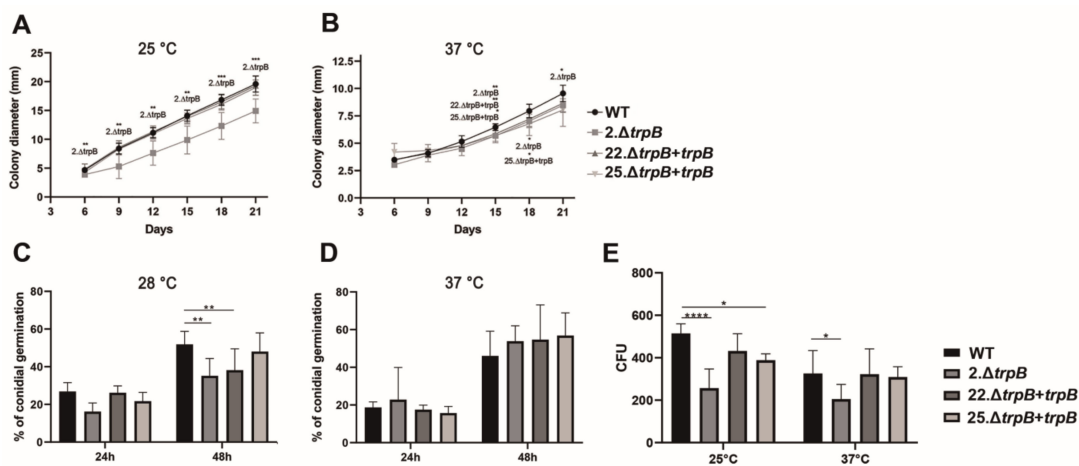


Figure 5. Deletion of *trpB* affects growth, viability, and conidial germination of *F. pedrosoi*. Colony diameter of WT, *ΔtrpB*, and reconstituted strains was measured after inoculation on SAB agar. The radial growth of the colonies was measured every seven days at 25 (A) and 37 °C (B). The statistical analyses were mixed-effects analysis and Dunnett's multiple comparisons post-test. $p < 0.0332$, $p < 0.0021$, and $p < 0.0002$ are indicated as *, **, and ***, respectively. Percentage of germinated conidia of WT, *ΔtrpB*, and reconstituted strains at 28 (C) and 37 °C (D) after incubation on SAB+L-trp broth for 24 and 48 h. (E) Colony Forming Units (CFU) were counted after 500 conidia of each strain were plated on SAB L-trp and incubated for 10 days at 28 or 37 °C. The statistical tests were two-way ANOVA and Dunnett's multiple comparisons post-test; **** indicates $p < 0.0001$. All experiments used culture medium supplemented with L-tryptophan (500 µg/mL). Averages of three independent experiments with intra-experiment triplicates were plotted on the graphics. The bars represent the standard error of each group.

3.5. *trpB* Deletion Induces 5-FAA Resistance in *F. pedrosoi*

In yeasts, mutants for tryptophan biosynthesis genes are resistant to 5-FAA [52–55]. This antimetabolite, when assimilated, is converted into the toxic product 5-fluorotryptophan. In our work, we decided to evaluate whether *trpB* deletion in *F. pedrosoi* confers resistance to 5-FAA, in order to expand the genetic manipulation tools for selection and counter-selection of mutants. For this purpose, we spotted serial dilutions of WT and *trpB* strains on SAB + L-trp plates supplemented by increasing amounts of 5-FAA (0.25; 0.5; 1.0; 2.0; and 3.0 mg/mL). The *F. pedrosoi trpB* mutant has higher resistance to 5-FAA compared to the WT strain. After 13 days of incubation at 28 °C, we observed that the *trpB* mutant tolerates 0.5 mg/mL of 5-FAA at low conidial density (10^2), while the WT grows only on 10^5 and 10^4 conidial spots. None of the strains grew on plates with >0.75 mg/mL of 5-FAA (Figure 6A). The reintroduction of *trpB* allele restored the $\Delta trpB$ susceptibility to the WT level (Figure 6B).

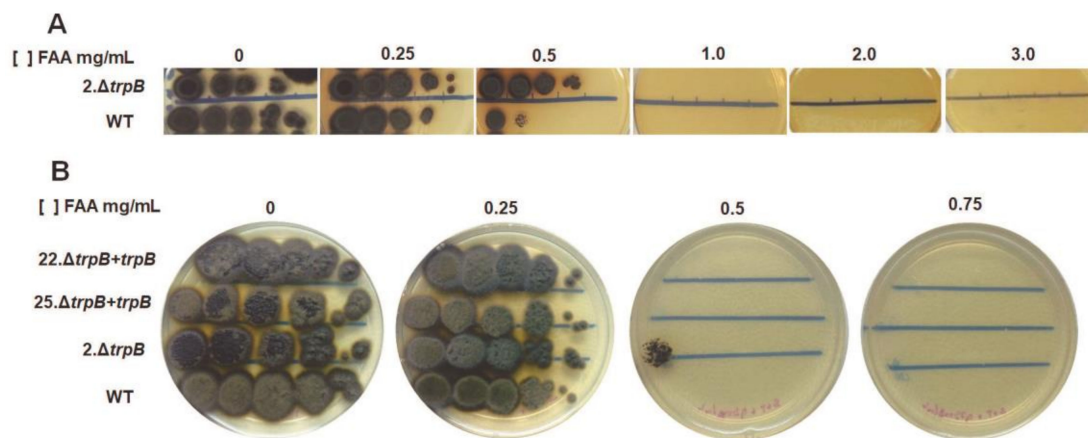


Figure 6. Deletion of *F. pedrosoi trpB* induces resistance to 5-FAA. The strains were grown on PD broth supplemented with 500 $\mu\text{g/mL}$ of tryptophan (L-trp) for 7 days at 28 °C. The conidia were purified, counted, and serially diluted to $2 \times 10^8 - 10^3/\text{mL}$. Five μL of each dilution were spotted on SAB + 500 $\mu\text{g/mL}$ of L-trp, supplemented with increasing concentrations of 5-FAA. (A) Serial dilutions of $2.\Delta trpB$ and the WT (CBS 271.37) conidia were spotted and plates were incubated at 28 °C for 13 days. The *trpB* mutant tolerates 0.5 mg/mL of 5-FAA at low conidial density (10^2), while WT grows only on 10^5 and 10^4 spots. None of the strains were able to grow at 5-FAA concentrations above 0.75 mg/mL. (B) Susceptibility to 5-FAA requires a functional tryptophan biosynthesis pathway. Reconstituted transformants (22. $\Delta trpB + trpB$ and 25. $\Delta trpB + trpB$) recovered the sensitivity to 5-FAA of $\Delta trpB$ to WT levels after incubation for 7 days at 28 °C. The pictures are representative of three independent experiments.

In order to analyze the use of 5-FAA as an agent to select tryptophan auxotrophic mutants, we plated WT and *trpB* mutant strains on different agar plates as follows: SAB agar, SAB + L-trp, SAB + L-trp + HygB, and SAB + L-trp + 5-FAA. Furthermore, to simulate a genetic transformation and evaluate the rate of spontaneous mutants for *trp* auxotrophy, a high density of conidia (5×10^5) was spread on the plates. As expected, in the SAB plates only the WT strain was able to grow, while in the SAB + L-trp + HygB condition only the $\Delta trpB$ strain grew, since resistance to HygB is guaranteed by the presence of the *hph* gene. Interestingly, in the condition of SAB + L-trp + 5-FAA, only *trp⁻* colonies were observed and no WT colonies were detected on those plates (Figure S7). This experiment demonstrates that it is possible to use 0.5 mg/mL of 5-FAA as the sole selective agent for identification of tryptophan auxotrophic mutants, extending the range of applications related to *trpB* locus and establishing it as a potential genetic transformation marker. Taken together, our results indicate that the 5-FAA-supplemented medium can be an interesting approach for tryptophan auxotrophic mutant selection. In addition, 5-FAA can be applied as a counter-selector of transformants in the case of *trp⁻* as a recipient strain in combination with the use of *trpB* as the selective marker in genetic transformation of *F. pedrosoi*.

4. Discussion

We first evaluated the enzymatic machinery in silico for tryptophan biosynthesis in *F. pedrosoi*. We identified that the enzymes in *F. pedrosoi* are displayed in a similar way to other filamentous fungi [48,50]. Unlike *S. cerevisiae*, *F. pedrosoi* has four of the five enzymes required to transform chorismate into tryptophan [47]. As reported for other ascomycetes and basidiomycetes, a single TRP1 ORF encoding a monofunctional PRA isomerase (PRAI) was not found in *F. pedrosoi*. Instead, it is fused to *trpC*^{TRP3}, generating a trifunctional enzyme with the arrangement from N- to C- terminals of glutamine amidotransferase (GATase), Indole-3-glycerol phosphate synthase (IGPS), and PRAI [47,48,50,59,60]. Our analyses showed that *F. pedrosoi* encodes all catalytic domains required for the synthesis of tryptophan; this finding opens prospects and launches new tools for a detailed and functional exploration of this essential pathway for fungal survival. Interestingly, in *C. neoformans*, TRP3^{trpC} and TRP5^{trpB} are essential genes [50], but the same cannot be applied to other fungi in which auxotrophic mutants were previously isolated [53,58,61–63]. We detected the four transcripts of the *trp* biosynthetic pathway (*trpB*, *trpC*, *trpD*, and *trpE*) by RT-PCR after WT strain biomass was incubated for 3 h in minimal medium and minimal medium supplemented with L-*trp*. It was not possible to detect differential expression of these genes depending on the culture media and incubation time used; however, the mechanisms of regulation of the tryptophan pathway deserve to be elucidated in future work. Because *trp* genes are suitable as selective markers for genetic transformation in other fungi, associated to the fact that their knockout mutants are easily detected on genetic transformation plates, we decided to evaluate the DJ-PCR approach to construct the deletion cassette and the biolistic approach to deliver the DNA in *F. pedrosoi*. Then, as a proof of concept of the methodology, we functionally characterized the tryptophan synthase (*trpB*) putative gene in this human fungal pathogen.

Tryptophan synthase is conserved among bacteria, archaea, fungi, and plants, and is absent in mammals; however, only fungi present the two subunits fused into a single ORF in an α - β order [37,64]. For this reason, in those microorganisms, the enzyme is a homodimer, unlike in bacteria, where it is a tetrameric enzyme with a β - α organization [45]. The *F. pedrosoi* TrpB putative protein sequence presents both α and β catalytic domains: tryptophan synthase alpha chain, pyridoxal-phosphate-dependent enzyme, and the region that interconnects them [45]. FpTrpB possesses the longest connector region (83 aa) located between a residue of tyrosine (Y) and proline (P), described so far among fungal species (ranging from 40 to 69 aa) [44,63–65]. Definition of the three-dimensional structure of tryptophan synthases occurred after the completion of X-ray crystallography studies of the *S. thyphimurium* enzyme [66]. The connector region forms a channel required for the mechanical transfer of indole between the two catalytic sites, and in fungi, it is longer than in other organisms to allow proper folding of α and β subunits and, thus, catalyze their respective reactions [46,67]. The deletion of an 18 amino acid segment of this region in *S. cerevisiae* inactivates the enzyme, and reinsertion of an unrelated fragment restores its activity [67]. TrpB from *F. pedrosoi* shares all features already described for other fungi; however, a more detailed analysis of its three-dimensional structure may elucidate if a longer length of tunnel region promotes any effect in enzymatic catalytic properties.

In 2018, our group reported—through two efficient techniques, biolistic and *Agrobacterium* mediated transformation—the insertion and expression of exogenous DNA into the *F. pedrosoi* genome. We also explored three drug-resistance markers (NAT, HYG, and NEO) for mutant selection. Continuing our efforts to make available and improve new molecular tools for genetic manipulation of a CBM-causing agent, in this study, we developed a stable, fast, and efficient approach for achieving targeted gene disruption by biolistic transformation into *F. pedrosoi*. We utilized the Hyg^R marker to replace *trpB* and constructed a deletion cassette using the double-joint PCR technique. This technique has already been successfully employed for other fungi [49,68–70]; however, this work shows for the first time its use in constructing cassettes for *F. pedrosoi* gene disruption. DJ-PCR is based on only two successive rounds of DNA amplifications and does not require long

and time-consuming vector construction steps, as is the case for *Agrobacterium*-mediated transformation in which the insertion of the deletion cassette into the T-DNA-carrying vector is required. Another advantage of constructing gene-disruption cassettes by DJ-PCR is that amplified products can be directly used in the genetic transformation of the fungus by electroporation or biolistics. Since homologous recombination inside the selective marker fragments is also required for mutant recovery, the chance of obtaining mitotically unstable transformants is reduced with the usage of the split-marker strategy, avoiding undesired genomic insertion [69]. Considering the non-homologous recombination mediated by the NHEJ pathway is more common in filamentous fungi than homologous recombination [71], this strategy contributes to generating a higher targeted-integration frequency. To our knowledge, this is the first report of the use of the DJ-PCR method followed by biolistic transformation to obtain null mutants in *F. pedrosoi*.

Three independent experiments yielded an efficiency of 6–11% triple-crossover recombination to promote the *trpB* replacement. Two other genes were successfully disrupted in our laboratory, with an HR rate of 2 and 5%. Our data are in accordance with those previously described for other filamentous fungi, in which a low efficiency of target integration into a specific locus is observed [71]. For other ascomycetes, this rate is quite variable: *A. fumigatus* has an HR efficiency of 5–10% [72,73], while in *N. crassa* it ranges from 2 to 23% [74,75]. Even within the same species, variable efficiency can be observed, as we have observed for *F. pedrosoi*. This fact can be attributed to the gene locus context, the size of the flanking region chosen to construct the deletion cassette, and the DNA delivery method [71]. For many fungi, especially ascomycetes, several former works inactivated the NHEJ machinery responsible for random integration of foreign DNA at ectopic genomic sites to circumvent this problem. The most common approach is to inactivate the *ku70* or *ku80* genes, creating NHEJ-deficient recipient strains that significantly improve the frequency of knockout mutants' recovery [71,76]. To prevent ectopic integrations during complementation of null mutants from interfering with the virulence and other characteristics of the fungus, some authors have already reported genomic regions considered as safe for genetic integrations, such as the safe haven for *C. neoformans* [77,78] or *RPS10* locus in *Candida albicans* [79]. Although we have not yet evaluated a potential safe region for gene reconstitution in *Fonsecaea* spp., this tool will be of great relevance when it was described.

trpB is not an essential gene in *F. pedrosoi*; however, its absence directly affects its life cycle. Our results show that the *F. pedrosoi* *trpB* mutant is extremely dependent on an external source of tryptophan. Supplementation of culture medium with >250 µg/mL of this amino acid is required to sustain mycelial vegetative growth and sporulation, but 500 µg/mL (level of L-trp used in all phenotype tests) was not enough to maintain germination, viability and growth rate as in the WT strain. We did not assess whether the WT phenotypes of $\Delta trpB$ strain can be rescued at higher levels of L-trpB as reported for the *A. nidulans* [63]. In *A. nidulans* $\Delta trpB$, although 10 µM (2 µg/mL) of tryptophan can trigger conidial germination and 100 µM (20 µg/mL) maintains the vegetative growth in solid medium, only higher L-trp concentrations (10 mM/2000 µg/mL) induce conidiospore production. However, even 50 mM (10,000 µg/mL) of tryptophan is not enough to generate viable ascospores and mature cleistothecia [63].

Yeast *trp* auxotrophic mutants require low levels of exogenous tryptophan [for *S. cerevisiae* 20 µg/mL (0.1 mM), *Hansenula* 30 µg/mL (0.15 mM) and *Candida guilliermondii* 40 µg/mL (0.2 mM)] [52,53,55]. On the opposite way, some filamentous fungi, as well as *F. pedrosoi*, demand 10 to 100 times higher amounts of this amino acid [*Aspergillus niger* (1 mM), *Metarhizium anisopliae* (5 mM) and *Nodosporium* sp (10 mM)] [58,61,62,80]. Eckert and colleagues suggested that the increased demand for tryptophan might be due to the limited ability to uptake the amino acid from the external source [63]. It is widely known that the anabolic and catabolic machinery of tryptophan, permeases and transporters, are finely tuned by intracellular levels of aromatic amino acids [48,50,64,81]. In filamentous fungal species, the transcriptional factor Cpc (cross pathway control) regulates the synthesis of aromatic amino acids, including tryptophan [59,63,82–84]. The high availability of

exogenous tryptophan can also promote feedback repression of the initial steps of aromatic amino acids biosynthesis, and impair *trp*⁻ mutants' growth due to decreased synthesis of phenylalanine and tyrosine. To circumvent this defect, simultaneous tryptophan and phenylalanine supply improved the growth of *N. crassa trp* mutants [85]. Further investigation can clarify whether CpcA plays the same role in *F. pedrosoi* and whether the addition of external sources of aromatic amino acids would benefit mycelial growth. By the way, we detected, through an in silico BLASTP search, a sequence similar to CpcA in the genome of *F. pedrosoi* opening prospects for its future characterization.

Auxotrophic mutants and the anabolic genes that complement biosynthesis defects have been widely used as powerful molecular tools in the fungal genetic transformation system, since the detection of the prototrophic transformants is quick and easy and does not require high-cost antibiotics [76,86,87]. The use of auxotrophic mutants has also disadvantages to be considered. In *C. albicans URA3* auxotrophic mutant, the authors identified that ectopically integration of *URA3* gene affects different characteristics of the fungus, including the virulence [79]. The *trp* encoding enzymes have been applied as selective markers of several fungi [53,54,59,61,80,88] and in this work, we propose the use of *trpB* as a new selective marker in *F. pedrosoi*. We showed the complementation of the *F. pedrosoi* Δ *trpB* mutant with the wild type copy of gene, that in spite of had being inserted randomly into the genome, the mutants became prototrophic and recovery the WT traits.

We assessed the susceptibility of *F. pedrosoi* to 5-FAA. Our results showed this antimetabolite could be used as a marker of counter-selection in genetic transformation experiments using *trp*⁻ as the recipient strain. This strategy is already widely used for yeasts [50,52,53,55]; however, as far as we know, there are no data for filamentous fungi. Due to the inability of the WT strain to grow on culture medium supplemented with 0.5 mg/mL of 5-FAA, it is a feasible and interesting tool for easily find *trp*⁻ mutants (positive selection) and also for identification of transformants complemented by *trpB* (counter selection) in *F. pedrosoi*. The counter selection methodology is indeed useful for recycling the selective marker for multiple gene deletion strategies on the same host strain, and it can be employed to select point mutations in genes related to the biosynthesis pathway [88]. Considering all this, the *trpB* mutant, despite some defective traits observed in conditions we tested, is not unfeasible as a recipient strain and can be used to generate other knockout strains; in addition, the *trpB* gene can be an alternative to the antibiotics as a selective marker for functional genomics in *F. pedrosoi*.

As tryptophan is an essential amino acid for fungal development and survival, and mammals acquire it from dietary sources, some authors suggest its biosynthesis apparatus may be an attractive selective therapeutic target [89]. In *C. neoformans*, an anthranilate synthase inhibitor (6-diazo-5-oxo-L-norleucine) was efficient in promoting in vitro cell death [50]. Although the role of *TRP3* and *TRP5* has not been evaluated in the pathogenicity of *C. neoformans* [50], in *A. fumigatus*, null mutants of *aroC* (chorismate mutase) and *trpA* play important roles in pulmonary and systemic aspergillosis infection models [90]. Considering that *F. pedrosoi* requires higher levels of tryptophan to survive (250 µg/mL) than that achieved in human serum (about 14 µg/mL) [91], and that mammals do not produce this amino acid, the search for specific inhibitors of tryptophan biosynthesis enzymes becomes a potential strategy to be explored against *Fonsecaea* spp. and other microbial pathogens [89,92,93].

5. Conclusions

In conclusion, to our knowledge, our work represents the first successful gene inactivation of the main CBM causative agent, *F. pedrosoi*. We demonstrate the use of split-markers for homologous integration allied to biolistic transformation were feasible to obtain Δ *trpB* mutants. The *trpB* gene can be exploited as an alternative and attractive selective marker for auxotrophic complementation of the *trpB* mutant. In addition, we showed the employment of 5-FAA as positive selection of *trp*⁻ mutants and as a new approach to facilitate identification of null mutants' complementation in *F. pedrosoi*. Our data broaden the molecular

toolbox by the use of traditional techniques for functional genome studies to improve the knowledge of not only *F. pedrosoi* biology but also of other CBM etiological agents. Notably, the functional studies of genes in the fungi of the genus *Fonsecaea* spp. are far behind compared to other fungal species, further contributing to the fact that many gaps in our knowledge of the disease remain, and CBM continues to be treated as a neglected tropical disease that affects many people around of the world.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/jof9020224/s1>. Table S1. Oligonucleotides used in this work; Figure S1. Construction of *trpB* disruption cassette by DJ-PCR/Hyg^R split marker strategy; Figure S2. PCR checking for homologous recombination of the *trpB* disruption cassette; Figure S3. Strategy for obtaining and confirming the complementation of *F. pedrosoi* *trpB* mutant; Figure S4. Conserved signature domains of *F. pedrosoi* putative enzymes required for tryptophan biosynthesis; Figure S5. Real-time PCR to evaluate the expression of the tryptophan biosynthetic genes: *trpB*, *trpC*, *trpD*, and *trpE* of *F. pedrosoi* in response to incubation in minimal medium (Czapeck Dox) for 3 h at 28 °C; Figure S6. Multiple sequence alignment of tryptophan synthases protein sequences; Figure S7. Evaluation of the use of 5-FAA at the concentration of 0.5 mg/mL as a selection agent for *trp*-mutants, and for counter-selection of strains that present active tryptophan synthesis pathway at high cell density (5×10^5) of WT and $\Delta trpB$.

Author Contributions: Conceptualization, L.F. and L.D.F.; methodology, L.D.F., C.d.S.G., T.S.H. and R.V.d.A.; formal analysis, L.F. and L.D.F.; investigation, L.D.F.; resources, L.F., A.L.B., R.V.d.A. and M.S.S.F.; writing—original draft preparation, L.F. and L.D.F.; writing—review and editing, L.F.; supervision, L.F. and A.L.B.; project administration, L.F.; funding acquisition, L.F., A.L.B. and M.S.S.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). The grants are FAP-DF-DEMANDA ESPONTÂNEA 00193-00000180/2019-91 to LF, FAP-DF-PRONEX 193.001.533/2016 to MSSF and FAP-DF-DEMANDA ESPONTÂNEA 193.000.805/2015 to ALB. LDF acknowledges the support given by the CNPq for Ms. Scholarship. The APC was funded by Fundação Universidade de Brasília (FUB).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We thank Vania A. Vicente from the University of Paraná and the Paraná Network of Biological Collections for kindly providing *F. pedrosoi* CBS 271.37 strain.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Santos, A.L.S.; Palmeira, V.F.; Rozental, S.; Kneipp, L.F.; Nimrichter, L.; Alviano, D.S.; Rodrigues, M.L.; Alviano, C.S. Biology and Pathogenesis of *Fonsecaea pedrosoi*, the Major Etiologic Agent of Chromoblastomycosis. *FEMS Microbiol. Rev.* **2007**, *31*, 570–591. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Queiroz-Telles, F.; Esterre, P.; Perez-Blanco, M.; Vitale, R.; Salgado, C.G.; Bonifaz, A. Chromoblastomycosis: An Overview of Clinical Manifestations, Diagnosis and Treatment. *Med. Mycol.* **2009**, *47*, 3–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Coelho, R.A.; Brito-Santos, F.; Figueiredo-Carvalho, M.H.G.; Silva, J.V.D.S.; Gutierrez-Galhardo, M.C.; do Valle, A.C.F.; Zancopé-Oliveira, R.M.; Trilles, L.; Meyer, W.; Freitas, D.F.S.; et al. Molecular Identification and Antifungal Susceptibility Profiles of Clinical Strains of *Fonsecaea* spp. Isolated from Patients with Chromoblastomycosis in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2018**, *12*, 1–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Brito, A.C.D.; Bittencourt, M.D.J.S. Chromoblastomycosis: An Etiological, Epidemiological, Clinical, Diagnostic, and Treatment Update. *An. Bras. Dermatol.* **2018**, *93*, 495–506. [[CrossRef](#)]
5. Santos, D.W.C.L.; de Azevedo, C.d.M.P.E.S.; Vicente, V.A.; Queiroz-Telles, F.; Rodrigues, A.M.; de Hoog, G.S.; Denning, D.W.; Colombo, A.L. The Global Burden of Chromoblastomycosis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2021**, *15*, 1–26. [[CrossRef](#)]
6. Bonifaz, A.; Carrasco-Gerard, E.; Saul, A. Chromoblastomycosis: Clinical and Mycologic Experience of 51 Cases. *Mycoses* **2001**, *44*, 1–7. [[CrossRef](#)]

7. Esterre, P.; Andriantsimahavandy, A.; Ramarcel, E.R.; Pecarrere, J.-L. Forty Years of Chromoblastomycosis in Madagascar: A Review. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1996**, *55*, 45–47. [[CrossRef](#)]
8. Agarwal, R.; Singh, G.; Ghosh, A.; Verma, K.K.; Pandey, M.; Xess, I. Chromoblastomycosis in India: Review of 169 Cases. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *11*, e0005534. [[CrossRef](#)]
9. Attapattu, M.C. Chromoblastomycosis—A Clinical and Mycological Study of 71 Cases from Sri Lanka. *Mycopathologia* **1997**, *137*, 145–151. [[CrossRef](#)]
10. Gomes, R.R.; Vicente, V.A.; Azevedo, C.M.P.S.d.; Salgado, C.G.; da Silva, M.B.; Queiroz-Telles, F.; Marques, S.G.; Santos, D.W.C.L.; de Andrade, T.S.; Takagi, E.H.; et al. Molecular Epidemiology of Agents of Human Chromoblastomycosis in Brazil with the Description of Two Novel Species. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*, 1–20. [[CrossRef](#)]
11. Silva, J.P.; De Souza, W.; Rozental, S. Chromoblastomycosis: A Retrospective Study of 325 Cases on Amazonic Region (Brazil). *Mycopathologia* **1998**, *143*, 171–175. [[CrossRef](#)]
12. Queiroz-Telles, F.; de Hoog, S.; Santos, D.W.C.L.; Salgado, C.G.; Vicente, V.A.; Bonifaz, A.; Roilides, E.; Xi, L.; de Maria Pedrozo e Silva Azevedo, C.; da Silva, M.B.; et al. Chromoblastomycosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2017**, *30*, 233–276. [[CrossRef](#)]
13. Gimenes, V.M.F.; Criado, P.R.; Martins, J.E.C.; Almeida, S.R. Cellular Immune Response of Patients with Chromoblastomycosis Undergoing Antifungal Therapy. *Mycopathologia* **2006**, *162*, 97–101. [[CrossRef](#)]
14. Ameen, M. Chromoblastomycosis: Clinical Presentation and Management. *Clin. Exp. Dermatol.* **2009**, *34*, 849–854. [[CrossRef](#)]
15. Alviano, C.S.; Farbiarz, S.R.; De Souza, W.; Angluster, J.; Travassos, L.R. Characterization of *Fonsecaea pedrosoi* Melanin. *J. Gen. Microbiol.* **1991**, *137*, 837–844. [[CrossRef](#)]
16. Alviano, D.S.; Franzen, A.J.; Travassos, L.R.; Holandino, C.; Rozental, S.; Ejzemberg, R.; Alviano, C.S.; Rodrigues, M.L. Melanin from *Fonsecaea pedrosoi* Induces Production of Human Antifungal Antibodies and Enhances the Antimicrobial Efficacy of Phagocytes. *Society* **2004**, *72*, 229–237. [[CrossRef](#)]
17. Cunha, M.M.L.; Franzen, A.J.; Alviano, D.S.; Zanardi, E.; Alviano, C.S.; De Souza, W.; Rozental, S. Inhibition of Melanin Synthesis Pathway by Tricyclazole Increases Susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* against Mouse Macrophages. *Microsc. Res. Tech.* **2005**, *68*, 377–384. [[CrossRef](#)]
18. Cunha, M.M.; Franzen, A.J.; Seabra, S.H.; Herbst, M.H.; Vugman, N.V.; Borba, L.P.; de Souza, W.; Rozental, S. Melanin in *Fonsecaea pedrosoi*: A Trap for Oxidative Radicals. *BMC Microbiol.* **2010**, *10*, 80. [[CrossRef](#)]
19. Bocca, A.L.; Brito, P.P.M.S.; Figueiredo, F.; Tosta, C.E. Inhibition of Nitric Oxide Production by Macrophages in Chromoblastomycosis: A Role for *Fonsecaea pedrosoi* Melanin. *Mycopathologia* **2006**, *161*, 195–203. [[CrossRef](#)]
20. Pinto, L.; Granja, L.F.Z.; Alviano, D.S.; da Silva, M.H.; Alviano, C.S.; Ejzemberg, R. Activation of the Human Complement System by Pigmented and Hypopigmented Mycelia of the Fungus *Fonsecaea pedrosoi*. *Mycoses* **2011**, *54*, 474–480. [[CrossRef](#)]
21. Pinto, L.; Granja, L.F.Z.; Almeida, M.A.d.; Alviano, D.S.; Silva, M.H.D.; Ejzemberg, R.; Rozental, S.; Alviano, C.S. Melanin Particles Isolated from the Fungus *Fonsecaea pedrosoi* Activates the Human Complement System. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2018**, *8*, 113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Gómez, B.L.; Nosanchuk, J.D. Melanin and Fungi. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2003**, *16*, 91–96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Chongkae, S.; Nosanchuk, J.D.; Pruksaphon, K.; Laliem, A.; Pornsuwan, S.; Youngchim, S. Production of Melanin Pigments in Saprophytic Fungi in Vitro and during Infection. *J. Basic Microbiol.* **2019**, *59*, 1092–1104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Xiao, X.; Li, Y.; Lan, Y.; Zhang, J.; He, Y.; Cai, W.; Chen, Z.; Xi, L.; Zhang, J. Deletion of PksA Attenuates the Melanogenesis, Growth and Sporulation Ability and Causes Increased Sensitivity to Stress Response and Antifungal Drugs in the Human Pathogenic Fungus *Fonsecaea monophora*. *Microbiol. Res.* **2021**, *244*, 126668. [[CrossRef](#)]
25. Li, M.; Huang, H.; Liu, J.; Zhang, X.; Li, Q.; Li, D.; Luo, M.; Wang, X.; Zeng, W.; Sun, J.; et al. Deletion C-Terminal Thioesterase Abolishes Melanin Biosynthesis, Affects Metabolism and Reduces the Pathogenesis of *Fonsecaea monophora*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2022**, *16*, 1–25. [[CrossRef](#)]
26. Siqueira, I.M.; Wüthrich, M.; Li, M.; Wang, H.; Las-Casas, L.d.O.; de Castro, R.J.A.; Klein, B.; Bocca, A.L. Early Immune Response against *Fonsecaea Pedrosoi* Requires Dectin-2-Mediated Th17 Activity, Whereas Th1 Response, Aided by Treg Cells, Is Crucial for Fungal Clearance in Later Stage of Experimental Chromoblastomycosis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2020**, *14*, e0008386. [[CrossRef](#)]
27. Wüthrich, M.; Wang, H.; Li, M.; Lersuthirat, T.; Hardison, S.E.; Brown, G.D.; Klein, B. *Fonsecaea pedrosoi*-Induced Th17-Cell Differentiation in Mice Is Fostered by Dectin-2 and Suppressed by Mincle Recognition. *Eur. J. Immunol.* **2015**, *45*, 2542–2552. [[CrossRef](#)]
28. Castro, R.J.A.D.; Siqueira, I.M.; Jerônimo, M.S.; Basso, A.M.M.; Veloso Junior, P.H.D.H.; Magalhães, K.G.; Leonhardt, L.C.; Oliveira, S.A.M.D.; Bürgel, P.H.; Tavares, A.H.; et al. The Major Chromoblastomycosis Etiologic Agent *Fonsecaea pedrosoi* Activates the NLRP3 Inflammasome. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 1572. [[CrossRef](#)]
29. Machado, A.P.; Regis Silva, M.R.; Fischman, O. Local Phagocytic Responses after Murine Infection with Different Forms of *Fonsecaea pedrosoi* and Sclerotic Bodies Originating from an Inoculum of Conidiogenous Cells. *Mycoses* **2011**, *54*, 202–211. [[CrossRef](#)]
30. Siqueira, I.M.; de Castro, R.J.A.; Leonhardt, L.C.d.M.; Jerônimo, M.S.; Soares, A.C.; Raiol, T.; Nishibe, C.; Almeida, N.; Tavares, A.H.; Hoffmann, C.; et al. Modulation of the Immune Response by *Fonsecaea pedrosoi* Morphotypes in the Course of Experimental Chromoblastomycosis and Their Role on Inflammatory Response Chronicity. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *11*, e0005461. [[CrossRef](#)]

31. Alviano, C.S.; Farbiarz, S.R.; Travassos, L.R.; Angluster, J.; de Souza, W. Effect of Environmental Factors on *Fonsecaea pedrosoi* Morphogenesis with Emphasis on Sclerotic Cells Induced by Propranolol. *Mycopathologia* **1992**, *119*, 17–23. [[CrossRef](#)]
32. Alviano, D.S.; Kneipp, L.F.; Lopes, A.H.; Travassos, L.R.; Meyer-Fernandes, J.R.; Rodrigues, M.L.; Alviano, C.S. Differentiation of *Fonsecaea pedrosoi* Mycelial Forms into Sclerotic Cells Is Induced by Platelet-Activating Factor. *Res. Microbiol.* **2003**, *154*, 689–695. [[CrossRef](#)]
33. Dong, B.; Tong, Z.; Li, R.; Chen, S.C.A.; Liu, W.; Liu, W.; Chen, Y.; Zhang, X.; Duan, Y.; Li, D.; et al. Transformation of *Fonsecaea pedrosoi* into Sclerotic Cells Links to the Refractoriness of Experimental Chromoblastomycosis in BALB/c Mice via a Mechanism Involving a Chitin-Induced Impairment of IFN- γ Production. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2018**, *12*, 1–31. [[CrossRef](#)]
34. Las-Casas, L.d.O.; Marina, C.L.F.; de Castro, R.J.A.; Coelho, L.C.; B ao, S.N.; de Hoog, G.S.; Vicente, V.A.; Fernandes, L.; Bocca, A.L. Pathogenicity and Growth Conditions Modulate *Fonsecaea* Extracellular Vesicles' Ability to Interact With Macrophages. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2022**, *12*, 1–14. [[CrossRef](#)]
35. Florencio, C.S.; Brand ao, F.A.S.; Teixeira, M.d.M.; Bocca, A.L.; Felipe, M.S.S.; Vicente, V.A.; Fernandes, L. Genetic Manipulation of *Fonsecaea pedrosoi* Using Particles Bombardment and Agrobacterium Mediated Transformation. *Microbiol. Res.* **2018**, *207*, 269–279. [[CrossRef](#)]
36. Lynch, J.H.; Dudareva, N. Aromatic Amino Acids: A Complex Network Ripe for Future Exploration. *Trends Plant Sci.* **2020**, *25*, 670–681. [[CrossRef](#)]
37. Hutter, R.; Niederberger, P.; DeMoss, J.A. Tryptophan Biosynthetic Genes in Eukaryotic Microorganisms. *Annu. Rev. Microbiol.* **1986**, *40*, 55–77. [[CrossRef](#)]
38. Bentley, R.; Haslam, E. The Shikimate Pathway—A Metabolic Tree with Many Branches. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1990**, *25*, 307–384. [[CrossRef](#)]
39. Herrmann, K.M.; Weaver, L.M. The Shikimate Pathway. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1999**, *50*, 473–503. [[CrossRef](#)]
40. Comai, S.; Bertazzo, A.; Brughera, M.; Crotti, S. Tryptophan in Health and Disease. *Adv. Clin. Chem.* **2020**, *95*, 165–218. [[CrossRef](#)]
41. Ren, W.; Bin, P.; Yin, Y.; Wu, G. Impacts of Amino Acids on the Intestinal Defensive System. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2020**, *1265*, 133–151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Yanofsky, C. Comparison of Regulatory and Structural Regions of Genes of Tryptophan Metabolism. *Mol. Biol. Evol.* **1984**, *1*, 143–161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Burns, D.M.; Horn, V.; Paluh, J.Y.C. Evolution of the Tryptophan Synthetase of Fungi. Analysis of Experimentally Fused *Escherichia Coli* Tryptophan Synthetase Alpha and Beta Chains. *Biochemistry* **1990**, *265*, 2060–2069. [[CrossRef](#)]
44. Burns, D.M.; Yanofsky, C. Nucleotide Sequence of the *Neurospora Crassa* Trp-3 Gene Encoding Tryptophan Synthetase and Comparison of the Trp-3 Polypeptide with Its Homologs in *Saccharomyces Cerevisiae* and *Escherichia Coli*. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 3840–3848. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Dunn, M.F.; Niks, D.; Ngo, H.; Barends, T.R.M.; Schlichting, I. Tryptophan Synthase: The Workings of a Channeling Nanomachine. *Trends Biochem. Sci.* **2008**, *33*, 254–264. [[CrossRef](#)]
46. Fleming, J.R.; Schupfner, M.; Busch, F.; Basl e, A.; Ehrmann, A.; Sterner, R.; Mayans, O. Evolutionary Morphing of Tryptophan Synthase: Functional Mechanisms for the Enzymatic Channeling of Indole. *J. Mol. Biol.* **2018**, *430*, 5066–5079. [[CrossRef](#)]
47. Braus, G.H. Aromatic Amino Acid Biosynthesis in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*: A Model System for the Regulation of a Eukaryotic Biosynthetic Pathway. *Microbiol. Rev.* **1991**, *55*, 349–370. [[CrossRef](#)]
48. Choera, T.; Zelante, T.; Romani, L.; Keller, N.P. A Multifaceted Role of Tryptophan Metabolism and Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity in *Aspergillus fumigatus*-Host Interactions. *Front. Immunol.* **2018**, *8*, 1–11. [[CrossRef](#)]
49. Kim, M.S.; Kim, S.Y.; Yoon, J.K.; Lee, Y.W.; Bahn, Y.S. An Efficient Gene-Disruption Method in *Cryptococcus neoformans* by Double-Joint PCR with NAT-Split Markers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *390*, 983–988. [[CrossRef](#)]
50. Fernandes, J.D.S.; Martho, K.; Tofik, V.; Vallim, M.A.; Pascon, R.C. The Role of Amino Acid Permeases and Tryptophan Biosynthesis in *Cryptococcus neoformans* Survival. *PLoS ONE* **2015**, *10*, 1–22. [[CrossRef](#)]
51. Nakayashiki, H.; Hanada, S.; Quoc, N.B.; Kadotani, N.; Tosa, Y.; Mayama, S. RNA Silencing as a Tool for Exploring Gene Function in Ascomycete Fungi. *Fungal Genet. Biol.* **2005**, *42*, 275–283. [[CrossRef](#)]
52. Toyn, J.H.; Gunyuzlu, P.L.; Hunter White, W.; Thompson, L.A.; Hollis, G.F. A Counterselection for the Tryptophan Pathway in Yeast: 5-Fluoroanthranilic Acid Resistance. *Yeast* **2000**, *16*, 553–560. [[CrossRef](#)]
53. Foureau, E.; Clastre, M.; Millerioux, Y.; Simkin, A.J.; Cornet, L.; Dutilleul, C.; Besseau, S.; Marais, E.; Melin, C.; Guillard, J.; et al. A TRP5/5-Fluoroanthranilic Acid Counter-Selection System for Gene Disruption in *Candida guilliermondii*. *Curr. Genet.* **2012**, *58*, 245–254. [[CrossRef](#)]
54. Cheon, S.A.; Han, E.J.; Kang, H.A.; Ogrydziak, D.M.; Kim, J.Y. Isolation and Characterization of the TRPI Gene from the Yeast *Yarrowia lipolytica* and Multiple Gene Disruption Using a TRP Blaster. *Yeast* **2003**, *20*, 677–685. [[CrossRef](#)]
55. Cheon, S.A.; Choo, J.; Ubiyovok, V.M.; Park, J.-N.; Kim, M.W.; Oh, D.-B.; Kwon, O.; Sibirny, A.A.; Kim, J.-Y.; Kang, H.A. New Selectable Host-Marker Systems for Multiple Genetic Manipulations Based on TRP1, MET2 and ADE2 in the Methylophilic Yeast *Hansenula polymorpha*. *Yeast* **2009**, *26*, 507–521. [[CrossRef](#)]
56. Abe, F.; Hiraki, T. Mechanistic Role of Ergosterol in Membrane Rigidity and Cycloheximide Resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2009**, *1788*, 743–752. [[CrossRef](#)]
57. K afer, E. The Anthranilate Synthetase Enzyme Complex and the Trifunctional Trpc Gene of *Aspergillus*. *Can. J. Genet. Cytol.* **1977**, *19*, 723–738. [[CrossRef](#)]

58. Ireland, C.; Peekhaus, N.; Lu, P.; Sangari, R.; Zhang, A.; Masurekar, P.; An, Z. The Tryptophan Synthetase Gene TRP1 of *Nodulisporium* Sp.: Molecular Characterization and Its Relation to Nodulisporic Acid a Production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *79*, 451–459. [[CrossRef](#)]
59. Dörnte, B.; Kües, U. Paradoxical Performance of Tryptophan Synthase Gene Trp1 + in Transformations of the Basidiomycete *Coprinopsis cinerea*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100*, 8789–8807. [[CrossRef](#)]
60. Yelton, M.M.; Hamer, J.E.; de Souza, E.R.; Mullaney, E.J.; Timberlake, W.E. Developmental Regulation of the *Aspergillus nidulans* TrpC Gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, *80*, 7576–7580. [[CrossRef](#)]
61. Goosen, T.; van Engelenburg, F.; Debets, F.; Swart, K.; Bos, K.; van den Broek, H. Tryptophan Auxotrophic Mutants in *Aspergillus niger*: Inactivation of the TrpC Gene by Cotransformation Mutagenesis. *MGG Mol. Gen. Genet.* **1989**, *219*, 282–288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Horng, J.S.; Linz, J.E.; Pestka, J.J. Cloning and Characterization of the TrpC Gene from an Aflatoxigenic Strain of *Aspergillus parasiticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1989**, *55*, 2561–2568. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Eckert, S.E.; Kübler, E.; Hoffmann, B.; Braus, G.H. The Tryptophan Synthase-Encoding TrpB Gene of *Aspergillus nidulans* Is Regulated by the Cross-Pathway Control System. *Mol. Gen. Genet.* **2000**, *263*, 867–876. [[CrossRef](#)]
64. Zalkin, H.Y.C. Yeast Gene TRP5: Structure, Function, Regulation. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 1491–1500. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Skrzynia, C.; Binniger, D.M.; Alspaugh, J.A.; Pukkila, P.J. Molecular Characterization of TRP1, a Gene Coding for Tryptophan Synthetase in the Basidiomycete *Coprinus Cinereus*. *Gene* **1989**, *81*, 73–82. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Hyde, C.C.; Ahmed, S.A.; Padlan, E.A.; Miles, E.W.; Davies, D.R. Three-Dimensional Structure of the Tryptophan Synthase Alpha 2 Beta 2 Multienzyme Complex from *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 17857–17871. [[CrossRef](#)]
67. Crawford, I.P.; Clarke, M.; Van Cleemput, M.; Yanofsky, C. Crucial Role of the Connecting Region Joining the Two Functional Domains of Yeast Tryptophan Synthetase. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 239–244. [[CrossRef](#)]
68. Liang, L.; Li, J.; Cheng, L.; Ling, J.; Luo, Z.; Bai, M.; Xie, B. A High Efficiency Gene Disruption Strategy Using a Positive-Negative Split Selection Marker and Electroporation for *Fusarium oxysporum*. *Microbiol. Res.* **2014**, *169*, 835–843. [[CrossRef](#)]
69. Kück, U.; Hoff, B. New Tools for the Genetic Manipulation of Filamentous Fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *86*, 51–62. [[CrossRef](#)]
70. Shen, B.; Xiao, J.; Dai, L.; Huang, Y.; Mao, Z.; Lin, R.; Yao, Y.; Xie, B. Development of a High-Efficiency Gene Knockout System for *Pochonia chlamydosporia*. *Microbiol. Res.* **2015**, *170*, 18–26. [[CrossRef](#)]
71. Krappmann, S. Gene Targeting in Filamentous Fungi: The Benefits of Impaired Repair. *Fungal Biol. Rev.* **2007**, *21*, 25–29. [[CrossRef](#)]
72. Da Silva Ferreira, M.E.; Kress, M.R.V.Z.; Savoldi, M.; Goldman, M.H.S.; Härtl, A.; Heinekamp, T.; Brakhage, A.A.; Goldman, G.H. The *AkuBKU80* Mutant Deficient for Nonhomologous End Joining Is a Powerful Tool for Analyzing Pathogenicity in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot. Cell* **2006**, *5*, 207–211. [[CrossRef](#)]
73. Krappmann, S.; Sasse, C.; Braus, G.H. Gene Targeting in *Aspergillus fumigatus* by Homologous Recombination Is Facilitated in a Nonhomologous End-Joining-Deficient Genetic Background. *Eukaryot. Cell* **2006**, *5*, 212–215. [[CrossRef](#)]
74. Ishibashi, K.; Suzuki, K.; Ando, Y.; Takakura, C.; Inoue, H. Nonhomologous Chromosomal Integration of Foreign DNA Is Completely Dependent on MUS-53 (Human Lig4 Homolog) in *Neurospora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 14871–14876. [[CrossRef](#)]
75. Ninomiya, Y.; Suzuki, K.; Ishii, C.; Inoue, H. From The Cover: Highly Efficient Gene Replacements in *Neurospora* Strains Deficient for Nonhomologous End-Joining. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 12248–12253. [[CrossRef](#)]
76. Jiang, D.; Zhu, W.; Wang, Y.; Sun, C.; Zhang, K.-Q.; Yang, J. Molecular Tools for Functional Genomics in Filamentous Fungi: Recent Advances and New Strategies. *Biotechnol. Adv.* **2013**, *31*, 1562–1574. [[CrossRef](#)]
77. Arras, S.D.M.; Chitty, J.L.; Blake, K.L.; Schulz, B.L.; Fraser, J.A. A Genomic Safe Haven for Mutant Complementation in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS ONE* **2015**, *10*, 1–16. [[CrossRef](#)]
78. Fan, Y.; Lin, X. An Intergenic “Safe Haven” Region in *Cryptococcus neoformans* Serotype D Genomes. *Fungal Genet. Biol.* **2020**, *144*, 103464. [[CrossRef](#)]
79. Brand, A.; MacCallum, D.M.; Brown, A.J.P.; Gow, N.A.R.; Odds, F.C. Ectopic Expression of URA3 Can Influence the Virulence Phenotypes and Proteome of *Candida albicans* but Can Be Overcome by Targeted Reintegration of URA3 at the RPS10 Locus. *Eukaryot. Cell* **2004**, *3*, 900–909. [[CrossRef](#)]
80. Staats, C.C.; Junges, A.; Fitarelli, M.; Furlaneto, M.C.; Vainstein, M.H.; Schrank, A. Gene Inactivation Mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in the Filamentous Fungi *Metarhizium anisopliae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *76*, 945–950. [[CrossRef](#)]
81. Wang, P.-M.; Choera, T.; Wiemann, P.; Pisithkul, T.; Amador-Noguez, D.; Keller, N.P. TrpE Feedback Mutants Reveal Roadblocks and Conduits toward Increasing Secondary Metabolism in *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet. Biol.* **2016**, *89*, 102–113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Carsiotis, M.; Jones, R.F. Cross-Pathway Regulation: Tryptophan-Mediated Control of Histidine and Arginine Biosynthetic Enzymes in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* **1974**, *119*, 889–892. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Tian, C.; Kasuga, T.; Sachs, M.S.; Glass, N.L. Transcriptional Profiling of Cross Pathway Control in *Neurospora crassa* and Comparative Analysis of the Gcn4 and CPC1 Regulons. *Eukaryot. Cell* **2007**, *6*, 1018–1029. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Braus, G.H.; Sasse, C.; Krappmann, S. Amino Acid Acquisition, Cross-Pathway Control, and Virulence in *Aspergillus*. *Med. Mycol.* **2006**, *44*, 91–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

85. Perkins, D.D.; Radford, A.; Newmeyer, D.; Björkman, M. Chromosomal Loci of *Neurospora crassa*. *Microbiol. Rev.* **1982**, *46*, 426–570. [[CrossRef](#)]
86. Prabha, V.L.; Punekar, N.S. Genetic Transformation in *Aspergilli*: Tools of the Trade. *Indian J. Biochem. Biophys.* **2004**, *41*, 205–215.
87. Meyer, V. Genetic Engineering of Filamentous Fungi—Progress, Obstacles and Future Trends. *Biotechnol. Adv.* **2008**, *26*, 177–185. [[CrossRef](#)]
88. Olmedo-Monfil, V.; Cortés-Penagos, C.; Herrera-Estrella, A. Three Decades of Fungal Transformation: Key Concepts and Applications. *Methods Mol. Biol.* **2004**, *267*, 297–313. [[CrossRef](#)]
89. Amich, J.; Bignell, E. Amino Acid Biosynthetic Routes as Drug Targets for Pulmonary Fungal Pathogens: What Is Known and Why Do We Need to Know More? *Curr. Opin. Microbiol.* **2016**, *32*, 151–158. [[CrossRef](#)]
90. Sasse, A.; Hamer, S.N.; Amich, J.; Binder, J.; Krappmann, S. Mutant Characterization and in Vivo Conditional Repression Identify Aromatic Amino Acid Biosynthesis to Be Essential for *Aspergillus fumigatus* Virulence. *Virulence* **2016**, *7*, 56–62. [[CrossRef](#)]
91. Geisler, S.; Mayersbach, P.; Becker, K.; Schennach, H.; Fuchs, D.; Gostner, J.M. Serum Tryptophan, Kynurenine, Phenylalanine, Tyrosine and Neopterin Concentrations in 100 Healthy Blood Donors. *Pteridines* **2015**, *26*, 31–36. [[CrossRef](#)]
92. Dias, M.V.B.; Canduri, F.; da Silveira, N.J.F.; Czekster, C.M.; Basso, L.A.; Palma, M.S.; Santos, D.S.; de Azevedo, W.F. Molecular Models of Tryptophan Synthase from *Mycobacterium tuberculosis* Complexed with Inhibitors. *Cell Biochem. Biophys.* **2006**, *44*, 375–384. [[CrossRef](#)]
93. Naz, S.; Farooq, U.; Ali, S.; Sarwar, R.; Khan, S.; Abagyan, R. Identification of New Benzamide Inhibitor against α -Subunit of Tryptophan Synthase from *Mycobacterium tuberculosis* through Structure-Based Virtual Screening, Anti-Tuberculosis Activity and Molecular Dynamics Simulations. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2019**, *37*, 1043–1053. [[CrossRef](#)]

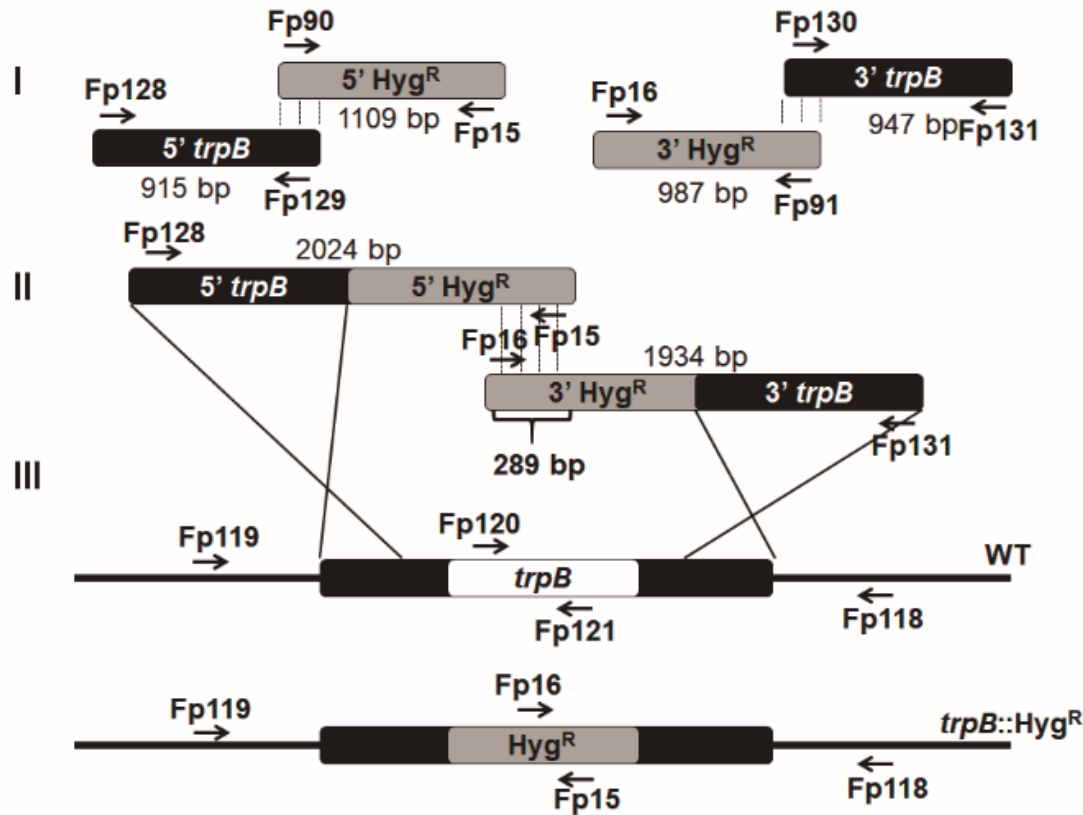
Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Favilla, L.D. Supplementary Materials

Table S1. Oligonucleotides used in this work

Name	Target	Use	Sequence 5' -3'
Fp15	Hyg ^R	DJ-PCR/ Deletion confirmation	CGTCTGCTGCTCCATACAAGC
Fp16	Hyg ^R	DJ-PCR/ Deletion confirmation	CATATGCGCGATTGCTGATCC
Fp90	Hyg ^R	DJ-PCR	CCGCGACGTAACTGATATT
Fp91	Hyg ^R	DJ-PCR	GTGGAGCCAAGAGCGGATT
Fp118	3' <i>trpB</i>	Deletion confirmation	GTCCCGGTGTCTACTATGAA
Fp119	5' <i>trpB</i>	Deletion confirmation	ATCGGTGTACAAGGCAAGC
Fp120	ORF <i>trpB</i>	Deletion confirmation	AGGGAGTGGTGATTGGTAGT
Fp121	ORF <i>trpB</i>	Deletion confirmation	CAGTGTGATTCAGGTCCTCT
Fp128	5' <i>trpB</i>	DJ-PCR	GGGCATATGTTCTTCCAGGAC
Fp129	5' <i>trpB</i>	DJ-PCR	AATATCAGTTAACGTCGCGGGTCAAGGTTGAAAGGGA
Fp130	3' <i>trpB</i>	DJ-PCR	AATCCGCTCTTGGCTCCACACGGCGTCAACCTCAAGATA
Fp131	3' <i>trpB</i>	DJ-PCR	CACAGCTCGACGGATAGGATA
Fp217	<i>trpB</i>	RT-PCR	CTCATCCCTTCCCGACGAT
Fp218	<i>trpB</i>	RT-PCR	CCACCGACACAAGCAATCAC
Fp219	<i>trpC</i>	RT-PCR	TGCCCTTCTCGTCGGTGTAT
Fp220	<i>trpC</i>	RT-PCR	CCGCATCCAATCCAAACTTC
Fp221	<i>trpD</i>	RT-PCR	GAAGTCGTGCGGAAGAGGAA
Fp222	<i>trpD</i>	RT-PCR	CGTGGTCGAGATGTTGAATGTC
Fp223	<i>trpE</i>	RT-PCR	TTCCTCTGCCCTACCAACCA
Fp224	<i>trpE</i>	RT-PCR	ACGTGCGCCTCATATCCTGT
Fp225	<i>gapdh</i>	RT-PCR	AAGGGTGGTGCGAAGAAGGT
Fp226	<i>gapdh</i>	RT-PCR	GGGATGTCGGGCTTGTATGA

A



B

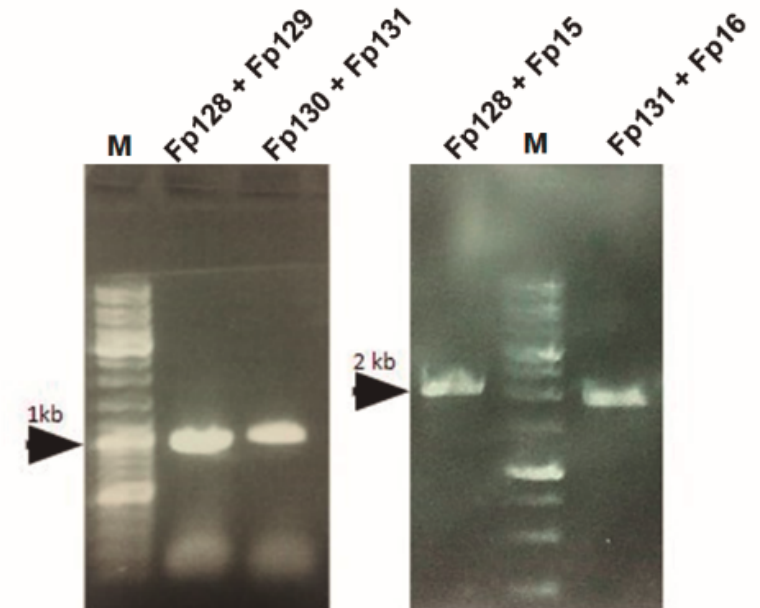


Figure S1. Construction of *trpB* disruption cassette by DJ-PCR/*Hyg^R* split marker strategy. (A) The first step of PCR generated four fragments, corresponding to the 5' and 3' flanking regions of the *trpB* and of *Hyg^R* selective marker. *trpB* 5' and 3' were amplified on reactions Fp128+Fp129, and Fp130+Fp131, respectively. *Hyg^R* 5' and 3' were obtained by Fp90+Fp15 and Fp16+Fp91, respectively (amplicons not shown in the figure B). The second reaction generated two overlapping fragments: 5' *trpB*/*Hyg^R* (Fp128+Fp15) and 3' *trpB*/*Hyg^R* (Fp16+Fp131) that were directly transformed on *F.pedrosoi* spores. (B) The DJ-PCR products for deletion cassette construction were electrophoresed in TAE 1× agarose gel in order to check the expected sizes. The length of the amplicons are depicted on (A). M: Molecular weight marker.

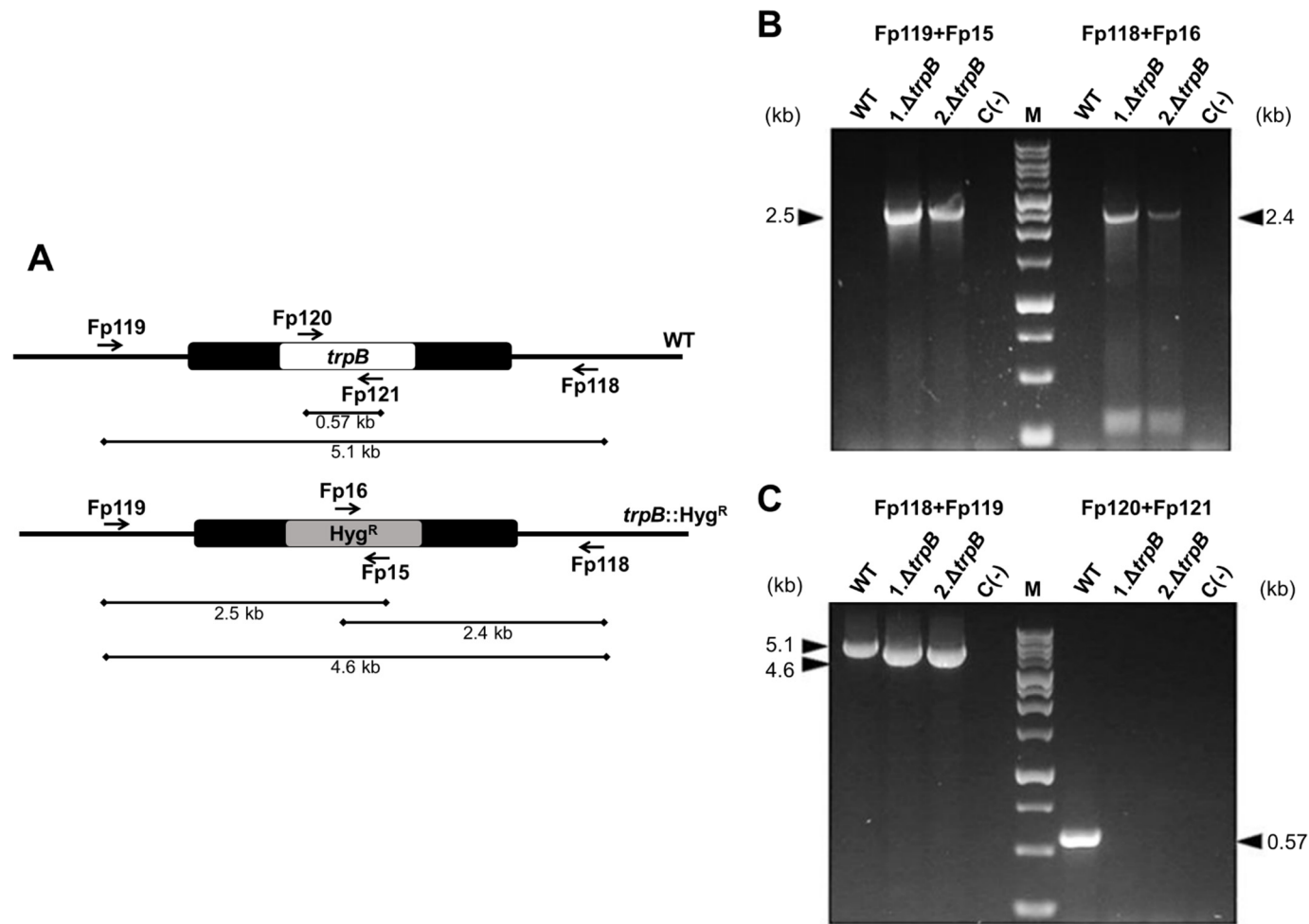


Figure S2. PCR checking for homologous recombination of the *trpB* disruption cassette. (A) Scheme representing the oligonucleotide positions used to confirm the insertion of Hyg^R into *trpB* locus of *F. pedrosoi*. (B) Products obtained after 5' and 3' *trpB* locus amplification confirmed Hyg^R cassette insertion. (C) On the left are shown the amplification of the full locus generating a 4.6kb for *trpB::hph* replacement and a 5.1kb related to intact allele. On the right side, internal oligonucleotides specific to *trpB* evidenced a 570 bp product in WT strain indicating the presence of *trpB* allele. The expected product sizes are depicted in the picture. M: Molecular weight marker, WT: wild type strain, C (-): H_2O

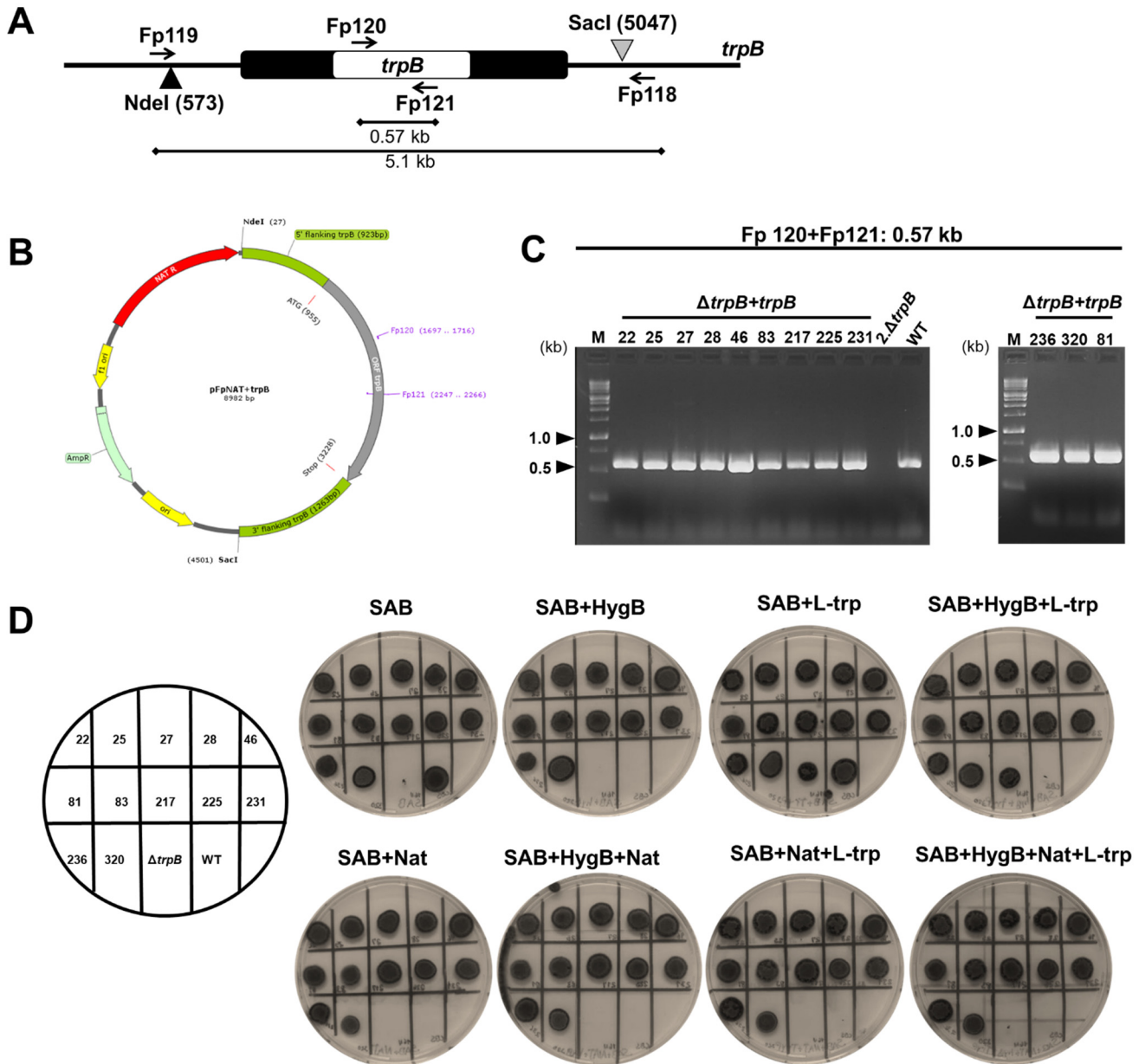


Figure S3. Strategy for obtaining and confirming the complementation of *F. pedrosoi* *trpB* mutant. (A) Schematic representation of the *trpB* locus indicating the position of the NdeI and SacI restriction sites and the oligonucleotides used in the PCRs. (B) Map of plasmid pFpNAT+*trpB* obtained after cloning the 4.7kb *trpB* into NdeI and SacII restriction sites. (C) Confirmation of 12 reconstituted strains (*trpBΔ* + *trpB*) after PCR amplification using *trpB* internal specific oligonucleotides (Fp120+Fp121). The product sizes are indicated in the picture. (D) Reconstituted strains of *F. pedrosoi* recovered the tryptophan prototrophic phenotype. Twelve transformants were obtained after biolistic transformation of Δ *trpB* with pFpNAT+*trpB* were able to grow in the absence of tryptophan after ectopic integration of *trpB* into the genome. The strains were inoculated on Sabouraud agar (SAB), supplemented or not with 500 μ g/mL of tryptophan (L-*trp*), 100 μ g/mL Hygromycin B (HygB) and 100 μ g/mL Nourseothricin (Nat) and incubated at 28 °C for 7 days. Strains Δ *trpB* and WT (CBS 271.37) were used as controls and are indicated. M: Molecular weight marker, WT: wild type strain, NAT^R: Nourseothricin resistance marker, AMP^R: Ampicillin resistance marker

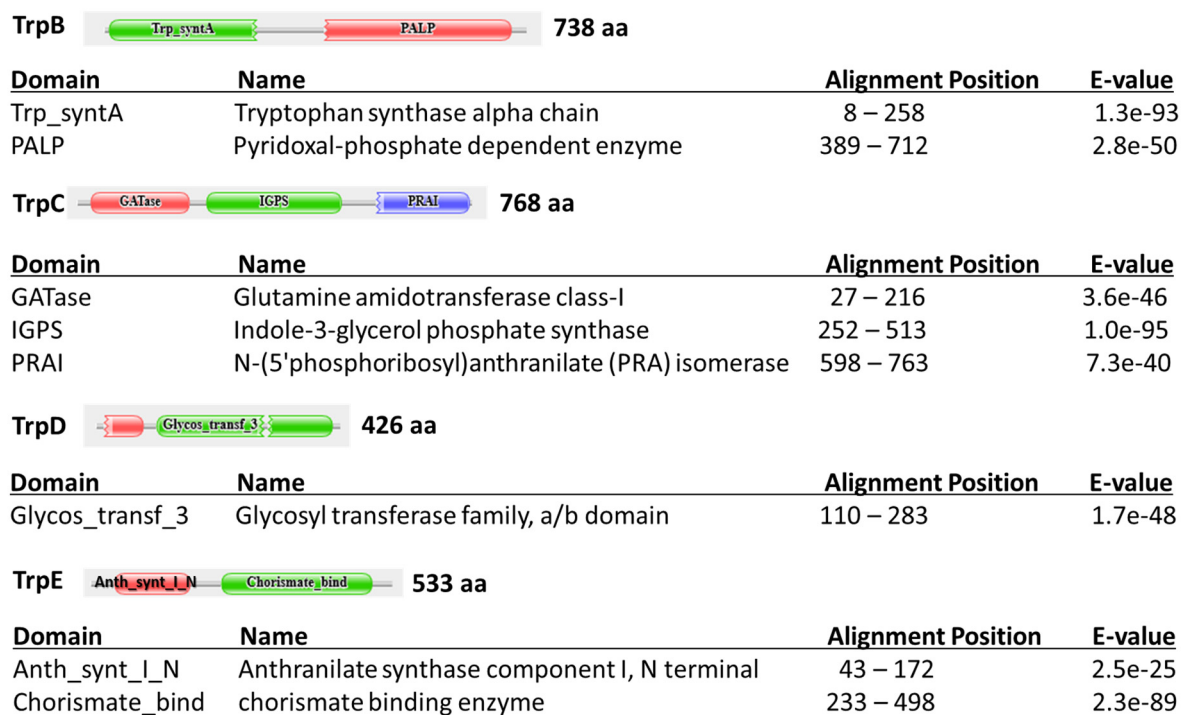


Figure S4. Conserved signature domains of *F. pedrosoi* putative enzymes required for tryptophan biosynthesis.

The domains were searched by pfam tool (<https://pfam.xfam.org/search/sequence>) in the translated sequences of transcripts identified in the *F. pedrosoi* genome database. The positions of each domain as well as the e-value are shown in the figure.

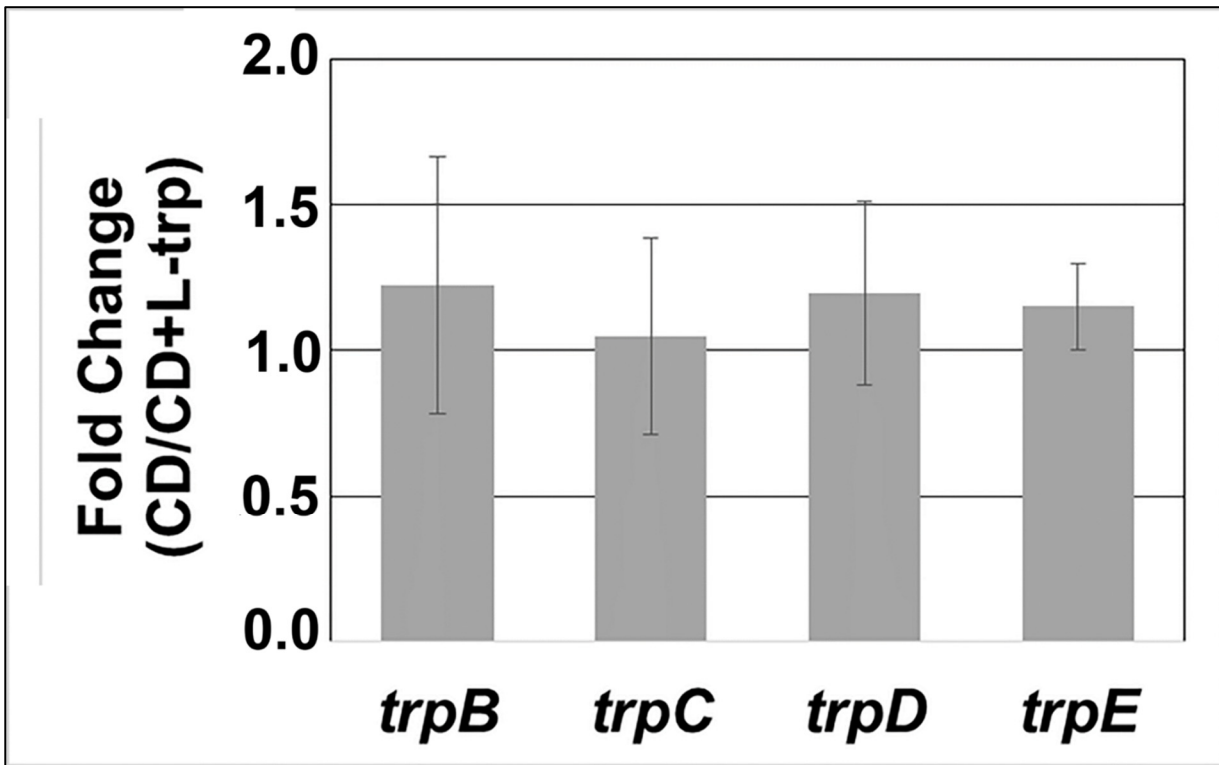


Figure S5. Real time PCR to evaluate the expression of the tryptophan biosynthetic genes: *trpB*, *trpC*, *trpD* and *trpE* of *F. pedrosoi* in response to incubation in minimal medium (Czapeck Dox) for 3h at 28 °C. Bars represent standard deviation of the mean of three biological replicates. *gapgh* was used as housekeeping gene.


```

XP_963281.1_Trp-3_Nc      DTERAKFVAATDAQAFEGFRLMSQLEGIIPALESSSHGIWGALELAKTMKPEDDVVICLSG
CAA24635.1_trp5_Sc      STGRAQFIAATDAQALLGFKLLSQLEGIIPALESSSHAVYGACELAKTMKPDQHLVINISG
P16578.3_Trp1_Cc       DSGRADYVVCCTDEDALRGFRMLTQKEGIIPALESSSHAIWEGVKIAKSLPKDKDIVICLSG
.  **  ::  .**  :*  **:  :::  *****:..:  .  ::**  :  .  :*  :**

KIW78135_TrpB_Fp       RGDKDVQSVADELPRLGPGIGWDLRF-----
AAF91181.1_TRPB_An     RGDKDVESVAESLPKLGPIGWDLRF-----
XP_963281.1_Trp-3_Nc   RGDKDVQSVADELPIIGPKIGWDLRF-----
CAA24635.1_trp5_Sc     RGDKDVQSVAEVLPKLGPKIGWDLRFEEEDPSA
P16578.3_Trp1_Cc      RGDKDVEQISELLPKWADKLDWHVSSNAIPSK
*****:..:  **  .  :.*.:

```

Figure S6. Multiple sequence alignment of tryptophan synthases protein sequences. The analyses of the sequences from *F. pedrosoi* (KIW78135), *Aspergillus nidulans* (AAF91181.1), *Neurospora crassa* (XP_963281.1), *Saccharomyces cerevisiae* (CAA24635.1) and *Coprinopsis cinerea* (P16578.3) was performed on CLUSTALW server (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>). The connecting region delimited by Tyrosine (Y) and Proline (P) between α and β catalytic domains are in bold. The access numbers to the NCBI deposited sequence are in parentheses.

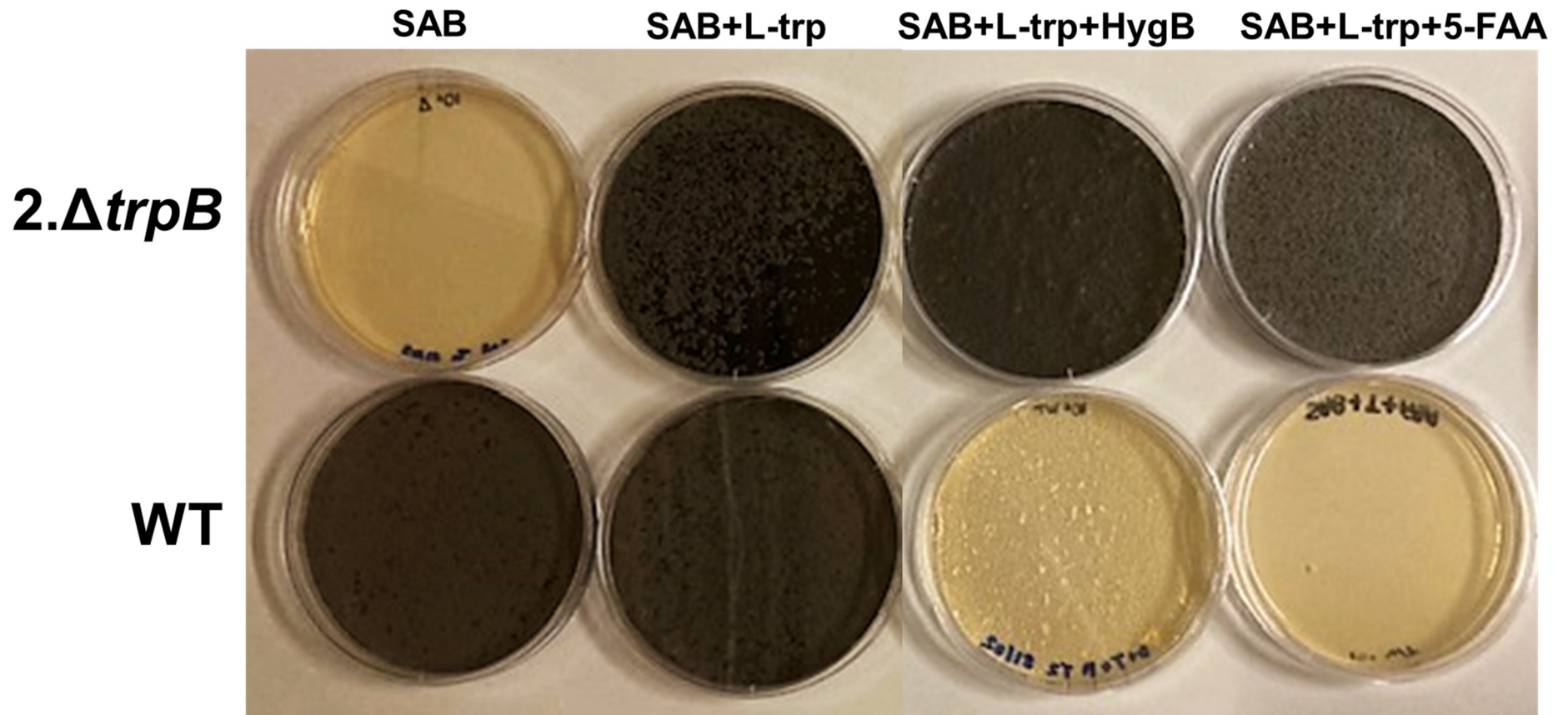


Figure S7. Evaluation of the use of 5-FAA at the concentration of 0.5 mg/mL as a selection agent for *trp*⁻ mutants, and for counter-selection of strains that present active tryptophan synthesis pathway at high cell density (5×10^5) of WT and $\Delta trpB$. The plates SAB agar, SAB agar +L-trp, SAB agar+L-trp+HygB and SAB agar+L-trp+5-FAA were incubated at 25 °C and inspected every three days until the 22nd day of growth. SAB agar plates were supplemented with 500 μ g/mL of L-trp and/or 100 μ g/mL of HygB.