



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA**

**Caracterização de um Antígeno Rico em Prolina
(PRA/Ag2) do fungo patogênico humano
*Paracoccidioides brasiliensis***

**Aluna: Kelly Pacheco de Castro
Orientadora: Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Biologia do Instituto de Ciências
Biológicas, da Universidade Federal de Goiás
como requisito parcial à obtenção do título de
mestre em Biologia Celular e Molecular.**

**- GOIÂNIA - GO -
- JANEIRO, 2008 -**

DISSERTAÇÃO DESENVOLVIDA NO LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR, DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, COMO REQUISITO PARCIAL PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR.

APOIO FINANCEIRO: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

BANCA EXAMINADORA

TITULARES

Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

Profa. Dra. Divina das Dores de Paula Cardoso, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás

Profa. Dra. Maristela Pereira, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

SUPLENTE

Profa. Dra. Silvia Maria Salém Izacc, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

Prof. Dr. Prof. Ivan Torres Nicolau de Campos, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás

*“Havia um
homem isolado
num deserto,
perdido, sedento
e faminto. Só tinha
como companhia,
num velho oásis,
uma árvore seca
e sem vida.
Revoltado,
num acesso de
solidão e raiva,
gritou:
Árvore tola
e sem vida!
Mostra-me
onde está Deus!
E a árvore
floresceu...”*

*Ao meu querido pai Adenil Alves de Castro pelo
exemplo de sabedoria e luta diante da vida.
Por todo o apoio financeiro e principalmente
por acreditar em mim.*

*A minha maravilhosa mãe Elcione Ferreira
Pacheco de quem recebi grandes
ensinamentos de vida, coragem e
perseverança.*

*Aos meus irmãos Eberton Pacheco de Castro (In
memorian) e Wemerson Pacheco de Castro.
Muito obrigado pelo apoio, carinho e amor
em todos os momentos.*

Amo muito todos vocês!!!

*Aos meus familiares e amigos que com carinho e
dedicação me apoiaram no decorrer deste
trabalho.*

*Ao meu esposo Cleydson Henrique Siqueira,
companheiro e amigo de tantos momentos
felizes e conturbados, que soube com doação
imensa e amor torná-los mais leves e mais
prazerosos. Em quem encontrei
compreensão pela ausência e amor para
seguir adiante.*

*“O amor é força e poder, como o ferro no
cimento: as duas naturezas fundem-se e
transformam-se num só e único bloco
inquebrantável, contra o qual em vão se
abate a força daqueles que o queiram
partir...”.*

*Amo muito você. Em todo momento louvo a Deus
por ter cruzado os nossos caminhos e por
permitir que seja parte da minha vida!*

AGRADECIMENTOS

À Deus, o Todo de Tudo. Se existem a Vida, a beleza, a sabedoria e o amor, é porque Ele está sempre presente. Obrigada por sempre me acolher em Teus braços, mesmo no meu desânimo e infidelidade, por me dar forças nos momentos de fraqueza e cansaço e principalmente por sempre ter cuidado de mim. Sei que sempre posso contar Contigo. Amo-te muito!!!

À Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares pela orientação, atenção, confiança e principalmente pelo grande exemplo de luta e dedicação na área de pesquisa. Você é um exemplo de profissionalismo e coragem. Tenha sempre minha eterna admiração.

À Profa. Dra. Maristela Pereira, pelo apoio, pelas sugestões e por todo auxílio prestado durante a realização desta dissertação.

À Profa. Silvia Maria Salem Izacc pela presença sempre alegre e amiga e pela disposição constante em ajudar.

Aos professores do Curso de Mestrado do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Goiás, que muito contribuíram em meu aprendizado.

À minha querida amiga Nadya, por ser uma das pessoas mais lindas que já conheci, por sua amizade, carinho e auxílio em todos os momentos que convivemos juntas!!! Pela paciência em “trilhar meus primeiros passos no mundo da pesquisa”. Que Deus lhe abençoe muito. Tenho muito carinho por você.

À Tereza Cristina pela presteza e dedicação, por sempre me ajudar nos momentos em que precisei e por ser um exemplo de coragem. Meu muito obrigado por tudo.

À Zilma por todo apoio e ajuda no tempo em que estive no laboratório.

À Lidiane, companheira de graduação e mestrado, por todos os momentos compartilhados durante o curso e no laboratório.

À Patrícia Zambuzzi e Sabrina por todas as conversas, pela convivência e amizade. Mas principalmente por todas as experiências trocadas de como ser uma “Dona de Casa”.

À Sarah pelo carinho, atenção e por todas as caronas!!!

Ao Rodrigo e à Nathalie pelo sorriso fácil e divertida convivência.

Ao Bruno, Moniquinha, Milce, Karinne, Bernadete, Rogério, Aline e Kesser, que deixaram muitas saudades.

Ao Clayton, Alexandre, Luiz Augusto, Juliana Parente e Mônica Santiago, pela convivência e por compartilharem suas experiências.

E a todos os colegas e companheiros de laboratório que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho: Patrícia Kotty, Roney, Christiely, Elisa Flávia, Mariana, Mirelle, Neto, Patrícia Lima, Ana Flávia, Ívian, Ademar, Raquel, Regilda, Rodrigo, Rogério, Amanda, Martha, Leandro, Daiane, Wesley, Renata.

Ao CNPq e CAPES, pelo apoio financeiro.

“Quem tem ‘por que’ viver pode suportar qualquer ‘como’ viver.”

Nietzsche

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1 – INTRODUÇÃO	13
1.1 – <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> – Aspectos Gerais.....	13
1.2 – Dimorfismo em <i>P. brasiliensis</i>	16
1.3 – Transcriptomas de <i>P. brasiliensis</i>	18
1.4 – Parede Celular de <i>P. brasiliensis</i>	22
1.5 – Proteínas GPI ancoradas.....	24
1.6 – Antígeno Rico em Prolina (PRA/Ag2).....	26
2 – JUSTIFICATIVAS	29
3 – OBJETIVOS E ESTRATÉGIAS	30
4 – MANUSCRITO	32
Title and general information.....	32
Abstract and keywords.....	33
Introduction.....	34
Materials and methods.....	36
Results.....	43
Discussion.....	48
Acknowledgments.....	52
References.....	52
Figure legends.....	59

Figures.....	63
5 – CONCLUSÕES.....	69
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

RESUMO

O fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente causador da micose sistêmica mais prevalente na América Latina. Em humanos, a infecção se dá pela inalação de propágulos do fungo, que ao alcançarem o epitélio pulmonar transformam-se na fase leveduriforme, parasitária, do fungo *P. brasiliensis*. Neste trabalho, descrevemos a caracterização de um homólogo de PRA/Ag2 (Antígeno rico em prolina), uma proteína predita de parede celular, primeiramente identificada em *Coccidioides immitis*. A proteína, o cDNA e a sequência genômica foram analisados. Análises através de Southern blot sugerem que há somente uma cópia do gene em *P. brasiliensis*. O cDNA clonado foi expresso em *Escherichia coli* e a rPbPRA/Ag2 purificada foi utilizada para obtenção do anticorpo policlonal. A proteína recombinante purificada foi reconhecida pelo soro de pacientes com paracoccidioidomicose comprovada e não foi reconhecida pelo soro de pacientes saudáveis. Microscopia eletrônica e estudos bioquímicos demonstraram a presença do PbPRA/Ag2 na parede celular de *P. brasiliensis*, ligada através de uma âncora de GPI. A expressão do gene que codifica *Pbpra/ag2* foi analisada através de PCR em Tempo Real e os resultados demonstraram regulação da expressão nas fases de *P. brasiliensis*, com maior nível de expressão na fase miceliana. Análises da expressão protéica corroboram os resultados da RT-PCR em Tempo Real.

ABSTRACT

The dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* is the causative agent of the most frequent systemic mycosis in Latin America. In humans, infection starts by inhalation of fungal propagules, which reach the pulmonary epithelium and differentiate into the yeast parasitic phase. Here we describe the characterization of a proline-rich protein (PRA/Ag2) homologue of *P. brasiliensis*, a predictable cell wall protein, first identified in *Coccidioides immitis*. The protein, the cDNA and genomic sequences were analyzed. Southern blot analysis suggested that there is one copy of the gene in *P. brasiliensis*. The cloned cDNA was expressed in *Escherichia coli* and the purified rPbPRA/Ag2 was used to obtain polyclonal antibody. The purified recombinant protein was recognized by sera of patients with proven paracoccidioidomycosis and not by sera of healthy individuals. Immunoelectron microscopy and biochemical studies demonstrated the presence of PbPRA/Ag2 in the fungal cell wall, linked through a GPI-anchor. The expression of the *PbpPra/ag2* gene was analyzed by real time PCR and results demonstrated developmental regulation in phases of *P. brasiliensis*, with a higher expression in the mycelium saprobic phase. The protein expression analyses corroborate the transcript levels.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Paracoccidioides brasiliensis* – Aspectos Gerais

Paracoccidioides brasiliensis, um fungo termodimórfico, é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), uma micose humana sistêmica geograficamente restrita à América Latina (Restrepo & Tobón, 2005). O Brasil é responsável por 80% dos casos descritos na literatura, sendo a maioria reportados nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (Blotta et al., 1999 e Paniago et al., 2003).

O fungo se desenvolve como levedura nos tecidos infectados ou quando cultivado *in vitro* a 36°C, e como micélio (forma infectiva) em condições saprobióticas no meio ambiente, ou quando cultivado em temperaturas inferiores a 28°C (Bagagli et al., 2006). As leveduras de *P. brasiliensis* são caracterizadas por apresentarem brotamentos múltiplos, formados pela evaginação da célula-mãe, onde uma célula central é circundada por várias células periféricas, conferindo um aspecto de roda de leme de navio. A forma miceliana pode ser identificada por filamentos septados com conídios terminais ou intercalares (Restrepo-Moreno, 2003).

A PCM representa um sério desafio de saúde pública, com importância social e econômica. Os indivíduos infectados compreendem principalmente trabalhadores rurais, do sexo masculino (Brummer et al., 1993). Coutinho et al. (2002) descreveram que a mortalidade por PCM no Brasil é a oitava quando classificada entre as doenças crônicas e a primeira entre as micoses sistêmicas. A taxa de mortalidade média anual é de 1,45/milhão de habitantes considerando ambos os sexos, sendo que o índice para homens é de 2,42/milhão e para mulheres 0,43/milhão de habitantes.

O local exato e as condições onde *P. brasiliensis* ocorre na natureza ainda são indeterminados em virtude de diversos fatores, tais como o raro isolamento do fungo do ambiente, o prolongado período de latência no hospedeiro humano, bem como a não identificação de hospedeiro intermediário do fungo (Montenegro et al., 1996; Bagagli et al., 1998; 2006). Micélio e conídio provavelmente podem crescer saprofitamente no solo, na água, e em plantas à temperatura ambiente e são consideradas como formas infectivas do fungo (Restrepo et al., 2001). O fungo já foi isolado do solo em países como o Brasil (Montenegro et al., 1996), Argentina (Negroni., 1966) e Venezuela

(Albornoz, 1971), de fezes de morcegos frugívoros (*Artibeus lituratus*) e de pingüim (Grose & Tamsitt, 1965 e Garcia et al., 1993) e de tatus, *Dasyurus novemcinctus* e *Cabassous centralis*, os quais são considerados hospedeiros silvestres do fungo (Bagagli et al., 1998; 2003; Corredor et al., 2005). A infecção natural em alguns animais selvagens e domésticos tem sido observada e manifestações clínicas da doença foram relatadas em cachorros (Ricci et al., 2004, Farias et al., 2005).

Os recentes avanços de metodologias moleculares têm ajudado na classificação taxonômica de vários fungos de importância médica (San-Blas et al., 2002). O fungo *P. brasiliensis* foi inicialmente classificado como um fungo imperfeito, pertencente ao filo anamórfico Deuteromycota e à classe Hyphomycetes. A atual classificação taxonômica do *P. brasiliensis* é: reino Fungi, filo Ascomycota, subdivisão Euascomycotina, classe Plectomyceto, subclasse Euascomycetidae, ordem Onygenales, família Onygenaceae, subfamília Onygenaceae Anamórficos, gênero *Paracoccidioides*, espécie *brasiliensis* (San-Blas et al., 2002). Matute et al. (2006) descreveram a existência de três diferentes espécies filogenéticas de *P. brasiliensis*: S1 (espécie 1), PS2 (espécie filogenética 2) e PS3 (espécie filogenética 3). A espécie filogenética PS3 está geograficamente restrita à Colômbia, enquanto S1 está distribuída no Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela. Alguns isolados da espécie filogenética PS2 foram encontrados no Brasil nos estados de São Paulo e Minas Gerais e ainda na Venezuela (Matute et al., 2006).

A organização genômica de *P. brasiliensis* ainda não está totalmente esclarecida; isso se deve principalmente ao fato de não se conhecer a fase sexual ou telemórfica do fungo. Através da técnica de eletroforese de pulso alternado (PFGE), foi possível identificar 4 ou 5 cromossomos com 2-10 Mb tanto de fungos isolados do meio ambiente, quanto de isolados clínicos (Cano et al., 1998). Desta maneira, estima-se que *P. brasiliensis* apresente um genoma variando entre 23-31 Mb (San Blas et al., 2002). Utilizando a técnica de citometria de fluxo (FCM), Almeida et al. (2007) sugeriram que o fungo apresenta um genoma variando de 26,3 a 35,5 Mb em células leveduriformes e que o genoma dos conídios apresenta um tamanho de 30,2 a 30,9 Mb, não apresentando nenhuma diferença significativa com a forma de levedura.

P. brasiliensis atinge o hospedeiro, usualmente através da via respiratória, por inalação de propágulos de micélio, como conídios. Nos pulmões esses propágulos se convertem para a fase leveduriforme, de onde podem disseminar-se para diferentes órgãos e tecidos (San-Blas et al., 2002). O contato inicial do hospedeiro com o fungo aparentemente evolui para uma infecção subclínica ou assintomática (PCM infecção).

Se há progressão da infecção, ocorre o estabelecimento da doença, que apresenta duas formas clínicas distintas: a forma aguda ou tipo juvenil e a forma crônica ou adulta (Franco et al., 1987).

A forma juvenil (aguda ou subaguda) da PCM representa 3 a 5% dos casos descritos da doença e afeta principalmente crianças e adultos jovens (Reis et al., 1986; Brummer et al., 1993). O quadro da doença caracteriza-se por um desenvolvimento rápido e por marcante envolvimento de órgãos como baço, fígado, gânglios linfáticos e medula óssea. A função imune mediada por células é gravemente deprimida nesses pacientes, provavelmente devido ao comprometimento medular (Londero & Melo, 1983; Brummer et al., 1993). Apesar de não haver manifestações clínicas ou radiológicas de comprometimento pulmonar evidente, pode-se isolar o fungo do lavado brônquico, evidenciando a participação do pulmão como porta de entrada do patógeno (Restrepo et al., 1989). Esta é a forma mais severa e com pior prognóstico (Brummer et al., 1993).

A forma crônica ou adulta representa mais de 90% dos casos, sendo a maioria dos pacientes constituída por homens adultos. Ao contrário da forma aguda, o quadro clínico apresenta um desenvolvimento lento com comprometimento pulmonar evidente (Brummer et al., 1993). Em aproximadamente 25% dos casos, o pulmão é o único órgão afetado - forma unifocal. Muitas vezes, com o desenvolvimento silencioso da doença, o paciente busca auxílio médico somente quando apresenta sintomas de comprometimento extrapulmonar. Nestes casos se constata o envolvimento de órgãos como pele, mucosas das vias aéreas superiores, tubo digestivo e linfonodos - forma multifocal (Londero, 1986; Brummer et al., 1993). A forma crônica apresenta notável tendência à disseminação, sendo pouco freqüentes os quadros onde há somente comprometimento pulmonar (Restrepo et al., 1983).

O grande número de tecidos que *P. brasiliensis* pode colonizar e infectar sugere que o fungo deve ter desenvolvido mecanismos que o capacitam a aderir, extravasar e invadir barreiras impostas pelos tecidos do hospedeiro (Mendes-Gianinni et al., 1994; Lenzi et al., 2000). Em *P. brasiliensis* algumas moléculas de adesão à matriz extracelular já foram descritas, incluindo, Gp43 (Vicentini et al., 1994), adesinas de 19 e 32 kDa (Gonzalez et al., 2005), 30 kDa (Andreotti et al., 2005), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Barbosa et al., 2006), triosefosfato isomerase (Pereira et al., 2007) e DFG5 (Castro et al., 2007). Durante o processo de invasão tecidual, fungos patogênicos

expressam moléculas que auxiliam na aderência celular, sendo fatores de colonização e disseminação.

1.2 – Dimorfismo em *P. brasiliensis*

O termo “dimorfismo fúngico” refere-se a uma habilidade de alguns fungos poderem transitar entre as formas de levedura e micélio. Trata-se de uma característica fúngica que depende da alteração da temperatura e/ou fontes de nutrientes. Em *P. brasiliensis* esse fator favorece a instalação do fungo nos tecidos do hospedeiro auxiliando sua invasão e estabelecimento da PCM (Villar et al., 1988). O dimorfismo em *P. brasiliensis* foi descrito por Lutz em 1908, quando este observou as diferentes formas do fungo no hospedeiro e em culturas à temperatura ambiente. O processo de transição *in vitro* de leveduras para micélio, induzido pela alteração de temperatura de incubação, foi descrito por Negroni em 1931. A transição *in vitro* de micélio para levedura em *P. brasiliensis*, é caracterizada pelo espessamento das regiões inter-septais das hifas, com surgimento de estruturas arredondadas, que se dividem por brotamento (San-Blas, 1982). No processo inverso, de levedura para micélio, *in vitro*, ocorre a formação de brotos alongados, multinucleados, em forma de pêra, os quais gradativamente assumem o aspecto de uma hifa. Diferenças bioquímicas e estruturais, como a composição e o teor de lipídeos variam entre as duas formas, sendo que em levedura há um teor de lipídeos duas vezes maior do que em micélio. Em micélio verifica-se um índice maior de ácidos graxos insaturados (Manocha et al., 1980).

O dimorfismo de fungos também está relacionado a alterações de componentes da parede celular (Borba & Schäffer, 2002). Em *P. brasiliensis* a diferenciação morfológica é consequência de um conjunto de alterações bioquímicas e fisiológicas desencadeadas pelo aumento de temperatura, a qual estimula uma adaptação no padrão transcricional e ou regulatório em geral de genes e proteínas (Nunes et al., 2005; Bastos et al., 2007). Na forma miceliana de *P. brasiliensis* há o predomínio da β -1,3 glucana, enquanto que, na forma leveduriforme a α -1,3 glucana é predominante. Estudos realizados com isolados de *P. brasiliensis* sugerem que a α -1,3 glucana protege o fungo contra o ataque de enzimas fagocitárias de leucócitos e macrófagos (San-Blas & San-Blas., 1977; Kurokawa et al., 1998). San-Blas (1982) sugere que fagócitos humanos poderiam produzir β -glucanase com a capacidade de digerir somente β -1,3 glucana

presente na parede celular da forma miceliana do fungo. A diferenciação do fungo para a forma leveduriforme começaria a infecção prevenindo a ação das enzimas fagocitárias, causando o parasitismo de *P. brasiliensis*.

Silva et al. (1994) caracterizaram *in vitro* o processo de diferenciação do isolado Pb01 (ATCC-MYA-826). A diferenciação de micélio para levedura ocorre em 20 dias e a de levedura para micélio em 15 dias, após a alteração da temperatura de cultivo. Em ambos, ocorre um período de latência que se dá entre 48-72 horas, atingindo 70-80% de diferenciação no décimo dia, o que caracteriza o processo de dimorfismo *in vitro* de *P. brasiliensis* como sendo lento e gradual.

Estudos experimentais com o hormônio feminino 17- β -estradiol mostraram a capacidade deste de inibir a transição de micélio para a fase leveduriforme tanto *in vitro* (Restrepo et al., 1984), como *in vivo* (Sano et al., 1999), sendo esse fato relacionado como possível proteção à infecção em mulheres. Felipe et al. (2005) identificaram um gene expresso diferencialmente na fase leveduriforme que possivelmente codifica uma proteína de 60 kDa do citosol de *P. brasiliensis*, a qual se ligaria ao estradiol. Acredita-se que a interação do hormônio 17- β -estradiol com esta proteína citoplasmática inibiria a transição de micélio para levedura, explicando a baixa incidência de PCM em mulheres.

O dimorfismo em *P. brasiliensis* tem sido considerado como ponto principal no desenvolvimento da infecção, visto que a eficiência de instalação do patógeno no hospedeiro se dá pela transição da forma miceliana, infectante, para a leveduriforme, patogênica (Restrepo, 1985; Brummer et al., 1993). Assim, tem sido realizada a clonagem e caracterização de genes, bem como a caracterização de proteínas diferencialmente expressas na fase de levedura e micélio. Cunha et al. (1999) caracterizaram seqüências parciais de aminoácidos da extremidade N-terminal de algumas proteínas diferencialmente expressas em ambas as formas de *P. brasiliensis*. Particularmente, destacam-se a PbM46 similar à enolases (46 kDa, presente em maior quantidade na fase leveduriforme) e PbY20 (proteína de 20 kDa presente somente na fase leveduriforme). O gene codificante para a PbY20 foi caracterizado; a análise comparativa da seqüência deduzida de aminoácidos mostrou identidade alta da PbY20 com flavodoxinas (Daher et al., 2005). Fonseca et al. (2001) caracterizaram seqüências parciais de aminoácidos dos antígenos catalase, frutose-1-6-bifosfato aldolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, malato desidrogenase e triosefosfato isomerase, todos preferencialmente expressos na forma leveduriforme de *P. brasiliensis*. Vários

dos genes correlatos foram posteriormente caracterizados e, como previsto, apresentaram expressão diferencial durante a transição dimórfica do fungo (Moreira et al., 2004; Pereira et al., 2004; Barbosa et al., 2004; Carneiro et al., 2005; Barbosa et al., 2006; Pereira et al., 2007). Além disso, os genes codificantes para as proteínas HSP70 (Silva et al., 1999), HSP60 (Salem-Izaac et al., 2001; Cunha et al., 2002), ClpB (Jesuino et al., 2002) e manosiltransferase (Costa et al., 2002) apresentam baixos níveis de expressão na forma miceliana, quando comparados com a forma leveduriforme de *P. brasiliensis*, sugerindo que estas proteínas sejam necessárias para sobrevivência de *P. brasiliensis* nas condições térmicas do hospedeiro e que elas possam desempenhar um papel na morfogênese do fungo. Venancio et al. (2002) utilizaram a técnica de DDRT-PCR para identificar genes diferencialmente expressos de *P. brasiliensis*. Os autores apresentaram como resultados 20 fragmentos de cDNA que correspondem provavelmente a genes diferencialmente expressos, os quais não apresentaram homologia com nenhuma seqüência depositada em bancos de dados, visto que, as seqüências eram pequenas e normalmente pertenciam à região 3' não traduzida de seus respectivos mRNAs.

1.3 – Transcriptomas de *P. brasiliensis*

Visando conhecer um maior número de genes de *P. brasiliensis*, diferentes abordagens no estudo de transcriptomas têm sido aplicadas. O Projeto Genoma Funcional de *P. brasiliensis*, desenvolvido por um consórcio de laboratórios da região Centro-Oeste do Brasil (Projeto Genoma Funcional e Diferencial de *Paracoccidioides brasiliensis*) resultou no seqüenciamento de 25.511 clones derivados de bibliotecas de cDNA de levedura e micélio (Felipe et al., 2003; 2005). O projeto cobriu cerca de 80% do genoma estimado do fungo *P. brasiliensis* e possibilitou a detecção de genes diferencialmente expressos nas fases de *P. brasiliensis*. A análise do transcriptoma revelou alguns prováveis componentes das vias de sinalização e seqüências gênicas consideradas como potenciais alvos para antifúngicos em *P. brasiliensis*, não possuindo nenhum homólogo no genoma humano, como: quitina deacetilase, isocitrato liase e α -1,3-glucana sintase, todos preferencialmente expressos na fase leveduriforme. Os autores descreveram ainda o perfil metabólico diferencial exibido por *P. brasiliensis* nas fases miceliana e leveduriforme. Em geral, micélio apresenta metabolismo aeróbio, uma

vez que durante a fase saprofítica, genes que codificam enzimas que participam da fosforilação oxidativa, como a isocitrato desidrogenase e succinil coenzima A sintase, estão altamente expressos. Ao contrário, a fase leveduriforme apresenta metabolismo mais anaeróbico quando comparado a micélio; nesta fase, os altos níveis de expressão da álcool desidrogenase I favorecem a fermentação alcoólica e conseqüente produção de etanol (Felipe et al., 2005). A diferenciação celular em *P. brasiliensis* requer mudança na temperatura, o que pode ser associado com a resposta ao estresse. Dessa forma, foram identificados 48 transcritos codificando chaperonas ou proteínas envolvidas no processo de estresse, sendo oito diferencialmente expressos.

Outro projeto de transcriptoma de *P. brasiliensis* foi desenvolvido por grupos do Estado de São Paulo. Através da análise de ESTs, Goldman et al. (2003) identificaram vários genes potenciais de virulência em *P. brasiliensis* homólogos à *Candida albicans*. A identificação de alguns genes de *P. brasiliensis* homólogos a genes envolvidos em vias de transdução de sinal e relacionados à virulência de *C. albicans*, sugere que estas vias possam estar atuando em *P. brasiliensis*, provavelmente controlando a diferenciação celular.

Marques et al. (2004) identificaram genes preferencialmente expressos na fase leveduriforme de *P. brasiliensis* (isolado *Pb18*), utilizando técnicas de subtração e microarranjos. Dentre os genes identificados como diferencialmente expressos estão α -1,3-glucana sintase, enzima relacionada ao metabolismo de parede celular; ERG25 que codifica uma C-4 esterol metil oxidase e atua no primeiro passo enzimático da síntese de ergosterol em fungos, além de genes envolvidos no metabolismo de enxofre, tais como metionina permease.

Nunes et al. (2005) utilizaram microarranjos com seqüências de 4.692 genes do fungo *P. brasiliensis* para monitorar a expressão gênica em alguns pontos da transição morfológica micélio-levedura (5 a 12 h depois da mudança da temperatura). A hibridização por microarranjo cobriu cerca de 50% do número total de genes estimado do fungo *P. brasiliensis*. Foram identificados 2583 genes diferencialmente expressos durante a transição morfológica. Estão inclusos entre esses, genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo de aminoácidos, transdução de sinal, síntese de proteínas, metabolismo da parede celular, estrutura do genoma, resposta ao estresse oxidativo, controle do crescimento e desenvolvimento do fungo *P. brasiliensis*. Um desses genes que codifica para a enzima 4-hidroxil-fenil piruvato dioxigenase foi

superexpresso durante a transição micélio-levedura e tem sido avaliado como um novo alvo para antifúngicos.

Andrade et al. (2006) e Ferreira et al. (2006) realizaram análises da expressão de genes envolvidos na utilização de enxofre por *P. brasiliensis*. Neste estudo, os autores caracterizaram a expressão de cinco genes envolvidos no metabolismo do enxofre e avaliaram o acúmulo de mRNA destes genes durante a transição de micélio para levedura e crescimento da fase leveduriforme, sugerindo que nestas situações estão ocorrendo mobilização e armazenamento de enxofre, além da ativação da via de assimilação inorgânica. Os autores sugerem que, embora *P. brasiliensis* não use enxofre inorgânico como única fonte para iniciar a transição e o crescimento da fase leveduriforme, este fungo pode de algum modo, utilizar ambas, as vias orgânica e inorgânica durante o processo de crescimento.

O perfil transcricional de *P. brasiliensis* durante a diferenciação morfológica de micélio para levedura foi avaliado por Bastos et al. (2007). Vários transcritos potencialmente relacionados com a síntese de membrana e parede celulares mostraram-se aumentados durante a diferenciação celular de micélio para levedura após 22 horas de indução da transição, sugerindo que *P. brasiliensis* favorece o remodelamento da membrana e de parede celulares nos estágios iniciais da morfogênese. Neste estudo, genes envolvidos na via de assimilação do enxofre, como a sulfito redutase, mostrou-se super expresso durante a transição, sugerindo o envolvimento do metabolismo do enxofre durante o processo de diferenciação em *P. brasiliensis*, como descrito anteriormente (Andrade et al., 2006; Ferreira et al., 2006). Durante a transição também foi verificada a presença de enzimas que participam do ciclo do glioxalato, como a isocitrato liase, malato desidrogenase, citrato sintase e aconitase. A presença destes transcritos durante a diferenciação indica que esta via é funcional durante esse processo. Também foram identificados genes envolvidos em vias de transdução de sinal tais como MAPK, serina/treonina quinase e histidina quinase, sugerindo que a transição morfológica em *P. brasiliensis* é mediada por vias de transdução de sinal que controlam a adaptação ao ambiente para a sobrevivência do fungo dentro do hospedeiro (Bastos et al., 2007).

Com o objetivo de estudar genes possivelmente envolvidos na adaptação e sobrevivência de *P. brasiliensis* no hospedeiro durante a infecção, Bailão et al. (2006) utilizaram a técnica de Análise de Diferença Representacional de cDNA (cDNA-RDA) para identificar genes de *P. brasiliensis* induzidos durante o processo infectivo e em

condições que mimetizam a via hematológica de disseminação fúngica. No modelo de infecção experimental foi observada a alta frequência do transcrito *zrt1* (zinco/ferro permease). O mesmo foi observado para o transcrito *ctr3*, codificando um transportador de cobre de alta afinidade, que sugere a exigência de uma permease cobre/ferro para o transporte do Fe. Em adição, o transcrito codificante para a glutamina sintase (*gln1*) foi fortemente induzido após incubação com sangue humano sugerindo que a remodelação na parede/membrana celular possa ser um dos meios pelos quais *P. brasiliensis* responda às mudanças de osmolaridade externa encontrada pelo fungo na via de disseminação sanguínea.

Recentemente, Bailão et al. (2007) analisaram genes preferencialmente expressos em leveduras de *P. brasiliensis* tratadas com plasma humano, simulando assim sítios de infecção, com inflamação. Foi observado um aumento significativo na expressão de transcritos associados com a degradação de ácido graxos, síntese de proteínas envolvidas no remodelamento da parede celular e síntese de proteínas relacionadas à mudança de osmolaridade. Assim como na incubação com sangue, a glutamina sintase também é super expressa na condição de incubação com plasma, reforçando a hipótese já descrita anteriormente de que a super expressão desta enzima esteja ligada ao aumento da síntese de quitina que ocorreria durante o estresse osmótico.

Tavares et al. (2007) realizaram experimentos de hibridização em microarranjos de DNA, nos quais foi possível definir transcritos de *P. brasiliensis*, isolado *Pb01*, internalizados em macrófagos. Após a internalização, o patógeno promove adaptação metabólica induzindo a expressão de genes da biossíntese de aminoácidos, especificamente genes envolvidos na biossíntese de metionina, além de diversos genes relacionados ao estresse como, por exemplo, a superóxido dismutase 3, Hsp60 e QCR8 (subunidade do citocromo oxidase c).

Recentemente, Costa et al. (2007) realizaram o transcriptoma de *P. brasiliensis*, fase leveduriforme, recuperado de fígado de animais experimentais (camundongos B10). Foram seqüenciadas 4.932 ESTs no processo infectivo, sendo 37,47% relacionadas a novos genes e 23,75% pertencentes a genes super expressos. Os genes identificados foram categorizados em processos metabólicos, transporte celular e energia. Do total de ESTs geradas neste estudo, 65,53% das seqüências identificadas, também estavam presentes no transcriptoma de levedura e micélio de células obtidas de cultura *in vitro*, descrito por Felipe et al. (2005). A demonstração do perfil gênico das células leveduriformes de *P. brasiliensis* recuperadas de animais infectados é um

requisito essencial para o estudo do genoma funcional de modo a esclarecer os mecanismos de patogenicidade e virulência fúngica.

1.4 – Parede Celular de *P. brasiliensis*

A parede celular é uma estrutura comum a fungos filamentosos e leveduras, localizada na interface entre o microrganismo e o meio ambiente (Firon et al., 2004). Ela tem uma estrutura rígida e recobre a célula protegendo-a contra variações osmóticas, químicas e biológicas. A parede possui ação de “filtro” permitindo a passagem de algumas moléculas e excluindo outras, desempenhando importante papel no crescimento, desenvolvimento e interações dos fungos com o ambiente e com outras células. A parede celular está envolvida com a morfogênese, expressão antigênica, adesão e interação célula-célula. Além disso, ela mantém a forma da célula e embora seja rígida e pareça estática, ela está freqüentemente sofrendo remodelamento, mudando assim sua estrutura e composição durante o crescimento e desenvolvimento de células fúngicas (Peberdy et al., 1990; Ruiz Herrera et al., 1991; Bulawa, 1993).

Embora, a parede celular de fungos varie freqüentemente entre diferentes espécies, ela é uma estrutura complexa composta tipicamente de quitina, β -1,3- e β -1,6-glucanas, mananas, proteínas, algumas altamente glicosiladas e lipídios. Estes componentes estão distribuídos diferencialmente ao longo da parede celular (Kanetsuna et al., 1972; San-Blas & San-Blas, 1977). Além disso, pesquisas genômicas e proteômicas têm mostrado que fungos como *Saccharomyces cerevisiae* e *C. albicans* incorporam um grande número de diferentes proteínas em sua parede celular e que essa incorporação é altamente controlada, dependendo da fase do ciclo celular, das condições ambientais, e estágio de desenvolvimento (De Groot et al., 2005).

A parede celular de *P. brasiliensis* é constituída de lipídios, proteínas e polissacarídeos, com a proporção de cada um variando de acordo com as fases miceliana e leveduriforme e a virulência da linhagem do fungo. Assim, a parede do micélio possui maior teor de proteínas totais e de proteínas com pontes dissulfeto (12 vezes mais) que levedura (Kanetsuna et al., 1969).

As tentativas de se correlacionar mudanças estruturais ocorridas durante o dimorfismo de *P. brasiliensis* com a composição química de sua parede celular, revelaram que o dimorfismo não depende somente da presença de polissacarídeos na parede celular, mas também de sua quantidade relativa e seu arranjo espacial (Paris et

al., 1986). Na maioria dos fungos a quitina, um polissacarídeo constituído de resíduos de N-acetilglicosamina unidos por ligações β -1,4, é o maior componente estrutural da parede celular (Bulawa, 1993; Munro & Gow, 1995). Em *P. brasiliensis* a fase leveduriforme apresenta maior quantidade de quitina em relação à fase miceliana, sendo composta na sua grande maioria por α -1,3 glucana (95%), tendo apenas 5% de β -1,3 glucana. Já a forma miceliana possui em sua maioria β -1,3 glucana (Kanetsuna et al., 1969). San-Blas et al. (1993; 1994) demonstraram que a diferença do padrão de síntese de glucanas entre as formas de micélio e levedura deve estar envolvida no processo de diferenciação celular. Durante a diferenciação de levedura para micélio, a síntese de α -1,3 glucana é interrompida por um período sem que haja indício de síntese de β -1,3 glucana e no processo inverso ocorre redução da síntese de β -1,3 glucana.

A composição de lipídeos de membrana celular também sofre mudanças durante o processo de dimorfismo em *P. brasiliensis*. A forma leveduriforme possui duas vezes mais lipídeos que a forma miceliana. O ácido linoléico e os lipídeos insaturados são encontrados em maior quantidade na forma miceliana, enquanto na forma de levedura o lipídeo predominante é o ácido oléico (San-Blas & San-Blas, 1997). Essa diferença possivelmente está relacionada à manutenção da permeabilidade normal da membrana, quanto submetida à temperatura de 36° C, necessária à sobrevivência do fungo (Hamdan et al., 1993).

Além dos componentes já mencionados, estudos têm comprovado que enzimas glicolíticas e outras proteínas abundantes no citosol, como a GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) se localiza na parede celular do fungo *P. brasiliensis* (Barbosa et al., 2006). Outras moléculas de superfície têm sido descritas em nosso laboratório, tais como HSP60 (Passos et al., 2003), formamidase (Borges et al., manuscrito em redação) e triose fosfato isomerase (Pereira et al., 2007).

O transcriptoma de *P. brasiliensis* gerado pelo projeto genoma funcional e diferencial foi rastreado, utilizando programas de bioinformática, com o objetivo de se identificar seqüências que codificam para proteínas com funções relacionadas à parede celular. Assim, Tomazett et al. (2005) identificaram no transcriptoma do fungo *P. brasiliensis* genes que codificam para proteínas envolvidas na estrutura, composição e organização da parede celular. Entre as seqüências identificadas estão: aquelas codificantes de quitina sintase (*Pbrchs6*), o qual está presente apenas na fase miceliana de *P. brasiliensis*; manosiltransferase (*Pbmnn9*), cujo produto protéico está envolvido na síntese da cadeia externa de manana; glucanosiltransferases (*Pbgel1*, *Pbgel2* e

Pbgel3), as quais codificam enzimas envolvidas na integração de β -1,3-glucana à parede celular; endoquitinase (*Pbcts1*) e exoquitinase (*Pbexg1*). Castro et al. (2005) identificaram no transcriptoma do fungo *P. brasiliensis* seqüências que codificam para prováveis proteínas GPI-ancoradas, as quais foram divididas em várias classes: entre elas podemos citar GPIs ancoradas à parede celular (GPI-CWP) (Crh-like, α -amilase e PRA/Ag2 “Antígeno Rico em prolina 2”), proteínas GPI-ancoradas possivelmente envolvidas na biossíntese da parede celular [ECM33 e Gels (1, 2 e 3)] e uma proteína GPI-ancorada com função de adesina (extracellular matrix protein).

1.5 – Proteínas GPI ancoradas

As proteínas de superfície celular constituem uma importante classe de biomoléculas por estarem localizadas na interface da célula como meio ambiente. Muitas proteínas de membrana de eucariotos sofrem algum tipo de modificação pós-traducional e várias delas são modificadas pela ligação de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) em um motivo na região C-terminal da proteína (Ferguson et al., 1988). As proteínas GPI-ancoradas possuem um peptídeo sinal N-terminal, uma região hidrofóbica e um sítio de ancoragem, denominado sítio ômega (ω), C-terminal (Hamada et al., 1998). A adição da âncora de GPI ocorre no retículo endoplasmático, seguido pela clivagem proteolítica do propeptídeo C-terminal (Orlean, 1997). Em adição a essas características, as proteínas GPI ancoradas apresentam uma seqüência rica em serina e treonina que fornece sítios para glicosilação. A localização celular dessas proteínas é parcialmente determinada por resíduos básicos ou hidrofóbicos na região do sítio ômega (Caro et al., 1997; Vossen et al., 1997; Hamada et al., 1998; 1999).

A estrutura central da âncora de GPI consiste em um único fosfolipídio estendendo-se até à membrana e um grupo principal formado por um inositol ligado a um fosfodiéster, no qual se liga uma molécula de glicosamina. Uma cadeia linear com três manoses se liga à glicosamina e um fosfato de etanolamina liga-se na região terminal dos resíduos de manose. Diferenças na composição lipídica e substituições na cadeia tetrassacarídica podem promover variações na estrutura da âncora de GPI (McConville & Ferguson, 1993).

Uma série de passos enzimáticos é necessária para a adição da âncora de GPI à proteína. As proteínas entram no retículo endoplasmático onde a cauda de GPI é covalentemente ligada ao sítio ω por um complexo de transamidases composto por cinco proteínas (PIG-A, PIG-C, PIG-H, GPI1, PIG-P) (Fraering et al., 2001; Hong et al., 2003). As proteínas GPI-ancoradas são então transportadas para o complexo de Golgi (Muniz et al., 2001). Sugere-se que estas proteínas possam ter dois destinos. Elas podem ser transportadas e se ligarem à membrana plasmática (proteínas GPI-ancoradas à membrana plasmática) ou podem se ligar à parede celular (GPI-CWPs) (Lu et al., 1994). Caro et al. (1997) propuseram, com base em análises *in silico* de proteínas GPI ancoradas de *S. cerevisiae*, que a presença de dois aminoácidos básicos, quatro resíduos acima do sítio ω , agem na retenção da proteína na membrana plasmática. Hamada et al. (1998; 1999) sugerem que na ausência desse sinal de retenção, aminoácidos na posição 2, 4 e 5, acima do sítio ω agem positivamente na localização da proteína na parede celular.

Estudos têm estabelecido uma série de funções às proteínas GPI-ancoradas. Elas podem ser enzimas, antígenos de superfície, moléculas de adesão ou receptores de superfície (Chatterjee & Mayor, 2001; Hoyer, 2001; Sundstrom, 2002). Elas foram reportadas ainda, em vários patógenos, como imunogênicas e sugere-se que sejam importantes fatores de virulência (Hung et al., 2002; McGwire et al., 2002). Em adição, proteínas GPI-ancoradas possuem propriedades enzimáticas, agindo na biossíntese da parede celular (Hartland et al., 1996; Mouyna et al., 2000).

A síntese da âncora de GPI é essencial para viabilidade de fungos, uma vez que manoproteínas de parede celular necessitam de uma âncora de GPI para poderem se incorporar covalentemente à parede celular (Leidich et al., 1994). Leveduras têm sido extensivamente usadas no estudo do sistema de ancoragem das GPIs (Ash et al., 1995; van der Vaart et al., 1995). Contudo, em contraste à *S. cerevisiae*, pouco se conhece sobre a estrutura e biossíntese da âncora de GPI em fungos filamentosos. *Aspergillus fumigatus* apresenta cerca de nove proteínas GPI-ancoradas homólogas (Bruneau et al., 2001). Em *C. albicans* e *S. cerevisiae* a maior parte de proteínas GPI ancoradas à parede celular (GPI-CWPs) é covalentemente ligada à β -1,6-glucana. A β -1,6-glucana pode ser ligada à β -1,3-glucana ou quitina resultando em uma forte ligação covalente de GPI-CWPs à parede celular (Kapteyn et al., 1996; 1997; Kollar et al., 1997; De Groot et al., 2004).

Estudos têm demonstrado que *P. brasiliensis* usa GPI para ancorar proteínas de superfície celular (Heise et al., 1995). As proteínas GPI-ancoradas de *P. brasiliensis* podem ser enzimas, antígenos de superfície, ou moléculas de adesão, e elas, possivelmente, tem função estrutural na biogênese da parede celular (Castro et al., 2005). Vinte proteínas GPI-ancoradas de *P. brasiliensis* foram identificadas: nove enzimas (α -amilase, proteinase aspártica, superóxido dismutase 1, ECM33, DFG5, β -1,3-glucanosiltransferases 1, 2 e 3 e uma fosfolipase B), duas proteínas estruturais (Crh-like e proteína GPI-ancorada à parede celular), uma molécula de adesão (proteína da matriz extracelular, EMP), três antígenos de superfície (antígeno 1, antígeno rico em prolina 2 e β -1,3-glucanosiltransferase 1) e seis proteínas hipotéticas (Castro et al., 2005). A enzima α -amilase está localizada na parede celular de fungos e possui função crucial durante o processo fermentativo em leveduras (Yabuki & Fukui, 1970; Nagamine et al., 2003). Algumas novas proteínas identificadas como ECM33 e DFG5-like foram descritas no processo de biogênese da parede celular (Lussier et al., 1997; Ross-MacDonald et al., 1999; Kitagaki et al., 2002; Castro et al., 2007) e crescimento em altas temperaturas (Terashima et al., 2003). Em adição, a família das Gels tem função descrita na reorganização e morfogênese da parede celular devido sua atividade no alongamento das cadeias de β -1,3-glucana (Mouyna et al., 2000). Duas proteínas têm sido reportadas como tendo função estrutural: Crh-like, que tem um provável domínio glicosidase podendo estar envolvida no desenvolvimento da arquitetura da parede celular (Rodriguez-peña et al., 2000), e uma proteína GPI-ancorada à parede celular que tem função na associação das redes de glucana (Moukadiri et al., 1997).

Assim a adição da âncora de GPI é requerida para morfogênese, virulência e interação patógeno-hospedeiro (Richard et al., 2002; Sundstrom, 2002; Delgado et al., 2003). Essas razões podem ser invocadas para justificar a importância das proteínas GPI-ancoradas em *P. brasiliensis*.

1.6 – Antígeno Rico em Prolina (PRA/Ag2)

O antígeno rico em prolina (PRA/Ag2) foi descrito em alguns microrganismos, exercendo, em alguns deles, função protetora contra infecção em modelos experimentais (Abuodeh et al., 1999). Dentre os microrganismos em que a PRA/Ag2 foi identificada

temos: *Coccidioides immitis* (Zhu et al., 1996), *Uncinocarpus reesi* (Johannesson et al., 2004) e *Chrysosporium lucknowense* (Johannesson et al., 2004).

A PRA/Ag2 foi relatada como imunogênica em outros microrganismos. Ward et al. (1975) isolaram uma fração solúvel em meio alcalino da parede celular de micélio de *C. immitis* tratado com tripsina e Lecara et al. (1983) demonstraram que esse extrato denominado C-ASWS promoveu proteção em ratos inoculados com o fungo. Análises desse extrato através de eletroforese bidimensional demonstraram que ele é rico em uma proteína que mais tarde foi denominada PRA/Ag2 (Cox, 1985). Vários trabalhos posteriores forneceram fortes evidências que PRA/Ag2, uma das primeiras proteínas imunogênicas identificadas em *C. immitis*, é o maior componente reativo com células T de pacientes com coccidioidomicose (Cox et al., 1977; Cox, 1989; Dugger et al., 1991). Zhu et al. (1996) identificaram e caracterizaram o cDNA codificante para PRA/Ag2 de *C. immitis* e demonstraram que a proteína recombinante reage com soro de pacientes com coccidioidomicose. Outros estudos revelaram que vacinas usando a PRA/Ag2 recombinante ou o cDNA codificante para a respectiva proteína provocaram proteção contra coccidioidomicose em camundongos (Kirkland et al., 1998; Abuodeh et al., 1999; Jiang et al., 1999; Shubitz et al., 2002). Jiang et al. (1999) realizaram testes comparativos de imunoproteção entre vacinação genética (cDNA ou DNA) e vacinação com a proteína recombinante demonstrando que o gene de PRA/Ag2 é mais eficaz em promover proteção em ratos infectados com *C. immitis*. Zhu et al. (1997), utilizando técnicas de PCR para gerar diferentes fragmentos da proteína, identificaram epítomos de PRA/Ag2 reativos com células B no domínio composto pelos aminoácidos 19-96 e Kirkland (1998) demonstrou a eficácia da proteína recombinante em promover imunoproteção.

Proteínas de superfície celular são moléculas potencialmente associadas à interação do fungo com o hospedeiro humano. Em fungos, as proteínas GPI ancoradas são conhecidas por estarem covalentemente incorporadas à parede celular ou por serem permanentemente fixadas à membrana plasmática. Muitas funções são sugeridas para as proteínas GPI-ancoradas. Elas podem estar envolvidas na biossíntese e no remodelamento da parede celular, podem determinar a hidrofobicidade e antigenicidade da superfície e desempenham papel na adesão e virulência (Hoyer, 2001; Klis et al., 2001; Sundstrom, 2002). PRA/Ag2 foi descrita como uma possível molécula GPI ancorada à parede celular (Galgiani et al., 1992; Zhu et al., 1996; Castro et al., 2005). As proteínas da camada externa da parede celular de fungos são os primeiros sítios de

interação com organismos hospedeiros (Vicentini et al., 1994; Staab et al., 1999; Long et al., 2003). Assim, é esperado que as proteínas de adesão e aquelas que conferem proteção contra moléculas do hospedeiro estejam na parede celular e que tenham um importante papel na virulência. Devido ao interesse do nosso laboratório em estudar moléculas potencialmente associadas à interação do fungo com o hospedeiro, realizamos estudos de caracterização da PRA/Ag2 homóloga de *P. brasiliensis* no intuito de futuramente avaliar o papel funcional dessa proteína na patogênese da PCM.

2. JUSTIFICATIVAS

Eventos relacionados à síntese e montagem da parede celular têm sido objeto de pesquisas em diferentes grupos. O nosso interesse nesse tópico se deve ao fato da parede celular ser responsável pela manutenção da estabilidade e forma celulares e ao fato de as proteínas nela presentes serem as primeiras a entrarem em contato com o hospedeiro, estabelecendo uma relação preliminar patógeno-hospedeiro.

Já foi descrito que a proteína rica em prolina (PRA/Ag2) é uma molécula ancorada à parede celular através de uma âncora de GPI e um antígeno de fungos, sendo o principal componente reativo com células T de pacientes com coccidioidomicose. Assim, estudos com essa proteína podem fornecer importantes informações sobre a interação fungo-hospedeiro e sobre mecanismos de estabelecimento da PCM.

3. OBJETIVOS E ESTRATÉGIAS

Proteínas de superfície celular são moléculas potencialmente associadas à interação do fungo com o hospedeiro humano. O estudo de moléculas envolvidas na interação patógeno-hospedeiro é um dos principais interesses de nosso grupo.

Visando esse enfoque, o presente estudo teve como objetivos específicos:

1. Caracterizar um antígeno rico em prolina (*PbPRA/Ag2*) de *P. brasiliensis*

Estratégias:

- Caracterização do cDNA referente à *PbPRA/Ag2*
- Análise da seqüência deduzida de aminoácidos através de ferramentas de bioinformática.

2. Avaliar o número de cópias do gene codificante da *PbPRA/Ag2* no genoma do fungo.

Estratégias:

- Experimento de *Southern blot*.

3. Promover a expressão heteróloga da *PbPRA/Ag2* e a purificação da proteína recombinante.

Estratégias:

- Clonagem do cDNA *PbPRA/Ag2* em vetor de expressão e indução da expressão da proteína em sistema bacteriano.
- Purificação da proteína recombinante através de cromatografia de afinidade e clivagem enzimática da proteína de fusão.

4. Identificar a proteína *PbPRA/Ag2* no proteoma de *P. brasiliensis*.

Estratégias:

- Produção de anticorpos policlonais.
- Eletroforese Bidimensional
- Ensaio de *western blot*.

5. Analisar a expressão de *PbPRA/Ag2* em células de *P. brasiliensis*.

Estratégias:

- Eletroforese de proteínas
- *Western blot*

6. Avaliar os níveis de transcritos de *PbPRA/Ag2* em *P. brasiliensis*.

Estratégias:

- Extração de RNA total de *P. brasiliensis* nas formas estágio específicos e durante a transição micélio – levedura.
- Reações de PCR em tempo real

7. Analisar a localização celular de *PbPRA/Ag2* em células leveduriformes de *P. brasiliensis*.

Estratégias:

- Ensaios de imunocitoquímica e microscopia eletrônica.
- Ensaios bioquímicos utilizando digestão com HF-piridina

The proline-rich cell-wall protein of *Paracoccidioides brasiliensis*

Short Title: The *PbPRA/Ag2* protein of *Paracoccidioides brasiliensis*

Kelly Pacheco de Castro¹, Nadya da Silva Castro¹, Luciano dos Santos Feitosa², Livia Kmetzsch Rosa e Silva³, Marilene Henning Vainstein³, Sônia Nair Bão⁴ and Célia Maria de Almeida Soares¹.

¹- Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, 74001-970, Goiânia, Goiás, Brazil. ²- Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo³- Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. ⁴- Laboratório de Microscopia Eletrônica, Universidade de Brasília.

Corresponding author: Dr. C. M. A. Soares, Laboratório de Biologia Molecular, ICB II, Campus II, Universidade Federal de Goiás, 74001-970, Goiânia-Goiás, Brazil. Tel/fax: 55-62-3521-1110. e-mail: celia@icb.ufg.br.

ABSTRACT

The dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* is the causative agent of the most frequent systemic mycosis in Latin America. In humans, infection starts by inhalation of fungal propagules, which reach the pulmonary epithelium and differentiate into the yeast parasitic phase. Here we describe the characterization of a proline-rich protein (PRA/Ag2) homologue of *P. brasiliensis*, a predictable cell wall protein, first identified in *Coccidioides immitis*. The protein, the cDNA and genomic sequences were analyzed. Southern blot analysis suggested that there is one copy of the gene in *P. brasiliensis*. The cloned cDNA was expressed in *Escherichia coli* and the purified rPbPRA/Ag2 was used to obtain polyclonal antibody. The purified recombinant protein was recognized by sera of patients with proven paracoccidioidomycosis and not by sera of healthy individuals. Immunoelectron microscopy and biochemical studies demonstrated the presence of PbPRA/Ag2 in the fungal cell wall, linked through a GPI-anchor. The expression of the PbPRA/Ag2 gene was analyzed by real time PCR and results demonstrated developmental regulation in phases of *P. brasiliensis*, with a higher expression in the mycelium saprobic phase. The protein expression analyses corroborate the transcript levels.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*; Proline-rich-antigen 2; cell wall.

1. INTRODUCTION

Paracoccidioides brasiliensis is the causative agent of paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic mycosis geographically restricted to Central and South America (Restrepo and Tobón, 2005). The fungus is thermodimorphic; that is, it grows as a yeast-like form in host tissues or when cultured at 35–36° C, and as mycelium in saprobic condition or when cultured at room temperature (18–23° C) (Lacaz, 1994). Temperature-dependent cellular differentiation to the parasitic yeast cell takes place in the lungs. The primary pulmonary infection eventually disseminates to other organs by hematogenic and/or lymphatic routes (Brummer et al., 1993).

The cell wall is a highly dynamic fungal structure. It is involved in the maintenance of cellular morphology and consequently in the dimorphic process, and also functions in matters such as the osmotic protection of the cell and the modulation of immunological responses against infection (Klis et al., 2002). In *P. brasiliensis* the molecular architecture and the functional components of the cell wall differ between the yeast and mycelial growth forms. Yeast and mycelia forms present chitin as a common structural polysaccharide (Kanetsuna et al., 1969). As the fungus adopts the yeast form, an increase in the chitin content is observed in the cell wall, followed by a change in the glucan anomeric structure from a β -1,3-linked polymer to an α -1,3-glucan (San-Blas et al., 2002). The surface α -glucan may have a role as a protective layer against the host defense mechanisms due to the incapacity of phagocytic cells to digest α -1,3-glucan (San-Blas, 1982). The total lipid content of yeast cells is twice more than in mycelia phase (Manocha, 1980).

The cell-wall forms an interface between pathogen and host and is believed to play a role in virulence. Also, it acts as a sieve and reservoir of molecules such as adhesins (Barbosa et al., 2006 and Pereira et al., 2007).

Glycoproteins of several organisms become attached to a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor and ultimately appear at the plasma membrane, and in some fungi in the cell wall (Tiede et al., 1999). Proteins destined to be GPI anchored have conserved features, such as an N-terminal signal sequence for addressing to the endoplasmic reticulum (ER) and a C-terminal signal sequence for attachment of the GPI anchor. Shortly after protein synthesis in the ER, the preformed GPI anchor replaces the C-terminal transmembrane region. Several studies have established that GPI-anchored proteins are a large class of functionally diverse proteins. They can be enzymes, surface antigens, adhesion molecules, or surface receptors (Chatterjee and Mayor, 2001; Hoyer, 2001; Sundstrom, 2002). GPI-anchored proteins reported in various microbial pathogens have been shown to be immunogenic and are suggested to be important virulence factors (Hung et al., 2002; McGwire et al., 2002). In addition, GPI-bound proteins can display enzymatic properties, playing an active role in cell wall biosynthesis (Hartland et al., 1996; Mouyna et al., 2000).

Through cDNA representational difference analysis (cDNA-RDA) with RNAs obtained from two fungal isolates we identified a cDNA encoding to the proline rich antigen 2 (PRA/Ag2) homologue of *P. brasiliensis*. In the *C. immitis* PRA/Ag2 is a GPI-anchored protein (Galgiani et al., 1992; Zhu et al., 1996) heavily glycosylated (Dugger et al., 1991) and it is located in the fungal cell wall (Galgiani et al., 1992), most probably attached to the cell-wall matrix (Peng et al., 2002). The protein is suggested to be important for spherule cell-wall morphogenesis during the infection process in *C. immitis* (Zhu et al., 1996).

In the present study we report the cloning and characterization of the cDNA and gene encoding the homologue of PRA/Ag2 in *P. brasiliensis*. In addition, we also performed the purification of the recombinant PRA/Ag2 (rPbPRA/Ag2) and the production of the anti-rPbPRA/Ag2 polyclonal antibody. It was demonstrated that purified recombinant protein was recognized by sera of patients with PCM. Immunoelectron microscopy was employed to define the PRA/Ag2 subcellular localization in *P. brasiliensis* and HF-pyridine digestion showed that PbPRA/Ag2 is a GPI-anchored protein. We have also demonstrated that the expression of PbPRA/Ag2 and its transcript is developmentally regulated in *P. brasiliensis*.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. *P. brasiliensis* isolate and growth conditions

The *P. brasiliensis* Pb01 isolate (ATCC MYA-826), and the *P. brasiliensis* isolate obtained from armadillos (Terçarioli et al., 2007) were cultivated in semisolid Fava Netto's medium (Fava-Netto, 1961) at 36 °C for the yeast phase and at 22 °C for mycelium. The differentiation of Pb01 was performed in the same medium above, without agar, by changing the temperature of the culture from 22 to 36° C for the mycelium to yeast transition, as described (Moreira et al., 2004). The cells were previously grown in liquid medium for 18 h before changing the incubation temperature, which was maintained for 24 hours.

2.2. Cloning of the gene and cDNA encoding PbPRA/Ag2

A complete cDNA encoding the *P. brasiliensis* homologue of PRA/Ag2 was obtained from a cDNA library constructed as described by Bailão et al. (2006), by

applying the RDA technique, to assess differences between the mRNA populations of two isolates of *P. brasiliensis*. The cDNA was sequenced on both strands by using the MegaBACE 1000 DNA sequencer (GE Healthcare, Amersham Biosciences).

The genomic sequence encoding PRA/Ag2 was obtained by PCR amplification of the total DNA of *P. brasiliensis*. Primers were constructed based on the cDNA sequence (Table 1). The PCR reaction was performed with 20 ng of total DNA of *P. brasiliensis*, and the amplification conditions were 25 cycles at 94 °C for 1 min and 30 s, annealing at 60 °C for 1 min and 15 s, and extension at 72 °C for 2 min. An amplified PCR product of 1361-bp was gel purified and subcloned into pGEM-T-Easy vector (Promega, Madison, WI, USA). The sequence was determined on both strands by automated DNA sequencing, applying the DNA sequencing method of Sanger et al. (1977).

2.3. DNA sequencing and sequence analysis

The cDNA and genomic DNA sequences were translated and compared to all non-redundant polypeptides in the translated NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) database. The predicted protein was analyzed by using the programs: Compute pI/Mw (http://ca.expasy.org/tools/pi_tool.html), Scan (<http://ca.expasy.org/tools/scanprosite/>), PSORT II (<http://www.psort.org/>), and Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/search.shtml>). The DGPI (http://129.194.185.165/dgpi/index_en.html) and big-PI fungal predictor (http://mendel.imp.univie.ac.at/gpi/fungi/gpi_fungi.html) (Eisenhaber et al., 2004) were used to predict the ω -site of the GPI-anchor.

2.4. DNA extraction of *P. brasiliensis* and Southern blot analysis

P. brasiliensis yeast cells were harvested, washed and frozen in liquid nitrogen. Grinding with a mortar and pestle broke the cells, and the genomic DNA was prepared by the cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) method according to Del Sal et al. (1989). The cell powder was suspended in extraction buffer [(2% (w/v) polyvinylpolypyrrolidone (PVP), 1.4 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl pH 8.0, 0.02 M ethylenediaminetetracetic acid (EDTA), 2% (w/v) CTAB]. The mixture was incubated at 65 °C for 1 h, extracted with 50% chloroform/50% isoamyl alcohol and precipitated with 100% ethanol. After treatment with RNase I and ethanol precipitation, the DNA was resuspended in water.

Total DNA (25 µg) was digested with the restriction enzymes *Hae*III, *Stu*I, *Dra*I, *Eco*RV, *Hind*III and *Sal*I. Standard conditions for electrophoresis were used (Sambrook and Russell, 2001). The blot was probed to the 654-bp *Pbpra/ag2* genomic fragment labeled by using the Gene Images Random Prime labeling module (GE Healthcare) and washed under high-stringency conditions [60°C, 1.0 x SSC (0.15 M NaCl, 0.015 M trisodium citrate), 0.1% [w/v] SDS and 0.5 x SSC, 0.1% [w/v] SDS] according to the manufacturer's instructions. Hybridization was detected with the Gene Image CDP-Star detection module (GE Healthcare).

2.5. Expression and purification of recombinant *PbPRA/Ag2*

Oligonucleotide primers were designed to amplify the 585 bp cDNA containing the complete coding region of PRA/Ag2 (Table 1). The PCR product was subcloned into the *Sal*I/*Not*I sites of pGEX-4T-3 (GE Healthcare). The DNA was sequenced on both strands and used to transform the *E. coli* C41 (DE3). The transformant cells were grown at 37 °C, induced with 1.0 mM isopropyl β-D- thiogalactopyranoside (IPTG) and

the bacterial extract was pelleted and resuspended in phosphate buffered saline (PBS 1X). The fusion protein PRA/Ag2 was expressed in the soluble form by the bacteria and purified by affinity chromatography under non-denaturing conditions. Subsequently the fusion protein was cleaved by the addition of thrombin protease (50U/ml). The purity and size of the recombinant protein were evaluated by running the purified molecule on a 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) followed by Coomassie blue staining.

2.6. Antibody production

The purified *rPbPRA/Ag2* was used to generate specific rabbit polyclonal serum. Rabbit preimmune serum was obtained and stored at -20°C. The purified recombinant protein (300 µg) was injected into rabbit with Freund's adjuvant three times at 10-days intervals. The obtained serum was sampled and stored at -20°C.

2.7. Preparation of *P. brasiliensis* total cell extracts

Protein crude extracts were obtained by disruption of frozen cells in liquid nitrogen in the presence of protease inhibitors: 50 µg/ml N α -p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK), 1 mM 4-chloromercuribenzoic acid (PCMB), 20 mM leupeptin, 20 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 5 mM iodoacetamide in homogenization buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.8, 2 mM CaCl₂).

2.8. Electrophoretic analysis

Polyacrylamide gel electrophoresis of native proteins and sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) were performed according to O'Farrell (1975) and Laemmli (1970), respectively. In brief, the proteins were precipitated by 10% (w/v)

trichloroacetic acid (TCA) addition. The pellets were washed in 10% (v/v) cold acetone and the samples were resuspended in lyses buffer containing 9.5 M urea, 2% (v/v) Nonidet P-40 (NP-40), 5% (v/v) β -mercaptoethanol, ampholytes 5.0-8.0 and 3.5-10.0 (ratio 4:1).

2.9. Western blotting analysis

The proteins were electrophoresed and stained with Coomassie brilliant blue R250 or transferred to a nylon membrane and checked by Ponceau S to determine equal loading. The membranes were blocked with PBS containing 5% non-fat dry milk. *P. brasiliensis* PRA/Ag2 as well as the purified recombinant protein were detected with the polyclonal antibody raised against the recombinant protein (diluted 1:3000) and after reaction with alkaline phosphatase anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) the reaction was developed with 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate–nitroblue tetrazolium (BCIP/NBT). Reactions were also performed with sera from patients with PCM and from control individuals (diluted 1:100). After incubation with peroxidase conjugate anti-human IgG the reaction was developed with hydrogen peroxide and diaminobenzidine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) as the chromogenic reagent.

2.10. *In vivo* deglycosylation treatments

In order to obtain the deglycosylated protein extract from *P. brasiliensis* yeast cells, 20 μ g/ml of tunicamycin was added to the fungal yeast cells liquid culture. Tunicamycin at this concentration had no effect on fungal growth (data not show). After incubation, the cells were harvested and subjected to total protein extraction, as described above.

2.11. Cell wall protein extractions and enzymatic treatments

Yeast cells were frozen in liquid nitrogen and disrupted by using a pestle and mortar. This procedure was carried out until complete cell rupture, verified by optical microscopic analysis and by the failure of cells to grow on Fava Netto's medium. Ground material was lyophilized, weighed, and resuspended in 25 μ l Tris buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.8) for each milligram of dry weight as described (Damveld et al., 2005). The supernatant was separated from the cell wall fraction by centrifugation at 10,000 g for 10 min at 4 °C. A new protein extraction was performed with Tris buffer as described above. To remove noncovalently linked proteins and intracellular contaminants, isolated cell wall fraction was washed extensively with 1M NaCl and was boiled three times in SDS-extraction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 2% [w/v] SDS, 100 mM Na-EDTA, 40 mM β -mercaptoethanol) and pelleted after the extractions by centrifugation at 10,000 g for 10 min (Montijn et al., 1994). The washed pellet containing the cell wall enriched fraction was washed six times with water, lyophilized, and weighed. The cell wall fraction, prepared as described above was treated with hydrofluoric acid-pyridine (HF-pyridine) (10 μ l for each milligram of dry weight of cell walls) for 4h at 0° C, according to De Groot et al. (2004). After centrifugation, the supernatant containing the HF-pyridine extracted proteins was collected and HF-pyridine was removed by precipitating the supernatant in 9 volumes of methanol buffer (50% v/v methanol, 50mM Tris-HCl, pH 7.8) at 0° C for 2h. The pellet was washed three times in methanol buffer and resuspended in approximately 10 times the pellet volume in protein loading buffer 2X (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 4.4% [w/v] SDS, 20% [v/v] glycerol, 2% [v/v] β -mercaptoethanol, and 0,4% [w/v] bromophenol blue in distilled water.

2.12. RNA extractions and cDNA synthesis

Total RNA was obtained by using Trizol (GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. The quality of RNA was assessed by evaluating the $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ ratio, and by visualization of rRNA after electrophoresis on 1.2% agarose gel. The presence of intact 28S and 18S ribosomal RNA bands was used as a criterion to verify if the RNA was intact. RNase-free DNase treatment was performed in a final volume of 100 μl containing (40 mM Tris-HCl pH 7.5 and 6 mM MgCl_2), 1 μl of RNasin (40 U/ μl , Promega, Madison, WI, USA), 10 μl of RNase-free DNase (1 U/ μl , Promega), 2.5 μl DTT 200 mM, and 10 μl of total RNA. The reaction was incubated at 37°C for 60 min and stopped by incubating at 70°C for 30 min. The RNA samples were used to first-strand cDNA synthesis. Briefly, 1 μg of total *P. brasiliensis* RNA was mixed with 2 μl of oligo dT (10 pmol/ μl) and 2 μl dNTPs (10 mM) in 20 μl of water and heated to 65°C for 5 min. The mixture was briefly chilled on ice and mixed with 4 μl of 0.1 M dithiothreitol, 8 μl of 5X first-strand buffer (Invitrogen, CA, USA), and 1.5 μl of Superscript II (200 U/ μl) (Invitrogen). The reaction was then incubated at 37°C for 60 min and terminated by a 15 min incubation at 65°C.

2.13. Quantitative analysis of *Pbpra/ag2* by Real-time PCR

RNA samples were reverse transcribed using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) and oligo(dT)15 primer. Real time PCR reactions were performed in ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (Perkin-Elmer Applied Biosystem, USA). The PCR thermal cycling conditions were as follows: an initial step at 50 °C for 2 min, followed by 5 min at 95 °C, and 40 cycles at 95 °C for 15 sec, 60 °C for 10 sec and 72 °C for 15 sec. The Platinum SYBR Green qPCR Supermix (Invitrogen) was used for

PCRs. Each cDNA sample was analyzed in triplicate with each primer pair. The data were normalized to the 60S ribosomal protein L34 (Andrade et al., 2006) and to the 40S ribosomal protein S30 cDNAs which were amplified in each set of PCRs experiments. The calculation of relative expression was performed according to the $2^{-\Delta CT}$ standard curve method (Livak and Schmittgen, 2001). A nontemplate control with no genetic material was included to eliminate contamination or nonspecific reactions. The oligonucleotides utilized in this experiment are listed in Table 1.

2.14. Transmission electron microscopy of *P. brasiliensis* yeast cells and immunocytochemistry of the PRA/Ag2

For ultrastructural and immunocytochemistry studies, it were employed the protocols previously described in Barbosa et al. (2006) and Pereira et al. (2007). After fixation of the yeast cells, ultrathin sections were stained with 3% (w/v) uranyl acetate and lead citrate. After, the ultrathin sections were incubated for 1 h with the anti-*PbPRA/Ag2* polyclonal antibody (diluted 1:100). After washing, the grids were incubated for 1 h with the labeled secondary antibody (anti-mouse IgG, Au conjugated, 10 nm average size; 1:20 diluted). The grids were observed with a Jeol 1011 transmission electron microscope (Jeol, Tokyo, Japan). Controls were incubated with mouse preimmune serum (1:100 diluted).

2.15. Nucleotide sequence accession numbers

The *P. brasiliensis* nucleotide sequences reported in this paper and the deduced amino acid sequences have been submitted to the GenBank database under accession numbers DQ186602 (cDNA) and EU177004 (genomic).

3. RESULTS

3.1. Identification of the cDNA and the gene encoding the *PbPRA/Ag2* homologue and characterization of the deduced amino acid sequence

The complete cDNA encoding the homologue of *P. brasiliensis* PRA/Ag2 presented 1216 nucleotides in length; it contained 68 bases at the 5' UTR (untranslated region) and 664 at the 3' UTR exclusive of the poly-A tail, as shown in Fig 1. The open reading frame is 585 bp in length. The ATG codon at base 68 encodes the presumed initiation methionine that is in the appropriate position of a consensus translation start codon (Kozak, 1986). The stop codon TAA is located at position 795. The primary translation product of *Pbptra/ag2* gene contains 194 aminoacid (aa) and, in the absence of any post-translational modification, has a predicted molecular size of 19.5 kDa. Sequence comparisons, performed according to the program of Altschul et al. (1990) showed that the 28 aa on the N terminus have characteristics of a signal peptide, a positively charged residue (His¹⁵) followed by a hydrophobic core composition and a putative peptidase cleavage site between Ala²⁸ and Gln²⁹ (Fig. 1). The deduced amino acid sequence of *PbPRA/Ag2* also shows a region (from residues 112 through 166) that contains 7 repeats of the tetrapeptide TXX'P (Fig. 1). Although a N-glycosylation site was not found, a Thr-rich region (Thr¹¹⁰ through Thr¹⁶³) with high possibility of O-glycosylation was identified in the *PbPRA/Ag2* using a database search (Hansen et al., 1995). Several potential phosphorylation sites were found at 13 positions (39, 70, 86, 94, 113, 129-130, 132, 139, 149, 151, 160, 164) (Fig. 1). The extreme C terminus of the PRA/Ag2 molecule contains a putative GPI signal sequence, from Ala¹⁷⁸ through Leu¹⁹⁴, with an anchor site at Gly¹⁷¹, a cleavage site between Gly¹⁷¹ and Ala¹⁷² and a glycosaminoglycan attachment site between Ser¹⁴⁹ to Gly¹⁵² (Fig. 1). A conserved domain CFEM, a eight-cysteine-containing domain, is located between residues Gln²⁹ and Ser⁹⁴ (Fig. 1). A Blastp pairwise comparison of the deduced *PbPRA/Ag2* exhibited

59% identity and 75% similarity to *C. immitis* PRA/Ag2; 59% identity and 74% similarity to *Coccidioides posadasii* PRA/Ag2; 59% identity and 69% similarity to *Chrysosporium queenslandicum* PRA/Ag2; 60% identity and 70% similarity to *Uncinocarpus reesi* PRA/Ag2 (data not shown). The complete genomic sequence was obtained by PCR amplification and was compared to the cDNA. The *Pbpra/ag2* presents introns, a characteristic of the *P. brasiliensis* ORFs sequenced so far. The genomic sequence includes two introns, of 72- and 73 bp at 112 to 183 and 323 to 395 positions. All the introns/exons boundaries conform to the basic consensus GT/AG for eukaryotic splice donor and acceptor sites (Breathnach and Chambon, 1981) and presented putative splice box, which, matches the filamentous-fungus consensus sequence (NNCTPuAPy) located at the 3' terminus of the introns (Gurr et al., 1987).

3.2. Southern blot analysis

The genomic organization of *Pbpra/ag2* was investigated by Southern blot analysis. Total DNA was digested with the restriction endonucleases *HaeIII*, *StuI*, *DraI*, *EcoRV*, *HindIII* and *Sall*. Southern blot analysis using the cDNA insert under high stringency conditions was able to detect a single DNA fragment in the *P. brasiliensis* DNA digested with the restriction enzymes *DraI*, *EcoRV*, *HindIII* and *Sall* (Fig. 2, lanes 3 to 6). *HaeIII* and *StuI* digestion produced fragments consistent, in number, with the single restriction site presumed to occur in *Pbpra/ag2* (Fig. 2, lanes 1 and 2). The obtained restriction profiles indicated that the *P. brasiliensis* genome contained a single copy of the *Pbpra/ag2* gene.

3.3. Expression and purification of the recombinant *PbPra/Ag2*, production of polyclonal antibody and reaction with sera of PCM patients

The cDNA encoding the *P. brasiliensis* PRA/Ag2 was sub cloned into the expression vector pGEX-4T-3 to obtain the recombinant fusion protein. After induction with IPTG, a 42.5 kDa recombinant protein was detected in bacterial lysates (Fig 3A, lane 2). The predicted molecular size of the recombinant protein included the vector-encoded fusion peptide of 26 kDa at its N-terminus. The fusion protein was purified using glutathione sepharose-4B and cleaved by the addition of thrombin protease to remove the 26 kDa GST (Fig. 3A, lanes 3 and 4). As observed, the cleaved recombinant protein migrated as a 22 kDa species in SDS-PAGE (Fig 3A, lane 4). The purified recombinant protein was used to generate polyclonal antibody. The antibody was reacted with the fusion protein (Fig 3B, lanes 1 and 2). The cleaved protein was detected as a species of 22 kDa (Fig 3B, lane 3). No cross-reactivity to the mouse preimmune serum was evidenced with the same samples (Fig 3C).

Five serum samples from *P. brasiliensis*-infected individuals and five serum samples from control individuals were reacted in immunoblot assays with 1.0 µg of the rPbPRA/Ag2 (Fig 3D). Strong reactivity was observed with sera of PCM patients (Fig 3D, lanes 1-5). No cross-reactivity was observed with control sera (Fig 3D, lanes 6-10). This result suggest a predictable role of *PbPRA/Ag2* in the fungus host interaction.

3.4. Detection of *PbPRA/Ag2* in *P. brasiliensis* cells

The protein extract from yeast cells was subjected to two-dimensional gel electrophoresis analysis, transferred to nylon membranes and analyzed by immunoblot. Signal corresponding to protein species of 60 kDa with *pI* of 4.7 can be observed (Fig 4A). Proteins stained with coomassie blue (Fig 4B).

3.5. Analysis of *PbPRA/Ag2* in *P. brasiliensis* cells and transcript analysis of *Pbpra/ag2* by Real time-PCR

P. brasiliensis total proteins extracts from mycelium, mycelium in transition to yeast cells, yeast cells and yeast cells after tunicamycin treatment were subjected to SDS-PAGE, blotted onto nitrocellulose membrane and reacted to the polyclonal antibody (Fig 5A). As demonstrated, a single protein species of 60 kDa was detected in mycelium, mycelium in transition to yeast and yeast cells. The protein amount was more abundant in mycelium (Fig 5A, lane 1) and decreased during fungal transition to yeast cells (Fig. 5A, lane 2). The yeast cells present a small amount of protein accumulation compared to mycelium (Fig 5A lane 3). Deglycosylated protein extract from *P. brasiliensis* yeast cells was obtained after treatment with tunicamycin. The apparent molecular mass of the *PbPRA/Ag2* in *P. brasiliensis* yeast cell extracts (Fig 5A, lane 4) was not altered by treatment with tunicamycin, which blocks the synthesis of dolichol pyrophosphate-N-acetylglucosamine, a key intermediate in the biosynthetic pathway of N-glycosylated glycoproteins, indicating that *PbPRA/Ag2* do not undergoes N-linked glycosylation. No cross-reactivity to the mouse preimmune serum was evidenced with the same samples (Fig 5B).

Quantitative analysis of expression levels of *Pbpra/ag2* was achieved by real-time PCR assay. High levels of transcript were observed in mycelium in comparison to yeast cells. During the transition from mycelium to yeast, it could be observed a decrease of the transcript level after the temperature shift from 22 to 36° C (Fig 5C) after 24 hours of temperature shift. We saw no difference between the two normalizes (date not show). Accordingly the amount of transcript was standardized with the ribosomal protein L34. The level expression of *Pbpra/ag2* of *P. brasiliensis* isolated in its yeast form from naturally infected armadillos also was analyzed for real-time PCR. The results demonstrated a low level of expression of *Pbpra/ag2* yeast cells, as demonstrated to *Pb01* (Fig. 5C).

3.6. Detection of the *PbPRA/Ag2* in cell wall of *P. brasiliensis* yeast cells

Extraction of fungal cells walls with HF-pyridine has been shown to be a reliable method for the release of GPI-anchored cell wall mannoproteins (de Groot et al., 2004). HF-pyridine specifically cleaves phosphodiester bonds, through which GPI-CWPs are linked to the β -1,6-glucan component of the cell wall. Western blot analysis demonstrated that *PbPRA/Ag2* was localized in cell wall of *P. brasiliensis* (Fig 6A – lane 1) and *P. brasiliensis* cell wall treatment with HF-pyridine result in the liberation of the protein (Fig 6A – lane 2).

In order to continue to define the cellular localization of the *PbPRA/Ag2* in *P. brasiliensis*, we performed immunocytochemistry experiments using ultrathin sections of LR Gold-embedded yeast cells of *P. brasiliensis*. Electron microscopy of conventionally embedded cells revealed the ultrastructure of the *P. brasiliensis* yeast form (Fig 6B). The immunocytochemistry assays revealed gold particles detected mainly in the cell wall (Fig 6B, panels 2 and 3). Control samples obtained by incubation of the yeast cells with the rabbit preimmune serum were free of label (Fig. 6B, panel 1).

4. DISCUSSION

In this study we have identified a new gene of *P. brasiliensis*, encoding a predicted cell wall protein, identified as a homologue of PRA/Ag2. We cloned the PRA/Ag2 cDNA and gene and determined their entire sequences. The open reading frame encodes a 194 amino acid polypeptide with a calculated molecular weight of 19.5 kDa. A tetrapeptide repeat region (TXX'P), a common feature of fungal cell-wall proteins, is found in *PbPRA/Ag2*. This region is rich in proline/threonine. It has been suggested that regions rich in proline may serve a structural function in cell wall (Blume

et al., 1991). The conserved, eight-cysteine-containing CFEM sequence is present in *PbPRA/Ag2*. This domain reported to occur in fungal pathogens of plants and animals is predominantly comprised of hydrophobic residues and is present in proteins with a signal sequence, a transmembrane span or a GPI anchor. The CFEM domain of *PRA/Ag2* has been reported to contain B cell epitopes in *C. immitis* (Zhu et al., 1997). Also, the deduced *PbPRA/Ag2* presents a glycosaminoglycan attachment site similar to those involved in the binding adhesins to the extracellular matrix of host tissue (Jackson et al., 1995).

Southern blot analysis suggested that *P. brasiliensis pra/ag2* gene is probably a single copy such as the *pra/ag2* gene of *C. immitis* (Peng et al., 1999). RT-PCR showed a single transcript of *Pbpra/ag2* (data not show), reinforcing the presence of only one gene in the fungus genome. Analysis of the genome of *Pb03* (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis.1/MultiHome.html) also showed the presence of only one gene of *pra/ag2*.

The recombinant *PbPRA/Ag2* was obtained and the purified protein was subjected to SDS-PAGE, exhibiting molecular mass of 22 kDa. The predicted molecular mass of the translated *pra/ag2* gene is 19.5 kDa. It was previously demonstrated that high proline content of *C. immitis* proteins typically leads to contradictory data on molecular size based on estimates derived from the deduced protein sequence, on the one hand, and SDS-PAGE on the other (Hung, Yu et al., 2002). This anomaly has been suggested to be due to conformational peculiarities of the proteins proline-rich even after exposure to the reducing conditions of sample preparation.

Using the recombinant purified protein, high titles of rabbit polyclonal antibody were raised. The serum, specifically, recognized the recombinant purified protein in the western blot assays, highly suggesting a role of *PbPRA/Ag2* in the fungal-host

interactions. In *C. immitis* the recombinant PRA/Ag2 protein showed reactivity with coccidioidomycosis sera and induced a delayed-type hypersensitivity response in *Coccidioides* immunized mice. In related studies, Abuodeh et al. (1999) cloned a gene of *C. immitis* that encoded PRA/Ag2 and in subsequent studies, recombinant PRA/Ag2 and the *pra/ag2* gene were reported to protect BALB/c mice against i.p. challenge with arthroconidia of *C. immitis*.

To search for the *PbPRA/Ag2* in the *P. brasiliensis* extracts, immunoassays were performed using the anti-*PbPRA/Ag2* polyclonal antibody. Yeast cell extract was analyzed by two-dimensional electrophoresis. A protein species of 60 kDa with *pI* of 4.7 could be observed. A feature of the deduced protein is a high calculated *pI* of 8.11, when compared to the native protein with a measured *pI* of 4.7. The presence of several sites of phosphorylation in the deduced sequence could explain the more acidic *pI* in the native protein (Beausoleil et al., 2004). Many cell surface proteins are modified by O-linked or N-linked glycosylation. In the deduced *PbPRA/Ag2*, it was found several potential O-glycosylation sites. Although the predicted molecular mass of *PbPRA/Ag2* was around 19,5 kDa we detected in immunoblot assays a protein species of 60 kDa suggesting pos-translational modification of the native protein. Deglycosylated protein extract from *P. brasiliensis* yeast cells was obtained after treatment with tunicamycin. This extract was analyzed by Western blot analysis using the polyclonal antibody against PRA/Ag2 of *P. brasiliensis*. The apparent molecular mass (60 kDa) of the *PbPRA/Ag2* in *P. brasiliensis* yeast cell extracts was not altered by treatment with tunicamycin indicating that *PbPRA/Ag2* doesn't undergoes N-linked glycosylation. That aspect will be further investigated. In agreement to our data, the homologue PRA/Ag2 of *C. immitis* is also a O-glycosylated protein (Zhu et al., 1996). Spherule cell extract of *C. immitis* was analyzed by two-dimensional electrophoresis. To search

for the *CiPRA/Ag2* immunoassays were performed using a monospecific rabbit antiserum. A protein species between 70 and >200 kDa with *pI* of 4.0 could be observed, which could be explained by microheterogeneity of glycosylation.

The expression of the protein and of *Pbpra/ag2* in both, the saprobic and parasitic phases of *P. brasiliensis*, was investigated. As demonstrated, a single protein species of 60 kDa was detected in extracts of both yeast and mycelium, more accumulated in mycelium cells. This results were corroborated by the analysis performed by real-time PCR indicating that *Pbpra/ag2* is preferentially expressed in the mycelium phase of *P. brasiliensis*. The expression of the PRA/Ag2 homologue of *C. immitis* and its cognate transcript are developmentally regulated in phases of *C. immitis*, and the level was shown to increase as a function of spherule maturity (Galgiani et al., 1992; Peng et al., 1999).

The presence in the deduced protein of a conventional N-terminus signal peptide, which is responsible for introducing protein into the secretory pathway (Conesa et al., 2001), as well as the putative signal peptide cleavage site indicates the protein route to the fungal cell wall. The polyclonal antibody produced against the recombinant *PbPRA/Ag2* allowed determination of the protein subcellular localization. We demonstrated by immunoelectrom microscopy the localization of the *PbPRA/Ag2* in yeast cell wall. The *P. brasiliensis* cell wall treatment with HF-pyridine resulted in the liberation of the protein suggesting that it presents a GPI-anchor. This result is consistent with extensive sequencing of the clone encoding *PbPRA/Ag2* and computational analysis of the deduced protein of *P. brasiliensis* by using the fungal big-II predictor (Eisenhaber et al., 2004), available at that indicated recognition sequences for GPI-anchorage in the *PbPRA/Ag2*. The homologue of *PbPRA/Ag2* have been

previously described in *C. immitis* (Zhu et al., 1996) which is predicted to contain a GPI-anchor attachment signal, but biochemical evidence that this protein is covalently bound to the cell wall by their GPI-anchor moiety is still lacking. In *P. brasiliensis* cell wall the treatment with HF-pyridine strongly indicate that *PbPRA/Ag2* is a GPI-anchored molecule.

ACKNOWLEDGMENTS

The work at Universidade Federal de Goiás was funded by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG-GO). Kelly P. Castro and Nadya S. Castro have a fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERENCES

- Abuodeh RO, Shubitz LF, Siegel E, Snyder S, Peng T, Orsborn KI, Brummer E, Stevens DA, Galgiani JN. Resistance to *Coccidioides immitis* in mice after immunization with recombinant protein or a DNA vaccine of a proline-rich antigen. *Infect Immun.* 1999 Jun;67(6):2935-40.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990 Oct 5;215(3):403-10.
- Andrade RV, Paes HC, Nicola AM, de Carvalho MJ, Fachin AL, Cardoso RS, Silva SS, Fernandes L, Silva SP, Donadi EA, Sakamoto-Hojo ET, Passos GA, Soares CM, Brígido MM, Felipe MS. Cell organisation, sulphur metabolism and ion transport-related genes are differentially expressed in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium and yeast cells. *BMC Genomics.* 2006 Aug 14;7:208.

- Bailão AM, Schrank A, Borges CL, Dutra V, Molinari-Madlum EEWI, Felipe MSS, Mendes-Giannini MJS, Martins WS, Pereira M, Soares CMA. Differential gene expression by *Paracoccidioides brasiliensis* in host interaction conditions: representational difference analysis identifies candidate genes associated with fungal pathogenesis. *Microbes Infect.* 2006 Oct;8(12-13):2686-97.
- Barbosa MS, Bão SN, Andreotti PF, de Faria FP, Felipe MS, dos Santos Feitosa L, Mendes-Giannini MJ, Soares CM. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. *Infect Immun.* 2006 Jan;74(1):382-9.
- Beausoleil SA, Jedrychowski M, Schwartz D, Elias JE, Villén J, Li J, Cohn MA, Cantley LC, Gygi SP. Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Aug 17;101(33):12130-5. Epub 2004 Aug 9
- Blume, J.E., and H.L. Ennis. A *Dictyostelium discoideum* cellulase is member of a spore germination-specific gene family. *Biol. Chem.* 1991. 266: 15432-15437.
- Breathnach R, Chambon P. Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins. *Annu Rev Biochem.* 1981;50:349-83.
- Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev.* 1993 Apr;6(2):89-117.
- Chatterjee, S. and Mayor, S. 2001. The GPI-anchor and protein sorting. *Cell. Mol. Life Sci.* 58: 1969-1987.
- Conesa EL, Valero F, Nadal JC, Fenoy FJ, López B, Arregui B, Salom MG. N-acetyl-L-cysteine improves renal medullary hypoperfusion in acute renal failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001 Sep;281(3):R730-7.

- Damveld RA, Arentshorst M, VanKuyk PA, et al. 2005. Characterization of CwpA, a putative glycosylphosphatidylinositol-anchored cell wall mannoprotein in the filamentous fungus *Aspergillus niger*. *Fungal Genet Biol* 42: 873-885.
- De Groot, P.W.; De Boer, A.D.; Cunningham, J.; Dekker, H.L.; De Jong, L.; Hellingwerf, K.J.; De Koster, C.; Klis, F.M. 2004. Proteomic analysis of *Candida albicans* cell walls reveals covalently bound carbohydrate-active enzymes and adhesins. *Eukaryot Cell*. 3, 955-965
- Del Sal G, Manfioletti G, Schneider C. The CTAB-DNA precipitation method: a common mini-scale preparation of template DNA from phagemids, phages or plasmids suitable for sequencing. *Biotechniques*. 1989 May;7(5):514-20.
- Dugger KO, Galgiani JN, Ampel NM, Sun SH, Magee DM, Harrison J, Law JH. An immunoreactive apoglycoprotein purified from *Coccidioides immitis*. *Infect Immun*. 1991 Jul;59(7):2245-51.
- Eisenhaber B, Schneider G, Wildpaner M, Eisenhaber F. A sensitive predictor for potential GPI lipid modification sites in fungal protein sequences and its application to genome-wide studies for *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *J Mol Biol*. 2004 Mar 19;337(2):243-53.
- Fava-Netto, C., 1961. Contribuição para o estudo imunológico da blastomicose de Lutz. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 21, 99-194.
- Galgiani JN, Sun SH, Dugger KO, Ampel NM, Grace GG, Harrison J, Wieden MA. An arthroconidial-spherule antigen of *Coccidioides immitis*: differential expression during in vitro fungal development and evidence for humoral response in humans after infection or vaccination. *Infect Immun*. 1992 Jul;60(7):2627-35.

- Gurr, S.J., Unkles, S.E., Kinghorn, J.R., 1987. The structure and organization of nuclear genes of filamentous fungi. In: Kinghorn, J.R. (Eds.), Gene Structure in Eukaryotic Microbes. IRL Press, Oxford, pp. 93-139.
- Hansen JE, Lund O, Engelbrecht J, Bohr H, Nielsen JO, Hansen JE. Prediction of O-glycosylation of mammalian proteins: specificity patterns of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase. Biochem J. 1995 Jun 15;308 (Pt 3):801-13.
- Hartland, R.P., Fontaine, T., Debeaupuis, J.P., Simenel, C., Delepierre, M. and Latgé, J.P. 1996. A novel beta-(1-3)-glucanosyltransferase from the cell wall of *Aspergillus fumigatus*. J. Biol. Chem. 271: 26843-26849
- Hoyer, L.L. 2001. The ALS gene family of *Candida albicans*. Trends Microbiol. 9: 176-180.
- Hung, C.Y., Yu, J.J., Seshan, K.R., Reichard, U. and Cole, G.T. (2002). A parasitic phase-specific adhesion of *Coccidioides immitis* contributes to the virulence of this respiratory fungal pathogen. Infect. Immun. 70: 3443-3456.
- Jackson DG, Bell JI, Dickinson R, Timans J, Shields J, Whittle N. Proteoglycan forms of the lymphocyte homing receptor CD44 are alternatively spliced variants containing the v3 exon. J Cell Biol. 1995 Feb;128(4):673-85
- Kanetsuna F, Carbonell LM, Moreno RE, Rodriguez J. Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. J Bacteriol. 1969. Mar. 97(3):1036-41
- Klis FM, Mol P, Hellingwerf K, Brul S. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol Rev. 2002 Aug;26(3):239-56. Review
- Kozak, M., 1986. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. Cell 44, 283-292.

- Lacaz C .1994. Historical evolution of the knowledge on paracoccidioidomycosis and its etiologic agent, *Paracoccidioides brasiliensis*. Paracoccidioidomycosis (Franco M, Lacaz C, Restrepo A & Del Negeo G, eds), pp. 1–11. CRC Press, Boca Ratón.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
- Manocha MS. 1980. Lipid composition of *Paracoccidioides brasiliensis*: comparison between the yeast and mycelial forms. *Sabouraudia* 18: 281-286.
- McGwire, B.S., O'Connell, W.A., Chang, K.P. and Engman, D.M. 2002. Extracellular release of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked Leishmania surface metalloprotease, gp63, is independent of GPI phospholipolysis: implications for parasite virulence. *J. Biol. Chem.* 277: 8802-8809.
- Montijn RC, van Rinsum J, van Schagen FA, Klis FM. 1994. Glucomannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* contain a novel type of carbohydrate side chain. *J Biol Chem* 269: 19338-19342.
- Moreira SF, Bailão AM, Barbosa MS, Jesuino RS, Felipe MS, Pereira M, Soares CMA. Monofunctional catalase P of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification, characterization, molecular cloning and expression analysis. *Yeast*. 2004 Jan 30;21(2):173-82.
- Mouyna, I., Fontaine, T., Vai, M., Monod, M., Fonzi, W.A., Diaquin, M., Popolo, L., Hartland, R.P. and Latge, J.P. 2000. Glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanoyltransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. *J. Biol. Chem.* 275: 14882-14889

- O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem.* 1975 May 25;250(10):4007-21.
- Peng T, Orsborn KI, Orbach MJ, Galgiani JN. Proline-rich vaccine candidate antigen of *Coccidioides immitis*: conservation among isolates and differential expression with spherule maturation. *J Infect Dis.* 1999 Feb;179(2):518-21.
- Peng T, Shubitz L, Simons J, Perrill R, Orsborn KI, Galgiani JN. Localization within a proline-rich antigen (Ag2/PRA) of protective antigenicity against infection with *Coccidioides immitis* in mice. *Infect Immun.* 2002 Jul;70(7):3330-5.
- Pereira LA, Bao SN, Barbosa MS, da Silva JL, Felipe MS, de Santana JM, Mendes-Giannini MJ, de Almeida Soares CM. Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function. *FEMS Yeast Res.* 2007 Dec;7(8):1381-8. Epub 2007 Aug 22.
- Restrepo A, Tobon A.M in: G.L. Mandell, J.E. Bennett, R. Dollin (Eds.), *Paracoccidioides brasiliensis*. Principles and Practice of Infectious Diseases, Elsevier, Philadelphia, 2005, pp. 3062 e 3068.
- Salem-Izacc SM, Gomez FJ, Jesuino RS, Fonseca CA, Felipe MS, Deepe GS, Soares CM. Molecular cloning, characterization and expression of the heat shock protein 60 gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* 2001 Oct;39(5):445-55.
- Sambrook J, Russel DW (Eds.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NewYork, 2001.
- San-Blas G. The cell wall of fungal human pathogens: its possible role in host-parasite relationships. *Mycopathologia.* 1982 Sep 17;79(3):159-84

- San-Blas G, Niño-Vega G, Iturriaga T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol.* 2002 Jun;40(3):225-42. Review
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Dec;74(12):5463-7.
- Singer-Vermes LM, Caldeira CB, Burger E, Calich LG. Experimental murine paracoccidioidomycosis: relationship among the dissemination of the infection, humoral and cellular immune responses. *Clin Exp Immunol.* 1993 Oct;94(1):75-9.
- Sundstrom, P. 2002. Adhesion in *Candida* spp. *Cell. Microbiol.* 4: 461-469.
- Terçarioli GR, Bagagli E, Reis GM, Theodoro RC, Bosco Sde M, Macoris SA, Richini-Pereira VB. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. *BMC Microbiol.* 2007 Oct 22;7:92.
- Tiede A, Bastisch I, Schubert J, Orlean P, Schmidt RE. Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositols in mammals and unicellular microbes. *Biol Chem.* 1999. May;380(5):503-23. Review.
- Zhu Y, Yang C, Magee DM, Cox RA. 1996. Molecular cloning and characterization of *Coccidioides immitis* antigen 2 cDNA. *Infect Immun.* 64(7):2695-9
- Zhu Y, Tryon V, Magee DM, Cox RA. Identification of a *Coccidioides immitis* antigen 2 domain that expresses B-cell-reactive epitopes. *Infect Immun.* 1997 Aug;65(8):3376-80.

Figure 1. Nucleotide sequences of the cDNA, of the gene and the deduced amino acid of *PbPRA/Ag2*.

Nucleotide and amino acid numbers are shown on the left. The intron sequences are represented in lowercase. Nucleotides in bold italics represent the conserved 5' and 3' consensus of the introns. The amino acid sequence is shown above the nucleotide sequence by a single letter code. The single underlined sequence indicate the predicted signal peptide and the putative signal peptide cleavage site of the deduced *PbPRA/Ag2* is between Ala²⁸ and Gln²⁹. The CFEM domain is shown in bold letters. The repeats of the tetrapeptide TXX'P are indicated by white letters and black blocks. The potential glycosaminoglycan attachment site is boxed (dotted lines). Potential O-glycosylation sites (#) in *PbPRA/Ag2* are indicated. The hydrophobic carboxy termini are underlined (double lines) and predicted GPI anchor site in the C-terminal region of the sequence is boxed (solid lines).

Figure 2: Analysis of the *P. brasiliensis* pra/ag2 gene organization. Southern blot analysis for determination of the copy number of *P. brasiliensis* pra/ag2 gene. Total DNA (25 µg) was digested with restriction enzymes *HaeIII*, *StuI*, *DraI*, *EcoRV*, *HindIII* and *SaII* (lanes 1 to 6, respectively). The blot was hybridized to the labeled insert of the cDNA. Size markers are indicated.

Figure 3. Expression and purification of the recombinant *PbPRA/Ag2*, generation of rabbit polyclonal antibody and reaction with sera of PCM patients.

A- SDS-PAGE analysis of *P. brasiliensis* recombinant PRA/Ag2. *E. coli* cells harboring the pGEX-4T-3-*Pra/ag2* plasmid were grown to an A₆₀₀ of 0.8 and harvested before (lane 1) or after (lane 2) a 5-h incubation with IPTG (1.0 mM). The cells were

lysed by sonication. Lane 3, the affinity-isolated recombinant *PbPRA/Ag2*; lane 4, the recombinant fusion protein was cleaved by thrombin digestion. Electrophoresis was carried out on 10% SDS–PAGE and the proteins stained by Coomassie blue R-250. (B and C)- Western blot analysis of the recombinant *PbPRA/Ag2*. The proteins were fractionated by one-dimensional gel electrophoresis, blotted onto a nitrocellulose membrane, and detected by using (B) the rabbit polyclonal anti-r*PbPRA/Ag2* antibody or (C) rabbit preimmune serum. In B and C: lanes 1- *E. coli* C41 (DE3) transformed with PGEX-4T-3-*Pbpra/ag2* construct; lanes 2- the affinity-isolated recombinant GST-*PbPRA/Ag2*; lanes 3- the recombinant fusion protein cleaved by thrombin. After reaction with the anti-rabbit IgG alkaline phosphatase-coupled antibody (diluted 1:3000), the reaction was developed with BCIP/NBT. Arrows indicate the deduced molecular mass of the proteins. Molecular markers are indicated. D – Reaction of the recombinant protein with human sera. 1.0 µg of purified *PbPRA/Ag2* was reacted with sera of PCM patients diluted 1:100 (lanes 1-5) or with control sera diluted 1:100 (lanes 6-10). After reaction with anti-human IgG peroxidase coupled antibody (diluted 1:1000), the reaction was developed with hydrogen peroxide and diaminobenzidine.

Figure 4. Detection of *PbPRA/Ag2* in *P. brasiliensis* cells

Two dimensional gel electrophoresis of *P. brasiliensis* yeast cells. A – After transfer to membrane the proteins were probed with the polyclonal antibody anti-*PbPRA/Ag2*. B - Proteins stained with coomassie blue The top numbers are related to the pH range of the first dimension and those on the left refer to the molecular mass markers from the second dimension (SDS–PAGE).

Figure 5. Analysis of the *pbpra/ag2* expression by Real-Time PCR and of the proteins levels in *P. brasiliensis* cells

A and B - Analysis of the expression of *PbPRA/Ag2*. The proteins (30 µg) were fractionated by one-dimensional gel electrophoresis, blotted onto a nitrocellulose membrane, and detected by using (A) the rabbit polyclonal anti-*PbPRA/Ag2* antibody or (B) rabbit preimmune serum. Lane 1 – Total protein extract of mycelium. Lane 2 – Total protein extract of mycelium in transition to yeast cells (24 hs). Lane 3 – Total protein extract of yeast cells. Lane 4 - *P. brasiliensis* yeast cells extract (30 µg) obtained after cell growth in the tunicamycin presence. The blots were developed as described in material and methods section. C – Real time PCR analyses of the expression of *pra/ag2* in *P. brasiliensis*. Real time PCRs were performed using total RNA collected from mycelium, mycelium in transition to yeast after 24hs of temperature shift and yeast cells. A housekeeping gene, 60S ribosomal L34 was used as the endogenous control to quantify PCR products. The expression level calculated by the formula $2^{-\Delta CT}$. Error bars indicate SD.

Figure 6. Immunoblot assays of the cell wall fractions and immunoelectron microscopy of *P. brasiliensis* yeast cells.

A – Cell wall fraction was obtained and analyzed by western blot with anti-*rPbPRA/Ag2* polyclonal antibody. Proteins obtained from cell wall (lane 1) were extracted by HF-pyridine digestion and analyzed (lane 2). Molecular weight markers are indicated. B - Immunoelectron microscopy detection of *PRA/Ag2* in *P. brasiliensis* yeast cells by post embedding methods. (1) Negative control exposed to the rabbit preimmune serum in transmission electron microscopy of *P. brasiliensis* yeast cells; nucleus (n), intracytoplasmic vacuoles (v), mitochondria (m) and cell wall (w). (2 and 3)

Gold particles are observed at the fungus cell wall (arrow) and in the cytoplasm (double arrowheads). Bars, 1 mm (A and B), 0.5 mm (C).

Table 1. Oligonucleotide sequences used in this study

Use and name	Sequence 5` to 3`
Quantitative RT-PCR	
PRA-1	CTTGCGTTGAGAAATCTTGC
PRA-2	TTGGGTTGGTGGTAGGATAAC
L34-1	CGGCAACCTCAGATACCTTC
L34-2	GGAGACCTGGGAGTATTCACG
S30-1	GTGCGGGAAAAGTCAAGTCTC
S30-2	GTAGGGTTCGGGTTCATCTTC
Genomic amplification	
PRA-3	AATCGGCACGAGGAAAAGTGGAAGAC
PRA-4 ^a	GGT <u>GCGGCCGCG</u> ACATAATTTACAGGTAAGC
Heterologous expression of <i>PbPRA/Ag2</i>	
PRA-4 ^a	GGT <u>GCGGCCGCG</u> ACATAATTTACAGGTAAGC
PRA-5 ^b	GGT <u>GTCGACC</u> AGCTCCCTAATATCCCAC

^a Restriction site underline: *NotI*

^b Restriction site underline: *SalI*

Castro et al. - *PbPRA* - Figure 1

```

1                                     M I L K H F N T F K M
-68 agcggcggttaaaactgtggatccccgggcccctgcaggtaatcggcaacgagggaaaagtggaaagacttttgATGATCTTAAACACTTTAAACACATTCAAGAT

12  O F S H A L I A L V A A S L A N A Q L P N I P P C A
33 GCAGTTCCTCACGCTCCTCATTGCTCTTGTTCGGCCAGCCTAGCAAATGCTCAGCTCCCTAATATCCCACCTTGGCGTgtatgttaattccaacottaa

38                                     L S C L V D A L G N D G C S Q L
133 aagagatagatggtgctccttggttgtgagaggctgacttgggggtgaatagTTGAGCTGTTTAGTTGATGCTCTCGGGAACGACGGGTGCTCCCAGCTGA

54  T D F E C H C K K P E L P G K I T P C V E K S C D V A A Q S
233 CCGACTTCGAATGCCACTGCAAGAAGCCTGAGTTGCCCGGAAAGATCACTCCTTGCGTTGAGAAATCTTGCGACGTTGCTGCCCAAAGCTgtaaggccta

84                                     S V S N L V I K Q C S S A
333 taaaaaccacctggttccatccatcctcetaaacactgaatcattgttttaacctttattcccagCGTCTCCAACCTCGTTATCAAGCAGTGTCTGTCGCG

97  G V P I K L P P I G G G G T T T S D P S V P T T K P T G K P T T T
433 TGGTGTTCOCATCAAGCTCCCACCGATTGGGGGTGGTGGCACTACCCCTCTGACCCCTCAGTGCCTACCAACCAAGCCCACTGGAAAGCCAAOCCACTAG

130 S P S Y P T T N P S E G P T V S R I P S G T E S K E V P T S T P T
533 TCCCTAGTTATCCTACCCCAACCAAGCGAGGGGCCAACTGTATCCAGAATCCCATCTGGCACGGGCTCAAAACCCGTGCCCACTCTACCCOCCACTA

163 T S R P A E F P G A G S N L N A M I G G V A A A L I A V A A Y L #
633 CCATCCGCCAGCTGAGTTCCCCGGCGCTGGTTCCAOCTCAAAGCAATATTGGAGGCGTTGCTGCCGCTCCTCTTGCGGTGCTGCTTACCTGTAAat

733 tatgtcatatgatatcggaacatcatagaccacagatgggagggcatttattgattggttgattatgtattccccagcgtcgttgccgttgcctttaaatt

833 taactccggtttccttatgtatctactctctccgtttcaagtataccaagcctatttatattccccttggggactaggaccgcccotgagatacaaacac

933 tgttcctttcataccgtcactcccctgggagtgctcattctggctgtctaagttggtttttcttttgcttagggcgccagttctcataaatagcaatcag

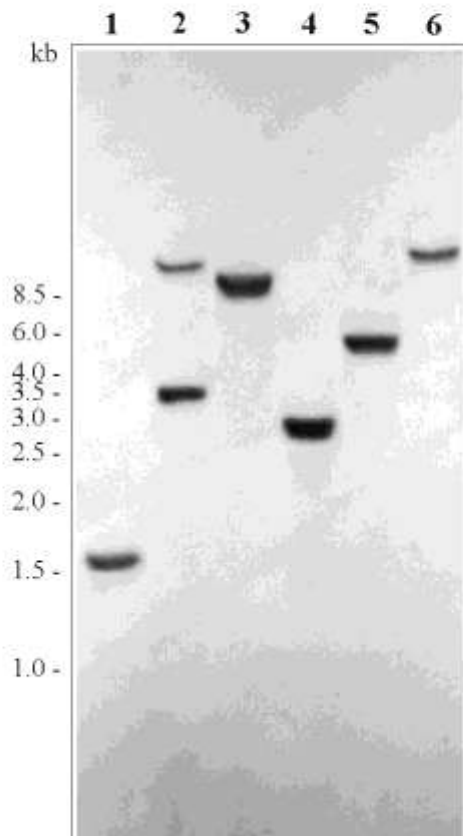
1033 ttcactcctggtttccgatatacgcctcgaatttcattggaacagagtatgttaatacaagtgcaaacggggtgtgtgatattcacaatttttattcccttc

1133 aattttcaagaattttcatatttttttgecaattttgatttgtotacattccttcattctatgtatcatatttcatttggaaatggttttggcattta

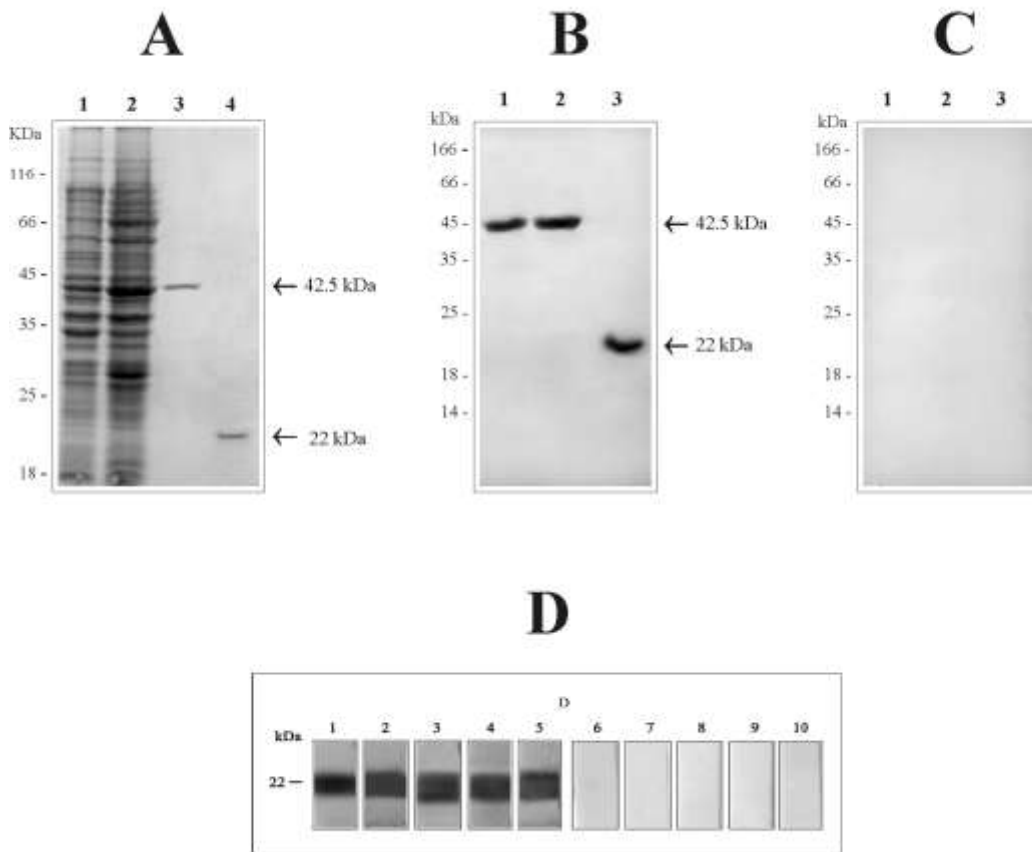
1233 acattcccccttaatatgtccacattttctoggagtcataactcgtgtcaatagcaaggg

```


Castro et al. - *PbPRA* - Figure 2

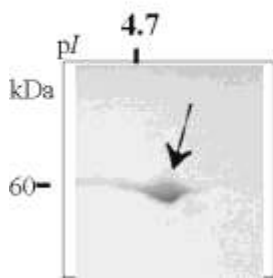


Castro et al. - *PbPRA* - Figure 3

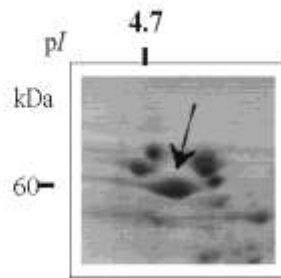


Castro et al. - *PbPRA* - Figure 4

A

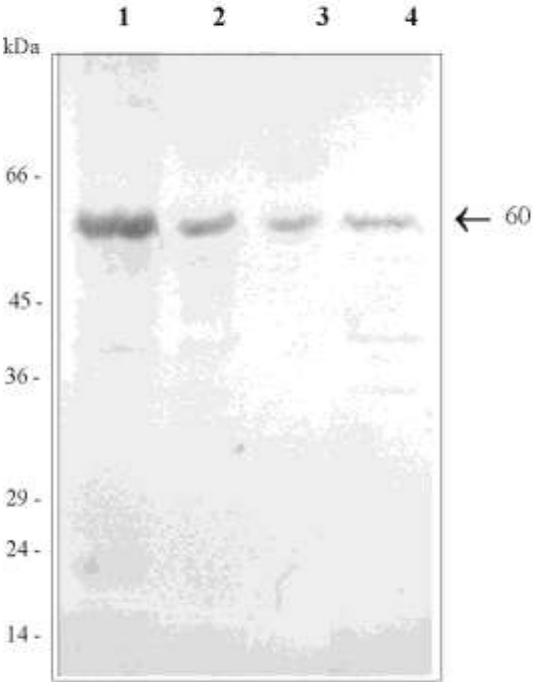


B

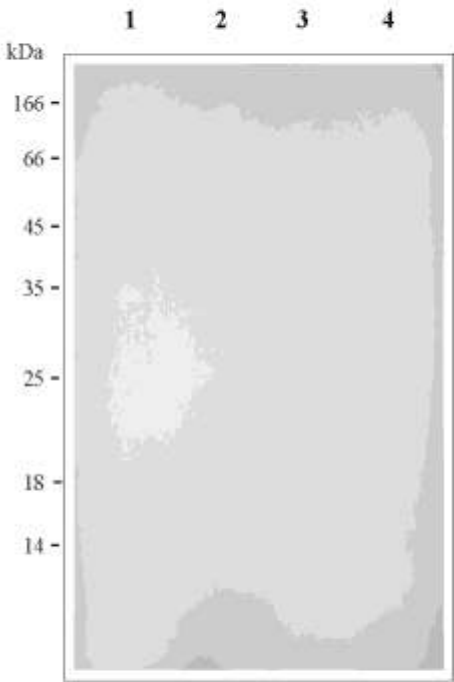


Castro et al. - *PbPRA* - Figure 5

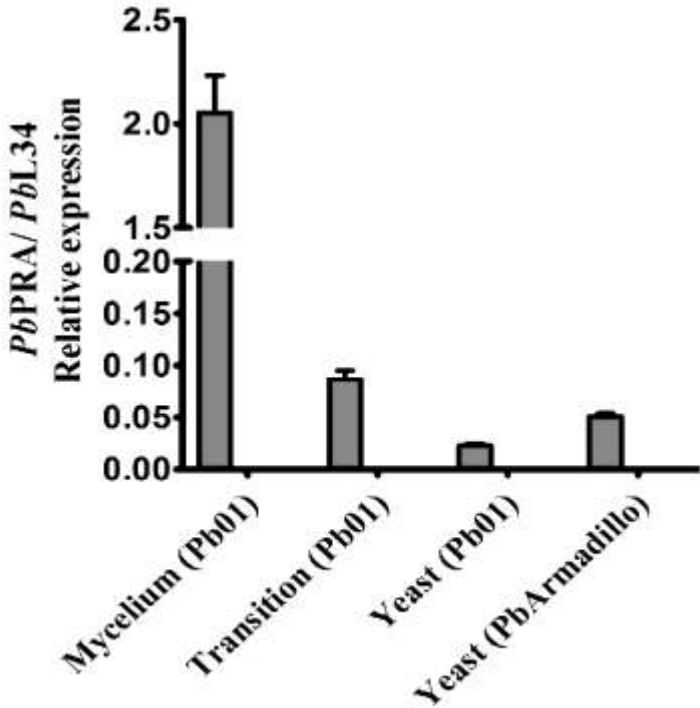
A



B

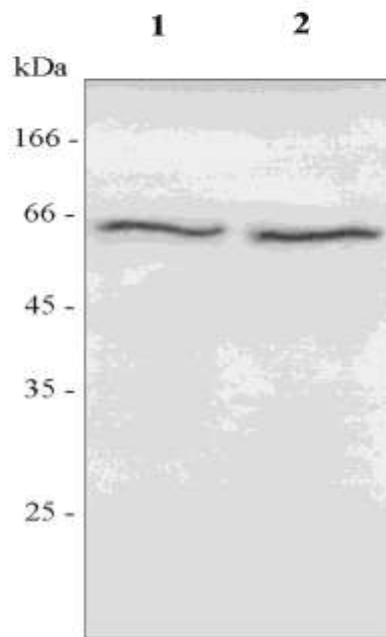


C

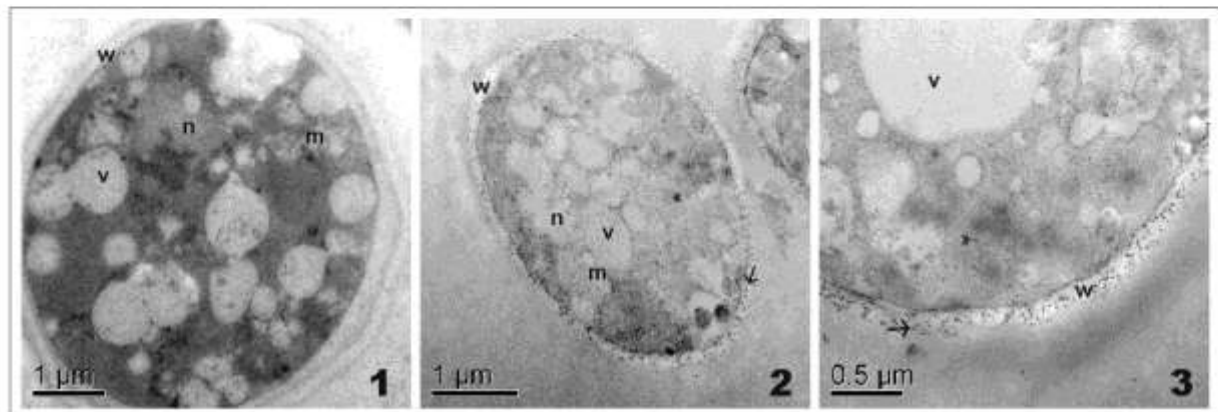


Castro et al. - *PbPRA* - Figure 6

A



B



4. CONCLUSÕES

As conclusões finais do trabalho são:

- Foram caracterizadas as seqüências completas do cDNA e do gene para a proteína PRA/Ag2 de *P. brasiliensis*.

- O gene *Pbpra/ag2* codifica uma proteína de 194 aminoácidos dos quais 28 correspondem a um peptídeo sinal N-terminal. Em adição, a proteína PRA/Ag2 apresentou uma massa molecular calculada de 19.5 kDa e ponto isoelétrico predito de 8.11.
- Muitas proteínas de superfície celular são modificadas por O ou N-glicosilação e a proteína *PbPRA/Ag2* apresenta vários sítios potenciais de O-glicosilação.
- Os dados obtidos em experimento de *Southern blot*, evidenciaram que o gene *Pbpra/ag2* provavelmente está presente em apenas uma cópia no genoma de *P. brasiliensis*. Experimentos de RT-PCR em Tempo Real revelaram um único transcrito referente ao cDNA de *Pbpra/ag2*, o qual é mais expresso em células micelianas de *P. brasiliensis*. Esses dados reforçam a presença de um único gene no genoma do fungo.
- A expressão heteróloga do cDNA de *PbPRA/Ag2* em sistema bacteriano e posterior purificação da proteína recombinante foi avaliada em SDS-PAGE, evidenciando uma proteína de 22 kDa. Embora, a proteína nativa migre no gel como espécie de 60 kDa, ensaios bioquímicos com tunicamicina não resultaram em alteração na mobilidade eletroforética, reforçando a predição de que a proteína provavelmente seja modificada por O-glicosilação
- Reações de imunocitoquímica realizadas com o anticorpo anti-rPRA/Ag2, e Immunoblotting utilizando extrato da parede celular de *P. brasiliensis*, revelaram a localização de *PbPRA/Ag2* na parede celular de *P. brasiliensis*, possivelmente ligada à componentes da parede através de uma âncora de GPI.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abuodeh RO, Shubitz LF, Siegel E, Snyder S, Peng T, Orsborn KI, Brummer E, Stevens DA, Galgiani JN. 1999. Resistance to *Coccidioides immitis* in mice after immunization with recombinant protein or a DNA vaccine of a proline-rich antigen. *Infect Immun.*67, 2935-40.

Albornoz MCB 1971. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. *Sabouraudia* 9, 248-253.

Almeida AJ, Matute DR, Carmona JA, Martins M, Torres I, McEwen JG, Restrepo A, Leão C, Ludovico P, Rodrigues F. 2007. Genome size and ploidy of *Paracoccidioides brasiliensis* reveals a haploid DNA content: flow cytometry and GP43 sequence analysis. 2007. *Fungal Genet. Biol.* 44, 25-31.

Andrade RV, Paes HC, Nicola AM, Carvalho MJ, Fachin AL, Cardoso RS, Silva SS, Fernandes L, Silva SP, Donadi EA, Sakamoto-Hojo ET, Passos GA, Soares CM, Brigido MM, Felipe MSS. 2006. Cell organization, sulphur metabolism and ion transport-related genes are differentially expressed in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium and yeast cells. *BMC Genomics* 7, 208-221.

Andreotti PF, Monteiro da Silva JL, Bailão AM, Soares CM, Benard G, Soares CP, Mendes-Giannini MJ. 2005. Isolation and partial characterization of a 30 kDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect.* 7, 875-881.

Restrepo A, Tobón AM in: Mandell GL, Bennett JE, Dollin R (Eds.). 2005. *Paracoccidioides brasiliensis*. Principles and Practice of Infectious Diseases. Elsevier, Philadelphia 3062-3068.

Ash J, Dominguez M, Bergeron JJ, Thomas DY and Bourbonnais Y. 1995. The yeast proprotein convertase encoded by YAP3 is a glycoposphatidylinositol-anchored protein that localizes to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 270, 20847-20854.

Bagagli E, Sano A, Coelho KI, Alquati S, Miyaji M, Camargo ZP, Gomes GM, Franco M, Montenegro MR. 1998. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus noveminctus*) captured in endemic area of paracoccidioidomycosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58, 505-12.

Bagagli E, Franco M, Bosco SMG, Hebel-Barbosa F, Trinca LA, Montenegro MR. 2003. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus noveminctus*): an ecological study. *Med. Mycol.* 41, 217-223.

Bagagli E, Bosco SM, Theodoro RC, Franco M. 2006. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. *Infect Genet. Evol.* 6, 344-351.

Bailão AM, Schrank A, Borges CL, Dutra V, Walquíria I, Molinari-Madlum EE, Soares Felipe MS, Mendes-Giannini MJ, Martins WS, Pereira M, Soares CMA. 2006. Differential gene expression by *Paracoccidioides brasiliensis* in host interaction conditions: representational difference analysis identifies candidate genes associated with fungal pathogenesis. *Microbes Infect.* 8, 2686-2697.

Bailão AM, Shrank A, Borges CL, Parente JA, Dutra V, Felipe MSS, Fiúza RB, Pereira M, Soares CMA. 2007. The transcriptional profile of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells is influenced by human plasma. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 51, 43-57.

Barbosa MS, Cunha Passos DA, Felipe MS, Jesuino RS, Pereira M, de Almeida Soares CM. 2004. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase homologue is differentially regulated in phases of *Paracoccidioides brasiliensis*: molecular and phylogenetic analysis. *Fungal Genet. Biol.* 41, 667-75

Barbosa MS, Bão SN, Andreotti PF, Faria FP, Felipe MSS, Feitosa LS, Mendes-Giannini MJS and Soares CMA. 2006. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. *Infect Immun.* 74, 382-389.

Bastos KP, Bailão AM, Borges CL, Faria FP, Felipe MSS, Silva MG, Martins WS, Fiúza RB, Pereira M, CMA Soares. 2007. The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. *BMC Microbiol.* 7, 29.

Blotta MHSL, Mamoni RL, Oliveira SJ, Nouér AS, Papaiordanou PM, Goveia A, Camargo ZP. 1999. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61, 390-394.

Borba CM, Schäffer GMV. 2002. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and an attempt to induce the dimorphism process with fetal calf serum. *Mycosis.* 45, 174-179.

Brummer E, Castaneda E, Restrepo A 1993. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin. Microbiol.* 6, 89-117.

Bruneau JM, Magnin T, Tagat E, Legrand R, Bernard M, Diaquin M, Fudali C, Latge JP. 2001. Proteome analysis of *Aspergillus fumigatus* identifies glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins associated to the cell wall biosynthesis. *Electrophoresis*. 22, 2812-2823.

Bulawa CE. 1993. Genetics and Molecular Biology of Chitin Synthesis in Fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* 47, 505-34.

Carneiro LC, Faria FP, Felipe MS, Pereira M, Soares CMA. 2005. *Paracoccidioides brasiliensis* presents two different cDNAs encoding homologues of the fructose 1,6-biphosphate aldolase: protein isolation, cloning of the cDNAs and genes, structural, phylogenetic and expression analysis. *Fungal Genet. Biol.* 42, 51-60

Caro LH, Tettelin H, Vossen JH, Ram, AF, van den Ende H, Klis FM. 1997. In silicio identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 13, 1477-1489.

Castro NS, Maia ZA, Pereira M, Soares CMA. 2005. Screening for glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome. *Genet. Mol. Res.* 4, 326-345.

Castro NS, Barbosa MS, Maia ZA, Bao SN, Felipe MSS, Santana JM, Mendes-Giannini MJ, Pereira M, Soares CMA. Characterization of the defective for filamentous growth protein of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast*. 2008. 20.

Chatterjee S, Mayor S. 2001. The GPI-anchor and protein sorting. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 1969-1987.

Corredor GG, Peralta LA, Castano JH, Zuluaga JS, Henao B, Arango M, Tabares, AMR, Matute DR, McEwen JG, Restrepo A. 2005. The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate. *Med. Mycol.* 43, 275–280.

Costa AA, Gomez FJ, Pereira M, Felipe MS, Jesuino RS, Deepe GS Jr, de Almeida Soares CM. 2002. Characterization of a gene which encodes a mannosyltransferase homolog of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect.* 4, 1027-34

Costa M, Borges CL, Bailao AM, Meirelles VG, Mendonça YA, Dantas SFIM, Faria FP, Felipe MSS, Molinari-Madlum EEWI, Mendes-Giannini MJS, Fiuza RB, Martins WS, Pereira M, Soares CMA. 2007. Transcriptome profiling of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells recovered from infected mice bring new insight into fungal response upon host-interaction. *Microbiology*. 153, 4194-207.

Coutinho ZF, Silva D, Lazéra M, Petri V, Oliveira RM, Sabroza PC, Wanke B. 2002. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad. Saúde Pública* 18, 1441-1454.

Cox RA, Brummer E, Lecara G. 1977. In vitro lymphocyte responses of coccidioidin skin test-positive and negative persons to coccidioidin, spherulin, and a coccidioides cell wall antigen. *Infect Immun.* 15, 751-5.

Cox RA. 1985. Antigenic heterogeneity of an alkali-soluble, water-soluble cell wall extract of *Coccidioides immitis*. *Infect Immun.* 50, 365-9.

Cox RA. 1989. Antigenic structure of *Coccidioides immitis*. *Immunol Ser.* 47, 133-70

Cunha AF, Sousa MV, Silva SP, Jesuíno RS, Soares CMA, Felipe MS. 1999. Identification, N-terminal region sequencing and similarity analysis of differentially expressed proteins in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med. Mycol* 37, 115-121.

Cunha DA, Zancope-Oliveira RM, Sueli M, Felipe S, Salem-Izacc SM, Deepe GS Jr, Soares CM. 2002. Heterologous expression, purification, and immunological reactivity of a recombinant HSP60 from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9, 374-7

Daher BS, Venancio EJ, de Freitas SM, Bão SN, Vianney PV, Andrade RV, Dantas AS, Soares CM, Silva-Pereira I, Felipe MSS. 2005. The highly expressed yeast gene pby20 from *Paracoccidioides brasiliensis* encodes a flavodoxin-like protein. 42, 434-43.

De Groot PW, De Boer AD, Cunningham J, Dekker HL, De Jong L, Hellingwerf KJ, De Koster C, Klis FM. 2004. Proteomic analysis of *Candida albicans* cell walls reveals covalently bound carbohydrate-active enzymes and adhesins. *Eukaryot. Cell.* 3, 955-965.

De Groot PW, Ram AF, Klis FM. 2005. Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. *Fungal Genet. Biol.* 42, 657-675.

Delgado N, Xue J, Yu JJ, Hung CY, Cole GT. 2003. A recombinant beta-1,3-glucanosyltransferase homolog of *Coccidioides posadasii* protects mice against coccidioidomycosis. *Infect. Immun.* 71, 3010-3019.

Dugger KO, Galgiani JN, Ampel NM, Sun SH, Magee DM, Harrison J, Law JH. 1991. An immunoreactive apoglycoprotein purified from *Coccidioides immitis*. *Infect Immun.* 59, 2245-51

Farias MR, Werner J, Muro M, Marques SA, Marques ME, Franco M, Ribeiro MG, Custodio CC, Condas LAZ, Bosco SMG, Bagagli E. 2005. Canine Paracoccidioidomycosis: case report of generalized lymphadenitis. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 47, 64.

Fraering P, Imhof I, Meyer V, Strub JM, van Dorsselaer A, Vionnet C, Conzelmann A. 2001. The GPI transamidase complex of *Saccharomyces cerevisiae* contains Gaa1p, Gpi8p and Gpi16p. Mol. Biol. Cell. 12, 3295-3306.

Feitosa LS, Cisalpino PS, dos Santos MR, Mortara RA, Barros TF, Morais FV. 2003. Chromosomal polymorphism, systemic relationships, and ploidy in the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Fungal Genet. Biol. 39, 60-69.

Felipe MS, Andrade RV, Petrofeza SS, Maranhao AQ, Torres FA, Albuquerque P, Arraes FB, Arruda M, Azevedo MO, Baptista AJ, Bataus LA, Borges CL, Campos EG, Cruz MR, Daher BS, Dantas A, Ferreira MA, Ghil GV, Jesuino RS, Kyaw CM, Leitão L, Martins CR, Moraes LM, Neves EO, Nicola AM, Alves ES, Parente JA, Pereira M, Pocas-Fonseca MJ, Resende R, Ribeiro BM, Saldanha RR, Santos SC, Silva-Pereira I, Silva MA, Silveira E, Simões IC, Soares RB, Souza DP, De-Souza MT, Andrade EV, Xavier MA, Veiga HP, Venancio EJ, Carvalho MJ, Oliveira AG, Inoue MK, Almeida NF, Walter ME, Soares CMA, Brigido MM. 2003. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. Yeast. 20, 263-271.

Felipe MSS, Andrade RV, Arraes FBM, Nicola AM, Maranhão AQ, Torres FAG, Silva-Pereira I, Poças-Fonseca MJ, Campos EG, Moraes LMP, Andrade PA, Tavares AHFP, Silva SS, Kyaw CM, Souza DP, PbGenome Network, Pereira M, Jesuino RSA, Andrade EV, Parente JA, Oliveira GS, Barbosa MS, Martins NF, Fachin AL, Cardoso RS, Passos GAS, Almeida NF, Walter MEMT, Soares CMA, Carvalho MJA, Brigido MM. 2005. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. J. Biol. Chem. 280, 24706-24714.

Ferguson MA, Homans SW, Dwek RA, Rademacher TW. 1988. Glycosylphosphatidylinositol moiety that anchors *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein to the membrane. Science. 239, 753-759.

Ferreira MES, Marques ER, Malavazi I, Torres I, Restrepo A, Nunes LR, Oliveira RC, Goldman MH, Goldman GH. 2006. Transcriptome analysis and molecular studies on sulphur metabolism in the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Mol. Genet. Genomics. 276, 450-463.

Firon A, Lesage G, Bussey H. 2004. Integrative studies put cell wall synthesis on the yeast functional map. *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 617-623.

Fonseca CA, Jesuino RS, Felipe MS, Cunha DA, Brito WA, Soares CM. 2001. Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect.* 3, 535-42.

Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marquez SA, Dillon NL, Mota NGS. 1987. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 20, 129-132.

Garcia NM, Del Negro GM, Heins-Vaccari EM, De Melo NT, De Assis CM, Lacaz CS. 1993. *Paracoccidioides brasiliensis* a new sample isolated from feces of a penguin. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 35, 227-235.

Galgiani JN, Sun SH, Dugger KO, Ampel NM, Grace GG, Harrison J, Wieden MA. 1992. An arthroconidial-spherule antigen of *Coccidioides immitis*: differential expression during *in vitro* fungal development and evidence for humoral response in humans after infection or vaccination. *Infect Immun.* 60, 2627-35.

Goldman GH, dos Reis Marques E, Duarte Ribeiro DC, de Souza Bernardes LA, Quiapin AC, Vitorelli PM, Savoldi M, Semighini CP, de Oliveira RC, Nunes LR, Travassos LR, Puccia R, Batista WL, Ferreira LE, Moreira JC, Bogossian AP, Tekaia F, Nóbrega MP, Nóbrega FG, Goldman MH. 2003. Expressed sequence tag analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence and pathogenicity genes. *Eukaryot. Cell.* 2, 34-48.

Gonzalez A, Gomez BL, Diez S, Hernandez O, Restrepo A, Hamilton AJ, Cano LE. 2005. Purification and partial characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* protein with capacity to bind to extracellular matrix proteins. *Infect Immun.* 73, 2486-2495.

Grose E, Tamsitt JR. 1965. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia. *Sabouraudia.* 4, 124-125.

Hamada K, Terashima H, Arisawa M, Kitada K. 1998. Amino acid sequence requirement for efficient incorporation of glycosylphosphatidylinositol-associated proteins into the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273, 26946-26953.

Hamada K, Terashima H, Arisawa M, Yabuki N, Kitada K. 1999. Amino acid residues in the omega-minus region participate in cellular localization of yeast glycosylphosphatidylinositol-attached proteins. *J. Bacteriol.* 181, 3886-3889.

Hamdan JS, Resende MA, Cunha AL, Alves EO, Cisalpino EO. 1993. Partial biochemical characterization of five *Paracoccidioides brasiliensis* strains. *Current Microbiology.* 27, 91-95.

Hartland RP, Fontaine T, Debeaupuis JP, Simenel C, Delepierre M, Latgé JP. 1996. A novel beta-(1-3)-glucanosyltransferase from the cell wall of *Aspergillus fumigatus*. *J. Biol. Chem.* 271, 26843-26849

Heise N, Travassos LR, de Almeida ML. 1995. *Paracoccidioides brasiliensis* expresses both glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins and a potent phospholipase C. *Exp. Mycol.* 19, 111-119.

Hong Y, Ohishi K, Kang JY, Tanaka S, Inoue N, Nishimura J, Maeda Y, Kinoshita T. 2003. Human PIG-U and yeast Cdc91p are the fifth subunit of GPI transamidase that attaches GPI-anchors to proteins. *Mol. Biol. Cell.* 14, 1780-1789.

Hoyer LL. 2001. The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 9, 176-180.

Hung CY, Yu JJ, Seshan KR, Reichard U, Cole, GT. 2002. A parasitic phase-specific adhesin of *Coccidioides immitis* contributes to the virulence of this respiratory fungal pathogen. *Infect. Immun.* 70, 3443-3456.

Jesuino RS, Azevedo MO, Felipe MSS, Pereira M, Soares CMA. 2002. Characterization of a chaperone ClpB homologue of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast.* 19, 963-972.

Jiang C, Magee DM, Quitugua TN, Cox RA. 1999. Genetic vaccination against *Coccidioides immitis*: comparison of vaccine efficacy of recombinant antigen 2 and antigen 2 cDNA. *Infect Immun.* 67, 630-5.

Johannesson H, Vidal P, Guarro J, Herr RA, Cole GT, Taylor JW. 2004. Positive directional selection in the proline-rich antigen (PRA) gene among the human pathogenic fungi *Coccidioides immitis*, *C. posadasii* and their closest relatives. *Mol. Biol. Evol.* 21, 1134-45.

Kanetsuna F, Carbonell LM, Moreno RE, Rodriguez J. 1969. Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Bacteriol.* 97, 1036-1041.

Kanetsuna F, Carbonell LM, Azuma I, Yamamura Y. 1972. Biochemical studies on the thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. J. Bacteriol. 110, 208-218.

Kapteyn JC, Montijn RC, Vink E, De La Cruz J, Llobell A, Douwes JE, Shimoï H, Lipke PN, Klis FM. 1996. Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a phosphodiester-linked beta-1,3-/beta-1,6-glucan heteropolymer. Glycobiology. 6, 337-345.

Kapteyn JC, Ram AF, Groos EM, Kollar R, Montijn RC, Van Den Ende H, Llobell A, Cabib E, Klis FM. 1997. Altered extent of cross-linking of beta1,6-glucosylated mannoproteins to chitin in *Saccharomyces cerevisiae* mutants with reduced cell wall beta1,3-glucan content. J. Bacteriol. 179, 6279-6284.

Kirkland TN, Finley F, Orsborn KI, Galgiani JN. 1998. Evaluation of the proline-rich antigen of *Coccidioides immitis* as a vaccine candidate in mice. Infect Immun. 66, 3519-22.

Kitagaki H, Wu H, Shimoï H, Ito K. 2002. Two homologous genes, *DCWI* (YKL046c) and *DFG5*, are essential for cell growth and encode glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored membrane proteins required for cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Microbiol. 46, 1011-1022.

Klis FM, de Groot P, Hellingwerf K. 2001. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. Med Mycol. 39, 1-8.

Kollar R, Reinhold BB, Petrakova E, Yeh HJ, Ashwell G, Drgonova J, Kapteyn JC, Klis FM, Cabib E. 1997. Architecture of the yeast cell wall. Beta(1→6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1→3)-glucan, and chitin. J. Biol. Chem. 11, 17762-17775.

Kurokawa CS, Sugizaki MF, Peraçoli MTS. 1998. Virulence factors in fungi of systemic mycosis. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 40, 125-135.

Lecara G, RA Cox, RB Simpson. 1983. *Coccidioides immitis* vaccine: potential of an alkali-soluble, water-soluble cell wall antigen. Infect. Immun. 39, 473-475.

Leidich SD, Drapp DA, Orlean P. 1994. A conditionally lethal yeast mutant blocked at the first step in glycosyl phosphatidylinositol anchor synthesis. J. Biol. Chem. 269, 10193-10196.

Lenzi HL, Calich VLG, Mendes-Giannini MJS, Xidiex CF, Miyaji M, Mota EM, Machado MP, Restrepo A. 2000. Two patterns of extracellular matrix expression in experimental paracoccidioidomycosis. Med. Mycol. 38, 115-119.

Londero AT, Melo IS. 1983. Paracoccidioidomycosis in childhood. A critical review. *Mycopathologia*. 82, 49-55.

Londero AT. 1986. Paracoccidioidomicose. Patogenia, formas clínicas, manifestações pulmonares e diagnóstico. *J. Pneumol*. 12, 41-57.

Long KH, Gomez FJ, Morris RE, Newman SL. 2003. Identification of heat shock protein 60 as the ligand on *Histoplasma capsulatum* that mediates binding to CD18 receptors on human macrophages. *J. Immunol*. 1, 487-494.

Lu CF, Kurjan J, Lipke PN. 1994. A pathway for cell wall anchorage of *Saccharomyces cerevisiae* alpha-agglutinin. *Mol. Cell. Biol*. 14, 4825-4833.

Lussier M, White AM, Sheraton J, di Paolo T, Treadwell J, Southard SB, Horenstein CI, Chen-Weiner J, Ram AF, Kapteyn JC, Roemer TW, Vo DH, Bondoc DC, Hall J, Zhong WW, Sdicu AM, Davies J, Klis FM, Robbins PW, Bussey H. 1997. Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 147, 435-450.

Lutz A. 1908. Uma mycose pseudo-coccidica localizada na boca e observada no Brasil: "Contribuição ao conhecimento das hiphoblastomycoses americanas". *Brás. Méd*. 22, 121-124.

Manocha MS, San-Blas G, Centeno S. 1980. Lipid composition of *Paracoccidioides brasiliensis*: possible correlation with virulence of different strains. *J. Gen. Microbiol*. 117, 147-154.

Marques ER, Ferreira ME, Drummond RD, Felix JM, Menossi M, Savoldi M, Travassos LR, Puccia R, Batista WL, Carvalho KC, Goldman MH, Goldman GH. 2004. Identification of genes preferentially expressed in the pathogenic yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis*, using suppression subtraction hybridization and differential macroarray analysis. *Mol. Genet. Genomics*. 271, 667-677.

Matute DR, McEwen JG, Puccia R, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, Rauscher JT, Restrepo A, Morais F, Nino-Vega G, Taylor JW. 2006. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol. Biol. Evol*. 23, 65-73.

McConville MJ, Ferguson MA. 1993. The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochem. J*. 294, 305-324.

McGwire BS, O'Connell WA, Chang KP, Engman DM. 2002. Extracellular release of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked *Leishmania* surface

metalloprotease, gp63, is independent of GPI phospholipolysis: implications for parasite virulence. *J. Biol. Chem.* 277, 8802-8809.

Mendes-Gianinni MJS, Ricci LC, Uemura M, Toscano E, Arns CW. 1994. Infection and apparent invasion of Vero cells by *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Med. Vet. Mycol.* 32, 189-195.

Montenegro MR, Miyaji M, Franco M, Nishimura K, Coelho KI, Horie Y, Mendes RP, Sano A, Fukushima K, Fecchio D. 1996. Isolation of fungi from Nature in Region of Botucatu, State of São Paulo, Brazil, an Endemic Area of Paracoccidioidomycosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 91, 665-670.

Moreira SF, Bailão AM, Barbosa MS, Jesuino RS, Felipe MS, Pereira M, de Almeida Soares CM. 2004. Monofunctional catalase P of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification, characterization, molecular cloning and expression analysis. *Yeast.* 21, 173-82

Moukadiri I, Armero J, Abad A, Sentandreu R, Zueco J. 1997. Identification of a mannoprotein present in the inner layer of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 179: 2154-2162.

Mouyna I, Fontaine T, Vai M, Monod M, Fonzi WA, Diaquin M, Popolo L, Hartland RP, Latge JP. 2000. Glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanoyltransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. *J. Biol. Chem.* 275, 14882-14889.

Muniz M, Morsomme P, Riezman H. 2001. Protein sorting upon exit from the endoplasmic reticulum. *Cell.* 104, 313-320.

Munro CA, Gow NAR. 1995. Chitin biosynthesis as a target for antifungals. In: Dixon GK, Copping LG, Hollomon DW, eds. *Antifungal Agents*. Oxford: Bios Scientific Publishers. 161-171.

Nagamine K, Murashima K, Kato T, Shimo H, Ito K. 2003. Mode of alpha-amylase production by the shochu koji mold *Aspergillus kawachii*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 2194-2202.

Negróni P. 1931. Estudio micológico sobre cincuenta casos de micosis observados em Buenos Aires. Tesis doctoral, Prensa universitaria, Buenos Aires, Argentina.

Negróni P. 1966. El *Paracoccidioides brasiliensis* vive saprofiticamente en el suelo argentino. *Prensa Med. Argent.* 53, 2831-2832.

Nunes LR, Costa de Oliveira R, Leite DB, da Silva VS, dos Reis Marques E, da Silva Ferreira ME, Ribeiro DC, de Souza Bernardes LA, Goldman MH, Puccia R, Travassos LR, Batista WL, Nóbrega MP, Nobrega FG, Yang DY, de Bragança Pereira CA, Goldman GH. 2005. Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. *Eukaryot. Cell.* 4, 2115-28.

Orlean P. 1997. Biogenesis of yeast cell wall and surface components. In: *The Molecular Biology of Yeast Saccharomyces* (Pringle JR, Broch JR and Jones EW, eds.). Vol. 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA. 229-362.

Paniago AM, Aguiar JI, Aguiar ES, da Cunha RV, Pereira GR, Londero AT, Wanke B. 2003. Paracoccidioidomycose: estudo clínico e epidemiológico de 422 casos observados no estado do Mato Grosso do Sul. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 36, 455-459.

Paris S, Prevost M, Latge JP, Garrison RG. 1986. Cytochemical study of the yeast and mycelial cell walls of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Exp. Mycol.* 10, 228-242.

Passos DAC, Bao SN, Chagas RF, Felipe MSS, Soares CMA. 2003. Cellular localization of the HSP60 of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Anais do XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia.*

Peberdy JF. 1990. Fungal cell - a review. In: Kuhn PJ, Trinci ACP, Jung MJ, Goosey MW, Copping LG. (eds) *Biochemistry of cell walls and membranes in fungi.* Springer, Berlin Heidelberg New York. 5-30.

Pereira LA, Pereira M, Felipe MS, Zancope-Oliveira RM, Soares CM. 2004. Proteomic identification, nucleotide sequence, heterologous expression and immunological reactivity of the triosephosphate isomerase of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect.* 6, 892-900.

Pereira LA, Bão SN, Barbosa MS, da Silva JL, Felipe MS, de Santana JM, Mendes-Giannini MJ, de Almeida Soares CM. 2007. Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function. *FEMS Yeast Res.* 7, 1381-8.

Reis VLL, Rolla VC, Rangel CA, Sampaio MBNO, Tavares W, Praxedes H, Rocha WB. 1986. Paracoccidioidomycose disseminada aguda com extenso derrame pleural. *Arq. Bras. Med.* 60, 275-80

Restrepo A, Cano LE, Tabares AM. 1983. A comparison of mycelial filtrate and yeast lysate paracoccidioidin in patients with paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia.* 84, 49-54.

Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover EP, Fredman D, Stevens DA. 1984. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect Immun.* 46, 346-353.

Restrepo A. 1985. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Sabouraudia.* 23, 323-334.

Restrepo A, Trujillo M, Gomez I. 1989. Inapparent lung involvement in patients with the subacute juvenile type of paracoccidioidomycosis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 31, 18-22.

Restrepo A, McEwen JG, Castaneda E. 2001. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med. Mycol.* 39, 233-241.

Restrepo-Moreno A. 2003. Paracoccidioidomycosis. In: Dismukes WE, Pappas PG, Sobel J (Eds.). *Clinical Mycology.* Oxford University Press, New York. 328-345.

Restrepo A, Tobón A. 2005. *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dollin R (Eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases,* Philadelphia 3062–3068.

Ricci G, Mota FT, Wakamatsu A, Serafim RC, Borra RC, Franco M. 2004. Canine paracoccidioidomycosis. *Med. Mycol.* 42, 379–383.

Richard M, De Groot P, Courtin O, Poulain D, Klis F, Gaillardin C. 2002. GPI7 affects cell-wall protein anchorage in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Microbiology.* 148, 2125-2133.

Rodriguez-Peña JM, Cid VJ, Arroyo J, Nombela C. 2000. A novel family of cell wall-related proteins regulated differently during the yeast life cycle. *Mol. Cell. Biol.* 20, 3245-3255.

Ross-MacDonald P, Coelho PS, Roemer T, Agarwal S, Kumar A, Jansen R, Cheung KH, Sheehan A, Symoniatis D, Umansky L, Heidtman M, Nelson FK, Iwasaki H, Hager K, Gerstein M, Miller P, Roeder GS, Snyder M. 1999. Large-scale analysis of the yeast genome by transposon tagging and gene disruption. *Nature.* 402, 413-418.

Ruiz Herrera J. 1991. Biosynthesis of β -glucans in fungi. *Antonie Leuvenhock.* 60, 72-81.

Salem-Izaac SM, Gomez J, Jesuino RSA, Fonseca CA, Pereira M, Felipe MSS, Deepe GSJ, Soares CMA. 2001. Molecular Cloning, Characterization and Expression of a Gene Encoding the Heat Shock Protein 60 from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med. Mycol.* 39, 445-455.

San-Blas G, San-Blas F. 1977. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence. Mycopathol. 62, 77-86.

San-Blas G. 1982. The cell wall of fungal human pathogens: its possible role in host-parasite relationship. Mycopathologia. 79, 159-184.

San-Blas G. 1993. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent: *Paracoccidioides brasiliensis*. J. Med. Vet. Mycol. 31, 99-113.

San-Blas F, San-Blas G, Gil F. 1994. Production and regeneration of protoplasts from the Y-phase of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. J. Med. Vet. Mycol. 32, 381-388

San-Blas G, Nino-Vega G, Iturriaga T. 2002. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. Med. Mycol. 40, 225-242.

Sano A, Nishimura K, Miyaji M. 1999. The research encouragement award. Effects of sex hormones on sexual difference of experimental paracoccidioidomycosis. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi. 40, 1-8.

Shubitz L, Peng T, Perrill R, Simons J, Orsborn K, Galgiani JN. 2002. Protection of mice against *Coccidioides immitis* intranasal infection by vaccination with recombinant antigen 2/PRA. Infect Immun. 70, 3287-9

Silva SP, Felipe MSS, Pereira M, Azevedo MO, Soares CMA. 1994. Phase transition and stage-specific protein synthesis in the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Exp. Mycol. 18: 294-299.

Silva SP, Borges-Walmsley MI, Pereira IS, Soares CMA, Walmsley AR Felipe MSS. 1999. Differential expression of an hsp 70 during transition from the mycelial to the infective yeast form of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Mol. Microbiol. 31, 1039-1050.

Staab JF, Bradway SD, Fidel PL, Sundstrom P. 1999. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. Science. 5, 1535-1538.

Sundstrom P. 2002. Adhesion in *Candida* spp. Cell. Microbiol. 4, 461-469.

Tavares AHFP, Silva SS, Dantas AC, Campos EG, Andrade RV, Maranhão AP, Brígido MM, Passos-Silva DG, Fachin AL, Teixeira SMR, Passos GAS, Soares CMA, Bocca AL, Carvalho MJA, Silva-Pereira I, Felipe MSS. 2007. Early transcriptional response of *Paracoccidioides brasiliensis* upon internalization by murine macrophages. Microbes Infect. 9, 583-590.

Terashima H, Hamada K, Kitada K. 2003. The localization change of Ybr078w/Ecm33, a yeast GPI associated protein, from the plasma membrane to the cell wall, affecting the cellular function. *FEMS Microbiol.* 218, 175-180.

Tomazett PK, Cruz AH, Bonfim SM, Soares CM, Pereira M. 2005. The cell wall of *Paracoccidioides brasiliensis*: insights from its transcriptome. *Genet. Mol. Res.* 4, 309-325.

Van der Vaart JM, Caro LH, Chapman JW, Klis FM, Verrips CT. 1995. Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 177, 3104-3110.

Venancio EJ, Kyaw CM, Mello CV, Silva SP, Soares CM, Felipe MS, Silva-Pereira I. 2002. Identification of differentially expressed transcripts in the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by differential display. *Med. Mycol.* 40, 45-51.

Vicentini AP, Gesztesi JL, Franco MF, de Souza W, Moraes JZ, Travassos LR, Lopez JD. 1994. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infect Immun.* 62, 1465-1469.

Villar LA, Salazar ME, Restrepo A. 1988. Morphological study of a variant of *Paracoccidioides brasiliensis* that exists in the yeast form at room temperature. *J. Med. Vet. Mycol.* 26, 269-276.

Vossen JH, Muller WH, Lipke PN, Klis FM. 1997. Restrictive glycosylphosphatidylinositol anchor synthesis in *cwh6/gpi3* yeast cells causes aberrant biogenesis of cell wall proteins. *J. Bacteriol.* 179, 2202-2209.

Ward ER, Jr, RA Cox, JA Schmitt Jr, M Huppert, SH Sun. 1975. Delayed-type hypersensitivity responses to a cell wall fraction of the mycelial phase of *Coccidioides immitis*. *Infect. Immun.* 12, 1093-1097.

Yabuki M, Fukui S. 1970. Presence of binding site for alpha-amylase and of masking protein for this site on mycelial cell wall of *Aspergillus oryzae*. *J. Bacteriol.* 104, 138-144.

Zhu Y, Yang C, Magee DM, Cox RA. 1996. Molecular cloning and characterization of *Coccidioides immitis* antigen 2 cDNA. *Infect Immun.* 64, 2695-9

Zhu Y, Tryon V, Magee DM, Cox RA. 1997. Identification of a *Coccidioides immitis* antigen 2 domain that expresses B-cell-reactive epitopes. *Infect Immun.* 65, 3376-80

HUNG, C.-Y. *et al.* A parasitic phase-specific adhesin of *Coccidioides immitis* contributes to the virulence of this respiratory fungal pathogen. *Infection and immunity* [S.I.], v. 70, n. 7, p. 3443-3456, 2002.