



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**Caracterização e Análise Funcional da Beta-1,3-
glicosiltransferase 2 de *Paracoccidioides brasiliensis***

**Goiânia - GO
Janeiro / 2010**

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Patrícia de Sousa Lima				
E-mail:	pathricialima@yahoo.com.br				
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? ☒ Sim ☐ Não					
Vínculo empregatício do autor					
Agência de fomento:					Sigla:
País:		UF:		CNPJ:	
Título:	Caracterização e Análise Funcional da Beta-1,3-glicosiltransferase 2 de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>.				
Palavras-chave:	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>, β-1,3-glicosiltransferase 2, Parede celular, Proteína GPI-ancorada.				
Título em outra língua:	Characterization and Functional Analysis of the Beta-1,3-glucanoyltransferase 2 of <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>.				
Palavras-chave em outra língua:	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>, β-1,3-glucanoyltransferase 2, Cell wall, GPI-anchored protein.				
Área de concentração:	Biologia Celular e Molecular				
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	29/01/2010				
Programa de Pós-Graduação:	Biologia				
Orientador (a):	Dra. Célia Maria de Almeida Soares				
E-mail:	celia@icb.ufg.br				
Co-orientador (a):					
E-mail:					

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?¹ ☒ total ☐ parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

☐ Capítulos. Especifique: _____

☐ Outras restrições: _____

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.


Assinatura do (a) autor (a)

Data: 04 / 03 / 2010

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**Caracterização e Análise Funcional da Beta-1,3-
glicosiltransferase 2 de *Paracoccidioides brasiliensis***

Candidata: Patrícia de Sousa Lima

Orientadora: 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
para obtenção do título de Mestre em
Biologia Celular e Molecular.**

**Goiânia - GO
Janeiro / 2010**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPT/BC/UFG**

L732c Lima, Patrícia de Sousa.
Caracterização e análise funcional da Beta-1,3-
glicosiltransferase 2 de *Paracoccidioides brasiliensis*
[manuscrito] / Patrícia de Sousa Lima. - 2010.
xvi, 120 f. : il., figs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás,
Instituto de Ciências Biológicas, 2010.
Bibliografia.

1. *Paracoccidioides brasiliensis*. 2. β -1,3-
glicosiltransferase 2. 3. Parede celular. 4. Proteína
ancorada - glicosilfosfatidilinositol. I. Título.

CDU: 582.58

DISSERTAÇÃO DESENVOLVIDA NO LABORATÓRIO DE
BIOLOGIA MOLECULAR, GENOMA E PROTEOMA DO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS.

APOIO FINANCEIRO: CAPES / CNPq / FINEP / FAPEG / SECTEC-GO.

Banca Examinadora

Titulares

Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

Prof. Dr. Jaime Martins de Santana

Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília

Dr. Clayton Luiz Borges

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

Suplentes

Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

Profa. Dra. Maristela Pereira

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

Dedico este trabalho ao meu Deus, Jesus Cristo, que sempre cuida de mim. Obrigada por todos os momentos em que a sua luz ilumina meus caminhos e tudo fica mais fácil. As lutas, com paciência e sabedoria, o Senhor me ensina a vencer. O amor, o Senhor me ensina a compartilhar. Obrigada por ter colocado todas as pessoas com quem eu convivo no meu caminho. Todas têm um grande sentido na minha vida. Enfim, obrigada por me amar e ser o meu melhor AMIGO !!!!

Aos meus pais, José Marcos e Sandra, muito obrigada! Vocês são quem mais confiam em mim. Desde o início nunca deixaram de me dar oportunidades para crescer em todas as áreas da minha vida. Meus amigos, companheiros, exemplos! Obrigada por toda paciência!

À minha irmã, Débora, por me compreender e sempre me desejar o melhor. Te desejo toda felicidade do mundo

Amo vocês...

Ao meu noivo, Rodrigo, por todo apoio e amor, sempre querendo o meu bem! A minha vida seria muito sem graça sem você. Saiba que é fundamental pra mim!

Amo “infinito”...

Ao meu avô Getúlio, avós Firma e Arcanja, tia Leila, tio Paulo, Aline, Letícia, tia Antônia, Karolina, Marília, tio José Divino, e a todos os outros familiares! Desculpem-me pelas falhas, pelos desencontros. Vocês são muito especiais pra mim...

Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Célia Maria de Almeida Soares, pela oportunidade de me integrar em seu grupo de pesquisa desde a iniciação científica. Reconheço e agradeço pelo esforço e compromisso que a senhora tem com cada aluno do laboratório. Admiro sua competência em tudo que faz! Você é uma grande profissional, de respeito e merece tudo isso. Com certeza absoluta, cresci muito nessa caminhada. Obrigada pela orientação!

Aos professores Jaime, Clayton, Alexandre e Maristela por aceitarem participar da minha banca e contribuírem para o meu trabalho!

Agradeço à Nadya, por me aceitar como aprendiz logo que entrei no laboratório. Sua atenção, paciência e sabedoria foram valiosas pra mim e enriquecedoras para o meu trabalho. Sempre que precisar estarei à disposição e mais uma vez, obrigada por tudo!

Às minhas amigas Elisa e Mirelle (árves!) por cada momento que passamos juntas. Muitos vezes trabalhamos duro até tarde, mas no fim sempre dá tudo certo! A Elisa, até quando erra acerta (aposto que você vai rir!). A Mirelle, uma paciência inexplicável! Admiro o esforço e a competência de vocês. Elisa, obrigada pela paciência. Você é uma pessoa muito doce e saiba que você tem uma amiga de verdade! Mirelle, obrigada pelo carinho, atenção e também, paciência. Sua amizade é valiosa pra mim. Torço pela felicidade e conquistas de vocês, tanto na vida pessoal quanto profissional. Obrigada às duas...

Ao meus amigos que não estão mais no laboratório mas têm um lugar mais que especial no meu coração: Rod, Ernna, Lidiane, Luiz e Nat! Vocês fazem muita falta!

Ao Rod, saiba que é meu amigo e nunca vou esquecer da sua ajuda em todos os momentos que precisei. Quantas vezes rimos juntos. Gosto muito de você, _____ encantado!!! À Nathalie, saudades das suas risadas e apelidos para o Rod. Gosto demais de vocês!

À Dayane (Estoooo ...) e ao Leandro (Preseeeença 2) obrigada pela companhia! A amizade de vocês é muito importante pra mim. Mesmo com toda dificuldade vocês sempre vencem. Admiro demais o esforço, a competência e a simplicidade dos dois. Obrigada por serem meus companheiros...

Ao Clayton (“Claytim”) e ao Alex pelos momentos juntos, alegrias e orientações! Sempre estão dispostos a ajudar e saibam que isso é muito valioso pra todos. Obrigada pelo carinho!

Ao Wesley (Tchatchá) que sempre me apoiou e me disse palavras positivas. Nunca te vi triste e isso é um exemplo pra mim. Todos os momentos felizes como Brasília, batatinhas, risadas no laboratório em véspera de ano novo e almoço na chácara, sempre vou valorizar. Você é um profissional e amigo incrível!

À Mariana (Preseeeeeeeença) pela felicidade que você passa todos os dias pra mim e a todos no laboratório. Sei onde você está, de longe! Precisamos de gente alegre, dedicada, sincera e às vezes “brava” por perto pra dar uma animada no ambiente. Você é uma delas. Gosto muito de você!!!!

À Juliana (Júju) por toda ajuda, Fafá (muito gente boa!), Ronney (eterno monitor), Cristina (Rainha do Proteoma), Daciene (Daci), Kelly, Simone, Hellen, Sarah, Luciane, Keyla Patrícia, Priscila (Pri), Ademar e Sabrina (dona dos brincos mais bonitos de Goiânia) por conviverem comigo e tornarem meu dia-a-dia mais feliz.

Ao Neto (Garotinhooooo e sofredor!!!!), Renata, Amanda, Patrícia Kott, Patrícia Zambuzzi, Raquel (responsável) e Rogério pelo carinho e atenção sempre que necessário.

Aos meus colegas de mestrado Saulo, Marcelo, Andrei, Lorena, Flávia e Eduardo por todos os momentos que passamos nas disciplinas. Vocês tornaram os dias difíceis mais alegres!

Aos professores Cirano Ulhoa, Maristela Pereira, Augusto Schrank e Sílvia Salem-Izacc por serem pessoas muito educadas e pelos ensinamentos valiosos. Obrigada...

Aos novos alunos do laboratório Marco Túlio, Edilaine, Karine, Simone e Elvis pela convivência agradável!

Às funcionárias da limpeza, em especial à Anézia (“Morgana”) por ajudar a manter o laboratório em ordem e nunca reclamar. Obrigada por ser essa pessoa agradável...

À Gleize, doce Gleize. Obrigada pela atenção, apoio, paciência e, desde a Graduação, mostrar ser uma pessoa muito competente. Você contribui muito para a Pós-Graduação e tenho muito orgulho de você. Obrigada...

Aos meus amigos da Graduação Letícia, Dani, Paulo e Thê por me acolherem nos momentos difíceis e serem meus amigos de verdade. Amo todos vocês...

A todos que de alguma maneira contribuíram para realização do meu trabalho!

Muito obrigada!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO _____	XV
ABSTRACT _____	XVI
1. INTRODUÇÃO	
1.1 - O fungo <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> _____	17
1.2 - Paracoccidioidomicose _____	20
1.3 - Dimorfismo de <i>P. brasiliensis</i> _____	22
1.4 - Parede celular de <i>P. brasiliensis</i> _____	26
1.5 - Âncora de GPI e β -1,3-glicosiltransferase 2 _____	34
1.6 - Interações proteína-proteína _____	40
2. JUSTIFICATIVA _____	45
3. OBJETIVOS _____	46
4. MATERIAIS E MÉTODOS	
4.1 - Microrganismos e condições de crescimento _____	47
4.2 - Clonagem do cDNA parcial e expressão da <i>PbGel2p</i> recombinante _____	47
4.3 - Análises de Bioinformática _____	48
4.4 - Produção do anticorpo anti- <i>PbGel2</i> _____	49

4.5 - Western blotting _____	49
4.6 - Obtenção de RNAs _____	49
4.7 - Análise quantitativa dos transcritos em tempo real (qRT-PCR) _____	50
4.8 - Ensaio de complementação gênica em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> _____	51
4.9 - Análise das interações proteína-proteína através da técnica de duplo-híbrido _____	52
4.10 - Ensaio de <i>Pull-down</i> _____	54
 5. RESULTADOS	
5.1 - Análise comparativa da sequência deduzida de aminoácidos de PbGel2p _____	57
5.2 - Expressão heteróloga e obtenção da proteína recombinante rPbGel2p ____	60
5.3 - Identificação de PbGel2p no proteoma de <i>P. brasiliensis</i> _____	61
5.4 - Análise quantitativa de transcritos em tempo real durante a transição dimórfica e sob condições de estresse da parede celular _____	62
5.5 - PbGEL2 restaura o fenótipo nulo mutante para GAS1 (<i>Agas1</i>) em células de <i>S. cerevisiae</i> _____	65
5.6 - Detecção das interações intermoleculares da Gel2p de <i>P. brasiliensis</i> através da técnica de duplo-híbrido _____	68

5.7 - Ensaio de <i>Pull-down</i> : novas interações de PbGel2p com proteínas de <i>P. brasiliensis</i> _____	72
6. DISCUSSÃO _____	75
7. CONCLUSÕES _____	92
8. PERSPECTIVAS _____	93
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	94

Índice de figuras

	Páginas
Figura 1 - Morfologia do fungo <i>P. brasiliensis</i> (Pb01) durante a transição de micélio para a forma de levedura induzida pela temperatura. _____	23
Figura 2 - Grupos de proteínas ligadas covalentemente à parede celular de <i>Candida albicans</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Candida glabrata</i> . _____	31
Figura 3 - Estrutura central básica da âncora de GPI. _____	35
Figura 4 - Síntese e modificação pós-síntese da β -1,3-glicana da parede celular. ____	37
Figura 5 - Esquema da técnica de duplo-híbrido e do ensaio de <i>pull-down</i> . _____	42
Figura 6 - Alinhamento da sequência de aminoácidos de PbGel2p com proteínas homólogas. _____	59
Figura 7 - Expressão heteróloga da PbGel2p. _____	60
Figura 8 - Análise através de <i>Western blotting</i> da proteína nativa PbGel2 no extrato protéico de <i>P. brasiliensis</i> nas fases de micélio e leveduriforme. _____	61
Figura 9 - Expressão do transcrito que codifica para PbGel2p como determinado por qRT-PCR durante a transição dimórfica. _____	63
Figura 10 - Expressão do transcrito que codifica para PbGel2p como determinado por qRT-PCR sob condições de estresse da parede celular. _____	64
Figura 11 - A proteína Gel2p de <i>P. brasiliensis</i> complementa função em $\Delta GAS1$ de <i>S. cerevisiae</i> . _____	67

Figura 12 - Seleção das leveduras expressando proteínas com provável interação com <i>PbGel2</i> . _____	69
Figura 13 - Co-imunoprecipitação das proteínas de <i>P. brasiliensis</i> que interagem com <i>PbGel2p</i> . _____	71
Figura 14 - Amostras de proteínas do ensaio de interações intermoleculares através da técnica <i>pull-down</i> . _____	73

Índice de Tabelas

	Página
Tabela 1: Proteínas preditas que interagem com <i>PbGel2p</i> , identificadas pelo sistema de duplo-híbrido em <i>S. cerevisiae</i> . _____	70
Tabela 2: Proteínas identificadas por espectrometria de massas: recombinante <i>PbGel2p</i> e interações detectadas após ensaio de <i>pull-down</i> . _____	74

Lista de Abreviaturas

AD - domínio de ativação da transcrição
ASL-CWPs - proteínas da parede celular sensíveis a álcali
BCIP - 5-bromo-4-chloro-3-indolil fosfato
CAZy - banco de dados para enzimas ativas para carboidrato
CBM43 - módulo de ligação à carboidratos, família 43
cDNA - DNA complementar
CFW - calcofluor White
CF4 - fator de Superfície Celular
CR- congo Red
CRH - hipersensibilidade à Congo Red
CW - parede celular
CWPs - proteínas da parede celular
Cys-Box - região rica em cisteína
DBD - domínio de ligação à região promotora do DNA
DEPC - dietilpirocarbonato (inativa RNAses)
DPMs - dolicol-fosfato manoses
DTT - 1,4-ditiotreitol
EPD - essencial para o desenvolvimento de pseudohifa
ESTs - etiquetas de Sequências Expressas
GAS - glicolipídeo ancorado à superfície
GEL - glicanosiltransferase alongando glicana
GH72 - família 72 de glicosil hidrolases
GPI - âncora lipídica glicosilfosfatidilinositol
GPI-CWPs - proteínas da parede celular ligadas à âncora de glicosilfosfatidilinositol
GPI-Ps - proteínas ancoradas por GPI
GSH - glutathiona-sefarose
GST - glutathiona-s-transferase
GPI - âncora lipídica de glicosilfosfatidilinositol
HF-piridina - fluoreto hidrogenado de piridina
HM - *locus* do tipo reprodutivo

IPTG - isopropil β -D tiogalactopiranosídeo

NaOH - hidróxido de sódio

NBT – nitro azul de tetrazol

ORF - região de leitura aberta

PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida

PbGel2p - β -1,3-glicosiltransferase 2 de *P. brasiliensis*

PbGEL2 - gene que codifica para proteína Gel2 de *P. brasiliensis*

PbrCHS (1-6) - genes que codificam para as proteínas quitina sintases (1-6) de *P. brasiliensis*

PBS - solução de tampão fosfato

PCM - paracoccidioidomicose

PCR - reação em cadeia da polimerase

pH - potencial hidrogeniônico

PHR - pH - regulado

Pi - fosfato inorgânico

PIGs - fosfatidilinositol-glicanas

PMF - *Peptide Mass Fingerprint*

QDO - meio mínimo sem os aminoácidos adenina, leucina, histidina e triptofano

RAPD - polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso

RT-PCR - sistema de transcrição reversa

qRT-PCR - PCR quantitativa em tempo real

rDNA - DNA ribossomal

RE - retículo endoplasmático

RFLP - polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição

RNA - ácido ribonucléico

SDS - dodecil Sulfato de Sódio

Ser-Box - região rica em serina e treonina

Sítio ω - sítio ω ou sinal para ligação à GPI

TFA – ácido trifluoracético

UTR2 - transcrito não identificado

UTR (3' e 5') - região não traduzida

WB2d - linhagem haplóide de *S. cerevisiae* tendo o gene GAS1 ausente

YNB - *yeast nitrogen base*

Resumo

Paracoccidioides brasiliensis é o agente causador da paracoccidioidomicose (PCM), prevalente em países da América Central e do Sul sendo considerada uma das mais importantes micoses endêmicas, especialmente entre a população rural masculina. A doença é causada pela inalação dos esporos assexuais (conídios) produzidos pela forma miceliana do fungo. Nos pulmões, os propágulos tendem à diferenciação para a forma leveduriforme parasitária. A parede celular de *P. brasiliensis* é uma estrutura dinâmica, composta essencialmente por glicanas ramificadas (ligações β -1,3 e β -1,6), quitina, lipídeos e manoproteínas. Muitas enzimas estão envolvidas no seu remodelamento. Uma delas é a Beta-1,3-glicosiltransferase 2 (*PbGel2p*), apresentada aqui. A sequência deduzida de aminoácidos de *PbGel2p* mostrou similaridade com outras proteínas envolvidas na morfogênese e biossíntese da parede celular fúngica e foi caracterizada como parte da família GH72, subfamília GH72⁻. A proteína recombinante r*PbGel2p* foi superexpressa em *Escherichia coli* e o anticorpo policlonal obtido. Os níveis de transcritos que codificam para *PbGel2p*, assim como os de proteína, foram detectados em maior teor na fase miceliana do fungo. O papel de *PbGel2p* na morfogênese e biossíntese da parede celular foi analisado pela habilidade da proteína em resgatar o fenótipo mutante para *GAS1Δ* de *Saccharomyces cerevisiae*. Os resultados indicaram que *PbGel2p* é uma proteína associada à parede celular que provavelmente atua no alongamento da β -1,3-glicana mediando a integridade da parede celular. Ainda, as interações proteína-proteína preditas entre *PbGel2p* e outras proteínas de *P. brasiliensis* usando o sistema de duplo híbrido e *pull-down* foram: componente 2 da antranilato sintase (envolvida na via do triptofano), proteína SamB com domínio MYND (relacionada com a morfogênese fúngica), proteína Mad2B (requerida na organização do citoesqueleto e controle do ciclo celular), subunidade beta da CpcB (organiza o citoesqueleto de actina), proteína com repetição WD (envolvida no controle do ciclo celular), fosfatidilinositol-4-fosfato-5-quinase (requerida para organização do citoesqueleto de actina), Hsp60 (relacionada à condições de estresse como temperatura) e ATPase (localizada na membrana plasmática/ envolvida no metabolismo de glicose). Essas interações sugerem a relação de *PbGel2p* em outros processos celulares para manutenção da integridade da parede celular.

Abstract

Paracoccidioides brasiliensis is the causative agent of paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic disorder geographically restricted to Central and South America, and one of the most important endemic mycoses in these regions, especially among the male rural populations. The disease is most likely caused by the inhalation of asexual spores (conidia) produced by the mycelia form of the fungus, propagules that once in the lungs undergo differentiation towards the parasitic yeast form. The cell wall of *P. brasiliensis* is a dynamic structure, essentially composed of branched glucan (β -1,3 and β -1,6 glucans), chitin, lipids and mannoproteins. Many enzymes are responsible for cell wall remodeling. One of them is the Beta-1,3-glucanosyltransferase 2 (*PbGel2p*) presented here. The amino acid deduced sequence of *PbGel2p* presented similarity to others proteins involved in fungal cell wall biosynthesis and morphogenesis and it was characterized as a member of GH72 family, GH72- subfamily. The recombinant r*PbGel2p* was overexpressed in *Escherichia coli* and the polyclonal antibody was obtained. The *PbGel2p* mRNA, as well as the protein, were detected at the highest level in the mycelium phase. The potencial role of *PbGel2p* in cell wall biosynthesis and morphogenesis was analyzed by assessing its ability to rescue the phenotype of the *Saccharomyces cerevisiae* *GAS1A*. The results indicated that *PbGel2p* is a cell wall-associated protein that probably works as a β -1,3-glucan elongase capable of mediating fungal cell wall integrity. In addition, predicted protein-protein interactions between *PbGel2p* and others proteins of the fungus *P. brasiliensis* were assessed by using a *S. cerevisiae* two hybrid system and pull-down assay. The proteins that were found to interact with *PbGel2p* are: anthranilate synthase component 2 (involved in the tryptophan pathway), MYND domain protein SamB (related to fungal morphogenesis), mitotic spindle checkpoint protein Mad2B (required of the organization of the cytoskeleton and control of cell cycle), G protein complex beta subunit CpcB (organize the cytoskeleton of actin), WD repeat protein (involved in the control of cell cycle), phosphatidylinositol-4-phosphate-5-kinase its3 (required of the organization of the actin cytoskeleton), Hsp60 (related of stress conditions like temperature) and ATPase (localized in the plasma membrane / involved in the glucose metabolism). This suggested the relation of *PbGel2p* in other process to maintenance of cell wall integrity.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 - O fungo *Paracoccidioides brasiliensis*

O fungo patogênico humano *Paracoccidioides brasiliensis* foi primeiramente observado pelo pesquisador brasileiro Adolpho Lutz em 1908 quando estudava novos casos de coccidioidomicose, tendo observado um caso diferente de blastomicose (Lutz, 1908). O pesquisador descreveu o observado como “uma nova enfermidade pseudococcídica”, caracterizada como sul-americana e diferente da norte-americana, bem estabelecida até aquele momento. Em 1930, Almeida descreveu o aparecimento de um novo granuloma paracoccidióidico sendo causado pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, agente etiológico da paracoccidioidomicose (Ochoa & Soto, 1957; San Blas, 1993).

Dados epidemiológicos indicam uma ampla distribuição geográfica desta doença na América Central e do Sul, do México à Argentina. O desenvolvimento da paracoccidioidomicose se dá a partir da inalação dos propágulos do fungo que ao atingirem o epitélio alveolar pulmonar, transitam para sua forma parasitária, levedura, estabelecendo a infecção (Restrepo *et al.*, 2001; San-Blas & Niño-Vega, 2001). No Brasil, a doença constitui um sério problema de saúde pública (Brummer *et al.*, 1993) e é responsável por 80% dos casos descritos na literatura, seguido pela Colômbia e Venezuela (Coutinho *et al.*, 2002). As regiões Sul e Sudeste são, no Brasil, os locais onde a doença é mais frequentemente encontrada (Prado *et al.*, 2009).

Em temperaturas próximas a 25 °C as culturas de *P. brasiliensis* apresentam aspecto algodonoso e estruturas celulares que se apresentam sob a forma miceliana, com formação de hifas septadas, multinucleadas, com filamentos finos e artroconídios intercalares (Brummer *et al.*, 1993; San-Blas, 1993). Acredita-se que a fase miceliana seja saprobiótica,

encontrada principalmente no solo e em plantas, e que seria também a forma na qual o fungo se encontra quando ocorre o contágio do hospedeiro.

À temperatura de 36 °C o fungo promove uma transição da estrutura filamentosa para uma estrutura globular, assumindo a forma de levedura (San-Blas, 1993). Esta seria sua forma parasitária, que assume características peculiares tais como a presença de brotamentos múltiplos, resultado de exoesporulação, uma membrana birrefringente, além de cromatina evidente. A morfologia única desta levedura é determinante no diagnóstico laboratorial da PCM e em uma avaliação comparativa se assemelha a uma "roda de leme de navio" (Furtado *et al.*, 1967). As células têm tamanhos heterogêneos caracterizando-se por células-mãe ovais ou arredondadas circundadas por brotamentos heterogêneos múltiplos também arredondados ou ovais (Almeida *et al.*, 2009).

Na natureza, o fungo *P. brasiliensis* é encontrado no solo, saprobicamente, na forma de micélio a 22 - 25 °C, sugerindo que o solo pode ser um importante elemento na biologia do fungo. As diferentes condições do solo alteram a capacidade de crescimento da forma miceliana e a produção de conídeos por *P. brasiliensis*. Terçarioli e colaboradores (2007) realizaram o cultivo de vários isolados de *P. brasiliensis* em diferentes tipos de solo e observaram que este fungo apresenta a capacidade de crescimento em solos arenosos e argilosos, com alta umidade. Neste caso, a produção de conídeos foi observada em alguns isolados. Seu nicho ecológico alternativo são animais com temperatura corporal de 36 - 37°C, onde a transição para a forma leveduriforme do fungo acontece, desencadeando a doença. O fungo tem sido frequentemente isolado de tatus (*Dasypus novemcinctus* no Brasil e *Cabassous centralis* na Colômbia) nas áreas endêmicas e esses animais são reconhecidos como reservatórios naturais do fungo (Bagagli *et al.*, 2003; Corredor *et al.*, 2005). O patógeno também tem sido relatado em cachorros (Ono *et al.*, 2001; Fontana *et al.*, 2010), pinguins (Garcia *et al.*, 1993) e morcegos frugívoros (Grose & Tamsitt, 1965). Testes sorológicos e intradérmicos sugeriram a presença do fungo em animais domésticos e primatas (Corte *et al.*, 2007).

O fungo *P. brasiliensis* pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, subdivisão Euscomycotina, classe Plectomyceto, subclasse Euscomycetidae, ordem Onygenales,

família Onygenaceae, subfamília Onygenaceae Anamórficos, gênero *Paracoccidioides*, espécie *Paracoccidioides brasiliensis* (San-Blas *et al.*, 2002). De maneira semelhante a muitos outros fungos patogênicos humanos, em *P. brasiliensis* nenhum estágio sexual ou telemórfico foi relatado. Este fungo tem mostrado extensiva variabilidade genética quando analisado por ferramentas moleculares tais como RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso), RFLP (Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição) (Soares *et al.*, 1995; Niño-Vega *et al.*, 2000), e cariotipagem eletroforética (Montoya *et al.*, 1997).

Matute *et al.*, (2006) descreveram a existência de três diferentes espécies filogenéticas de *P. brasiliensis* através do estudo de oito regiões de cinco genes nucleares com 65 isolados 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).

Em um estudo utilizando a técnica de concordância genealógica para reconhecimento de espécies filogenéticas (*Genealogic Concordance for Phylogenetic Species Recognition - GCPSR*), Carrero e colaboradores (2008) analisaram 14 genes de 21 isolados de *P. brasiliensis*. Com exceção das análises filogenéticas realizadas para os genes codificantes para quitina sintase 1 e catalase A, o isolado *Pb01* apresentou-se filogeneticamente distinto dos outros isolados analisados. O isolado *Pb01* agrupou-se com o isolado IFM 54648, obtido a partir de um paciente do estado do Paraná. Os outros isolados apresentaram-se agrupados segundo a região geográfica das quais foram obtidos. Estes resultados sugerem a possibilidade de ocorrência de mais de três espécies filogenéticas em *P. brasiliensis*. Os resultados sugerem que os isolados *Pb01* e IFM 54648 apresentam-se geneticamente separados dos outros isolados por um longo período de tempo. Especulou-se também, que o isolado *Pb01* possa constituir uma nova espécie do gênero *Paracoccidioides* (Carrero *et al.*, 2008).

Teixeira e colaboradores (2009) utilizando a técnica de concordância genealógica para reconhecimento de espécies filogenéticas, investigaram a possível existência de novas espécies filogenéticas incluindo *Pb01* e outros isolados Latino Americanos. Foi visto que poucos polimorfismos são encontrados entre o complexo *Pb01* e as três espécies filogenéticas *S1/PS2/PS3*, quando analisado o grau de divergência entre eles. Isso indica que os dois grupos são altamente divergentes um do outro. Análises morfológicas de um membro escolhido de cada grupo filogenético do gênero *Paracoccidioides* revelaram características que são exclusivas de cada grupo corroborando com os dados filogenéticos. Entretanto, mais isolados do complexo *Pb01* devem ser analisados para avaliar se essas diferenças são conservadas (Teixeira *et al.*, 2009).

A organização genômica também tem sido investigada em *P. brasiliensis*. Recentemente, o seqüenciamento dos genomas estruturais dos isolados *Pb01*, *Pb03* e *Pb18* de *P. brasiliensis* foi realizado. Os resultados confirmaram a presença de 5 cromossomos em cada isolado. O genoma do isolado *Pb01* é composto de 32,94 Mb, com um total de 9.132 genes. Este isolado apresenta o genoma maior tanto em número de bases quanto em quantidade de genes comparado aos outros dois isolados analisados, que apresentaram genomas do tamanho de 29,06 e 29,95 Mb, com número de genes de 7.875 e 8.741 (dados dos isolados *Pb03* e *Pb18*, respectivamente). Essas informações, além de auxiliar a elucidar as diferenças existentes entre os isolados, são importantes na caracterização de genes e regiões promotoras e, conseqüentemente, na melhor caracterização da biologia de *P. brasiliensis* (<http://www.broad.mit.edu/science/projects/msc/data-release-summary>).

1.2 - Paracoccidioidomicose

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose humana sistêmica granulomatosa, enfermidade de alta prevalência e morbidade, limitadas somente a alguns países da América Latina. Por não ser uma doença de notificação compulsória, os dados sobre sua incidência no Brasil são imprecisos. O fungo *P. brasiliensis* infecta hospedeiros humanos a

partir da inalação de propágulos do micélio e artroconídeos, uma via clássica envolvendo as vias respiratórias (Bagagli *et al.*, 2006). A primeira interação parasita-hospedeiro ocorre nos alvéolos pulmonares e a partir dos pulmões, o fungo pode disseminar-se por vias hematogênica ou linfática acometendo outros órgãos e sistemas como fígado, baço, ossos e sistema nervoso central (San-Blas, 1993; Camargo & Franco, 2000; Valera *et al.*, 2008).

A PCM apresenta duas formas clínicas principais: forma aguda ou subaguda (juvenil) e forma crônica (adulta). A forma juvenil atinge crianças de ambos os sexos, envolve um sistema fagocítico mononuclear, tem evolução mais rápida e é mais severa levando a taxas de mortalidade significantes. Aqui, 3 a 5 % dos casos descritos da doença são representados (Brummer *et al.*, 1993). A forma crônica, por sua vez, é altamente prevalente entre adultos, tem progressão lenta e compromete primeiramente os pulmões, podendo a partir daí disseminar-se para outros órgãos e tecidos formando lesões secundárias (Franco, 1987). Esta fase representa mais de 90 % dos casos (Brummer, *et al.*, 1993) e afeta a pele, linfonodos e vários órgãos internos, incluindo os pulmões e os sistema nervoso central (Restrepo, 1985). O progresso da patologia e a diversidade das formas clínicas dependem dos fatores imunológicos do hospedeiro (Franco, 1987) e dos diferentes níveis de virulência dos diversos tipos de isolados do fungo (San-Blas & Niño-Veja, 2001; Panunto-Castelo *et al.*, 2003).

A distribuição geográfica da PCM apresenta-se restrita a países da América Latina, onde um grande número de habitantes é acometido (Lacaz *et al.*, 1991; Brummer *et al.*, 1993). Algumas evidências mostram que os conídeos de *P. brasiliensis* são a forma infectiva, mas seu habitat natural não está totalmente determinado. No Brasil, a moléstia é responsável por 200 mortes ao ano, sendo o país considerado o maior centro endêmico desta micose (Prado *et al.*, 2009). Nos países onde a doença é endêmica, os casos não são distribuídos homogeneamente ao longo do território, pois tende a se concentrar em torno das florestas úmidas (Restrepo, 1985).

Prado e colaboradores (2009) demonstraram que as micoses sistêmicas estão em décimo lugar entre as doenças parasitárias e infecciosas que causam mais mortes no Brasil. Dados isolados mostraram que a paracoccidioidomicose é a principal doença em causar

mortes entre as micoses sistêmicas seguida pela criptococose, candidíase e histoplasmose, representando um importante problema de saúde pública. Os Estados da região Sudeste e Sul tiveram as taxas de mortalidade mais altas, mais concentradas em São Paulo e Paraná. Em relação à idade e sexo, a maioria das mortes causadas pela doença ocorreu em indivíduos com idade entre 30 - 59 anos sendo a maioria do sexo masculino. A incidência da doença em homens foi de 13: 1 quando comparada a das mulheres (Prado *et al.*, 2009). O trabalho com solo e plantações em área rural é fator ocupacional predisponente para a aquisição da PCM (Franco, 1987). Acredita-se, que provavelmente, a menor taxa de incidência entre as mulheres, seja pela presença do hormônio β -estradiol que proporciona proteção para o sexo feminino por inibir a transição dimórfica do fungo dificultando o estabelecimento da doença (Restrepo *et al.*, 1984, 2008) e/ou pela ausência ou até mesmo menor contato com as fontes de infecção (Marques *et al.*, 1983).

1.3 - Dimorfismo de *P. brasiliensis*

O dimorfismo em *P. brasiliensis* foi descrito por Lutz, em 1908, quando este observou formas diferentes do fungo no hospedeiro e em culturas à temperatura ambiente. Essa conversão morfológica constitui uma etapa inicial para o estabelecimento da doença e invasão dos tecidos tornando-se um mecanismo de defesa importante para a adaptação dos fungos ao ambiente hostil encontrado nos tecidos do hospedeiro (Nemecek *et al.*, 2006; San-Blas *et al.*, 2002).

P. brasiliensis pertence à família de patógenos fúngicos (*Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Sporothrix schenckii* e *Penicillium marneffeii*) capazes de converterem-se da forma miceliana não patogênica para a forma de levedura patogênica (ou esporos, no caso de *C. immitis*). Essa habilidade de transformação parece ser importante por influenciar na virulência e patogenicidade desses fungos dimórficos (Klein & Tebbets, 2007).

A variação de temperatura parece ser o principal fator responsável pela diferenciação celular de *P. brasiliensis*, uma vez que esta pode ser obtida, *in vitro*, apenas pela alteração

da temperatura de incubação (San-Blas, 1993) (Fig.1). Durante a transição da forma de micélio para forma de levedura de *P. brasiliensis* ocorre, *in vitro*, o espessamento das regiões inter-septais das hifas com surgimento de estruturas arredondadas que se dividem por brotamento (San-Blas, 1982). Inversamente, de levedura para micélio ocorre a formação de brotos alongados, multinucleados, em forma de pêra, os quais gradativamente assumem o aspecto de uma hifa (Bartinick-Garcia *et al.*, 1995).

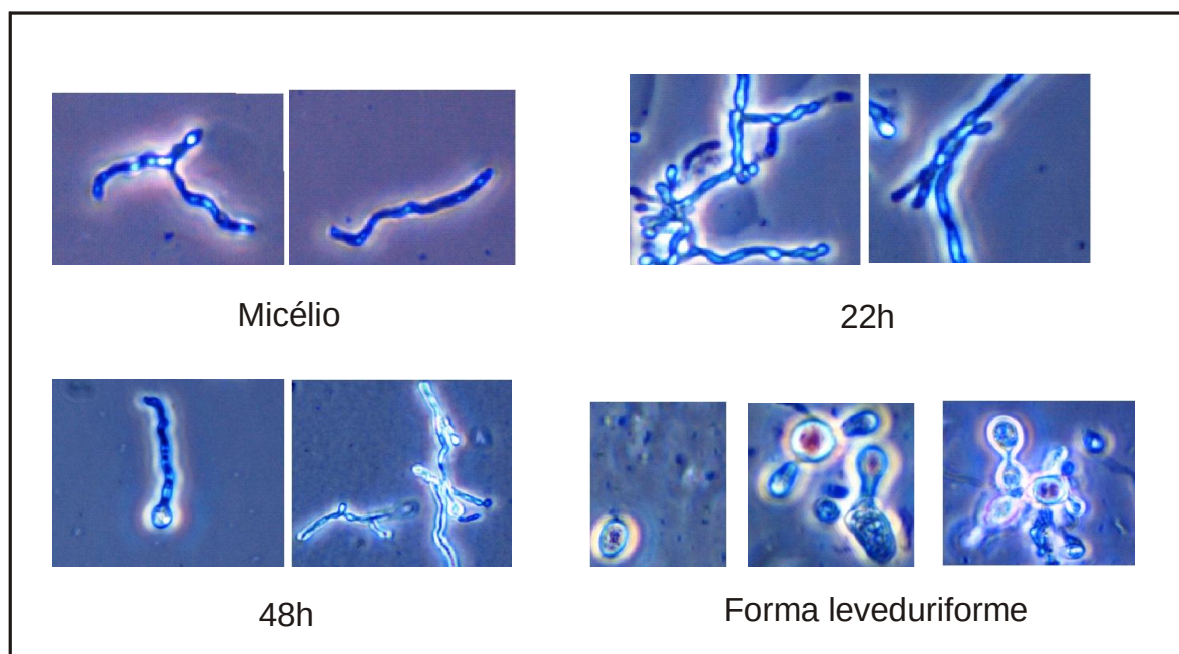


Figura 1- Morfologia do fungo *P. brasiliensis* (Pb01) durante a transição de micélio para a forma de levedura induzida pela temperatura. Aumento de 40x.

Estudos demonstram que o hormônio feminino 17- β -estradiol é relacionado à diferenciação de *P. brasiliensis*. Esse hormônio é capaz de inibir a transição de micélio para levedura de maneira dose-dependente, *in vitro* (Restrepo, 1985), e *in vivo* (Sano *et al.*, 1999). Análises do transcriptoma de *P. brasiliensis*, isolado Pb01 (Felipe *et al.*, 2005), evidenciaram um gene preferencialmente expresso na fase leveduriforme que potencialmente codifica uma proteína de ligação ao 17- β -estradiol, previamente

caracterizada (Loose *et al.*, 1983). 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 da doença em mulheres.

Com o intuito de identificar genes e proteínas relacionados com o dimorfismo de *P. brasiliensis* foram realizadas análises transcricionais. Laboratórios da região Centro-Oeste do Brasil (Projeto Genoma Funcional e Diferencial de *Paracoccidioides brasiliensis*) seqüenciaram 25.511 ESTs (Etiquetas de Sequências Expressas) obtidas de bibliotecas de cDNA das fases de levedura e micélio, resultando em 6022 genes expressos (Felipe *et al.*, 2005). Além disso, nesse transcriptoma foram identificados 48 transcritos codificantes para proteínas de resposta a estresse (HSP), sendo que o número destes transcritos foi 38 % maior na biblioteca de levedura do que na biblioteca de micélio. Estas proteínas estão envolvidas em processos como transição dimórfica e imunopatogenicidade de organismos sendo compatível com a maior temperatura (36 °C) de crescimento de células leveduriformes em relação ao micélio (23 °C). Além disso, foram identificados na fase leveduriforme, genes considerados como prováveis fatores de virulência e potenciais alvos para antifúngicos, não possuindo nenhum homólogo no genoma humano, como por exemplo, quitina deacetilase, isocitrato liase e α -1,3-glicana sintase. Ainda, estudos comparativos entre as fases miceliana e leveduriforme de *P. brasiliensis* identificaram um perfil metabólico diferencial. A fase miceliana apresenta metabolismo preferencialmente aeróbio, uma vez que durante a fase saprobiótica genes que codificam enzimas que participam da fosforilação oxidativa e do ciclo do ácido cítrico (isocitrato desidrogenase e succinil coenzima-A sintase) estão altamente expressos, ao contrário da fase leveduriforme, que apresenta metabolismo preferencialmente anaeróbio. Nesta fase, os altos níveis de expressão da enzima álcool desidrogenase I favorecem a fermentação alcoólica e conseqüente produção de etanol (Felipe *et al.*, 2005).

Com o intuito de detectar genes preferencialmente expressos na fase leveduriforme de *P. brasiliensis* (isolado Pb18), Marques *et al.* (2004) utilizaram as tecnologias de microarranjos e bibliotecas subtraídas (SSH - *Suppression Subtraction Hybridization*) nas fases micélio e de levedura. Dentre os genes identificados como diferencialmente expressos

está aquele que codifica para α -1,3-glicana sintase, envolvida no metabolismo de parede celular. A mudança morfológica de *P. brasiliensis* é acompanhada por alterações na composição da parede celular onde, monômeros de glicana passam de β -1,3-glicana para α -1,3-glicana, assim que o fungo transita para a forma de levedura (San-Blas & Niño-Vega, 2001). Observou-se, nas análises acima citadas, uma expressão muito maior do gene que codifica para a α -1,3-glicana sintase na fase de levedura, quando comparada à fase de micélio (Marques *et al.*, 2004).

O perfil transcricional de *P. brasiliensis* (Pb01) durante a diferenciação morfológica de micélio para levedura também 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 a forma leveduriforme após 22 h de indução da transição, sugerindo que *P. brasiliensis* favorece o remodelamento da membrana e de parede celulares nos estágios iniciais da morfogênese. Um novo transcrito que codifica para alfa-glicosidase, possivelmente relacionado ao processamento de β -1,6 glicana também foi identificado durante a transição dimórfica de micélio para levedura. Genes codificantes para quitinase 1 (CTS1) e 3 (CTS3) foram induzidos sugerindo que o processamento de quitina, o maior componente da parede celular, é importante para a transição dimórfica em *P. brasiliensis*. Durante a transição também foi verificada a presença de enzimas que participam do ciclo do glioxalato, como isocitrato liase, malato desidrogenase, citrato sintase e aconitase, indicando que esta via é funcional durante esse processo. Também foram identificados genes envolvidos em vias de transdução de sinais tais como MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno), serina/treonina quinase e histidina quinase, sugerindo que a transição morfológica em *P. brasiliensis* é mediada por vias de transdução de sinais que controlam a adaptação ao ambiente para a sobrevivência do fungo dentro do hospedeiro (Bastos *et al.*, 2007).

1.4 - Parede celular de *P. brasiliensis*

A parede celular dos fungos é uma estrutura que habilita a célula a resistir às pressões osmóticas, a estresses ambientais e ainda contribui para sua morfogênese (de Groot *et al.*, 2007). Apresenta-se como uma estrutura dinâmica no qual os polímeros constituintes são continuamente modificados e rearranjados durante sua biossíntese como, por exemplo, durante o ciclo celular, brotamento e em resposta a estímulos ambientais tais como sinais de estresse e acasalamento (Popolo *et al.*, 2001). Além disso, é uma estrutura com função de proteção e ao mesmo tempo utilizada durante a invasão do fungo na célula hospedeira. Protetora por proporcionar ao fungo uma barreira inicial no contato com o ambiente hostil do hospedeiro. Caso a parede celular seja removida ou sujeita a danos, o fungo morre ao menos que esteja osmoticamente protegido. Por outro lado, a parede celular contribui para que o fungo invada seu nicho ecológico, pois contém muitas moléculas requeridas neste processo (Latgé, 2007).

O número de genomas totais sequenciados tem aumentado rapidamente e análises genômicas comparativas tem se tornado uma ferramenta poderosa para identificar proteínas e outros constituintes envolvidos na formação da parede celular. O melhor entendimento da biossíntese e composição das paredes celulares são de grande interesse nas áreas médica e biotecnológica representando alvos atrativos no desenvolvimento de drogas antifúngicas (de Groot *et al.*, 2009).

Durante a transição dimórfica a parede celular dos fungos passa por alterações na sua composição e organização, resultando na expressão de moléculas antigênicas e de fatores de virulência (Nemecek *et al.*, 2007). Modificações na parede celular alteram a adesão e o reconhecimento do sistema imunológico pelo hospedeiro. Quando genes identificados como adesinas foram deletados em *Candida albicans*, a virulência do fungo foi reduzida. A expressão dessas moléculas é de extrema importância para invasão do microrganismo na célula hospedeira (Navarro-Garcia *et al.*, 2001).

Nos ascomicetos, essa parede é estruturada como uma bicamada com a camada mais interna responsável por conferir forma a célula e a camada externa, fibrilar, consistindo de glicoproteínas por toda sua superfície (Klis *et al.*, 2007). Embora a composição da parede

celular dos fungos varie entre as diferentes espécies, é composta basicamente por proteínas, glicoproteínas (galacto ou manoproteínas), lipídeos e principalmente por polissacarídeos do tipo quitina e glicanas, distribuídos diferencialmente ao longo da superfície (De Groot *et al.*, 2005). Os polissacarídeos somam mais que 90 % dos constituintes da parede celular (Latgé, 2007). Para quase todos os fungos, o núcleo central da parede celular é formado por cadeias de β -1,3-glicana que se ramificam ao longo da parede além das moléculas de β -1,6-glicana e quitina. A quitina se liga às cadeias de β -1,3-glicana por ligações β -1,4 (Fontaine *et al.*, 2000; Latgé, 2007).

Em *P. brasiliensis*, foi observado que a parede celular de micélio possui maior quantidade de proteínas (24 a 41 %) do que a de levedura (7 a 14 %). A composição de lipídeos da membrana celular também muda durante o processo de dimorfismo em *P. brasiliensis*. A fase leveduriforme possui duas vezes mais lipídeos do que a miceliana (Manocha, 1980). Ácido linoléico e lipídeos insaturados são encontrados em maior quantidade na forma miceliana, enquanto que na forma de levedura o lipídeo predominante é o ácido oléico (San-Blas & San-Blas, 1977). Essa diferença possivelmente está relacionada à manutenção da permeabilidade normal da membrana que é necessária para sobrevivência do fungo quando submetido à temperatura de 36 °C (Hamdan *et al.*, 1993).

Os principais componentes da parede celular de *P. brasiliensis* são os polissacarídeos glicana e quitina. Estes variam de acordo com a fase morfológica e grau de virulência da linhagem do fungo (Kanetsuna & Carbonell, 1970). As glicanas apresentam-se em quantidades semelhantes nas duas fases morfológicas, porém mudam em seu tipo: β e/ou α -glicanas. A forma miceliana de *P. brasiliensis* contém em sua parede celular somente β -glicana (prevalecendo ligações β -1,3 com pequenas quantidades de β -1,6). Um outro carboidrato, a galactomanana, também está presente nesta fase, porém em pequena quantidade: 6 % do total de polissacarídeos. Além disso, foram encontradas 12 vezes mais ligações dissulfetos na parede celular de micélio quando comparadas com a da levedura (Kanetsuna *et al.*, 1969). Em contrapartida, a forma de levedura contém principalmente α -glicana (α -1,3 e α -1,6-glicanas) apresentando também β -glicana, em pequenas frações, com ligações β -1,3 (Kanetsuna *et al.*, 1972).

Os polissacarídeos β e α -glicanas da parede celular de *P. brasiliensis* tem sido propostos como contribuintes da transição dimórfica e importantes para virulência do fungo, já que a baixa quantidade de α -1,3-glicana na parede celular em células leveduriformes atenuou sua virulência (Hallak *et al.*, 1982). Além disso, estudos realizados com isolados de *P. brasiliensis* sugerem que a α -1,3-glicana, na fase leveduriforme, protege o fungo contra enzimas do sistema de defesa do hospedeiro (San-Blas, 1985). A β -1,3-glicana pode ser um importante imunomodulador e em conjunto com a α -1,3-glicana são apontados como fatores de virulência (Restrepo-Moreno, 1993). San-Blas (1982) sugeriu que fagócitos humanos produzam β -1,3-glicanase capaz de digerir somente β -1,3-glicana presente na parede celular da forma miceliana do fungo. Entretanto, a transformação de micélio para levedura logo no início da infecção, devido o maior teor de α -1,3-glicana, possivelmente protege o patógeno contra a ação dessa enzima fagocitária, permitindo a estabilidade do fungo na forma de levedura e o estabelecimento da infecção. Ainda em *P. brasiliensis*, foi visto que a β -glicana é capaz de induzir um aumento da liberação do TNF- α (fator de necrose tumoral-alfa), com conseqüente morte do fungo (Anjos *et al.*, 2002).

A quitina é um importante componente estrutural da parede celular dos fungos e é constituída por resíduos de N-acetilglicosamina unidos por ligações β -1,4 (Munro & Gow, 2001). A forma de levedura possui maior quantidade (43 %) quando comparada a miceliana que contém 13 % de quitina (Kanetsuna *et al.*, 1969). Estudos realizados por microscopia eletrônica mostraram que estruturalmente, a quitina da fase leveduriforme encontra-se associada a pequenas frações de β -1,3 e de α -1,6-glicana e corresponde à camada interna da parede celular, logo abaixo da camada formada por α -1,3-glicana, externamente. Já a quitina de micélio encontra-se associada às β -glicanas e proteínas em uma única camada da parede celular (Carbonell, 1969; Kanetsuna *et al.*, 1969, 1972; San-Blas & San-Blas, 1977; San-Blas *et al.*, 1987). Em *H. capsulatum* o silenciamento do gene α -1,3-glicana sintase (AGS1) pela técnica de RNA de interferência prejudicou o crescimento da forma de levedura em macrófagos e a capacidade em colonizar os pulmões de camundongos sugerindo que a diminuição do teor de α -1,3-glicana na parede celular atenuou a virulência do fungo (Rappleye *et al.*, 2004). Em adição, foi demonstrado que no fungo *H. capsulatum*

a α -1,3-glicana localiza-se na camada mais externa da parede recobrendo a camada de β -1,3-glicana, o que bloqueia a ligação da dectina-1, um receptor para β -glicana, inibindo a produção de TNF- α por células fagocitárias do hospedeiro, com a conseqüente redução da eficácia da resposta imune (Rapplee *et al.*, 2007).

Tomazett *et al.* (2005), identificaram através de análises *in silico* em bancos de dados de ESTs (<http://www.biomol.unb.br/Pb>) do fungo *P. brasiliensis* transcritos que codificam para proteínas envolvidas na estrutura, composição e organização da parede celular. Entre as seqüências identificadas estão: quitina sintase (*PbrCHS6*), a qual está presente apenas na fase miceliana de *P. brasiliensis*; manosiltransferase 9 (*PbMNN9*), cujo produto protéico está envolvido na síntese da cadeia externa de manana; glicosiltransferases (*PbGEL1*, *PbGEL2* e *PbGEL3*), os quais codificam enzimas envolvidas na integração de β -1,3-glicana à parede celular; endoquitinase 1 e exoquitinase 1. Seis genes codificantes para quitina sintase (*PbrCHS1*, *PbrCHS2*, *PbrCHS3*, *PbrCHS4*, *PbrCHS5* e *PbrCHS6*) são ativos em *P. brasiliensis*, sendo detectados em ambas as fases, micélio e leveduriforme (Niño-Vega *et al.*, 1998, 2000, 2004; Tomazett *et al.*, 2005; San-Blas & Niño-Vega, 2008), com exceção de *PbrCHS3* que é expresso exclusivamente na fase leveduriforme (San-Blas & Niño-Vega, 2008).

A parede celular por localizar-se na interface entre o microrganismo e o ambiente desempenha importante papel para o crescimento, morfogênese e interações dos fungos com o ambiente e com outras células. É conhecido que nas paredes celulares fúngicas, alguns componentes são ligados a ela por ligações covalentes, associados através de pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas ou ainda associações iônicas. As proteínas não escapam desta generalização e algumas delas estão ligadas na parede celular por meio de interações com polissacarídeos enquanto outras estão ligadas covalentemente a outras proteínas (Klis *et al.*, 2006; Ruiz-Herrera *et al.*, 2006). Embora a parede celular dos fungos varie frequentemente entre as espécies, a camada externa que determina as propriedades da superfície celular, consiste principalmente de proteínas, as manoproteínas, que são ligadas covalentemente a β -1,6 e β -1,3-glicanas (Klis *et al.*, 2001). Em vários fungos patogênicos, essas moléculas estão em contínuo contato com a célula hospedeira agindo como antígenos

e enzimas ativas durante o processo de infecção (Latgé, 1999) e como adesinas e lectinas que permitem o reconhecimento da célula hospedeira (Castillo *et al.*, 2008).

A parede celular de *C. albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida glabrata* contém proteínas que podem ser classificadas em dois grupos (de Groot *et al.*, 2004, 2008). Um deles compõe proteínas extraídas com SDS (detergente) e agentes redutores sendo, portanto consideradas não covalentemente ligadas à parede celular (Pitarch *et al.*, 2008). O outro grupo é amplo e consiste de proteínas da parede celular (CWPs) resistentes à extração com SDS, sendo as ligadas covalentemente à parede celular (Fig.2).

As proteínas da parede celular (CWPs), o segundo grupo, contêm proteínas que podem ser reunidas dependendo da estrutura C-terminal e o tipo de ligação à glicana. A maioria das CWPs são as GPI-CWPs (proteínas da parede celular ligadas à âncora de glicosilfosfatidilinositol) que incluem floculinas, adesinas, transglicosidases, proteínas envolvidas na utilização de ferro e proteínas com funções desconhecidas (Klis *et al.*, 2006) (Fig.2-A). Essas proteínas são modificadas pela âncora lipídica glicosilfosfatidilinositol (GPI) que as fixam na rede de carboidratos da parede por uma ligação covalente entre o açúcar remanescente da âncora GPI e a β -1,6-glicana. A β -1,6-glicana pode ser ligada à β -1,3-glicana ou quitina resultando em uma forte ligação covalente das GPI-CWPs à parede celular (de Groot *et al.*, 2004). HF-piridina (fluoreto hidrogenado de piridina) cliva especificamente ligações fosfodiéster pela qual as GPI-CWPs estão ligadas às cadeias de β -1,6-glicana (Weig *et al.*, 2004). O menor grupo das CWPs consiste de proteínas ligadas covalentemente à β -1,3-glicana via ligação sensível ao pH alcalino: as ASL-CWPs (proteínas da parede celular com sensíveis a álcali) (Fig.2-B). Neste grupo estão incluídas as proteínas Pir (Proteínas com repetições internas) que são ligadas à β -1,3-glicana na parede celular através da formação de uma ligação éster entre um resíduo de glutamina da sequência consenso Q-[IV]-XD-G-Q-[IVP]-Q e a β -1,3-glicana (Kapteyn *et al.*, 2000; Yin *et al.*, 2005; de Groot *et al.*, 2008). As proteínas Pir podem ser extraídas da parede celular utilizando-se NaOH (hidróxido de sódio) (Kapteyn *et al.*, 1999). Além disso, as proteínas da parede celular podem ser ligadas não apenas aos polissacarídeos da parede celular, mas a outras CWPs através de pontes dissulfeto (Pitarch *et al.*, 2008).

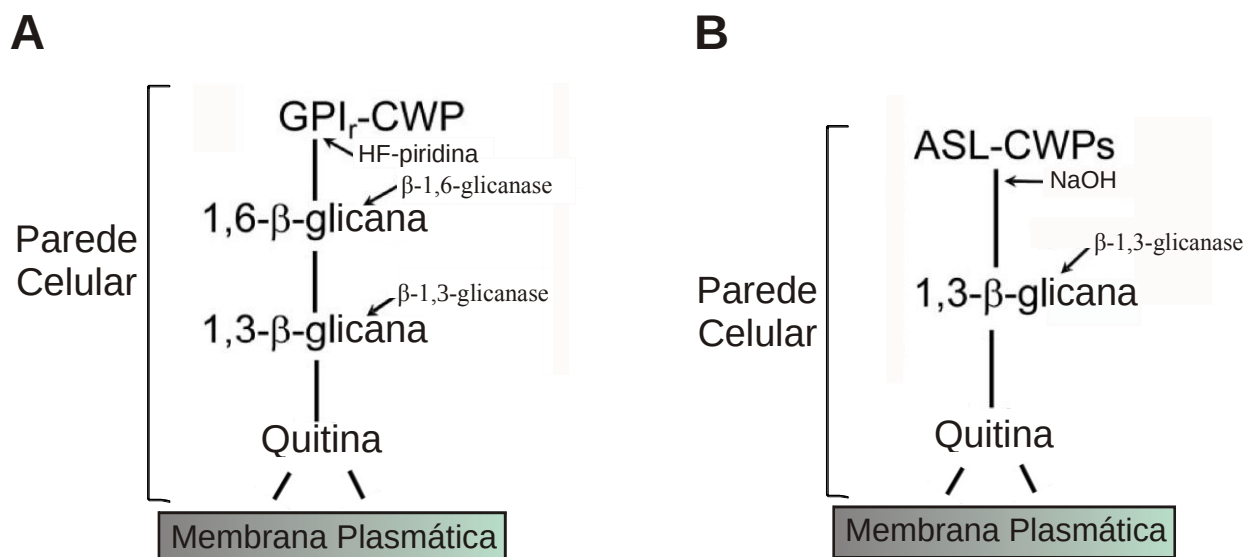


Figura 2- Grupos de proteínas ligadas covalentemente à parede celular de *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida glabrata*. (A) CWPs-GPI fixas à parede celular pela rede tridimensional formada por várias cadeias de β-1,3-glicana através de uma ligação covalente via β-1,6-glicana. Na parte mais interna da parede celular, várias cadeias de quitina são acopladas ligando-se a rede formada pela β-1,3-glicana. (B) ASL-CWPs ligadas a β-1,3-glicana através de uma ligação sensível ao pH alcalino. As setas indicam os efeitos de tratamentos enzimáticos e químicos para liberação das proteínas. Adaptação: de Groot *et al.* (2008).

As proteínas podem ainda se ligar à membrana plasmática. Uma das formas é através de âncoras lipídicas. As proteínas ancoradas por lipídeos se dividem em dois grupos: proteínas ligadas a âncoras de miristoil ligadas a amido (Boutin, 1997; Richard & Plaine, 2007), âncoras de grupos acil ligadas a tio-éster e âncoras de prenil ligadas a tio éter (Dohlman, 2002); e proteínas que contém uma seqüência sinal C-terminal que permite o acoplamento da âncora de GPI ao se associar à camada de lipídeos na membrana plasmática, representando as proteínas GPI-ancoradas (GPI- Ps) (Sharom & Lehto, 2002). Dentre todas as proteínas ancoradas por GPI estas são a minoria (Pittet & Conzelmann, 2007). A âncora destas proteínas pode ainda ser removida pela ação de fosfolipases específicas (Griffith & Ryan, 1999), convertendo a proteína em uma forma solúvel.

A composição do proteoma da parede celular é altamente dinâmica e depende da fase do ciclo celular, das condições ambientais tais como disponibilidade de nutrientes, temperatura, pH externo e níveis de oxigênio, estresses na parede celular e estágios de desenvolvimento (Kapteyn *et al.*, 2001; De Groot *et al.*, 2005; Klis *et al.*, 2006). Dessa forma, a expressão e incorporação de proteínas da parede celular (CWPs) são temporal e espacialmente controladas. Análises transcricionais em *S. cerevisiae* e *C. albicans* deixaram claro que os níveis de transcritos das proteínas da parede celular podem variar imensamente. As evidências disponíveis indicam que os níveis de proteínas da parede são correlacionados com os níveis de transcritos e que a composição dessas proteínas depende fortemente das condições ambientais (De Groot *et al.*, 2005).

Quando a parede celular é estressada, quer constitutivamente devido a defeitos genéticos ou temporariamente/dose-dependente devido o crescimento das células na presença de componentes que desestruturam (perturbam) a parede celular, as células tendem a aumentar em tamanho por consequência do ganho de água (osmose) e diminuição da pressão de turgor (exercida pela parede celular). Em resposta a esses estresses, vias relacionadas com a integridade da parede celular são ativadas, resultando em um aumento na expressão de genes específicos no grupo das CWPs, deposição maciça de quitina nas laterais da parede celular e maiores quantidades de todo complexo polissacarídico nessa estrutura (Kapteyn *et al.*, 1997; Lagorce *et al.*, 2003). Estas alterações são parte de um conjunto de reações compensatórias a fim de garantir a integridade da parede celular (de Nobel *et al.*, 2000).

O Calcofluor White (CFW) e o Congo Red (CR) são corantes que contêm grupos ácidos sulfônicos em sua estrutura química e são conhecidos por interagirem com vários polissacarídeos da parede celular de fungos, algas e plantas superiores (Roncero & Duran, 1985; Ram & Klis, 2006). Quando solubilizados, em meios levemente acidificados, neutros ou básicos (pH acima de 5,0), os grupos sulfônicos da estrutura química desses agentes tornam-se carregados negativamente. Como consequência, esses compostos tornam-se capazes de interagirem com os polissacarídeos da parede celular, tal como ocorre nos fungos. Esse seria o principal motivo pelo qual esses compostos não passam pela

membrana plasmática e têm como alvo polissacarídeos da parede celular localizados externamente a essa membrana (Roncero *et al.*, 1988; Kopecka & Gabriel, 1992).

In vitro, o CFW e o CR interagem com várias glicanas com ligações β e *in vivo*, como descrito para a alga *Poteroiochromas stipitata*, esses compostos podem interagir fortemente com cadeias nascentes de quitina (Herth, 1980). O CFW preferencialmente se liga a quitina na parede celular de fungos e o CR à β -glicanas, ambos interferindo na construção e integridade da parede celular (Ram & Klis, 2006; Siafakas, *et al.*, 2007; Ogawa *et al.*, 1973). É concebível que esses agentes desestabilizadores de parede celular causem, quando se ligam às cadeias de quitina, inibição da correta construção da parede celular por consequência da interrupção tanto da construção das microfibrilas de quitina quanto da interconexão das mesmas às cadeias de glicanas com ligações β -1,3 e β -1,6. Isso ocorre porque enzimas envolvidas nesses processos de conexão da quitina às cadeias de glicanas têm suas ações seriamente rompidas. Como resultado, a parede celular torna-se enfraquecida resultando em mudanças morfológicas como observado em *S. cerevisiae* através da incompleta separação das células-mãe e filhas (Roncero & Duran, 1985; Ram & Klis, 2006; Ram *et al.*, 2004).

Outro composto que afeta a integridade da parede celular é o SDS (Dodecil-Sulfato de Sódio), um detergente aniônico que atua como desestabilizante protéico (Banks *et al.*, 2005). Em contato com a parede celular dos fungos, este agente químico anfipático interage com as proteínas e, de certa forma, modifica a estrutura da parede celular. A ligação da região hidrocarbônica apolar da molécula do SDS com as proteínas resulta na exposição de regiões antes enoveladas, facilitando o rompimento do ancoramento das mesmas à parede celular. Além disso, as proteínas adquirem carga total negativa, em consequência da região polar da molécula do SDS. Como resultado dessas interações, as proteínas não contribuem com a total integridade da rede estrutural da parede celular, o que a torna mais enfraquecida.

A exposição a esses agentes químicos resulta na ativação de respostas a estresse da parede celular (Levin, 2005) incluindo a ativação transcricional de muitos genes que codificam proteínas com funções que reforçam a estrutura da parede (Ram *et al.*, 2004). Em

C. albicans, a deleção de genes da família CRH (Hipersensíveis a Congo Red) que codificam proteínas da parede celular dependentes da âncora GPI e com provável atividade de transglicosidase (ligam a quitina à β -1,6-glicana), resultou na sensibilidade da parede celular aos componentes CFW, SDS, CR e a altas concentrações de Ca^{2+} sugerindo que esses genes contribuem para organização da parede celular. Essa família inclui proteínas codificadas pelos genes UTR2 (Transcrito não identificado), homólogo ao gene CF4 (Fator de Superfície Celular) de *S. cerevisiae*, CRH11 e CRH12 (Hipersensíveis a Congo Red) (Pardini *et al.*, 2006).

1.5 - Âncora de GPI e β -1,3-glicosiltransferase 2

Muitas proteínas da superfície celular dos eucariotos sofrem algum tipo de modificação pós-traducional sendo uma delas a adição de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) na extremidade C-terminal da proteína. Alguns estudos têm estabelecido que essas proteínas podem ser enzimas, antígenos e receptores de superfície, além de moléculas de adesão (Chatterjee & Mayor, 2001; Hoyer, 2001; Sundstrom, 2002). Algumas delas, com atividades enzimáticas, podem atuar na biossíntese e remodelamento da parede celular (Mouyna *et al.*, 2000a) e, em vários patógenos, as proteínas com âncora GPI têm sido relatadas como imunogênicas sugerindo que sejam importantes fatores de virulência (Hung *et al.*, 2002).

As proteínas acopladas à âncora de GPI possuem características estruturais comuns tais como um peptídeo sinal N-terminal que direciona a proteína para o retículo endoplasmático (RE) e um segundo domínio hidrofóbico na porção C-terminal que é clivado e substituído pela âncora de GPI no resíduo de aminoácido designado sítio ômega (ω), dentro do lúmen do retículo endoplasmático (RE) (Hamada *et al.*, 1998). Em adição a essas sequências sinais, as proteínas GPI apresentam sequências ricas em serina e treonina proporcionando sítios de glicosilação e a localização subcelular na membrana plasmática ou parede celular parece ser, no mínimo parcialmente, determinada por resíduos ácidos ou básicos na região ômega (Caro *et al.*, 1997; Hamada *et al.*, 1999).

A estrutura central da âncora GPI consiste de um grupo lipídico, fosfolipídeo, servindo como âncora se ligando na membrana plasmática; um grupo inositol; uma glicosamina; três grupos de manose e por fim, um grupo fosfoetanolamina que conecta a âncora de GPI à uma região C-terminal de uma proteína através de uma ligação amida (Tiede *et al.*, 1999) (Figura 3). A síntese da âncora de GPI ocorre simultaneamente à tradução e clivagem proteolítica do propeptídeo C-terminal da futura proteína ancorada por GPI (Caro *et al.*, 1997) sendo a biossíntese da âncora e ligação da mesma à proteína feita por um complexo de fosfatidilinositol-glicanas (PIGs), dolicol-fosfato manoses (DPMs) e transamidases em *S. cerevisiae* e em mamíferos (Orlean & Menon, 2007). Um estudo recente comparando a âncora de GPI entre representantes de mamíferos, leveduras e o tripanossoma africano *Trypanosoma brucei*, mostrou que apesar da estrutura da âncora de GPI ter elementos comuns conservados, as cadeias laterais e os lipídeos que a formam são geralmente diferentes, sugerindo que sua estrutura é remodelada durante a biossíntese e após o acoplamento nas proteínas alvo (Fujita & Kinoshita, 2009).

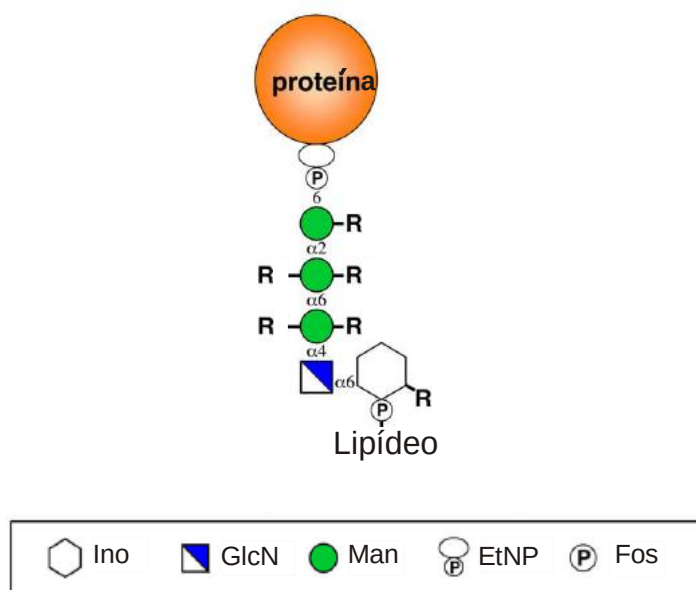


Figura 3 – Estrutura central básica da âncora de GPI. Ino- inositol; GlcN- glicosamina; Man- manose; EtNP- etanolamina-fosfato e Fos- fosfato. As cadeias laterais (manoses e etanolaminas) se ligam nas manoses e no inositol da estrutura da âncora. Adaptação: (Fujita & Kinoshita, 2009).

Em *P. brasiliensis*, foi realizado um rastreamento das ESTs (Etiquetas de Sequências Expressas) derivadas das bibliotecas de cDNA das fases de levedura e micélio (<http://www.biomol.unb.br/Pb>) utilizando ferramentas computacionais, com a finalidade de se identificar genes que codificam possíveis proteínas ancoradas por GPI. Um total de 20 proteínas preditas foram identificadas possuindo possíveis papéis como fatores de virulência, moléculas de adesão, antígenos de superfície, enzimas e com funções estruturais na biogênese da parede celular. A β -1,3-glicosiltransferase 2 se constitui em uma dessas proteínas (Castro *et al.*, 2005).

Durante o remodelamento da parede celular, hidrolases glicosídicas e glicosiltransferases/transglicosidases possuem função importante. Hidrolases glicosídicas degradam glicanas principalmente para regular a plasticidade da parede celular sob diferentes circunstâncias tais como divisão celular, separação da célula e esporulação (Adams, 2004) enquanto que proteínas com atividade transglicosidase são capazes de formar novas ligações glicosídicas gerando polímeros alongados e ramificados (Rodriguez-Pena *et al.*, 2000).

Estudos focando nas atividades enzimáticas envolvidas na modificação da β -1,3-glicana no espaço periplasmático, tais como as glicanases e transglicosidases, identificaram bioquimicamente uma nova atividade β -1,3-glicosiltransferase em *Aspergillus fumigatus* (proteína Bgt2 - β -glicosiltransferase 2) (Hartland *et al.*, 1996) e o gene GEL1 (glicosiltransferase alongando glicana) foi caracterizado (Mouyna *et al.*, 2000a). Os genes GELs são homólogos às famílias gênicas GAS (glicolípido ancorado à superfície) de *S. cerevisiae*, GEL de *Coccidioides posadasii*, PHR (pH - regulado) de *C. albicans* e EPD (essencial para o desenvolvimento de pseudohifa) em *Candida maltosa*. Todas essas enzimas pertencem à família 72 de glicosil hidrolases (GH 72) contidas no banco de dados das enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos (CAZy, Enzimas que ativam carboidratos) (<http://www.cazy.org/fam/GH72.html>) e codificam para proteínas ancoradas por GPI, requeridas para correta morfogênese da parede celular fúngica (Papaleo *et al.*, 2006).

As enzimas com atividade β -1,3-glicosiltransferase estão presentes nos fungos, mas não nas células de mamíferos (Klis, 1994; Klutts *et al.*, 2006). Tais enzimas agem em dois passos: primeiramente, uma ligação glicosídica interna na cadeia de β -1,3-glicana doadora é clivada e a porção redutora é liberada e, depois, essa extremidade é transferida para uma extremidade não redutora de outra cadeia de β -1,3-glicana receptora resultando, dessa forma, em seu alongamento (Mouyna *et al.*, 2005) (Figura 4).

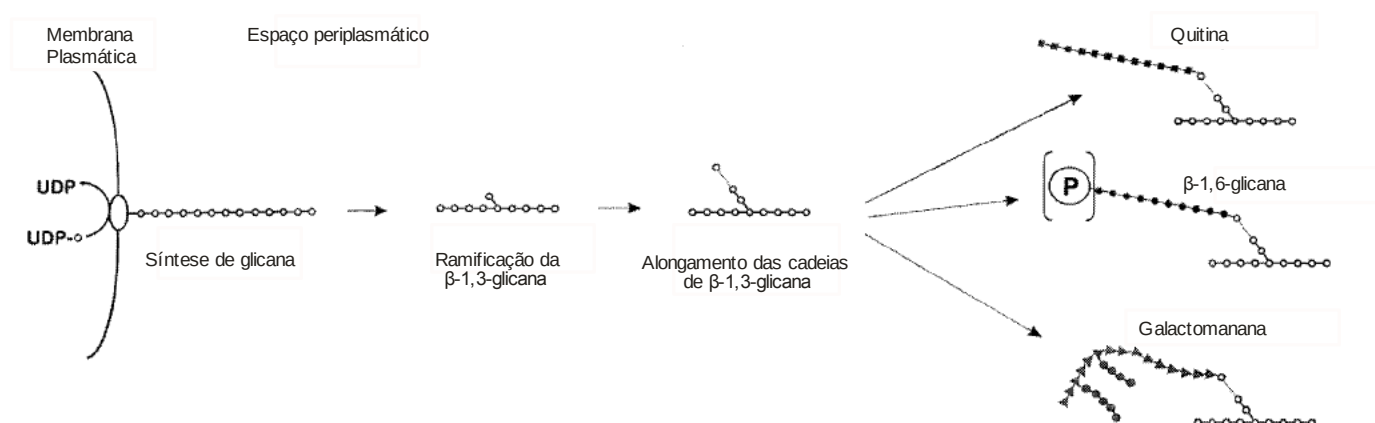


Figura 4 – Síntese e modificação pós-síntese da β -1,3-glicana da parede celular. A glicana sintetizada por um complexo na membrana plasmática é ramificada e alongada por enzimas específicas para servir de acoplamento a moléculas como quitina, β -1,6-glicana e galactomananas formando a estrutura da parede celular. UDP: UDP-glicose; P: proteínas. Adaptação: (Mouyna, *et al.*, 2000).

A β -1,3-glicana, substrato dessas enzimas, é sintetizada a partir de UDP-glicose por um complexo localizado na membrana plasmática denominado glicana sintase, tendo como subunidades catalíticas as proteínas Fks (β -1,3-glicana sintase). As cadeias de glicana formadas são deslocadas para dentro do espaço periplasmático e, dessa forma, disponibilizadas para serem ramificadas, alongadas e remodeladas (Latgé, 2007; Hurtado-Guerrero *et al.*, 2009). Foi proposto que as proteínas com atividade β -1,3-glicosiltransferase poderiam agir *in vivo* como um grupo de enzimas que transferem segmentos de β -1,3-glicana em pontos ramificados de outras glicanas criando múltiplos sítios de ancoragem para manoproteínas, quitina e galactomananas contribuindo na biogênese da parede celular (Mouyna *et al.*, 2000b).

As proteínas Gas/Gel consistem de uma sequência sinal, um centro catalítico, além de um domínio rico em cisteína (classificado como CBM43 - Módulo de Ligação a Carboidratos) ou um motivo rico em serina e treonina (Ser-box), seguido por uma região hidrofóbica com sítio de ligação à âncora de GPI (Hurtado-Guerrero *et al.*, 2009). No centro catalítico, estão presentes dois resíduos conservados de glutamato essenciais para catálise e sítios de N-glicosilação (Mouyna *et al.*, 2000b). A proteína Gas1 solúvel de *S. cerevisiae* mostrou atividade de β -1,3-glicosiltransferase, a qual é abolida pela substituição dos dois resíduos glutamato (Carotti *et al.*, 2004).

Baseado na presença ou ausência do domínio rico em cisteína, anotado como domínio X8 (<http://pfam.sanger.ac.uk/family?PF07983>), a família GH72 é subdividida em duas subfamílias: GH72 + e GH72 -, respectivamente (Ragni *et al.*, 2007a). O genoma de *S. cerevisiae* contém cinco genes parálogos codificantes para proteínas Gas (Gas1-Gas5) nos quais Gas1 e Gas2 pertencem à subfamília GH72 +. Com exceção da Gas3, a atividade transglicosidase foi relatada em todas essas enzimas (Popolo & Vai, 1999; Ragni *et al.*, 2007a, 2007b). O fungo *A. fumigatus* contém sete genes codificantes para família de proteínas Gel (Gel1 - Gel7) com somente as proteínas Gel1 e Gel2 (ambas GH72 -) e Gel4 (GH72 +) sendo expressas durante o crescimento micelial, em meio rico. As proteínas Gel3, Gel4, Gel5 e Gel7 possuem de 53 a 65 % de identidade entre si, formando um subgrupo, enquanto que Gel1, Gel2 e Gel6 possuem de 36 a 38 % de identidade, formando

outro subgrupo (Mouyna *et al.*, 2005). Em *C. albicans* cinco enzimas GH72, Phr1-3 e Pga4-5 foram detectadas. Phr1, Phr2 e Pga5 pertencem à família GH72 + enquanto que Phr3 e Pga4 pertencem à subfamília GH72 -. Diferentes enzimas GH72 + e GH72 - devem satisfazer as necessidades celulares de remodelar β -1,3-glicana em diferentes condições fisiológicas e em diferentes conformações do substrato. Isso poderia explicar a redundância das enzimas GH72 (Popolo *et al.*, 2008).

Em *P. brasiliensis* três genes codificam para proteínas da família Gel (GEL1, GEL2 e GEL3) (Tomazett *et al.*, 2005) ancoradas por GPI (Castro *et al.*, 2005). Recentemente, foi demonstrado que *PbGel3p* faz parte da subfamília GH72 + mostrando homologia com proteínas que pertencem a família GH72, com os 300 primeiros aminoácidos revelando sequências mais similares e idênticas entre si, além dos dois resíduos de glutamato, essenciais para a atividade enzimática, conservados no domínio catalítico (Castro *et al.*, 2009). A β -1,3-glicosiltransferase 2 de *P. brasiliensis* (*PbGel2p*), assim como Gel1 e Gel3, são homólogas às outras proteínas com atividade transglicosidase.

A função das proteínas β -1,3-glicosiltransferases na morfogênese fúngica tem sido avaliada em estudos que focam no rompimento de genes em organismos (Hurtado-Guerrero *et al.*, 2009). A deleção (nocaute) do gene GAS1 de *S. cerevisiae* resultou em morfologia celular aberrante, taxa reduzida de crescimento, agregação celular e composição diferente da parede celular (Popolo *et al.*, 1993; Ram *et al.*, 1998). Em *Pichia pastoris* a deleção de GAS1, também influenciou na morfologia da parede celular mostrando o mesmo fenótipo relatado para GAS1 de *S. cerevisiae* (Marx *et al.*, 2006). A dupla deleção de GAS2 e GAS4 em *S. cerevisiae* resultou em severa redução na capacidade de esporulação, aumento na permeabilidade dos esporos a substâncias exógenas e produção de esporos não viáveis (Ragni *et al.*, 2007b). Os genes PHR1 e PHR2 de *C. albicans*, quando mutados, também resultaram em defeitos no crescimento, redução no teor de β -1,3-glicana associada à β -1,6-glicana e aumento de cinco vezes de quitina na parede celular, como efeito compensatório (Saporito-Irwin *et al.*, 1995; Muhlschlegel and Fonzi, 1997). Em *C. albicans* a mutação de genes que codificam para proteínas da família CHR (Hipersensíveis a Congo Red), envolvidas na construção da parede celular e com atividade transglicosidase,

resultou em defeitos na parede celular. No mutante para Utr2p (Transcrito não identificado), uma das proteínas pertencente à família CHR, foram observadas alterações na composição polissacarídica da parede celular. Nas células selvagens, a quitina demonstrou associação com β -1,3-glicana, o contrário do observado nas células mutadas para Utr2p. Isso sugere a participação de Utr2p no processo de ligação da β -1,3-glicana à quitina, importante na construção e integridade da parede celular (Pardini *et al.*, 2006).

Com finalidade de elucidar os mecanismos moleculares envolvidos na construção e morfogênese da parede celular, um trabalho recente caracterizou e analisou a função da proteína Gel3p de *P. brasiliensis*. A proteína apresenta similaridade funcional à família de proteínas envolvidas na biogênese da parede celular (Gas/Phr/Gel) e mostra ser associada à estrutura da parede celular. Análises a nível de transcrito e de proteína, durante a transição dimórfica das fases de micélio para a leveduriforme, revelaram que *PbGel3p* é presente em maior quantidade na forma miceliana do fungo quando comparada à leveduriforme. Ainda, *PbGel3p* foi capaz de resgatar o fenótipo do mutante para GAS1 de *S. cerevisiae* corrigindo defeitos morfológicos característicos da falta de Gas1p na célula. Características tais como morfologia elipsoidal, taxa de crescimento similar a do tipo selvagem, habilidade para crescimento em meio na presença de CFW (Calcofluor White) e SDS (Dodecil-Sulfato de Sódio) foram recuperadas nas células complementadas com *PbGel3p*. Isso indica que essa proteína é funcional e provavelmente atua no alongamento das cadeias de β -1,3-glicana mediando a integridade da parede celular do fungo *P. brasiliensis* (Castro *et al.*, 2009).

1.6 - Interações proteína-proteína

Na fase pós-genômica cada vez mais tem se tornado indispensável a compreensão dos muitos processos biológicos inerentes a qualquer organismo (Causier & Davies, 2002). A chave para compreensão de muitos desses processos biológicos reside no estudo das interações físicoquímicas entre as proteínas a fim de que sejam, também, elucidadas funções dessas moléculas. O sistema de duplo híbrido em leveduras permite a detecção de interações entre proteínas *in vivo* fornecendo, na maioria das vezes, um estudo inicial de

identificação de interações entre proteínas, em sua conformação original (Fields & Song, 1989).

O sistema de duplo híbrido em levedura (*S. cerevisiae*) é uma metodologia baseada na estrutura de um fator de transcrição que tem dois domínios fisicamente separados: o domínio de ligação ao DNA (BD) e o domínio de ativação da transcrição (AD) (Figura 5-A). Os genes codificantes para estes domínios estão presentes em plasmídeos diferentes onde são clonados genes de uma biblioteca de cDNA (presa) e o gene para o qual se deseja rastrear a interação (isca). Caso as proteínas façam interação *in vivo* o fator de transcrição atua sobre o promotor que se situa no início de um gene repórter, o qual após ativar a transcrição dos genes repórteres, determina o crescimento das leveduras em meio seletivo, onde crescem apenas as leveduras que apresentam proteínas que interagiram (Chien *et al.*, 1991; Fields & Sternglanz, 1994).

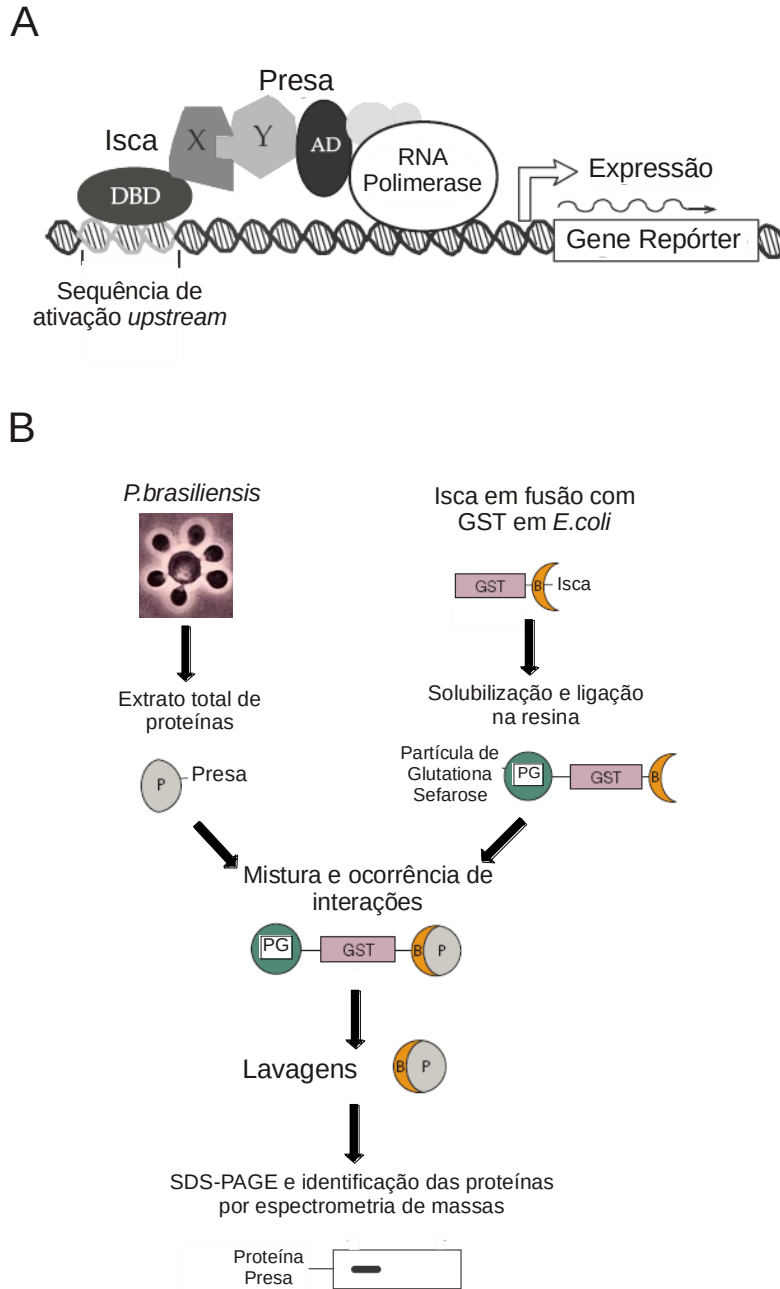


Figura 5 – Esquema da técnica de duplo-híbrido e do ensaio de pull-down. (A) Esquema do ensaio de duplo-híbrido. DBD – Domínio de ligação à região promotora do DNA, o qual é fusionado à isca *PbGel2p* (X). AD – Domínio de ativação da transcrição, o qual é fusionado às proteínas (presas-Y) de *P. brasiliensis*. A interação de proteínas fusionadas aos domínios (BD e AD) compõe o fator de transcrição que ativa a expressão do gene repórter permitindo o crescimento das leveduras em meio seletivo. **(B)** Proteínas totais extraídas do fungo *P. brasiliensis* (presas) são incubadas com a resina contendo *PbGel2p* (isca) *in vitro*. Sucessivas lavagens retiram as ligações inespecíficas e as proteínas são detectadas em gel de poliacrilamida e identificadas por espectrometria de massas. Adaptação: *ProQuest™ Two-Hybrid System (Invitrogen®)* e *Protein Interaction Guide (Promega®)*.

Um passo preliminar para entendimento da estrutura e função de uma proteína é determinar quais proteínas interagem com a mesma. Além da técnica de duplo-híbrido, outro ensaio tem se tornado interessante para essas análises: ensaio de *pull-down* (Figura 5-B). Neste, as interações físicas são determinadas *in vitro*, de uma forma mais direta, sendo uma ferramenta útil na confirmação de interações proteína-proteína preditas por outras técnicas (co-imunoprecipitação, sistema de duplo-híbrido, etc) ou um ensaio de rastreamento inicial para identificar interações desconhecidas. O requerimento mínimo para o ensaio de *pull-down* é a disponibilidade da proteína de interesse (isca) fusionada a uma proteína de fusão que se liga em resinas específicas, facilitando a captura das interações. Essa proteína de fusão pode ser a GST (Glutathione-S-Transferase) que se liga na resina de agarose-GSH (Glutathione-S-agarose) (Vikis & Guan, 2004). A presa, proteína que interage com a proteína de interesse, pode ser obtida a partir de proteínas recombinantes, lisados celulares ou produtos de transcrição/tradução *in vitro* que, em solução, proporcionam um grupo de proteínas (Golemis, 2002). As proteínas podem ser visualizadas por géis de poliacrilamida, SDS-PAGE, após coloração por azul de Coomassie ou prata, *Western blotting* ou ainda por detecção radioisotópica (^{35}S). A identificação pode ser feita por espectrometria de massas e quando acoplada a essa técnica, o ensaio de *pull-down* pode ser considerado equivalente ao sistema de duplo-híbrido (Brymora *et al.*, 2004).

Estudos recentes com a glicosiltransferase Gas1 de *S. cerevisiae* demonstram como a investigação de interações entre moléculas contribui para o entendimento das funções das proteínas. Koch & Pillus (2009) demonstraram que a proteína Gas1 participa no silenciamento transcricional em *S. cerevisiae* de maneira independente da sua função estabelecida na parede celular (outros mutantes para genes da parede celular não apresentam defeitos no silenciamento). Nesse fungo, as três regiões de cromatina silenciadas são: os *loci* do tipo reprodutivo (HML e HMR), os telômeros localizados nas extremidades de cada cromossomo e o *locus* do DNA ribossomal (rDNA). A deleção de GAS1 não altera o padrão de silenciamento em HM (*locus* do tipo reprodutivo), mas o silenciamento telomérico foi reduzido e o do rDNA, aumentado. Nenhum outro gene apresenta este efeito *locus* específico no silenciamento gênico da levedura. Gas1p atua no

silenciamento através da modificação da proteína Sir2 (proteína reguladora da informação para silenciamento) que promove o silenciamento da cromatina ao deacetilar uma lisina da histona H4 (Garcia, 2003). Sir2 forma um complexo de silenciamento junto com outra proteína reguladora do silenciamento gênico, a Sir3. Gas1p, ao modificar Sir2, adiciona um motivo de carboidrato e altera a capacidade do complexo em formar e manter a cromatina silenciada. Esse estudo revelou uma função nuclear adicional no silenciamento transcricional para a enzima que contribui para integridade da parede celular ao modificar carboidratos (Koch & Pillus, 2009).

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

A parede celular fúngica é responsável pela manutenção da morfologia e integridade das células. Durante a transição dimórfica a parede celular está relacionada com a patogenicidade de *P. brasiliensis*, visto que linhagens que não se diferenciam para forma leveduriforme são avirulentas. Além disso, a parede celular é uma estrutura altamente dinâmica, contém um reservatório de moléculas antigênicas e fatores de virulência que contribuem para o estabelecimento da infecção favorecendo o contato do fungo com a célula hospedeira e estabelecendo uma relação preliminar patógeno-hospedeiro.

Durante o processo de remodelamento da parede celular as proteínas β -1,3-glicosiltransferases, ancoradas por GPI e homólogas às proteínas da família Gel/Gas de diversos fungos, atuam modificando a β -1,3-glicana e ramificando as cadeias formadas para a correta construção da parede. As β -1,3-glicosiltransferases se encontram possivelmente na superfície celular e estão acessíveis às células do sistema imune do hospedeiro, podendo induzir a produção de anticorpos específicos durante o crescimento do fungo.

Em *P. brasiliensis*, entre as proteínas relacionadas à síntese da parede celular estão as β -1,3-glicosiltransferases Gel1p, Gel2p e Gel3p. A β -1,3-glicosiltransferase 3 de *P. brasiliensis*, recentemente caracterizada, está envolvida na biossíntese e morfogênese da parede celular visto que o fenótipo mutante para GAS1 em *S. cerevisiae* foi complementado. Estudos mais detalhados sobre cada uma das β -1,3-glicosiltransferases de *P. brasiliensis* definem o papel principal de cada uma delas na célula. Nesse sentido, a caracterização e o estudo funcional da β -1,3-glicosiltransferase 2 deverá contribuir no estabelecimento do papel de PbGel2p, bem como novas funções, considerando o estudo das interações com outras proteínas de *P. brasiliensis*. Dessa forma, alguns mecanismos moleculares envolvendo essa proteína e a estrutura da parede celular, essencial para a patogenicidade de *P. brasiliensis*, poderão ser elucidados.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo principal caracterizar e analisar funcionalmente a β -1,3-glicosiltransferase 2 de *P. brasiliensis*. As estratégias experimentais em função dos objetivos propostos foram:

- Clonagem molecular e expressão heteróloga da β -1,3-glicosiltransferase 2 de *P. brasiliensis* (rPbGel2p);
- Obtenção da sequência predita de aminoácidos codificantes para PbGel2p;
- Produção de anticorpo policlonal anti-PbGel2p;
- Avaliação da expressão da PbGel2p no proteoma total de células de *P. brasiliensis* nas fases de micélio e levedura;
- Avaliação da expressão de transcritos codificantes para PbGel2p durante a transição dimórfica de micélio para levedura e sob condições de estresse da parede celular;
- Ensaio de complementação gênica de PbGEL2 utilizando o mutante para GAS1 (Δ GAS1) de *S. cerevisiae* ;
- Rastreamento das interações intermoleculares de PbGel2p com proteínas de *P. brasiliensis* por meio do sistema de duplo híbrido em *S. cerevisiae* e ensaio de *pull-down* seguido por espectrometria de massas.

METODOLOGIA

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Microrganismos e condições de crescimento

Paracoccidioides brasiliensis, isolado 01 (coleção ATCCMYA-826) já caracterizado e padronizado em nosso laboratório foi utilizado neste trabalho. O fungo foi cultivado e mantido em meio de cultura Fava-Neto por 7 dias (Fava-Neto, 1955) na temperatura de 36 °C para a fase leveduriforme e 22 °C para a miceliana, durante 14 dias. Durante a transição dimórfica, as células foram mantidas em meio Fava-Netto por 16 h antes da mudança da temperatura de 22 °C para 36 °C da forma miceliana para a de levedura, sendo cultivadas durante 6 dias.

As células WB2d de *S. cerevisiae* nulo mutante para *GAS1* (*GAS1Δ::LEU2*), derivada da W303-1B (*MATα ADE2-1 HIS3-11,15 LEU2-3,112 TRP1-1 URA3-1 CAN1-100*), foram obtidas em um estudo prévio (Vai *et al.*, 1996) e foram utilizadas como linhagem hospedeira para os experimentos de complementação gênica. As células da levedura cresceram a 30 °C em meio YNB sem aminoácidos (YNB - aa, 6.7g.L⁻¹) contendo glicose ou galactose 2 % mais os suplementos requeridos. O meio tamponado foi preparado pela adição de MES (4-ácido morfolino etanosulfônico, 10 g.L⁻¹) ao meio YNB seguido pelo ajuste do pH para 6.5. Durante o crescimento o pH foi monitorado e não variou por mais que 0.1. O número de células foi determinado em amostras sonicadas suavemente e posteriormente diluídas. Foi utilizado um contador de partículas (*Coulter counter*) e um analisador de tamanho, modelo Z2, descrito previamente (Vanoni *et al.*, 1983). As taxas de crescimento específicas e tempo de duplicação foram obtidos pelo número de células versus o tempo.

4.2- Clonagem do cDNA parcial e expressão da *PbGel2p* recombinante

O cDNA parcial correspondente à *PbGEL2* foi identificado por análises das informações disponíveis no banco de dados do transcriptoma de *P. brasiliensis*

(<https://www.biomol.unb.br/Pb>) (Felipe *et al.*, 2003), na estratégia de identificar genes codificantes para proteínas ancoradas por GPI (glicosilfosfatidilinositol) (Castro *et al.*, 2005). Os oligonucleotídeos **G2-EcoRI-sense** (5'-GAATTCCGAGGTTCTGCGTATATTCG-3') e **G2-XhoI-antisense** (5'-CTCGAGCTTGTTAGGGTTTTTGATGCC-3') com sítios de restrição para tais enzimas (sublinhado) foram construídos e utilizados em reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando 10 ng do cDNA total (biblioteca de cDNA construída no vetor λ ZAPII (Stratagene, USA) (<https://www.biomol.unb.br/Pb>). O produto amplificado correspondente a 662 pb foi purificado (GFX PCR DNA- GE Healthcare®), clonado no vetor pGEM-T-Easy (Promega) e sequenciado. O cDNA foi subclonado no vetor pGEX-4T-3 (GE Healthcare). O resultado da construção foi transferido para *E. coli* (linhagem DH5 α), conforme descrito por Sambrook *et al.*, (1989), possibilitando a expressão da proteína recombinante após indução por adição de isopropil β -D tiogalactopiranosídeo (IPTG) na concentração de 0,4 mM. A proteína fusionada com o domínio da Glutathione-S-transferase (GST) de *Shistosoma japonicum* (26 kDa) tem massa molecular predita correspondente à 51 kDa.

4.3- Análises de bioinformática

As sequências de aminoácidos correspondentes à PbGel2p e proteínas homólogas foram obtidas com base no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) usando o algoritmo BLASTX. O alinhamento entre as sequências foi realizado através do programa CLUSTALX (Thompson *et al.*, 1997) e as análises dos aminoácidos foram realizadas utilizando os bancos de dados InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>) e Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk>), além dos algoritmos para predição do sítio ômega (*big-PI fungal predictor* http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi/gpi_fungi.html) e localização de peptídeos sinais das proteínas (*Signal P* - <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>).

4.4- Produção do anticorpo anti-PbGel2

A proteína recombinante (rPbGel2p) fusionada com o domínio da Glutathione-S-transferase (GST), foi excisada do gel de poliacrilamida e, na quantidade de 100 µg, inoculada em coelho por três vezes com intervalos de 10 dias para gerar soro contendo anticorpo policlonal anti-PbGel2p. Ambos os soros pré-imune e imune (contendo anticorpo policlonal anti-rPbGel2p) foram coletados e estocados a -20 °C.

4.5- Western blotting

Células das fases de micélio e de levedura de *P. brasiliensis* foram obtidas. As células congeladas (3 g) foram rompidas por maceração e ressuspensas em tampão Tris-Ca (20 mM Tris-HCl, pH 8.8, 2 mM CaCl₂) com inibidores de proteases (*Protease Inhibitor mix 100x*, Amersham). A mistura foi centrifugada a 2000 g, 15 min e o sobrenadante obtido foi submetido à nova centrifugação, à 20000 g, 4 °C por 20 min. Os extratos protéicos foram dosados utilizando reagente de Bradford (Sigma Aldrich) e alíquotas foram estocadas à -80 °C. As proteínas (30 µg) foram eletroforéticamente transferidas para membrana de náilon. PbGel2p foi detectada utilizando-se o anticorpo policlonal anti-PbGel2p na diluição de 1:2000. Foi utilizado o anticorpo secundário imunoglobulina G (IgG) anti-coelho que se liga em porções espécies-específicas do anticorpo primário e a enzima fosfatase alcalina para facilitar a revelação pois se liga ao anticorpo secundário. A reação foi revelada com BCIP/NBT (*5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate/nitroblue tetrazolium*). O controle negativo foi obtido com soro pré-imune do coelho.

4.6- Obtenção de RNAs

Células da fase miceliana do fungo *P. brasiliensis* cultivadas *in vitro* na temperatura de 22 °C foram mantidas em meio Fava-Neto líquido, também à 22 °C, por 16 h. Após esse

período de adaptação ao meio líquido, a mudança da temperatura de 22 °C para 36 °C foi realizada. Os RNAs relativos à fase de micélio e da transição dimórfica com o tempo de incubação de 22 h, 48 h e 6 dias, foram extraídos. A partir de 6 dias de diferenciação, foram adicionados à 10^8 células/mL, a concentração de 25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de CFW (Calcofluor White-*Fluorescent Brightener 28*, Sigma Aldrich), 25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de CR (Congo Red-Sigma Aldrich) e 0,015 % de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio- $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4\text{Na}$ - USB®), segundo o protocolo descrito por Ram & Frans (2006). Após 1 e 3 h na agitação de 190 rpm e temperatura de 36 °C, os RNAs foram extraídos. A padronização da concentração de cada agente químico foi realizada por meio de ensaios em placa, utilizando células leveduriformes de *P. brasiliensis*.

As extrações de RNA foram realizadas utilizando-se Trizol (GIBCO™ Invitrogen Corporation), seguindo as instruções do fabricante. As células foram centrifugadas, lavadas com PBS 1X estéril, pesadas e o Trizol acrescentado na proporção de 3,5 mL para 1,5 mL de células. O mesmo volume de pérolas de vidro foi adicionado, livres de RNases. O material foi agitado por 10 min, mantido em repouso por 10 min à temperatura ambiente e centrifugado a 3.000 *g* por 10 min a 4 °C. A fase aquosa foi retirada a qual foi adicionado clorofórmio (0,2 mL para cada 0,75 mL de Trizol). O material foi homogeneizado por 5 min, incubado durante 10 min à temperatura ambiente e centrifugado a 3.000 *g* por 15 min a 4 °C. A fase aquosa foi recolhida, sendo adicionado à mesma, uma mistura de clorofórmio: fenol: álcool isoamílico (v/v). O material foi agitado, incubado durante 10 min à temperatura ambiente e centrifugado a 3.000 *g* por 15 min à 4°C. A fase aquosa foi recolhida e o RNA foi precipitado pela adição de citrato de sódio 1,2 M e cloreto de sódio 0,8 M e isopropanol (0,25 ml para cada 0,75 mL de Trizol). O material foi agitado, incubado à temperatura ambiente por 10 min e centrifugado a 3.000 *g* por 30 min a 4 °C. O sedimento obtido foi lavado com etanol 75 % (1 mL para cada 0,75 mL de Trizol) e centrifugado a 3.000 *g* por 5 min a 4 °C. O RNA resultante foi seco à temperatura ambiente por 10 min e ressuscitado em água tratada com DEPC 0,01 %. O RNA foi quantificado por espectrofotometria (comprimento de onda 260 / 280), visualizado em gel de agarose 1,2 %, aliquoteado e estocado a -80°C.

4.7- Análise quantitativa dos transcritos em tempo real (qRT-PCR)

Os RNAs, tratados com DNase (*RNAse Free-Fermentas Life Sciences*), foram utilizados para síntese de cDNAs utilizando a enzima transcriptase reversa SuperScript II (*InvitrogenTM, Life Technologies, Carlsbad, CA*) e oligonucleotídeo oligo(dT)₁₅, seguindo as instruções do fabricante. A reação de PCR em tempo real foi realizada no sistema de PCR em tempo real StepOnePlus (*Applied Biosystems, Foster City, CA*), em triplicatas. A especificidade de cada par de oligonucleotídeos utilizados foi confirmada pela visualização de um único produto de PCR em gel de agarose 1,2 %. Os oligonucleotídeos utilizados foram:

β -1,3-glicosiltransferase	2	–	PbGEL2	sense	(5'-
GGACGGTGTAATCTTGGAAC-3')			PbGEL2	antisense	(5'-
AAGGAGAGAGAGAGCATTGGAG-3')	e	tubulina	–	TUB	sense
ACAGTGCTTGGAAGTATACC-3')	e	TUB		antisense	(5'-
GGGACATATTTGCCACTGCC-3')					

A reação foi realizada em 40 ciclos de 95 °C por 15 seg e 60 °C por 1 min. A mistura SYBER Green PCR (*Applied Biosystems*) foi utilizada adicionada de 10 pmol de cada oligonucleotídeo e 40 ng de cDNA molde, em um volume final de 25 µl. As curvas padrão foram geradas para confirmação de um único produto de PCR e foram realizadas utilizando-se uma alíquota de cDNA de cada amostra, serialmente diluídas (1:5 da diluição original). Os dados foram normalizados com o transcrito codificante para a proteína tubulina amplificado em cada conjunto de experimentos de qRT-PCR. Os níveis de expressão relativa dos genes de interesse foram calculados utilizando-se o método de curva padrão para quantificação relativa (Bookout *et al.*, 2006). Os resultados foram validados pelo teste *t*-Student's, sendo consideradas diferenças significativas as amostras que apresentaram $P \leq 0,05$.

4.8- Ensaio de complementação gênica em *Saccharomyces cerevisiae*

A expressão ectópica de GEL2 de *P. brasiliensis* em *S. cerevisiae* foi realizada através da clonagem da sequência completa do cDNA codificante para PbGel2p de 1.4 kb (número de acesso: PAAG_05245 / banco de dados do genoma estrutural: http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis) no vetor pYES2 (*Invitrogen*TM), desenhado para expressão de proteínas recombinantes em *S. cerevisiae*, sob o controle do promotor GAL1. Os oligonucleotídeos construídos foram: **GEL2 sense** (5'-GGTACCAACACAATGACTCTCCTTCG-3'); **GEL2 antisense** (5'-CTCGAGCTTGTTAGGGTTTTGATGCC-3'). O cDNA codificante para PbGel2p apresenta sítios para enzimas de restrição KpnI/XhoI (sublinhado). O fragmento foi clonado no vetor pYES2 (*Invitrogen*TM), digerido com as mesmas enzimas de restrição. O plasmídeo resultante foi usado para transformar a linhagem de *S. cerevisiae* WB2d (Vai *et al.*, 1996), denominada YGEL2. Métodos padrão foram utilizados para manipulação do DNA e transformação da levedura (Hill *et al.*, 1991; Sambrook & Russel, 2001).

Na determinação da sensibilidade das diferentes linhagens ao SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) e CW (Calcofluor White) as células da levedura *S. cerevisiae* que cresceram exponencialmente em meio com galactose (pH 6.5) foram cultivadas nas placas com o meio suplementado com 0.01 % de SDS ou 50 µg.mL⁻¹ de CW (5 µl da suspensão concentrada de 10⁷ células/mL e uma série de 10 diluições). As placas foram incubadas a 30 °C por 3 dias e o crescimento das células nas placas sem SDS e CW também foi monitorado. A morfologia das células de *S. cerevisiae* foi examinada por microscópio de contraste de fase Nomarski. A visualização da quitina ocorreu após coloração com Calcofluor White (CW-*Fluorescente Brightener 28, Sigma Aldrich*) como relatado em (Cipollina *et al.*, 2007) sob microscópio de fluorescência Nikon Eclipse E600 equipado com a câmera Leica DC 350F ccd. Para as taxas de crescimento foram utilizados o teste *t*-Student's sendo o nível da significância estatística com valor de $P \leq 0.01$.

4.9- Análise das interações proteína-proteína através da técnica de duplo-híbrido

Oligonucleotídeos foram construídos para a clonagem do cDNA completo que codifica para β -1,3-glicosiltransferase 2 de *P. brasiliensis* (número de acesso: PAAG_05245 / banco de dados do genoma estrutural: http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis) no vetor de expressão pGBK-T7 (*Clontech Laboratories, Inc*). As sequências de nucleotídeos dos oligos foram: ***G2TH sense*** (5'-CCCGGGAAATAACTATCATGACTCTCCTTCG-3') ***G2TH anti-sense*** (5'-CTGCAGTGTCGTCCTCTATAACCATAAGC-3'), no qual continham sítios de restrição para as enzimas *SmaI*/*PstI* (sublinhado). O plasmídeo pGBK-T7 contém o gene *TRP1* (permite a seleção em meio mínimo sem triptofano) e o domínio GAL4 de ligação ao DNA. O produto clonado foi usado para transformar a linhagem Y187 de *S. cerevisiae* (Δ *TRP1*). A biblioteca de cDNA foi construída com RNA das células de levedura de *P. brasiliensis* e clonada no vetor de expressão pGADT7-Rec, usando o sistema comercial de Rastreamento e Construção de Bibliotecas *Matchmaker*TM. O vetor pGADT7-Rec contém o gene *LEU2* (permite a seleção em meio mínimo sem leucina) e o domínio GAL4 de ativação da transcrição. Os produtos da clonagem foram transformados na linhagem AH109 de *S. cerevisiae* (Δ *LEU2*). A linhagem Y187 contendo a isca, *PbGEL2*, foi usada para rastrear a biblioteca na linhagem AH109 através da promoção da diploidia (acasalamento) das leveduras. As interações positivas ativam a transcrição de genes repórteres como *ADE2*, *HIS3* e *MEL1* permitindo a seleção em meio mínimo sem triptofano, leucina, adenina e histidina. O meio mínimo sem esses aminoácidos e contendo X-alfa-Gal (5-Bromo-4-Cloro-3-Indol-D-galactopiranosídeo), também confirma as interações pela ativação do gene *MEL1* (*screening* visual). A identificação dos genes que interagiram com a *PbGel2p*, foi feita por sequenciamento, em ambos os sentidos, dos produtos de PCR. Foram utilizados oligonucleotídeos ***AD 5'*** (5'-CTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCC-3') e ***AD 3'*** (5'-GTGAACTTGCGGGGTTTTTCAGTATCTACGAT-3'), os quais flanqueiam a região do vetor pGADT7-Rec contendo esses genes. Os DNAs foram purificados utilizando

o sistema comercial GFX PCR DNA (GE, Healthcare®) e sequenciados (Sistema “DYEnamic ET, Dye Terminator Cycle Sequencing” em aparelho MEGABACE 1000 (GE, Healthcare®). As sequências obtidas do sequenciamento foram processadas utilizando a ferramenta de bioinformática Pipeline no qual permite a execução do PHRED, CROSS_MATH, CAP3 a fim de se obter *singlets* e *contigs* (<http://www.lbm.icb.ufg.br>). Posteriormente, as sequências foram comparadas com bancos de dados de proteínas (bancos de dados do genoma estrutural de *P. brasiliensis*: http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis e GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando-se a ferramenta BLASTX (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul *et al.*, 1990).

As interações positivas foram confirmadas pelo uso do sistema de tradução e transcrição *in vitro* a partir de Lisado Reticulócitos acoplado à TNT T7 RNA polimerase (Promega®) com metionina marcada radiotivamente (S^{35}) onde as proteínas traduzidas foram co-imunoprecipitadas (*Matchmaker™ Co-IP Kit*, Clontech Laboratories, Inc). Resumidamente, a proteína PbGel2 traduzida em fusão com o epítipo c-Myc (c-Myc-Gel2) e as proteínas, presas, traduzidas em fusão com o epítipo hemaglutinina HA (HA-presas) foram misturadas à temperatura ambiente por 1 h. A mistura foi incubada com a resina de proteína A e com o anticorpo monoclonal anti-c-Myc à temperatura ambiente por 1 h. Após lavagens, a resina contendo as proteínas que interagiram foram submetidas a um passo de centrifugação e o precipitado foi ressuspensionado em tampão de amostra 2X para proteínas (0,2 M de Tris-HCl, pH 6,8; SDS 0,4 %, β -Mercaptoetanol 20 %, Glicerol 20 % e azul de bromofenol 0,1 %), seguido pelo aquecimento a 80 °C por 5 min. As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12 %). O gel foi fixado com solução 20 % de etanol e 10 % de ácido acético por 30 min e incubado em 20 mL de solução intensificadora de sinal NAMP 100 (Reagente Fluorográfico de Amplificação-GE Healthcare®). O gel foi seco a 80 °C por 90 min, sob vácuo, e a autoradiografia foi obtida. Controles negativos foram realizados utilizando o anticorpo anti-c-Myc incubados somente com as proteínas presas. Após incubação, centrifugação e ressuspensão das amostras em tampão de amostra, da mesma forma, as proteínas foram separadas por eletroforese em gel

de poliacrilamida (SDS-PAGE 12 %) e o gel foi fixado, seco a 80 °C por 90 min, sob vácuo, obtendo a autoradiografia. Os controles foram realizados a fim de se confirmar a interação entre a isca e a proteína iscada sem que o motivo seja o uso do anticorpo e sim por suas propriedades moleculares.

4.10- Ensaio de *Pull-down*

Os plasmídeos pGEX-4T-3 (*GE Healthcare*) e pGEX-4T-3-PbGel2p foram utilizados para o ensaio de *pull-down*. Primeiramente, os plasmídeos foram transformados em células de *E.coli*, linhagem BL21 (DE) pLys, termo-competentes, conforme descrito por Sambrook *et al.*, (1989), possibilitando assim, a expressão tanto da proteína recombinante PbGel2 quanto da GST (Glutathione-S-transferase), utilizada como controle. Ambas foram induzidas por IPTG na concentração de 0,1 mM por 16 h à 15 °C. O material foi submetido a três choques térmicos (-80 °C/37 °C) e posteriormente solubilizado para obtenção da proteína recombinante e proteína controle, solúveis. Nesta fase, foi utilizado o aparelho ultrassônico com microponta de titânio catenoidal (Unique®) com potência máxima e 12 ciclos de 30 s com intervalos de 1min para ambas. O sonicado foi centrifugado e 1,2 mL deste material, na concentração de 3,3 mg.mL⁻¹, foi utilizado para ligação em 40 µl de resina (Glutathione-Sefarose) (*GE Healthcare*). Para o controle GST, 1,2 ml de sonicado na concentração de 1,9 mg.mL⁻¹ foi utilizado para ligação em 40 µl de resina. A resina foi lavada 10 vezes com 1 mL de Tampão PBS 1X (10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM de KH₂PO₄; 140 mM de NaCl; 2,7 mM de KCl; q.s.p. 1L) à 37 °C e depois, mantida à 4 °C.

Células de levedura de *P. brasiliensis* foram congeladas, rompidas por maceração e ressuspendidas em tampão Tris-Ca (20 mM Tris-HCl, pH 8.8, 2 mM CaCl₂) com inibidor de proteases (*Protease Inhibitor mix 100x*, *Amersham*). A mistura foi centrifugada a 2000 g por 15 min e o sobrenadante obtido foi novamente centrifugado à 20000 g, 4 °C por 15 min. O volume de 2,5 mL desse extrato de proteínas totais, na concentração de 5 mg.mL⁻¹, foi incubado por 2 h, à 4°C, sob agitação leve, com uma alíquota de 10 µl da resina ligada somente à GST, previamente diluída (10 µl de resina ligada à GST em 1 mL de PBS 1X). O

sobrenadante desta incubação foi, então, incubado com a resina ligada a *PbGel2* por mais 3 h, à 4 °C, sob agitação leve. As resinas foram lavadas com PBS 1X gelado (dificulta o rompimento das ligações entre a proteína e a resina da GST) a 200 g por 5 min em um total de 4 vezes para ambas as resinas. Tampão de amostra de proteínas foi adicionado às resinas e após terem sido fervidas por 7 min, as proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12 %). O gel foi corado com azul de Comassie (*Phastgel GelTM Blue R-GE*).

As proteínas que interagiram com *PbGel2p* foram removidas do gel para digestão com tripsina e identificação por espectrometria de massas. Os fragmentos do gel foram incubados por 5 min em 100 µl de acetonitrila. O sobrenadante foi removido e depois o material foi seco à vácuo por 10 min. Posteriormente, uma solução redutora de 10 mM de DTT (1,4-ditiotreitol) em 25 mM de NH_4HCO_3 foi adicionada e mantida à 56 °C por 1 h. A solução foi retirada e substituída por uma solução alquilante de iodoacetamida 55 mM em 25 mM de NH_4HCO_3 por 45 min, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Os pedaços de gel passaram por duas lavagens sob agitação: uma com solução tampão de 25 mM de NH_4HCO_3 , por 10 min, e outra com solução de 25 mM de NH_4HCO_3 em 50% de acetonitrila, por 5 min. Foi realizada secagem à vácuo por 10 min e reidratação dos fragmentos com tripsina (Promega, Madison, WI), 10 ng/mL, no gelo por mais 10 min. O excesso de tripsina foi retirado e os fragmentos de gel foram incubados à 37 °C por 16 h, em solução tampão de bicarbonato de amônio.

A solução foi retirada e colocada em tubos novos. No material submetido à digestão com tripsina foi, ainda, realizado por duas vezes o seguinte passo: adição de 50 µl de acetonitrila/5% de TFA e manutenção, sob agitação, por 10 min à temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram submetidas a 3 ciclos de 1 min, cada um, de sonicação (Aparelho Sonoplus HD2200-Bandelin). O sobrenadante de cada amostra foi seco à vácuo e o precipitado foi ressuspensionado em 2 µl de água Mili-Q para análise por espectrometria de massas. Foi adicionado 1 uL da solução de matriz CHCA (10 mg/ml ácido α -ciano- 4-hidroxicinamico em 0,1 % (v/v) TFA, 70 % (v/v) acetonitrila) e deixado secar à temperatura ambiente por 15 min, seguido por lavagem da placa com 2 µL de TFA 0,1% de

por 10 s. Os peptídeos foram analisados utilizando o aparelho MALDI-Synapt MSTM (Waters-Micromass, Manchester, UK). As proteínas foram identificadas por análise PMF (Peptide Mass Fingerprint) usando o algoritmo MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) contra o banco de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os parâmetros do Mascot foram: Banco de dados - NCBI; Taxonomia - Fungos; Enzima - tripsina com permissão para clivagem única por proteína; Modificações variáveis – carbamidometilação dos resíduos de cisteína e oxidação da metionina; Tolerância do desvio do valor da massa do peptídeo – 100 ppm. Scores maiores que 71 foram considerados significantes.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1- Análise comparativa da sequência deduzida de aminoácidos de *PbGel2p*

A sequência do cDNA completo codificante para *PbGel2p* foi obtido do banco de dados do genoma estrutural de *P. brasiliensis* (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html), gerado por um projeto do Instituto Broad (<http://www.broadinstitute.org/>) em parceria com cientistas de outras instituições. A sequência deduzida de aminoácidos mostrou homologia significativa de *Gel2p* de *P. brasiliensis* com homólogos pertencentes à família GH72 com sequências depositadas no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) tais como *Blastomyces dermatitidis* (número de acesso: XP002628718), *Ajellomyces capsulatus* (número de acesso: XP001536581), *Neosartorya fischeri* (número de acesso: XP001258256) e *Aspergillus fumigatus* (número de acesso: XP751022) (Figura 6).

Análises utilizando o algoritmo InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>) auxiliaram na identificação da região que caracteriza a família GH72 e o domínio catalítico dessas proteínas e através de outro algoritmo, o Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk>), os resíduos glutamato no domínio catalítico puderam ser identificados. Esses resíduos, na posição 159 e 260 para *PbGel2p*, são essenciais para atividade enzimática e mostraram ser conservados em todas as proteínas. O sítio potencial para ligação à âncora GPI de cada proteína, sítio ômega, foi encontrado em cada uma delas e a região N-terminal, com peptídeo sinal para endereçamento ao retículo endoplasmático, foi determinada por análises dos prováveis sítios de clivagem dessa região. Para *PbGel2p*, o sítio de clivagem predito foi encontrado entre os aminoácidos 20 e 21, determinado por análises utilizando a ferramenta de bioinformática *Signal P* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) e para ligação da âncora de GPI, o preditor do sítio de ligação *big-PI* foi utilizado (http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi/gpi_fungi.html).

O cDNA parcial codificante para *PbGel2p*, identificado por Castro e colaboradores (2005) através das análises das informações disponíveis no banco de dados do transcriptoma de *P. brasiliensis* (<https://www.biomol.unb.br/Pb>) (Felipe *et al.*, 2003) tem a sequência deduzida de aminoácidos e a região correspondente à proteína recombinante, obtida por expressão heteróloga, demonstradas na Figura 6.

[illegible]

5.2 - Expressão heteróloga e obtenção da proteína recombinante rPbGel2p

A partir do cDNA parcial codificante para *PbGel2p*, *PbAEST* 2375 (Castro *et al.*, 2005), a proteína recombinante pode ser obtida. A sequência de nucleotídeos do cDNA parcial correspondente à proteína recombinante, depositada no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), número de acesso AY340235, foi analisada com o algoritmo BLASTp e os resultados evidenciaram que a proteína parcial, mostrada na Figura 6, tem 57 % (156/272) de identidade com a sua homóloga Gel2p de *Aspergillus fumigatus*. A sequência parcial do cDNA depositado apresentou as seguintes características: região N-terminal incompleta; única ORF (quadro de leitura aberto) de 949pb e a região 3' UTR (regiões não traduzidas) de 658pb. Com base na sequência do cDNA parcial, oligonucleotídeos foram construídos e um fragmento correspondente à 662 pb foi clonado no vetor de expressão pGEX-4T-3 para obtenção da proteína recombinante fusionada à GST (Glutathione S-Transferase: 26 kDa) apresentando massa molecular predita de 51 kDa (Figura 7). A proteína recombinante fusionada à GST, excisada do gel de poliacrilamida, foi utilizada para produção de anticorpo policlonal anti-*PbGel2p*.

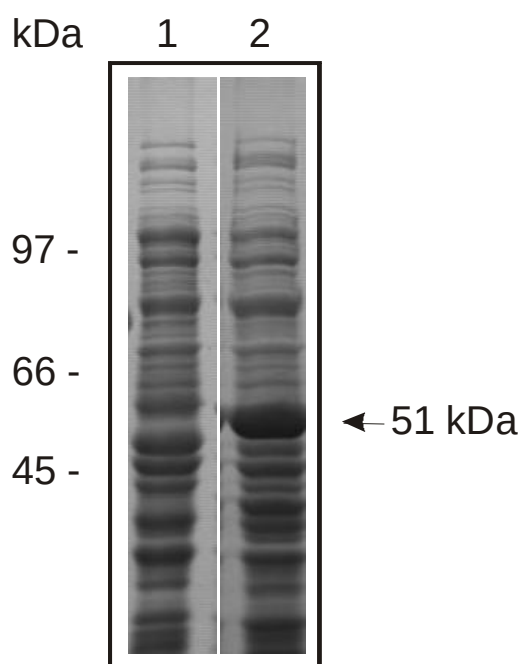


Figura 7 - Expressão heteróloga da *PbGel2p*. Células de *E.coli* da linhagem DH5 α foram transformadas com pGEX-4T-3-*PbGel2* crescidas na ausência (1) e presença (2) de 0,4 mM de IPTG. As células foram coletadas por centrifugação, ressuspensas em PBS 1X e uma alíquota foi analisada em gel SDS-PAGE 9 %. As proteínas foram coradas com azul de Comassie. Marcadores de massas moleculares são indicados.

5.3 - Identificação de *PbGel2p* no proteoma de *P. brasiliensis*

As proteínas totais das fases de levedura e micélio de *P. brasiliensis* foram obtidas e, após separação eletroforética em gel SDS-PAGE 12%, foram transferidas para membrana de nylon (Figura 8). As proteínas foram incubadas com anticorpo policlonal anti-*PbGel2p*, na diluição 1:2000 e a reação foi revelada com BCIP/NBT. Como demonstrado, *PbGel2p* apresentou massa molecular de 55 kDa e foi detectada nos extratos de *P. brasiliensis*, com maior quantidade na fase miceliana do fungo. Nenhuma reatividade cruzada foi detectada no controle negativo no qual foi utilizado soro pré-imune do coelho.

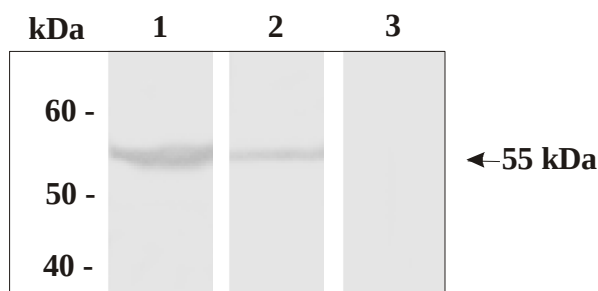


Figura 8- Análise através de Western blotting da proteína nativa *PbGel2* no extrato protéico de *P. brasiliensis* nas fases de micélio e leveduriforme. As amostras foram separadas em gel SDS-PAGE 12% e transferidas para membrana de nylon. As membranas foram reagidas com o anticorpo anti-r*PbGel2p* e a reação revelada por adição de BCIP-NBT. (1) Micélio; (2) Levedura; (3) Soro pré-imune. Massas moleculares são indicadas.

5.4 - Análise quantitativa de transcritos em tempo real durante a transição dimórfica e sob condições de estresse da parede celular

Os RNAs obtidos de células na fase de micélio, em diferenciação para leveduras nos tempos de 22 e 48 h e leveduriformes de *P. brasiliensis* foram extraídos do isolado Pb01. Moléculas de cDNA correspondentes foram sintetizadas através de RT-PCR (sistema de transcrição reversa) e, então, utilizadas para estimar os níveis relativos do transcrito codificante para *PbGel2p*, através da técnica de PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR). Os valores da expressão do transcrito foram normalizados utilizando-se os valores de expressão do gene constitutivo codificante para a proteína tubulina, em triplicatas. Os resultados mostram que a expressão do transcrito que codifica para *PbGel2p* (Figura 9) foi quatro vezes maior na fase de micélio, decrescendo significativamente durante a transição dimórfica para a fase leveduriforme do fungo (Figura 9).

Após 6 dias de transição morfológica induzida pela temperatura, as células de *P. brasiliensis* foram submetidas ao tratamento com agentes químicos desestabilizantes de parede celular, durante 1 e 3 h, a fim de se estimar os níveis relativos de expressão do transcrito codificante para *PbGel2p*, sob tais condições (Figura 10). Os compostos CFW - Calcofluor White, CR - Congo Red e SDS - Dodecil Sulfato de Sódio foram utilizados como estressores da parede celular nas concentrações de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e 0,015 %, respectivamente. Os resultados mostraram que após 1 h de tratamento com os agentes, os níveis relativos de expressão do transcrito foram significativamente maiores, comparado ao controle. Após 3 h de tratamento, os níveis relativos de expressão do transcrito diminuíram em todas as células tratadas com os desestabilizantes de parede celular (Figura 10).

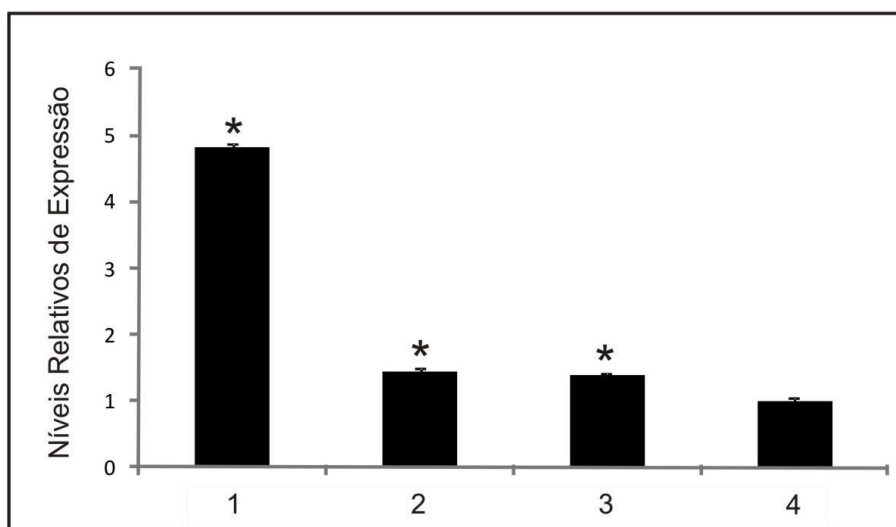


Figura 9 – Expressão do transcrito que codifica para *PbGel2p* como determinado por qRT-PCR durante a transição dimórfica. Os níveis de expressão do transcrito na fase miceliana (1), nos tempos de 22 (2), 48 h (3) e 6 dias após a mudança da temperatura (4), são mostrados. Os valores de expressão do transcrito foram padronizados utilizando valores de expressão do gene constitutivo que codifica para a proteína tubulina. Os níveis de expressão foram calculados pelo método de curva padrão relativa. Os desvios padrão são apresentados advindos de triplicatas. * Expressão diferencialmente significativa ($P \leq 0,05$).

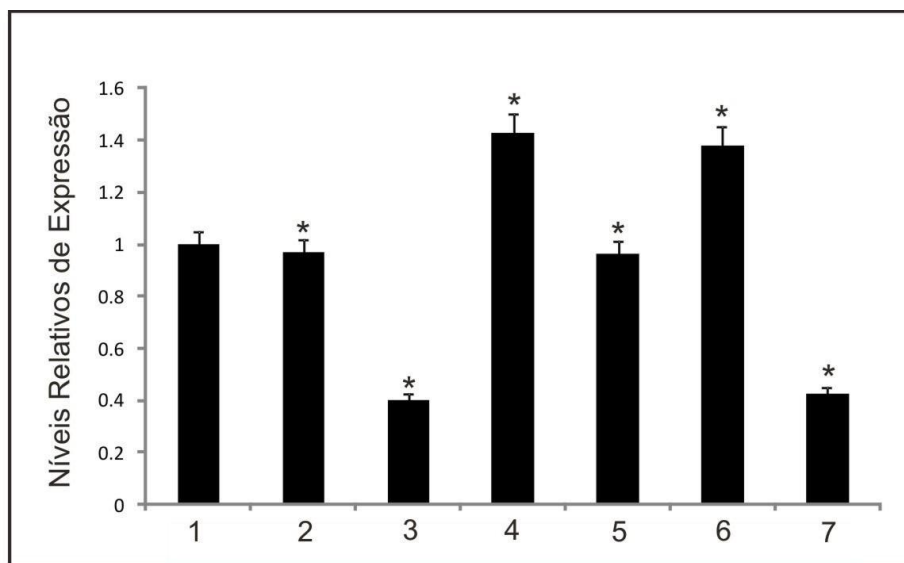


Figura 10 - Expressão do transcrito que codifica para *PbGel2p* como determinado por qRT-PCR sob condições de estresse da parede celular. Os níveis de expressão do transcrito durante o tratamento das células após 6 dias da mudança de temperatura com os agentes estressores de parede celular CFW - Calcofluor White, CR - Congo Red e SDS - Dodecil Sulfato de Sódio, são mostrados. A forma miceliana de *P. brasiliensis*, após 6 dias de diferenciação para forma leveduriforme, foram submetidas aos agentes químicos estressores da parede celular durante 1 e 3h. (1) Células com 6 dias de diferenciação após a mudança da temperatura; (2) CFW, 1 h; (3) CFW, 3 h; (4) CR, 1 h; (5) CR, 3 h; (6) SDS, 1 h; (7) SDS, 3 h. Os valores de expressão do transcrito foram padronizados utilizando-se valores de expressão do gene constitutivo que codifica para a proteína tubulina. Os níveis de expressão foram calculados pelo método de curva padrão relativa. Os desvios padrão são apresentados advindos de triplicatas. * Expressão diferencialmente significativa ($P \leq 0,05$).

5.5- *PbGEL2* restaura o fenótipo nulo mutante para *GAS1* (Δ *GAS1*) em células de *S. cerevisiae*

O cDNA completo codificante para *PbGel2p* de *P. brasiliensis*, com 1416 pb, foi clonado no vetor pYES2 e expresso, sob o controle do promotor GAL1, na linhagem Δ *GAS1* (mutante de *GAS1* em *S. cerevisiae*). A proteína *Gas1* é homóloga à *PbGel2p*. A expressão resultou em um fenótipo que foi analisado em meio contendo galactose (meio de indução). Através da taxa de crescimento específica e tempo de duplicação celular (taxa de crescimento das células versus o tempo), foi demonstrado que *PbGEL2* restaurou o crescimento lento das células Δ *GAS1* nas células mantidas tanto em meio não tamponado quanto em meio tamponado (Figura 11, painel A). As células expressando *GEL2* (Y*GEL2*) tiveram um resgate parcial do crescimento, em meio não tamponado, com taxa de crescimento de 2 h 45 min. Esse valor foi próximo ao das células Δ *GAS1*, com taxa de 3 h, e um pouco distante do valor das células do tipo selvagem, 1 h 45 min. Em meio tamponado, a taxa de crescimento teve valores próximos aos das células do tipo selvagem (resgate total) e a taxa aumentou conforme o aumento do pH (células do tipo selvagem: 2 h 20 min/ Y*GEL2*: 2 h 30 min/ Δ *GAS1*: 4 h).

É conhecido que mutantes para *GAS1* de *S. cerevisiae* apresentam decréscimo na quantidade de β -1,3-glicana na parede celular e efeitos compensatórios são induzidos com a finalidade de restaurar a composição da parede celular com o aumento do polissacarídeo quitina e de manoproteínas. Esse defeito resulta em uma morfologia celular alterada, falha na separação celular, taxa reduzida de crescimento e sensibilidade a certos compostos químicos (Popolo *et al.*, 1997). A análise fenotípica da linhagem Y*GEL2* e sua morfologia celular foram, também, realizadas nos meios não tamponado e tamponado, ambos suplementados ou não com os agentes químicos CW (Calcofluor White) e SDS (Dodecil Sulfato de Sódio). A finalidade desse ensaio foi testar a sensibilidade de todas as linhagens levando-se em consideração que para o mutante nulo *GAS1* Δ , o aumento no nível de quitina também determina a hipersensibilidade à presença de CW (Valdivieso *et al.*, 2000). Como

resultado, em células da linhagem YGEL2 crescidas no meio com galactose/ pH 6.5 suplementado com 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de CW, *PbGEL2* aboliu completamente a hipersensibilidade ao CW das células *GAS1Δ* (Figura 11, painel B). No meio não tamponado com adição deste composto, YGEL2 não restaurou o fenótipo mutante, pois o tamponamento do meio parece necessário para ação da enzima sob condições que perturbam a parede celular (Figura 11, painel B).

O CW também foi utilizado em experimentos realizados por microscopia para visualização da quitina e consequente morfologia celular. Após a coloração das células de *S. cerevisiae* por CW, as células YGEL2 mostraram fluorescência pontuada nos locais de brotamento (divisão celular) e junções das células mãe e filhas, abolindo a sensibilidade ao CW, similarmente ao padrão já conhecido para as células selvagens (Castro *et al.*, 2009; Valdivieso *et al.*, 2000). O oposto foi observado para as células *GAS1Δ* que apresentaram a quitina distribuída de forma heterogênea e sensibilidade ao composto. Além disso, as células complementadas com *PbGEL2* apresentaram morfologia regular (reassumindo a forma elipsoidal) e brotamentos mais definidos quando comparadas com as células *GAS1Δ* que apresentaram morfologia alterada, defeitos na maturação do broto e na separação celular (Figura 11, painel C).

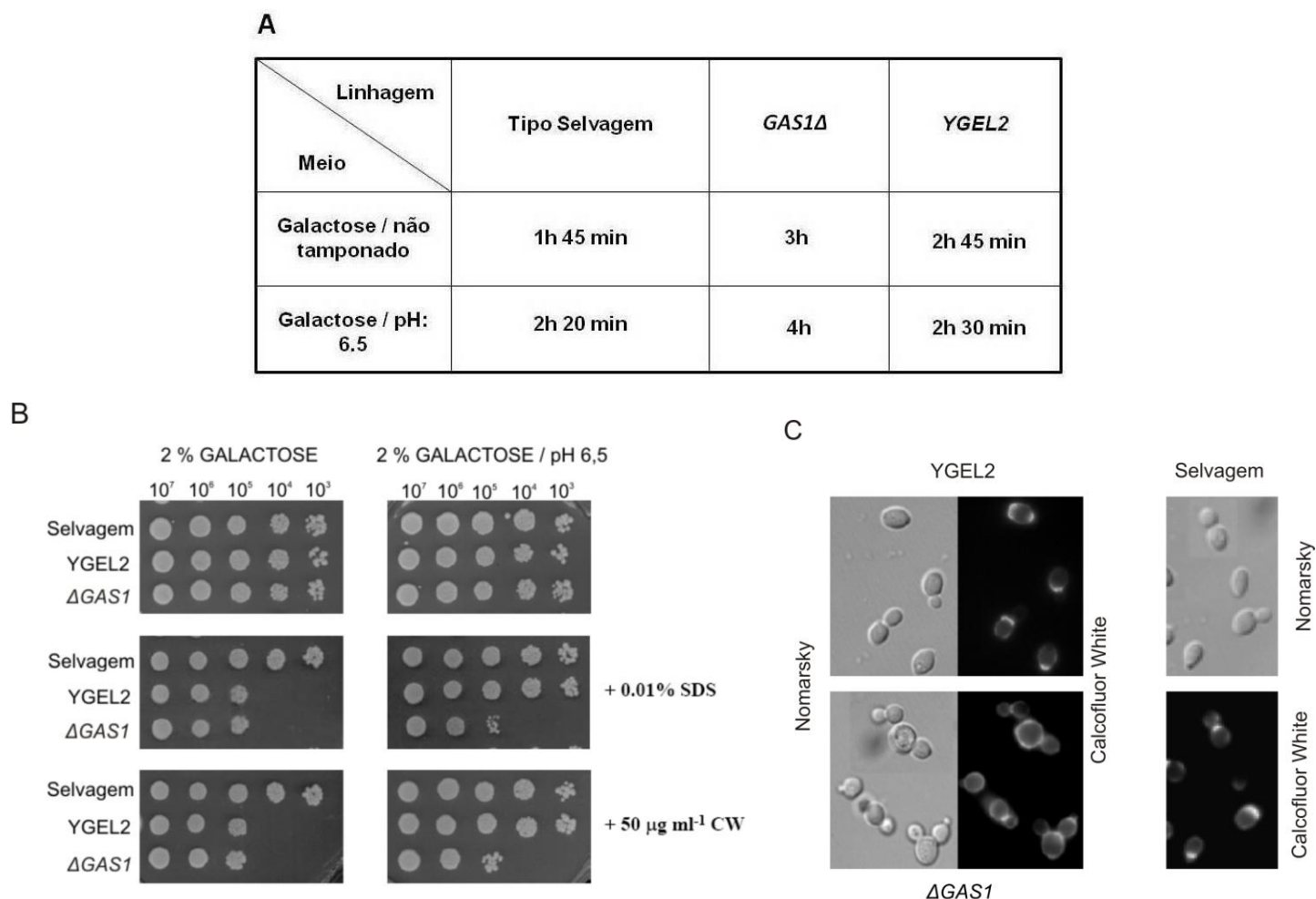


Figura 11 – A proteína Gel2p de *P. brasiliensis* complementa função em *ΔGAS1* de *S. cerevisiae*. (A) Taxa de crescimento das linhagens tipo selvagem, mutante para *GAS1* (*GAS1Δ*) e complementado com *PbGEL2* (*YGEL2*) de acordo com o meio de crescimento e pH. **(B)** Análise do crescimento das células de *S. cerevisiae* em crescimento exponencial em meio com 2 % de galactose /não tamponado e 2 % de galactose/ tamponado ambos suplementados ou não com CW e SDS. Um total de 5 μ l da suspensão de células da levedura (10^7 células / mL), das diferentes linhagens, foram plaqueadas (série de diluições de 10 vezes). **(C)** Células das linhagens *YGEL2* e *GAS1Δ* do meio com galactose/ pH 6,5 e suplementado com CW foram visualizadas através do microscópio de contraste de fase Nomarski e por microscopia de fluorescência para detecção da quitina. Células do tipo selvagem são mostradas ao lado. Para as taxas de crescimento foram utilizados o teste *t*-Student's sendo o nível da significância estatística com valor de $P \leq 0.01$.

5.6 - Detecção das interações intermoleculares da Gel2p de *P. brasiliensis* através da técnica de duplo-híbrido

O estudo de interações prováveis de *PbGel2p* com outras moléculas foi realizado pela técnica de duplo-híbrido rastreando proteínas da biblioteca de cDNA de *P. brasiliensis*. As linhagens Y187, contendo a isca (*PbGEL2*) e AH109, contendo a biblioteca de cDNA das células de levedura do fungo *P. brasiliensis*, foram incubadas para que a diploidia (acasalamento) ocorresse. As colônias crescidas em meio seletivo foram novamente selecionadas em meio mínimo adicionado de X-alfa-Gal (5-Bromo-4-Cloro-3-Indol-D-galactopiranosídeo), um substrato cromogênico (Figura 12). Esse ensaio com X-alfa-Gal monitora a ativação do gene MEL1 de *S. cerevisiae*, um gene GAL4-regulado, que codifica para a enzima alfa-galactosidase. O fator de transcrição GAL4 somente é funcional se os seus dois domínios, de ligação e de ativação, estiverem interagindo fisicamente. As colônias, dessa forma, adquirem coloração azul.

Do total de 37 colônias previamente selecionadas em meio mínimo QDO, dezoito foram obtidas em meio mínimo QDO suplementado com X-alfa-Gal. Para identificação dos genes que interagiram com *PbGel2*, os DNAs dos clones foram sequenciados. As sequências de DNA formaram 2 *Contigs* e 7 *Singlets* e foram comparadas com os bancos de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando a ferramenta BLASTX (Tabela1).

As possíveis interações protéicas foram confirmadas por co-imunoprecipitação (Figura 13). Os produtos gênicos de duas proteínas da biblioteca (presas) e de *PbGel2p* (isca) foram transcritos e traduzidos *in vitro* (Figura 13, A) possibilitando o ensaio de co-imuprecipitação das proteínas por meio do uso do anticorpo c-Myc o qual reconhece o epítopo c-Myc fusionado à isca (*PbGel2p*) (Figura 13, B). As proteínas SamB e Mad2B mostraram interação com *PbGel2p*. Controles negativos foram realizados usando o anticorpo c-Myc com as proteínas presas. Dessa forma, confirma-se a especificidade de ligação do anticorpo c-Myc com a *PbGel2p*.

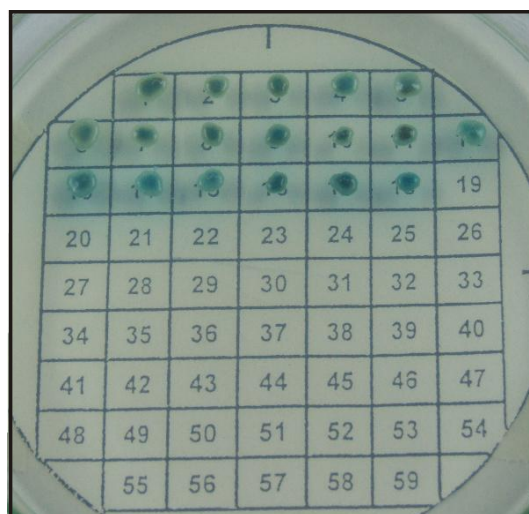


Figura 12- Seleção das leveduras expressando proteínas com provável interação com *PbGel2*. Após o cruzamento das linhagens Y187 (isca) e AH109 (biblioteca de cDNA de *P. brasiliensis*), as leveduras que apresentaram as construções híbridas (leveduras diplóides expressando proteínas que interagiram) e que foram selecionadas anteriormente em meio mínimo sem os aminoácidos adenina, leucina, histidina e triptofano (QDO), foram novamente selecionadas em meio mínimo adicionado de X-alfa-Gal. Um total de 18 colônias cresceram nesse meio confirmando as interações pela ativação do gene repórter MEL1 que codifica para α -galactosidase, uma enzima que degrada o X-alfa-Gal, tornando as colônias azuis.

Tabela 1: Proteínas preditas que interagem com PbGel2p, identificadas pelo sistema de duplo-híbrido em *S. cerevisiae*

Produto gênico	Organismo/número de acesso ^a	Valor de e ^b	Redundância	Provável função ^c
Antranilato sintase, componente 2	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> /EEH39399.1	0.0	4	Biossíntese do triptofano
Proteína hipotética conservada	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> /EEH36195.1	0.0	1	—
* SamB (domínio MYND)	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> /EEH40423.1	0.0	1	Morfogênese celular
*Mad2B	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> /EEH42014.1	0.0	1	Controle da divisão celular
Proteína com repetição WD	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> /EEH36866.1	0.0	1	Morfogênese celular
CpcB, complexo Beta da proteína G	<i>Ajellomyces capsulatus</i> / EEH07310.1	0.0	1	Morfogênese celular
Fosfatidilinositol-4-fosfato-5 quinase its 3	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> /EEH34952.1	0.0	1	Modulação da parede celular e citocinese

* Interações confirmadas por Co-imunoprecipitação

^a Número de acesso no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

^b Parâmetro estatístico que corresponde à probabilidade de se obter, com outra sequência aleatória de mesmo tamanho e composição de caracteres, outro alinhamento com *score* igual ou superior ao obtido previamente.

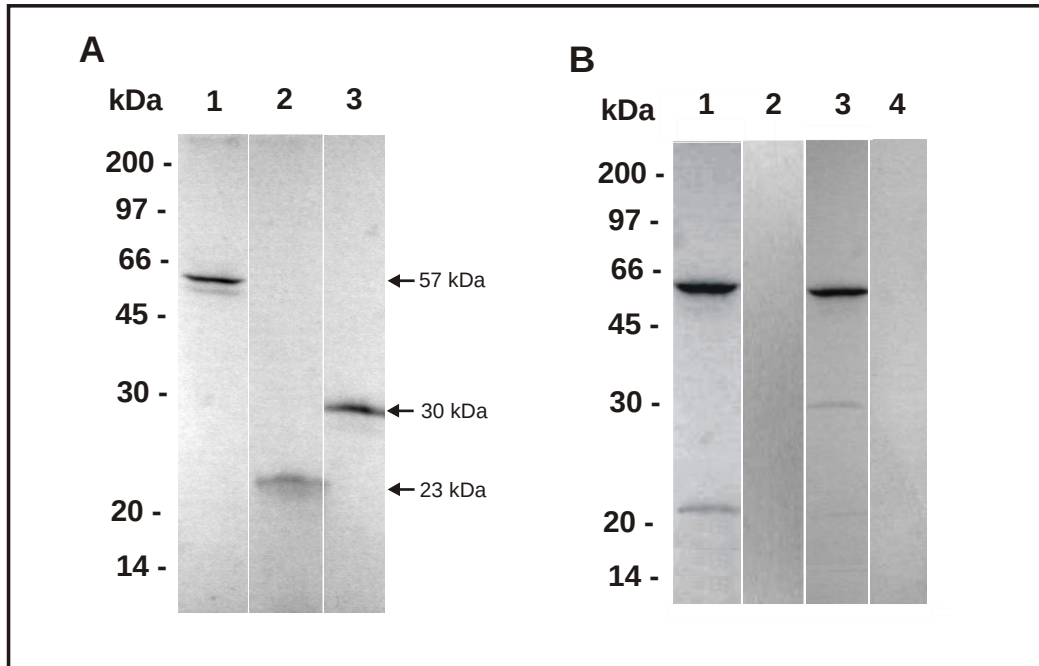


Figura 13- Co-imunoprecipitação das proteínas de *P. brasiliensis* que interagem com *PbGel2p*. (A) As proteínas foram sintetizadas *in vitro* e marcadas com metionina radioativa (^{35}S). A isca *PbGel2p* foi traduzida em fusão com o epítipo c-Myc (isca-c-Myc) e as proteínas presas, fusionadas com o epítipo hemaglutinina (presa-HA). 1-*PbGel2p*; 2-SamB e 3-Mad2B. (B) As proteínas traduzidas foram incubadas com a resina de proteína A, o anticorpo monoclonal anti-c-Myc e separadas por SDS-PAGE. Após fixação do gel e secagem à vácuo, a autoradiografia foi obtida. Os controles negativos para cada reação foram realizados. 1, SamB; 3, Mad2B; 2 e 4, respectivos controles negativos.

5.7- Ensaio de *Pull-down*: novas interações de *PbGel2p* com proteínas de *P. brasiliensis*

Com finalidade de se confirmar ou detectar novas interações protéicas entre *PbGel2p* e as proteínas de *P. brasiliensis* foi realizado o ensaio de *pull-down*. O produto da expressão dos plasmídeos, *rPbGel2p* fusionada a GST e somente a GST, foram ligados à resina de glutationa sefarose para o ensaio de *pull-down*. As proteínas foram incubadas com o extrato total de proteínas de células da fase leveduriforme de *P. brasiliensis*. Após eletroforese em gel e coloração pelo azul de Comassie, algumas proteínas observadas no ensaio com *PbGel2p* e não encontradas no controle foram removidas do gel para procedimento de identificação. Isso sugere a presença de interações proteína-proteína com a *PbGel2p* (Figura 14).

Do total de 8 proteínas removidas do gel SDS-PAGE 12%, digeridas com tripsina e identificadas por espectrometria de massas, três obtiveram parâmetros confiáveis de identificação demonstrando que possivelmente interagiram com *PbGel2p*, a qual também foi identificada. O ensaio de interações proteína-proteína preditas *in vitro* pela técnica do *pull-down* identificou as proteínas ATPase (subunidade alfa da ATPase) e HSP60 (proteína de choque térmico), que mostraram interação com *PbGel2p* (Figura 14).

Para identificação das proteínas resultantes do ensaio de *pull-down*, o algoritmo MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) foi utilizado e para identificação da proteína *PbGel2p* foi feito MS/MS sendo a busca feita pelo banco de dados do genoma estrutural do fungo *P. brasiliensis* (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis) (Tabela 2). Dessa forma, o ensaio de *pull-down* identificou novas interações protéicas envolvendo a β -1,3-glicosiltransferase 2 de *P. brasiliensis*.

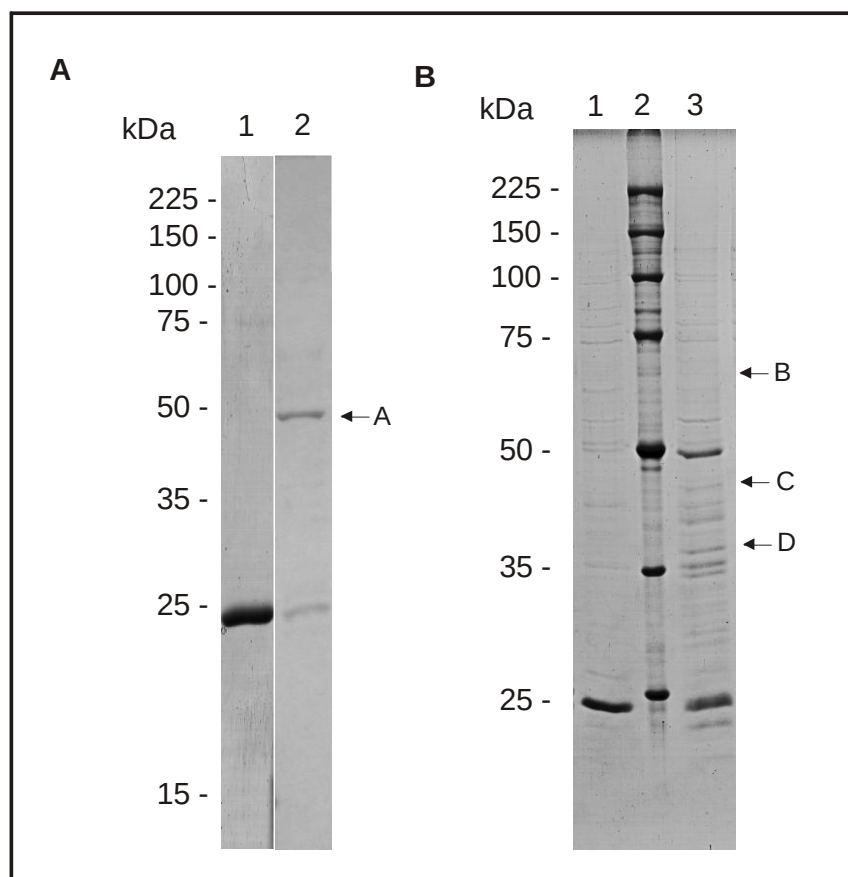


Figura 14 – Amostras de proteínas do ensaio de interações intermoleculares através da técnica *pull-down*. (A) Ligação das proteínas solúveis na resina de Glutathione Sefarose possibilitando o ensaio de *pull-down*. 1- GST; 2- rPbGel2p indicado pela letra A. (B) Ensaio de *pull-down*. 1- Proteínas ligadas à resina com GST, resultantes da incubação prévia do extrato total protéico de *P. brasiliensis*, com a finalidade de obtenção de um controle das ligações inespecíficas; 2- Marcador de massa molecular; 3- *Pul-down* com PbGel2p. As proteínas diferencialmente ligadas (controle) foram removidas do gel para identificação através de espectrometria de massas. As proteínas indicadas como B e C foram identificadas como a subunidade alfa da ATPase e a proteína de choque térmico (Hsp60), respectivamente e a D como proteína hipotética.

Tabela 2: Proteínas identificadas por espectrometria de massas: recombinante PbGel2p e interações detectadas após ensaio de pull-down

Proteína (Fig. 14)	Identificação	Organismo/número de acesso	Score/Cobertura	Provável função
A	β -1,3-glicosiltransferase 2	¹ <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb01/PAAG_05245.1	9.1/14.4%	Biossíntese e remodelamento da parede celular
B	ATPase, subunidade alfa	² <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb18/ gi 226291035	109/35%	Captação de nutrientes, homeostase de íons e respostas à estresses
C	Hsp60 (proteína de choque térmico)	² <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb01/ gi 6016259	135/46%	Enovelamento proteico e envolvimento na divisão celular
D	Proteína Hipotética	² <i>Saccharomyces cerevisiae</i> / gi 207343934	72/100%	—

¹ Número de acesso pelo banco de dados do genoma estrutural de *P. brasiliensis* (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis)

² Número de acesso pelo algoritmo MASCOT Peptide Mass Fingerprinting (<http://www.matrixscience.com>)

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Nas leveduras, a morfogênese e a biogênese da parede celular são dois processos ligados e mutuamente dependentes responsáveis pelas mudanças na forma celular durante todo ciclo de vida (Rolli *et al.*, 2009). No fungo dimórfico *P. brasiliensis* não é diferente. A parede celular, composta principalmente por proteínas, lipídeos, quitina e glicanas, muda durante todo dimorfismo celular. Há um favorecimento do remodelamento da membrana e da parede celular (Bastos *et al.*, 2007) e os principais componentes variam dependendo da fase e virulência do fungo (Kanetsuna & Carbonell, 1970). Uma das famílias de enzimas responsáveis pela biogênese e remodelamento da parede celular é a GH72, em que a β -1,3-glicosiltransferase 2 de *P. brasiliensis*, *PbGel2p*, ancorada por GPI na membrana plasmática, se insere. Essa enzima contribui para integridade da parede celular fúngica por atuar na elongação da β -1,3-glicana, um dos componentes mais abundantes da parede celular dos fungos. Forma-se uma rede fibrilar tridimensional na parede celular a fim de que outros polissacarídeos e proteínas possam ser ancoradas (Mouyna *et al.*, 2005). Neste estudo foi realizada a caracterização e análise funcional da β -1,3-glicosiltransferase 2 para que seu papel principal seja estabelecido, bem como novas funções, no fungo *P. brasiliensis*.

O alinhamento da sequência completa deduzida de aminoácidos correspondente à *PbGel2p* foi realizado utilizando-se ferramentas de bioinformática. *PbGel2p* apresentou homologia com proteínas da família 72 de glicosil hidrolases (GH72) que são ancoradas pela âncora glicosilfosfatidilinositol (GPI) na membrana plasmática e são proteínas associadas à parede celular, requeridas para sua correta morfogênese. Essas enzimas apresentam na região N-terminal um peptídeo sinal para endereçamento ao retículo endoplasmático e um domínio característico da família GH72. A região do sítio catalítico é conservada, apresentando dois resíduos do aminoácido glutamato, também conservados e essenciais para atividade enzimática. Além disso, na extremidade C-terminal, há um sítio para ligação da âncora GPI, característico dessas proteínas (Mouyna *et al.*, 2000a; Carotti *et al.*, 2004). A ausência do domínio Cys-Box, rico em cisteína, caracteriza *PbGel2p* como representante da subfamília GH72-, contendo a região C-terminal rica em serina/treonina

assim como algumas proteínas da família Gas de *S. cerevisiae* e a proteína Gel2 de *A. fumigatus*.

A partir do cDNA codificante para *PbGel2p*, o anticorpo policlonal anti-*PbGel2p* foi produzido. A identificação da *PbGel2p* no proteoma do fungo foi realizada através do perfil de expressão da proteína nas diferentes fases morfológicas do microrganismo, miceliana e leveduriforme. Por análises *Western blotting* verificou-se que o acúmulo da proteína *PbGel2* é maior na fase miceliana do fungo quando comparada com a leveduriforme. Esse resultado é consistente com a composição da parede celular do fungo, composta principalmente por β -1,3-glicana que, além de ser substrato para a enzima *PbGel2p*, é gradualmente substituído por α -1,3-glicana durante a transição da forma miceliana para leveduriforme (San Blas & San Blas, 1994). Ainda, a expressão relativa do transcrito que codifica para *PbGel2p*, foi maior na fase miceliana. Durante a transição dimórfica, os níveis relativos do transcrito diminuíram, em concordância com o observado a nível protéico. Esse resultado está de acordo com a mudança na quantidade de β -1,3-glicana na parede celular do fungo. Esses dados sugerem que *PbGel2p* provavelmente participa da manutenção e morfologia da parede fúngica.

Durante a transição dimórfica de *P. brasiliensis*, induzida pela temperatura, as células do fungo foram submetidas ao tratamento com agentes químicos desestabilizantes de parede celular para que os níveis relativos de expressão de transcritos que codificam para *PbGel2p*, sob tais condições, fossem estimados. Os resultados obtidos demonstraram que após 1 h da adição dos agentes estressores da parede celular, os níveis relativos do transcrito foram significativamente maiores, comparado ao controle. Sabe-se que os agentes químicos CFW (Calcofluor White) e CR têm afinidades por polissacarídeos da parede celular como a quitina e β -glicanas. Ambos se ligam à quitina da parede celular, porém alguns pesquisadores sugerem que o CFW preferencialmente se liga a quitina na parede celular dos fungos e o CR às β -glicanas, interferindo na construção e integridade da parede celular (Ram & Klis, 2006; Siafakas, *et al.*, 2007; Ogawa *et al.*, 1973). A adição do agente químico CR nas células de *P. brasiliensis* resultou em um aumento significativo no nível do transcrito, consistente com a preferência de ligação do composto químico CR ao

componente estrutural β -glicana da parede celular. Como a β -1,3-glicana é substrato para *PbGel2p*, a interação do composto químico com este carboidrato favoreceu o requerimento de maior quantidade de transcritos para essa molécula, na tentativa de restaurar os danos causados na parede celular. O SDS, um detergente aniônico que atua como desestabilizador protéico (Banks *et al.*, 2005), afetou a integridade da parede celular de forma que os níveis de transcritos referentes à *PbGel2p*, aumentaram significativamente após 1 h da adição do agente químico. Em relação ao CFW, não foi observado um requerimento preferencial de *PbGel2p* nos mecanismos de reparo da parede celular. Uma explicação seria a afinidade do composto pelas cadeias nascentes de quitina. Isso pode ter desencadeado o aumento da transcrição de outros genes que têm a quitina como substrato ou parte de vias biossintéticas durante o processo de restauração da parede. Por exemplo, em *Aspergillus niger*, o gene que codifica para proteína GfaA (glicosamina: glicose 6-fosfato amidotransferase), constituinte da via de biossíntese da quitina, apresentou um aumento significativo nos níveis de expressão do transcrito quando em contato com o composto químico estressor da parede celular CFW, após 1 h de tratamento. Esse resultado indicou que foi necessário um mecanismo compensatório de restaurar a integridade da parede celular sob condições de estresse (Ram *et al.*, 2004).

Em adição a essas análises, foi observado que os níveis relativos de expressão do transcrito que codifica para *PbGel2p*, diminuíram em todas as células, após 3 h de tratamento com os agentes estressores da parede celular. Esse resultado indica que o tempo do tratamento foi suficiente para que ocorressem a tradução e modificações pós-traducionais das proteínas, inclusive a *PbGel2p*, na tentativa de restaurar os danos na parede celular, resultando no menor requerimento da proteína. Todas essas respostas indicam o possível requerimento de *PbGel2p* para correta formação da parede celular como um mecanismo compensatório da célula sob condições de estresses, visto aqui por agentes químicos.

Estudos funcionais em *P. brasiliensis* têm sido limitados pela ausência de uma ferramenta molecular eficiente para a deleção de genes. A possível função de *PbGel2p* na biossíntese e morfogênese da parede celular foi investigada através do resgate *in vivo* do

fenótipo no mutante para o gene *GAS1* de *S. cerevisiae*. De fato, em *S. cerevisiae* a falta da proteína Gas1 e sua atividade β -1,3-glicosiltransferase, afeta drasticamente a proporção e o grau de interconexão dos constituintes da parede celular (Popolo *et al.*, 1997; Ram *et al.*, 1998). O fenótipo mutante para *GAS1* é caracterizado por taxa reduzida de crescimento, morfologia celular alterada (arredondada), sensibilidade ao agente químico CFW, aumento da secreção e permeabilidade da parede celular (Popolo & Vai, 1999; Vai *et al.*, 2000). Como resultado, *PbGel2p* restaurou parcialmente o fenótipo mutante para o gene que codifica para Gas1p nas células em meio não tamponado e totalmente nas células em meio tamponado (pH 6.5). As células mostraram taxa de crescimento similar a do tipo selvagem, morfologia celular elipsoidal, habilidade de crescimento em meio suplementado com CFW e SDS, além da quantidade e localização das moléculas de quitina distribuídas normalmente nas células. Esse resultado, foi similar ao encontrado para *PbGel3p*, da mesma família de proteínas glicosiltransferases de *P. brasiliensis* que, em condições similares, restaurou o crescimento lento das células *GAS1Δ* porém, em meios tamponados para dois valores de pH: 5.5 e 6.5 (Castro *et al.*, 2009). Esses resultados suportam a ideia de condições ótimas de pH para a atividade da *PbGel2p* como relatado para *PbGel3p*, Gas2 e Gas4p de *S. cerevisiae*, que tiveram atividades em valores de pH próximos da neutralidade (Castro *et al.*, 2009; Ragni *et al.*, 2007b). Relaciona-se essa característica, possivelmente às condições de crescimento de *P. brasiliensis* no ambiente e o pH dos nichos colonizados por este patógeno. De fato, as células leveduriformes não crescem abaixo do pH 3.6; a maioria dos isolados clínicos requerem o pH do meio de cultura acima de 5.6 e o estabelecimento da infecção nos tecidos do hospedeiro humano ocorre em valores de pH próximos da neutralidade (Franco, 1986; Sano *et al.*, 1997; Restrepo *et al.*, 2001).

Sabe-se ainda que para *GAS1Δ*, o decréscimo na quantidade de β -1,3-glicana na parede celular induz efeitos compensatórios a fim de restaurar a composição da parede celular, aumentando o polissacarídeo quitina e manoproteínas (Popolo *et al.*, 1997). Em células crescidas no meio com galactose/ pH 6.5 suplementado com 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de CFW, *PbGel2p* aboliu completamente a hipersensibilidade ao CFW das células *GAS1Δ*, restaurando os defeitos morfológicos característicos do mutante. Possivelmente, as células

do mutante apresentaram uma parede celular mais permeável à esse agente químico (Mouyna *et al.*,2005). No ensaio com o SDS (0.01 %), que destrutura a parede celular dificultando o crescimento das células *GAS1Δ* (Vai *et al.*,1996), YGEL2 mostrou a mesma sensibilidade das células selvagens. Esses resultados mostram que *PbGel2p* é funcional em *S. cerevisiae* suprimindo tanto defeitos morfológicos quanto respostas compensatórias pela falta de *Gas1p*. Resultados similares foram obtidos com *Gel1p* e *Gel2p* de *Aspergillus fumigatus*. *Gel1p* complementou parcialmente a funcionalidade de *GAS1Δ* de *S. cerevisiae* em meio suplementado com CFW, enquanto *Gel2p* complementou totalmente (Mouyna *et al.*,2005).

O sistema de duplo-híbrido em leveduras tornou-se uma das tecnologias mais comuns para detecção de interações por ser simples, rápida e barata (evita purificações protéicas dispendiosas e desenvolvimentos de anticorpos necessários em métodos bioquímicos tradicionais). Não há necessidade de conhecimento prévio sobre as proteínas para que o rastreamento seja realizado e o sistema pode ser usado em larga escala (MacDonald, 2001). Entretanto, a técnica tem algumas limitações. Algumas classes de proteínas não estão disponíveis para análise pelo sistema de duplo-híbrido. Por exemplo, ativadores transcricionais podem ativar a transcrição de genes repórteres sem nenhuma interação e gerar falsos positivos. Proteínas contendo domínios transmembrana hidrofóbicos podem atrapalhar o caminho da proteína até o núcleo. Outras proteínas podem requerer modificações por enzimas para que possam interagir com outras proteínas. Algumas interações podem, ainda, ativar genes repórteres sem que nenhuma interação proteína-proteína tenha acontecido: são os falsos positivos. Geralmente os falsos positivos são causados por iscas que atuam como ativadores transcricionais ou por proteínas iscas ou presas que podem afetar a viabilidade geral das colônias permitindo que cresçam em meio seletivo ativando os genes repórteres. Porém, múltiplos procedimentos têm sido desenvolvidos para identificar ou evitar os falsos positivos como a utilização de repórteres múltiplos, métodos independentes de testes específicos e repetições do ensaio para que o resultado seja mais confiável (Golemis, 2002).

Neste estudo, o ensaio de duplo-híbrido foi realizado para detectar proteínas de *P. brasiliensis* que mostraram interação com PbGel2p. PbGel2p deve estar localizada na membrana plasmática, assim como as proteínas PbGel3p, Gas1 e Phr1 (Cabezón *et al.*, 2009; Castro *et al.*, 2009). De fato, as proteínas da família em que PbGel2p pertence, foram descritas na membrana plasmática (Popolo *et al.*, 1988) e também ligadas covalentemente à parede celular via remanescente glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Yin *et al.*, 2005; Rolli *et al.*, 2009).

PbGel2p mostrou interação com o componente 2 da proteína antranilato sintase de *P. brasiliensis*. A enzima antranilato sintase é um oligômero formado por duas cadeias protéicas não idênticas designadas componente 1 da antranilato sintase (AS1) e componente 2 da antranilato sintase (AS2), presentes no citoplasma celular. AS1 cataliza a reação de conversão do corismato em antranilato, dependente de amônia. AS2, com função amidotransferase glutamina, se liga à glutamina e fornece a amônia para AS1 que sintetiza a molécula antranilato (Goto *et al.*, 1976; Tso *et al.*, 1980). A antranilato sintase é integrante da via biossintética do triptofano sendo sua atividade inibida pelo próprio produto final da via: o triptofano (*feedback negativo*).

Em *S. cerevisiae* a biossíntese de aminoácidos aromáticos, que inclui a do triptofano, é estritamente regulada (Braus, 1991). A via do triptofano é essencial para sobrevivência de plantas e microrganismos e não existe em humanos (Lin *et al.*, 2009). Um estudo recente sugeriu que a via do triptofano inicia um papel defensivo em plantas (Ishihara *et al.*, 2008; Niyogi *et al.*, 1992). Essa via está envolvida na produção de metabólitos secundários como a serotonina. O aumento na regulação da via do triptofano em folhas de arroz infectadas pelo fungo *Bipolaris oryzae*, resultou no aumento da atividade da antranilato sintase, do produto da via, o triptofano, e do metabólito secundário derivado dele, a serotonina. A serotonina acumulou-se na parede celular das folhas com o tecido lesionado indicando que o aumento da quantidade de triptofano está ligado ao aumento de serotonina e que essa modificação da parede celular é parte do sistema de defesa físico da planta. Ainda, a serotonina serviu como substrato para peroxidases que ao oxidá-la permitiu a formação de polímeros que funcionam como uma barreira física na

parede celular contra a infecção causada pelo fungo. Como o sistema de defesa físico via derivados do triptofano não tinha sido descrito anteriormente nas plantas, a deposição de serotonina na parede celular representa uma nova função da via do triptofano (Ishihara *et al.*, 2008). Em *Arabidopsis thaliana*, a subunidade alfa da antranilato sintase também está relacionada com o sistema de defesa da planta. Um dos genes que codifica para subunidade alfa da antranilato sintase, o AS1, é regulado pela demanda de metabólitos da via do triptofano. Sugere-se que o aumento na expressão de AS1, quando a planta está em contato com uma bactéria patogênica, é parte do sistema de defesa da planta e não está relacionado com o requerimento de aminoácidos durante esse processo de estresse. O sistema de defesa foi relacionado à produção de metabólitos secundários da via do triptofano que incluíram substâncias tóxicas como indol-3-metilglicosinolatos e indolfitoalexinas (Niyogi *et al.*, 1992). Possivelmente, a interação de PbGel2p com a antranilato sintase está envolvida em respostas às mudanças que ocorrem na parede celular durante diversos processos no fungo, incluindo o contato do fungo com a célula hospedeira. A enzima pode se envolver em vias de sinalização que resultam em algum sistema de defesa para o fungo, relacionado à parede celular, a primeira estrutura da célula que entra em contato com as células do hospedeiro.

A proteína SamB (*Suppressor of Anucleate Metulae*), mostrou interação com PbGel2p. A proteína SamB está envolvida no crescimento filamentosos em *Aspergillus nidulans* e esporulação em *Saccharomyces cerevisiae*. O crescimento celular é alcançado pela expansão isotrópica da célula ou extensão apical polarizada. Essas formas de crescimento contribuem para diferentes extensões durante a morfogênese fúngica (Kruger & Fisher, 1998).

Primeiramente, SamB foi caracterizada como uma proteína, conservada em ascomicetos, que participava na distribuição dos núcleos nos locais das células em divisão (brotamento/crescimento apical), assim como as proteínas ApSA e ApsB, supressoras de estruturas anucleadas, em fungos filamentosos e leveduras (Kruger & Fisher, 1996). Esse processo é essencial para que as células continuem o brotamento ou o crescimento apical. Porém, evidências sugeriram que SamB é uma proteína que está envolvida preferencialmente em vias de regulação da morfogênese nos ascomicetos. SamB participa

de vias de sinalização em que as proteínas quinase C (Pkc) e a Cdc28 de *S. cerevisiae* estão envolvidas. Cdc28 é uma proteína quinase necessária para o início do ciclo celular e Pkc é requerida para o crescimento do broto (Marini *et al.*, 1996).

Outra característica de SamB, é a presença de um domínio MYND na sua sequência. Homóloga à proteína Mub1 de *S. cerevisiae*, SamB possui uma região hidrofóbica na região N-terminal e esse domínio MYND, semelhante ao dedo de zinco, na C-terminal. Esse domínio sugere que SamB pode se ligar ao DNA. A proteína pode alternar sua localização entre o local de ramificação da hifa, no fungo filamentosos, ou no broto, da levedura, e o citoplasma. Sob certos estímulos, a proteína se realocaliza do citoplasma para o núcleo, se liga ao DNA e regula genes requeridos para indução do crescimento localizado (Kruger & Fisher, 1998). Mais estudos são requeridos nesse sentido, mas em *S. cerevisiae* a proteína Yap1 atua de forma semelhante, porém em resposta à estresses oxidativos (Kuge *et al.*, 1997). A deleção dos genes correspondentes à SamB em *A. nidulans* e Mub1 em *S. cerevisiae*, aumentou a frequência de ramificação do fungo filamentosos e formação de brotos prematuros na levedura indicando seu papel na correta morfogênese nos locais de crescimento polarizado em fungos ascomicetos, filamentosos e leveduras (Kruger & Fisher, 1998).

Bastos e colaboradores (2007) relataram o perfil de expressão de genes durante a diferenciação celular das células da fase miceliana do fungo *P. brasiliensis* para leveduriforme, através de análises *in silico* de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) resultantes do sequenciamento de DNA dos clones selecionados aleatoriamente (<https://dna.biomol.unb.br/Pb/>). SamB foi um dos novos genes identificados em *P. brasiliensis* e ao ser validado por RT-PCR semi-quantitativa (*Reverse transcription polymerase chain reaction*) apresentou maior teor de transcritos durante a transição, indicando sua função nos processos de morfogênese celular, evidente durante a transição dimórfica do fungo *P. brasiliensis* (Bastos *et al.*, 2007). Essa interação entre SamB e PbGel2p pode estar envolvida em respostas às mudanças requeridas para a correta morfogênese das células de *P. brasiliensis* durante a transição dimórfica e divisão celular.

A Mad2B foi outra proteína que mostrou interação com PbGel2p. A Mad2B (proteína reguladora do fuso mitótico - *Mitotic Arrest Defective*) foi identificada em várias espécies, inclusive a humana, sendo relacionada com o controle da divisão celular. O monitoramento da progressão do ciclo celular durante a mitose é determinado pelo controle de alguns pontos do ciclo com finalidade de preservação da integridade do DNA e prevenção da aneuploidia cromossomal. Vários componentes de um dos pontos de controle, o do fuso mitótico, foram identificados em *Saccharomyces cerevisiae* através do estudo do efeito de drogas que desestabilizam os microtúbulos. O fuso mitótico é formado pelo citoesqueleto que é formado principalmente por filamentos de actina e microtúbulos de tubulina. Um dos genes envolvidos nesse processo foi o que codifica para Mad2B (Li and Benezra, 1996; Zhang *et al.*, 2000; Van Den Hurk *et al.*, 2004).

A proteólise é um dos eventos críticos que regulam o ciclo celular. Um importante mediador desse processo associado ao ciclo celular é o complexo promotor da anáfase (CPA). Durante a mitose, o CPA controla transições do ciclo e a regulação da sua atividade é essencial para a progressão ordenada do ciclo celular. O CPA é responsável pela ubiquitilação e proteólise de proteínas como as ciclinas e outros reguladores da mitose. O alvo do complexo promotor da anáfase é a checagem da construção do fuso mitótico como um mecanismo de controle até que todos os cromossomos estejam alinhados na metáfase. Assegura-se, desse modo, a fidelidade na separação das cromátides irmãs pelo monitoramento da ligação do fuso mitótico nos cinetócoros prevenindo a progressão prematura do ciclo para a anáfase (Chen *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1998). A atividade do complexo promotor da anáfase é controlada por três proteínas: Mad2B, Cdc20 (ciclo de divisão celular) e Cdh1 (homólogo da proteína Cdc20 da divisão celular). A Mad2B inibe o complexo *in vitro* (Chen & Fang, 2001) enquanto que Cdc20 e Cdh1 ativam (Fang *et al.*, 1998a, 1998b). Assim que a construção do fuso mitótico inicia-se, Mad2B interage com Cdc20 e Cdh1, impedindo indiretamente a progressão prematura da metáfase para anáfase porque Cdc20 não consegue ativar o complexo promotor da anáfase (CPA) (Fang *et al.*, 1998b). Depois da anáfase, a degradação de algumas ciclinas leva a célula para a fase da

citocinese (King *et al.*, 1995). De fato, tal mecanismo de controle da divisão celular foi relatado nas leveduras (Muhua *et al.*, 1998).

Mad2B mostrou ter um outro papel independente da inativação do complexo promotor da anáfase. Mad2B, também conhecida como Rev7, um homólogo de *S. cerevisiae*, representa uma subunidade da DNA polimerase que passa por translesões na fita de DNA permitindo a replicação em locais que foram lesionados por agentes tais como a UV (luz ultravioleta). Desse modo, Mad2B pode atuar coordenando respostas do ciclo celular aos danos na molécula de DNA a nível de replicação do DNA e nos reguladores principais do ciclo celular (Zhang *et al.*, 2007). Mad2B, fusionada à proteína verde fluorescente (GFP), se localiza no citoplasma, especificamente no fuso mitótico, em análises de co-localização de Mad2B com a proteína Ran (pequena GTPase que regula o ciclo celular), com a qual mostrou interação durante o ciclo celular (Medendorp *et al.*, 2009).

A interação de *PbGel2p* com Mad2B é uma indicação de um dos mecanismos de controle da divisão celular. A organização do citoesqueleto é um processo essencial para que a célula, por exemplo, em brotamento, se divida corretamente. Além disso, Mad2B pode coordenar respostas do ciclo celular referentes às mudanças na estrutura da parede celular contribuindo para um arranjo geral da célula em desenvolvimento.

PbGel2 mostrou interação com uma proteína com repetições WD, de *P. brasiliensis*. As repetições WD40 são motivos curtos de 40 aminoácidos frequentemente terminados com o dipeptídeo triptofano-aspartato (W-D). As proteínas com repetições WD são parte de uma ampla família encontrada em todos os eucariotos que servem como plataforma para construção de complexos protéicos ou mediadores de interações entre proteínas (<http://pfam.sanger.ac.uk/family?acc=PF00400>). No geral, essas proteínas estão associadas a diversos processos celulares, incluindo formação do fuso mitótico (de Hostos *et al.*, 1991), regulação transcricional, processamento de RNA (Williams *et al.*, 1991; Hoey *et al.*, 1993), regulação da formação e tráfego de vesículas (Pryer *et al.*, 1993) e controle da divisão celular (Feldman *et al.*, 1997).

A proteína Cdc20 (*Cell Division Cycle*), encontrada em *P. brasiliensis*, é uma proteína com repetição WD40 que interage com Mad2B, podendo ser uma das prováveis proteínas com repetições WD que mostrou interação com PbGel2p. Essa proteína contém o motivo característico da família das proteínas WD e durante a regulação da divisão celular pelo complexo promotor da anáfase (CPA), interage com a Mad2B. A proteína Cdc20, em um dos passos do processo de proteólise das proteínas durante a mitose, contribui para a ligação da ubiquitina nas proteínas que mantêm o ciclo celular na metáfase sendo, portanto, degradadas. Desse modo, há regulação do progresso do ciclo celular que progride para anáfase e citocinese nas leveduras (Schuyler & Murray, 2009).

A proteína Rack1 (Receptora da quinase C1 ativada) também é da família de proteínas com repetições WD40 (Ron *et al.*, 1994). Rack1 tem homologia com a subunidade beta das proteínas G heterotriméricas (Dell *et al.*, 2002) e por se localizar em vários locais na célula tais como membrana plasmática, citoesqueleto e ribossomo (Mochly-Rosen & Kauvar, 1998; Won *et al.*, 2001; Nilsson *et al.*, 2004), pode ter interagido com PbGel2p. O estudo da proteína Rack1 de *Caenorhabditis elegans* sugere que a proteína contribui para invaginação da membrana e divisão celular via reciclagem dos endossomos facilitando a dinâmica de endomembranas durante a citocinese (Ai *et al.*, 2009). Na citocinese, vias do tráfego e remodelamento da membrana coordenam a dinâmica dos componentes dessa organela, tais como os lipídeos e proteínas (Albertson *et al.*, 2005). No final da citocinese, uma membrana elaborada juntamente com a correta construção do citoesqueleto de actina e microtúbulos, permite que a célula mãe se separe das células filhas corretamente (Skop *et al.*, 2001). Além disso, Rack1 é requerida para separação dos cromossomos e comprimento do microtúbulo astral por se localizar nos centrossomos, cinetócoros, citoesqueleto (interage com a dineína) (Zhang *et al.*, 2008) e envelope nuclear durante o ciclo celular (Ai *et al.*, 2009).

Outras proteínas da família WD, são as que se ligam às histonas, associadas com o DNA. Recentemente, a proteína Pwp1p de *S. cerevisiae*, uma proteína com repetição WD40, mostrou interação com a histona H4 em ensaios *in vivo*. Pwp1 se associa à cromatina de DNA ribossomal (DNAr) de maneira dependente da histona H4, regulando a

transcrição de RNAs ribossomais (Suka *et al.*, 2006). A elucidação da proteína Gas1p de *S. cerevisiae* como participante do silenciamento transcricional, reforça as diferentes funções de muitas proteínas. Gas1p, homóloga à Gel2p de *P. brasiliensis*, é essencial para morfogênese de *S. cerevisiae* ao participar da biogênese e construção da parede celular, mas sua função no silenciamento gênico é a mais nova descoberta do seu papel na célula (Koch & Pillus, 2009).

Dessa forma, *PbGel2p* poderia mostrar interação com proteínas com repetição WD durante processos de divisão celular nos processos de controle do fuso mitótico e indiretamente em funções no silenciamento transcricional. Assim, vias de sinalização podem ser ativadas para organização do citoesqueleto. Como resultado, a célula, juntamente com a correta formação da parede celular, prossegue nos processos de divisão celular sem danos em sua estrutura.

A CpcB (subunidade beta da proteína G) mostrou interação com *PbGel2p*. Interessantemente, essa proteína é parte da família das proteínas G com repetições WD. Em animais e leveduras algumas pequenas proteínas G e proteínas G heterotriméricas estão localizadas na membrana plasmática (Yuyama *et al.*, 2007). As membranas plasmáticas, nas células de animais e leveduras, contêm proteínas que estão envolvidas na regulação de vias de transdução de sinais tais como endocitose, exocitose, secreção protéica, apoptose e regulação do citoesqueleto de actina (Simons & Toomre, 2000). As proteínas G são compostas por três subunidades: alfa, com atividade GTPase, beta e gama, formando um complexo. CpcB (subunidade beta da proteína G) é homóloga às proteínas Cpc2 (subunidade beta da proteína G) e Rack1 (Receptora da quinase C ativada) de *S. cerevisiae*, todas representantes da família de proteínas com repetições WD40. A Cpc2 é uma proteína que atua, provavelmente, como receptora da proteína quinase C (Pkc) na regulação da organização do citoesqueleto de actina durante a síntese e morfogênese da parede celular (Albuquerque *et al.*, 2008). De fato, a proteína Rkp1 de *Schizosaccharomyces pombe*, homóloga à Rack1 (Receptora da quinase C1 ativada), CpcB e Cpc2 mostrou interação com Pck2, uma proteína quinase C, *in vivo* e *in vivo*. Foi proposto que Rkp1 funciona como receptora de Pck2 em vias de regulação da organização do citoesqueleto de actina durante a

síntese da parede celular e morfogênese de *S. pombe* (Won *et al.*, 2001). *PbGel2p* mostrou interação com *CpcB* demonstrando possivelmente participação do controle da organização do filamentos de actina e consequentemente do citoesqueleto de *P. brasiliensis* ao interagir com *CpcB* no qual ativa vias relacionadas com esse processo.

A proteína fosfatidilinositol-4-fosfato-5-quinase *its3* também mostrou interação com *PbGel2p*. Nas leveduras, as fosfatidilinositol fosfato quinases (PIPKs-*Phosphatidylinositol phosphate kinases*) são similares às PIPKs de mamíferos. Na levedura de fissão *Schizosaccharomyces pombe* o gene *ITS3* codifica para a proteína fosfatidilinositol-4-fosfato-5-quinase *Its3* (PI4P5K *Its3*) (Santarius *et al.*, 2006) homóloga à PI4P5K de *P. brasiliensis*. Essa proteína é requerida no processo da citocinese celular (Zhang *et al.*, 2000).

Proteínas da família fosfatidilinositol-4-fosfato-5-quinase, ancoradas pela âncora de GPI, com repetições WD-40 (similar a proteína *Cwf8* que controla o ciclo celular), proteína ligadora de GTP e as HSPs 70 e 90, são descritas localizadas na membrana plasmática e envolvidas em vários processos de sinalização em células animais, leveduras e plantas (Fujiwara *et al.*, 2009). Pesquisas indicam que PI4P5K *Its3* converte fosfatidilinositol-4-fosfato (PI(4)P) em fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PI(4,5)P₂). O produto, PI(4,5)P₂, ativa *Rgf1* que modula *Rho1*. *Rho1* é uma pequena GTPase localizada nas membranas (Deng *et al.*, 2005; Cabezon *et al.*, 2009) ou citosol. Como resultado, há modulação da integridade celular através de diversas redes de sinalização (Deng *et al.*, 2005). *Rgf1* é uma GEF (fatores de troca do nucleotídeo guanina) que está envolvida na formação da parede celular e septo além de coordenar a polarização celular através da biogênese da parede celular nas leveduras de fissão ao ativar *Rho1* (Garcia *et al.*, 2006). A GTPase *Rho1*, em fungos patogênicos, regula a β -1,3-glicana sintase em *C. albicans* (Kondoh *et al.*, 1997), *A. fumigatus* (Beauvais *et al.*, 2001), *C. neoformans* (Tanaka *et al.*, 1999) e *P. brasiliensis* (Amaral *et al.*, 2005) além de estar envolvida em processos de reorganização de filamentos de actina (Ridley & Hall, 1992). Mutantes para o gene *ITS3* resultam em desorganização do citoesqueleto e morfologia celular alterada além de acúmulo de PI(4)P (fosfatidilinositol-4-

fosfato) (Zhang *et al.*, 2000). Em *S. cerevisiae* Rho1 está envolvida em processos como a construção da parede celular e polaridade celular (Levin, 2005).

A interação da PI4P5K com *PbGel2p* possivelmente está relacionada com vias de sinalização que resultam na modulação da parede celular e da citocinese, uma vez que o produto da reação que a PI4P5K participa, o fosfatidilinositol-4,5-bifosfato é parte de uma rede de sinalização celular que geram respostas à esses processos.

Através do ensaio de *pull-down*, outras proteínas mostraram interação com *PbGel2p* além daquelas identificadas pela técnica do duplo-híbrido. Dependendo da interação, algumas técnicas limitam os resultados. Interações proteína-proteína estáveis são mais fáceis de serem detectadas por métodos físicos como o *pull-down* porque, por exemplo, complexos protéicos não se desfazem o tempo todo. As ligações inespecíficas podem ser minimizadas somente com o desenho de procedimentos que utilizem um controle e no geral, o ensaio de *pull-down* através das interações *in vitro* contribui para detecção das interações proteína-proteína de uma forma mais direta (Vikis & Guan, 2004).

A proteína Hsp60 (proteína de choque térmico) mostrou interação com *PbGel2p* através do ensaio do *pull-down*. A Hsp60 é altamente conservada entre os organismos, habilitando-os a responder a mudanças de temperatura e a outras condições ambientais adversas, assim como as outras Hsps, pelas funções no enovelamento protéico, translocações de proteínas e envolvimento na divisão celular. A Hsp60 de fungos, protozoários e bactérias, patogênicos, foi identificada como sendo antígeno de reconhecimento das células CD4⁺ do hospedeiro humano (Deepe *et al.*, 1996) e preparações de proteínas recombinantes derivadas de Hsp60 de patógenos foram utilizadas em vacinas em modelo animal (Gomez *et al.*, 1995; Soares *et al.*, 2008), demonstrando sua relevância para patogenicidade dos organismos. Em *Histoplasma capsulatum*, a Hsp60 foi encontrada como constituinte da superfície celular como uma adesina, mediando a interação entre células leveriformes do fungo e a célula hospedeira (Long *et al.*, 2003). Recentemente, a Hsp60 foi encontrada nas vesículas extracelulares de *H. capsulatum* (Albuquerque *et al.*, 2008) além de presente, assim como outras Hsps, na parede celular de fungos, podendo exercer funções similares daquelas encontradas no citoplasma (Chaffin *et al.*, 1998). A

expressão da Hsp60 nas células da levedura *S. cerevisiae* é relacionada à proteção das células contra estresses oxidativos (Cabisco *et al.*, 2002). Condições de estresse incluem danos nas estruturas celulares (Mager & Ferreira, 1993) e com as funções essenciais no enovelamento e translocações de proteínas, as Hsp60 tornam-se essenciais para a viabilidade dos organismos (Cabisco *et al.*, 2002). A interação da Hsp60 com PbGel2p provavelmente ocorre na parede celular e pode se relacionar às condições de mudança na estrutura da parede celular, por exemplo, durante a divisão e crescimento celulares ou até mesmo sob mudanças morfológicas, tais como ocorrem em *P. brasiliensis*. A atividade da Hsp60 provavelmente contribui para a manutenção da estrutura das proteínas da parede celular, contribuindo para sua integridade. Por ser uma molécula imunogênica, a interação de PbGel2p com a Hsp60 pode estar relacionado, de certo modo, com a patogenicidade de *P. brasiliensis*. Além disso, em *H. capsulatum*, a proteína Hsp60 e a β -1,3-glicosiltransferase 3 foram encontradas nas vesículas extracelulares produzidas pelo fungo. É possível que PbGel2p, homóloga da PbGel3p, mostre interação com a Hsp60 nessas estruturas celulares (ainda não descritas para *P. brasiliensis*).

A subunidade alfa da proteína ATPase de *P. brasiliensis* mostrou interação com PbGel2p. A ATPase da membrana plasmática de fungos e plantas hidrolisa ATP (adenosina trifosfato), originando ADP (adenosina difosfato) e Pi (fosfato inorgânico), além de bombear prótons para fora da célula (H^+ -ATPase). O gradiente eletroquímico H^+ resultante, gera energia para uma amplitude de sistemas de transporte secundários (Serrano, 1988). A ATPase tem sua atividade finamente regulada por requerimento de nutrientes, balanço osmótico, homeostase de íons e tolerância à estresses. De acordo com sua atividade, relaciona-se taxa de crescimento e respostas à estresses (Moskvina *et al.*, 1999). O número de íons transportados por ATP hidrolisado determina a capacidade dessa bomba de formar um gradiente eletroquímico. Consequentemente, o pH citosólico é ajustado e a energia gerada, utilizada para captação de nutrientes entre outros processos (de la Fuente *et al.*, 1997).

Um dos processos caracterizados de captação de nutrientes relaciona-se à glicose. A adição de glicose em células de *S. cerevisiae* mostrou que a ATPase da membrana foi

estimulada, aumentando o número de prótons transportados por ATP hidrolisado, demonstrando que a atividade hidrolítica do ATP pela ATPase da membrana plasmática é positivamente regulada por esse carboidrato. Na presença da glicose, a enzima é ativada por mecanismos transcricionais e pós-traducionais e o nível da atividade ATPase é aumentado nas células da levedura *S. cerevisiae* (Venema & Palmgren, 1995; Serrano, 1988). A nível de modificações pós-traducionais, a ATPase pode ser modificada por direta fosforilação da enzima ou por degradação proteolítica de ativadores da enzima, inibindo-a (Goossens *et al.*, 2000). Recentemente, foi demonstrado que proteínas quinases envolvidas na regulação de proteínas da membrana plasmática são relacionadas com a ATPase dessa membrana, após ativação induzida pela glicose. Foi proposto que a via de sinalização do fosfatidilinositol pode estar envolvida na ativação da ATPase da membrana plasmática relacionando-se à ativação da Pkc (proteína quinase C) nas células de *S. cerevisiae* (Brandão *et al.*, 1994). Desse modo, espera-se um sistema completo no processo de ativação da ATPase induzida pela glicose em que receptores específicos para glicose, proteínas G, sinais internos, fosforilação e ativação da enzima são parte do mecanismo de transdução de sinal trilhado pelo metabolismo dessa molécula (Souza *et al.*, 2001). Desde que a *PbGel2p* tem como substrato a β -1,3-glicana, possivelmente alongando esse carboidrato durante os processos de biogênese e integridade da parede celular de *P. brasiliensis*, a interação com subunidade alfa da ATPase da membrana plasmática torna-se interessante tanto pelo envolvimento da ATPase no processo de captação da glicose, substrato de enzimas que a convertem a β -1,3-glicana, utilizada pela *PbGel2p*, quanto pela ativação da ATPase sob condições de estresses na célula. Como a parede celular é uma estrutura dinâmica e passa por condições de estresse durante o ciclo de vida do fungo, a atividade da ATPase pode estar envolvida enquanto desencadeia-se respostas à tais condições na tentativa de manter a estrutura da parede celular íntegra. Dessa maneira, mecanismos de regulação da construção da parede celular tornam-se mais evidentes com a interação de *PbGel2p* e a ATPase de *P. brasiliensis*.

Interações moleculares que envolvem proteínas localizadas em compartimentos celulares próximos facilitam o entendimento dos mecanismos relacionados com cada

interação. Porém, as proteínas nem sempre estão no mesmo local na célula e nem desempenham papéis únicos. As proteínas *moonlighting* são únicas e possuem papéis múltiplos na célula (Jeffery, 2003). Desse modo, o entendimento dos possíveis mecanismos utilizados pelas proteínas em ensaios de interações protéicas torna-se facilitado, proporcionando explicação para a função de muitas proteínas recentemente identificadas.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que:

- A sequência de aminoácidos de *PbGel2p* apresenta uma sequência sinal, um motivo catalítico conservado, uma região rica em serina/ treonina seguido por uma região com sítio de ligação à âncora de GPI, o sítio ômega, caracterizando-a como representante da família GH72 e subfamília GH72 - .
- *PbGel2p* é mais abundante na fase miceliana de *P. brasiliensis* possivelmente devido a maior quantidade de β -glicana existente na parede celular do fungo nesta fase morfológica.
- *PbGel2p* possivelmente está envolvida na organização e integridade da parede celular de *P. brasiliensis*. Em células nas quais a parede celular necessita de remodelamento após tratamento com agentes químicos que as desestabilizam, *PbGel2p* é requerida durante mecanismos compensatórios de restauração dessa estrutura.
- *PbGel2p* pode ter papel funcional na manutenção da parede celular de *P. brasiliensis* uma vez que a proteína demonstrou, pelo ensaio de complementação gênica, capacidade em restaurar o fenótipo da linhagem mutante para o gene *GAS1* de *S. cerevisiae*, na presença de agentes desestabilizantes da parede celular.
- Através da técnica do duplo-híbrido e *pull-down*, *PbGel2p* mostrou interação com proteínas de *P. brasiliensis* indicando possíveis funções para a proteína além do envolvimento na biossíntese e remodelamento da parede celular do fungo.

PERSPECTIVAS

8. PERSPECTIVAS

As perspectivas deste trabalho são:

- Identificação da proteína nativa *PbGel2* no proteoma de *P. brasiliensis*.
- Análises proteômicas das proteínas ancoradas por GPI por meio da solubilização diferencial de proteínas da membrana plasmática de *P. brasiliensis* nas fases miceliana e leveduriforme, após tratamento com a enzima fosfolipase C.
- Ensaio de imunocitocalização da proteína *PbGel2p* em células de *P. brasiliensis* por microscopia eletrônica de transmissão.
- Confirmação de novos clones resultantes do ensaio de duplo-híbrido, por co-imunoprecipitação.

BIBLIOGRAFIA

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, D. J. (2004). Fungal cell wall chitinases and glucanases. **Microbiology** 150 (Pt 7): 2029-35.
- Ai, E., Poole, D. S. and Skop, A. R. (2009). RACK-1 directs dynactin-dependent RAB-11 endosomal recycling during mitosis in *Caenorhabditis elegans*. **Mol Biol Cell** 20(6): 1629-38.
- Albertson, R., Riggs, B. and Sullivan, W. (2005). Membrane traffic: a driving force in cytokinesis. **Trends Cell Biol** 15(2): 92-101.
- Albuquerque, P. C., Nakayasu, E. S., Rodrigues, M. L., Frases, S., Casadevall, A., Zancoppe-Oliveira, R. M., Almeida, I. C. and Nosanchuk, J. D. (2008). Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. **Cell Microbiol** 10(8): 1695-710.
- Almeida, A. J., Cunha, C., Carmona, J. A., Sampaio-Marques, B., Carvalho, A., Malavazi, I., Steensma, H. Y., Johnson, D. I., Leao, C., Logarinho, E., Goldman, G. H., Castro, A. G., Ludovico, P. and Rodrigues, F. (2009). Cdc42p controls yeast-cell shape and virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genet Biol** 46(12): 919-26.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Miller W, Lipman DJ (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.** 25: 3389-402.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. A. (1990). Basic local alignment search tools. **J. Mol. Biol.** 215:403-410.
- Amaral, A. C., Fernandes, L., Galdino, A. S., Felipe, M. S., Soares, C. M. and Pereira, M. (2005). Therapeutic targets in *Paracoccidioides brasiliensis*: post-transcriptome perspectives. **Genet Mol Res** 4(2): 430-49.

Anjos, A. R., Calvi, S. A., Ferracini, R., Peracoli, M. T., Silva, C. L. and Soares, A. M. (2002). Role of *Paracoccidioides brasiliensis* cell wall fraction containing beta-glucan in tumor necrosis factor-alpha production by human monocytes: correlation with fungicidal activity. **Med Mycol** 40(4): 377-82.

Bagagli, E., Bosco, S. M., Theodoro, R. C. and 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(5): 344-51.

Bagagli, E., Franco, M., Bosco Sde, M., Hebelers-Barbosa, F., Trinca, L. A. and Montenegro, M. R. (2003). High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. **Med Mycol** 41(3): 217-23.

Banks, I. R., Specht, C. A., Donlin, M. J., Gerik, K. J., Levitz, S. M. and Lodge, J. K. (2005). A chitin synthase and its regulator protein are critical for chitosan production and growth of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell** 4(11): 1902-12.

Bastos, K. P., Bailao, A. M., Borges, C. L., Faria, F. P., Felipe, M. S., Silva, M. G., Martins, W. S., Fiuza, R. B., Pereira, M. and Soares, C. M. (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.

Beauvais, A., Bruneau, J. M., Mol, P. C., Buitrago, M. J., Legrand, R. and Latge, J. P. (2001). Glucan synthase complex of *Aspergillus fumigatus*. **J Bacteriol** 183(7): 2273-9.

Boutin, J. A. (1997). Myristoylation. **Cell Signal** 9(1): 15-35.

Brandão, R. L., de Magalhaes-Rocha, N. M., Alijo, R., Ramos, J. and Thevelein, J. M. (1994). Possible involvement of a phosphatidylinositol-type signaling pathway in

glucose-induced activation of plasma membrane H(+)-ATPase and cellular proton extrusion in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochim Biophys Acta** 1223(1): 117-24.

Braus, G. H. (1991). Aromatic amino acid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a model system for the regulation of a eukaryotic biosynthetic pathway. **Microbiol Rev** 55(3): 349-70.

Brown, G. D. and Gordon, S. (2003). Fungal beta-glucans and mammalian immunity. **Immunity** 19(3): 311-5.

Brummer, E., Castaneda, E. and Restrepo, A. (1993). Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin Microbiol Rev** 6(2): 89-117.

Brymora, A., Valova, V. A. and Robinson, P. J. (2004). Protein-protein interactions identified by pull-down experiments and mass spectrometry. **Curr Protoc Cell Biol** Chapter 17: Unit 17 5.

Cabezón, V., Llama-Palacios, A., Nombela, C., Monteoliva, L. and Gil, C. (2009). Analysis of *Candida albicans* plasma membrane proteome. **Proteomics** 9(20): 4770-86.

Cabiscol, E., Belli, G., Tamarit, J., Echave, P., Herrero, E. and Ros, J. (2002). Mitochondrial Hsp60, resistance to oxidative stress, and the labile iron pool are closely connected in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem** 277(46): 44531-8.

Camargo, Z. P. and Franco, M. F. (2000). Current Knowledge on Pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Rev Iberoam Micol** 17: 41-48.

Caro, L. H., Tettelin, H., Vossen, J. H., Ram, A. F., van den Ende, H. and Klis, F. M. (1997). In silico identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast** 13(15): 1477-89.

Carotti, C., Ragni, E., Palomares, O., Fontaine, T., Tedeschi, G., Rodriguez, R., Latge, J. P., Vai, M. and Popolo, L. (2004). Characterization of recombinant forms of the yeast Gas1 protein and identification of residues essential for glucanosyltransferase activity and folding. **Eur J Biochem** 271(18): 3635-45.

Carotti C, Ragni E, Palomares O, Gissi C, Latgé J, Fontaine T, Popolo L. (2006). A Cys-enriched domain to a novel plant carbohydrate-binding module is essential for the glucan-transferase activity of a Phr/Gel/Gas protein sub family. In: **8th ASM Conference on Candida and Candidiasis**. Washington, DC: American Society for Microbiology, pp. 83.

Carrero, L. L., Nino-Vega, G., Teixeira, M. M., Carvalho, M. J., Soares, C. M., Pereira, M., Jesuino, R. S., McEwen, J. G., Mendoza, L., Taylor, J. W., Felipe, M. S. and San-Blas, G. (2008). New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. **Fungal Genet Biol** 45(5): 605-12.

Castillo, L., Calvo, E., Martinez, A. I., Ruiz-Herrera, J., Valentin, E., Lopez, J. A. and Sentandreu, R. (2008). A study of the *Candida albicans* cell wall proteome. **Proteomics** 8(18): 3871-81.

Castro, N. S., de Castro, K. P., Orlandi, I., Feitosa Ldos, S., Rosa e Silva, L. K., Vainstein, M. H., Bao, S. N., Vai, M. and Soares, C. M. (2009). Characterization and functional analysis of the beta-1,3-glucanosyltransferase 3 of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **FEMS Yeast Res** 9(1): 103-14.

Castro, S., Maia, Z. A., Pereira, M. and Soares, C. M. (2005). Screening for glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome. **Genet Mol Res** 4(2): 326-45.

Causier, B. and Davies, B. (2002). Analysing protein-protein interactions with the yeast two-hybrid system. **Plant Mol Biol** 50(6): 855-70.

Chaffin, W. L., Lopez-Ribot, J. L., Casanova, M., Gozalbo, D. and Martinez, J. P. (1998). Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. **Microbiol Mol Biol Rev** 62(1): 130-80.

Chen, R. H., Waters, J. C., Salmon, E. D. and Murray, A. W. (1996). Association of spindle assembly checkpoint component XMad2 with unattached kinetochores. **Science** 274(5285): 242-6.

Chatterjee, S. and Mayor, S. (2001). The GPI-anchor and protein sorting. **Cell Mol Life Sci** 58(14): 1969-87.

Chien, C. T., Bartel, P. L., Sternglanz, R. and Fields, S. (1991). The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. **Proc Natl Acad Sci U S A** 88(21): 9578-82.

Cipollina C, Vai M, Porro D & Hatzis C. (2007). Towards understanding of the complex structure of growing yeast populations. **J Biotechnol** 128: 393–402.

Corredor, G. G., Peralta, L. A., Castano, J. H., Zuluaga, J. S., Henao, B., Arango, M., Tabares, A. M., Matute, D. R., McEwen, J. G. and 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(3): 275-80.

Corte, A. C., Svoboda, W. K., Navarro, I. T., Freire, R. L., Malanski, L. S., Shiozawa, M. M., Ludwig, G., Aguiar, L. M., Passos, F. C., Maron, A., Camargo, Z. P., Itano, E. N. and Ono, M. A. (2007). Paracoccidioidomycosis in wild monkeys from Parana State, Brazil. **Mycopathologia** 164(5): 225-8.

de Groot, P. W., Brandt, B. W., Horiuchi, H., Ram, A. F., de Koster, C. G. and Klis, F. M. (2009). Comprehensive genomic analysis of cell wall genes in *Aspergillus nidulans*. **Fungal Genet Biol** 46 Suppl 1: S72-81.

de Groot, P. W., de Boer, A. D., Cunningham, J., Dekker, H. L., de Jong, L., Hellingwerf, K. J., de Koster, C. and Klis, F. M. (2004). Proteomic analysis of *Candida albicans* cell walls reveals covalently bound carbohydrate-active enzymes and adhesins. **Eukaryot Cell** 3(4): 955-65.

de Groot, P. W., Kraneveld, E. A., Yin, Q. Y., Dekker, H. L., Gross, U., Crielgaard, W., de Koster, C. G., Bader, O., Klis, F. M. and Weig, M. (2008). The cell wall of the human pathogen *Candida glabrata*: differential incorporation of novel adhesin-like wall proteins. **Eukaryot Cell** 7(11): 1951-64.

De Groot, P. W., Ram, A. F. and Klis, F. M. (2005). Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. **Fungal Genet Biol** 42(8): 657-75.

de Groot, P. W., Yin, Q. Y., Weig, M., Sosinska, G. J., Klis, F. M. and de Koster, C. G. (2007). Mass spectrometric identification of covalently bound cell wall proteins from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **Yeast** 24(4): 267-78.

de Hostos, E. L., Bradtke, B., Lottspeich, F., Guggenheim, R. and Gerisch, G. (1991). Coronin, an actin binding protein of *Dictyostelium discoideum* localized to cell surface projections, has sequence similarities to G protein beta subunits. **Embo J** 10(13): 4097-104.

de la Fuente, N., Maldonado, A. M. and Portillo, F. (1997). Glucose activation of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase requires the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. **FEBS Lett** 411(2-3): 308-12.

de Nobel, H., Ruiz, C., Martin, H., Morris, W., Brul, S., Molina, M. and Klis, F. M. (2000). Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slt2/Mpk1 MAP kinase and in an Slt2-mediated increase in FKS2-lacZ expression, glucanase resistance and thermotolerance. **Microbiology** 146 (Pt 9): 2121-32.

- Deepe, G. S., Jr., Gibbons, R., Brunner, G. D. and Gomez, F. J. (1996). A protective domain of heat-shock protein 60 from *Histoplasma capsulatum*. **J Infect Dis** 174(4): 828-34.
- Dell, E. J., Connor, J., Chen, S., Stebbins, E. G., Skiba, N. P., Mochly-Rosen, D. and Hamm, H. E. (2002). The betagamma subunit of heterotrimeric G proteins interacts with RACK1 and two other WD repeat proteins. **J Biol Chem** 277(51): 49888-95.
- Deng, L., Sugiura, R., Ohta, K., Tada, K., Suzuki, M., Hirata, M., Nakamura, S., Shuntoh, H. and Kuno, T. (2005). Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase regulates fission yeast cell integrity through a phospholipase C-mediated protein kinase C-independent pathway. **J Biol Chem** 280(30): 27561-8.
- Dohlman, H. G. (2002). G proteins and pheromone signaling. **Annu Rev Physiol** 64: 129-52.
- Fang, G., Yu, H. and Kirschner, M. W. (1998a). Direct binding of CDC20 protein family members activates the anaphase-promoting complex in mitosis and G1. **Mol Cell** 2(2): 163-71.
- Fang, G., Yu, H. and Kirschner, M. W. (1998b). The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation. **Genes Dev** 12(12): 1871-83.
- Feldman, R. M., Correll, C. C., Kaplan, K. B. and Deshaies, R. J. (1997). A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. **Cell** 91(2): 221-30.
- Felipe, M.S.S., Andrade, R.V., Petrofeza, S.S. *et al.* (2003) Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. **Yeast** 20: 263–271.

Felipe, M. S., Andrade, R. V., Arraes, F. B., Nicola, A. M., Maranhao, A. Q., Torres, F. A., Silva-Pereira, I., Pocas-Fonseca, M. J., Campos, E. G., Moraes, L. M., Andrade, P. A., Tavares, A. H., Silva, S. S., Kyaw, C. M., Souza, D. P., Pereira, M., Jesuino, R. S., Andrade, E. V., Parente, J. A., Oliveira, G. S., Barbosa, M. S., Martins, N. F., Fachin, A. L., Cardoso, R. S., Passos, G. A., Almeida, N. F., Walter, M. E., Soares, C. M., Carvalho, M. J. and Brigido, M. M. (2005). Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. **J Biol Chem** 280(26): 24706-14.

Fields, S. and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. **Nature** 340(6230): 245-6.

Fields, S. and Sternglanz, R. (1994). The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. **Trends Genet** 10(8): 286-92.

Fontaine, T., Simenel, C., Dubreucq, G., Adam, O., Delepierre, M., Lemoine, J., Vorgias, C. E., Diaquin, M. and Latge, J. P. (2000). Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. **J Biol Chem** 275(52): 41528.

Fontana, F. F., Dos Santos, C. T., Esteves, F. M., Rocha, A., Fernandes, G. F., do Amaral, C. C., Domingues, M. A., De Camargo, Z. P. and Silva-Vergara, M. L. (2010). Seroepidemiological survey of paracoccidioidomycosis infection among urban and rural dogs from uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Mycopathologia** 169(3): 159-65.

Franco, M. (1987). Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **J Med Vet Mycol** 25(1): 5-18.

Frieman, M. B. and Cormack, B. P. (2003). The omega-site sequence of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Saccharomyces cerevisiae* can determine distribution between the membrane and the cell wall. **Mol Microbiol** 50(3): 883-96.

Fujita, M. and Kinoshita, T. (2009). Structural remodeling of GPI anchors during biosynthesis and after attachment to proteins. **FEBS Lett.**

Fujiwara, M., Hamada, S., Hiratsuka, M., Fukao, Y., Kawasaki, T. and Shimamoto, K. (2009). Proteome analysis of detergent-resistant membranes (DRMs) associated with OsRac1-mediated innate immunity in rice. **Plant Cell Physiol** 50(7): 1191-200.

Furtado, J. S., de Brito, T. and Freymuller, E. (1967). The structure and reproduction of *Paracoccidioides brasiliensis* in human tissue. **Sabouraudia** 5(3): 226-9.

Garcia, P., Tajadura, V., Garcia, I. and Sanchez, Y. (2006). Rgf1p is a specific Rho1-GEF that coordinates cell polarization with cell wall biogenesis in fission yeast. **Mol Biol Cell** 17(4): 1620-31.

Garcia, S.N. (2003) Ph.D. dissertation (University of California at San Diego, La Jolla, CA).

Goldman, G. H., dos Reis Marques, E., Duarte Ribeiro, D. C., de Souza Bernardes, L. A., Quiapin, A. C., Vitorelli, P. M., Savoldi, M., Semighini, C. P., de Oliveira, R. C., Nunes, L. R., Travassos, L. R., Puccia, R., Batista, W. L., Ferreira, L. E., Moreira, J. C., Bogossian, A. P., Tekaia, F., Nobrega, M. P., Nobrega, F. G. and Goldman, M. H. (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(1): 34-48.

Golemis, E. (2002) Protein-Protein Interactions. A Molecular Cloning Manual. **Cold Spring Harbour Laboratory Press.**

Gomez, F. J., Allendoerfer, R. and Deepe, G. S., Jr. (1995). Vaccination with recombinant heat shock protein 60 from *Histoplasma capsulatum* protects mice against pulmonary histoplasmosis. **Infect Immun** 63(7): 2587-95.

Goossens, A., de La Fuente, N., Forment, J., Serrano, R. and Portillo, F. (2000) Regulation of yeast H(+)-ATPase by protein kinases belonging to a family dedicated to activation of plasma membrane transporters. **Mol Cell Biol** 20(20): 7654-61.

Goto, Y., Zalkin, H., Keim, P. S. and Heinrikson, R. L. (1976). Properties of anthranilate synthetase component II from *Pseudomonas putida*. **J Biol Chem** 251(4): 941-9.

Griffith, O. H. and Ryan, M. (1999). Bacterial phosphatidylinositol-specific phospholipase C: structure, function, and interaction with lipids. **Biochim Biophys Acta** 1441(2-3): 237-54.

Grose, E. and Tamsitt, J. R. (1965). *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia, S.A. **Sabouraudia** 4(2): 124-5.

Hallak, J., San-Blas, F. and San-Blas, G. (1982). Isolation and wall analysis of dimorphic mutants of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Sabouraudia** 20(1): 51-62.

Hamada, K., Terashima, H., Arisawa, M. and 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(41): 26946-53.

Hamada, K., Terashima, H., Arisawa, M., Yabuki, N. and Kitada, K. (1999). Amino acid residues in the omega-minus region participate in cellular localization of yeast glycosylphosphatidylinositol-attached proteins. **J Bacteriol** 181(13): 3886-9.

Hamdan, J. S., Rocha, O. A., Resende, M. A. and Cisalpino, E. O. (1993). Histopathological alterations induced by non-viable cells and biochemical fractions from *Paracoccidioides brasiliensis* in mice. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 88(1): 111-7.

Hartland, R. P., Fontaine, T., Debeaupuis, J. P., Simenel, C., Delepierre, M. and Latge, J. P. (1996). A novel beta-(1-3)-glucanosyltransferase from the cell wall of *Aspergillus fumigatus*. **J Biol Chem** 271(43): 26843-9.

Herth, W. (1980). Calcofluor white and Congo red inhibit chitin microfibril assembly of *Poteroiochromonas*: evidence for a gap between polymerization and microfibril formation. **J Cell Biol** 87(2 Pt 1): 442-50.

Hill J, Jan KA, Donald G & Griffiths E (1991) DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. **Nucleic Acids Res** 19: 5791.

Ho,Y., et al. (2002) Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. **Nature** 415:180–183.

Hoyer, L. L. (2001). The ALS gene family of *Candida albicans*. **Trends Microbiol** 9(4): 176-80.

Hoey, T., Weinzierl, R. O., Gill, G., Chen, J. L., Dynlacht, B. D. and Tjian, R. (1993). Molecular cloning and functional analysis of *Drosophila* TAF110 reveal properties expected of coactivators. **Cell** 72(2): 247-60.

Hung, C. Y., Yu, J. J., Seshan, K. R., Reichard, U. and Cole, G. T. (2002). A parasitic phase-specific adhesin of *Coccidioides immitis* contributes to the virulence of this respiratory Fungal pathogen. **Infect Immun** 70(7): 3443-56.

Hurtado-Guerrero, R., Schuttelkopf, A. W., Mouyna, I., Ibrahim, A. F., Shepherd, S., Fontaine, T., Latge, J. P. and van Aalten, D. M. (2009). Molecular mechanisms of yeast cell wall glucan remodeling. **J Biol Chem** 284(13): 8461-9.

Ishihara, A., Hashimoto, Y., Tanaka, C., Dubouzet, J. G., Nakao, T., Matsuda, F., Nishioka, T., Miyagawa, H. and Wakasa, K. (2008). The tryptophan pathway is involved in the defense responses of rice against pathogenic infection via serotonin production. **Plant J** 54(3): 481-95.

Jeffery, C. J. (2003). Moonlighting proteins: old proteins learning new tricks. **Trends Genet** 19(8): 415-7.

Kanetsuna, F. and Carbonell, L. M. (1970). Cell wall glucans of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Bacteriol** 101(3): 675-80.

Kanetsuna, F., Carbonell, L. M., Azuma, I. and Yamamura, Y. (1972). Biochemical studies on the thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Bacteriol** 110(1): 208-18.

Kanetsuna, F., Carbonell, L. M., Moreno, R. E. and Rodriguez, J. (1969). Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Bacteriol** 97(3): 1036-41.

Kapteyn, J. C., Hoyer, L. L., Hecht, J. E., Muller, W. H., Andel, A., Verkleij, A. J., Makarow, M., Van Den Ende, H. and Klis, F. M. (2000). The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. **Mol Microbiol** 35(3): 601-11.

Kapteyn, J. C., Ram, A. F., Groos, E. M., Kollar, R., Montijn, R. C., Van Den Ende, H., Llobell, A., Cabib, E. and Klis, F. M. (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(20): 6279-84.

Kapteyn, J. C., ter Riet, B., Vink, E., Blad, S., De Nobel, H., Van Den Ende, H. and Klis, F. M. (2001). Low external pH induces HOG1-dependent changes in the organization of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. **Mol Microbiol** 39(2): 469-79.

Kapteyn, J. C., Van Egmond, P., Sievi, E., Van Den Ende, H., Makarow, M. and Klis, F. M. (1999). The contribution of the O-glycosylated protein Pir2p/Hsp150 to the construction of the yeast cell wall in wild-type cells and beta 1,6-glucan-deficient mutants. **Mol Microbiol** 31(6): 1835-44.

Kim, S. H., Lin, D. P., Matsumoto, S., Kitazono, A. and Matsumoto, T. (1998). Fission yeast Slp1: an effector of the Mad2-dependent spindle checkpoint. **Science** 279(5353): 1045-7.

King, R. W., Peters, J. M., Tugendreich, S., Rolfe, M., Hieter, P. and Kirschner, M. W. (1995). A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. **Cell** 81(2): 279-88.

Klein, B. S. and Tebbets, B. (2007). Dimorphism and virulence in fungi. **Curr Opin Microbiol** 10(4): 314-9.

Klis, F. M. (1994). Review: cell wall assembly in yeast. **Yeast** 10(7): 851-69.

Klis, F. M., Boorsma, A. and De Groot, P. W. (2006). Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast** 23(3): 185-202.

Klis, F. M., de Groot, P. and Hellingwerf, K. (2001). Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. **Med Mycol** 39 Suppl 1: 1-8.

Klis, F. M., de Jong, M., Brul, S. and de Groot, P. W. (2007). Extraction of cell surface-associated proteins from living yeast cells. **Yeast** 24(4): 253-8.

Klutts, J. S., Yoneda, A., Reilly, M. C., Bose, I. and Doering, T. L. (2006). Glycosyltransferases and their products: cryptococcal variations on fungal themes. **FEMS Yeast Res** 6(4): 499-512.

Kondoh, O., Tachibana, Y., Ohya, Y., Arisawa, M. and Watanabe, T. (1997). Cloning of the RHO1 gene from *Candida albicans* and its regulation of beta-1,3-glucan synthesis. **J Bacteriol** 179(24): 7734-41.

Koch, M. R. and Pillus, L. (2009). The glucanosyltransferase Gas1 functions in transcriptional silencing. **Proc Natl Acad Sci U S A** 106(27): 11224-9.

Kopecka, M. and Gabriel, M. (1992). The influence of congo red on the cell wall and (1---3)-beta-D-glucan microfibril biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Arch Microbiol** 158(2): 115-26.

Kuge, S., Jones, N. and Nomoto, A. (1997). Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. **Embo J** 16(7): 1710-20.

Lacaz, C. S., E., P. and Martins, J. E. C. (1991). Paracoccidioidomycosis. **Micologia Médica**. São Paulo, Sarvier Editora: 248-261.

Lafon, A., Chang, C.S., Scott, E.M., Jacobson, S.J., Pillus, L. (2007) MYST opportunities for growth control: Yeast genes illuminate human cancer gene functions. **Oncogene** 26:5373–5384.

Lagorce, A., Hauser, N. C., Labourdette, D., Rodriguez, C., Martin-Yken, H., Arroyo, J., Hoheisel, J. D. and Francois, J. (2003). Genome-wide analysis of the response to cell wall mutations in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem** 278(22): 20345-57.

Latgé, J. P. (1999). *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. **Clin Microbiol Rev** 12(2): 310-50.

Latgé, J. P. (2007). The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. **Mol Microbiol** 66(2): 279-90.

Levin, D. E. (2005). Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol Mol Biol Rev** 69(2): 262-91.

Li, Y. and Benezra, R. (1996). Identification of a human mitotic checkpoint gene: hsMAD2. **Science** 274(5285): 246-8.

Lin, X., Xu, S., Yang, Y., Wu, J., Wang, H., Shen, H. and Wang, H. (2009). Purification and characterization of anthranilate synthase component I (TrpE) from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. **Protein Expr Purif** 64(1): 8-15.

Long, K. H., Gomez, F. J., Morris, R. E. and Newman, S. L. (2003). Identification of heat shock protein 60 as the ligand on *Histoplasma capsulatum* that mediates binding to CD18 receptors on human macrophages. **J Immunol** 170(1): 487-94.

Loose, D. S., Stover, E. P., Restrepo, A., Stevens, D. A. and Feldman, D. (1983). Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 80(24): 7659-63.

MacDonald, P.N. (2001) Two-Hybrid Systems. Methods in Molecular Biology. **Humana Press**.

Manocha, M. S. (1980). Lipid composition of *Paracoccidioides brasiliensis*: comparison between the yeast and mycelial forms. **Sabouraudia** 18(4): 281-6.

Marini, N. J., Meldrum, E., Buehrer, B., Hubberstey, A. V., Stone, D. E., Traynor-Kaplan, A. and Reed, S. I. (1996). A pathway in the yeast cell division cycle linking protein kinase C (Pkc1) to activation of Cdc28 at START. **Embo J** 15(12): 3040-52.

Marques, E. R., Ferreira, M. E., Drummond, R. D., Felix, J. M., Menossi, M., Savoldi, M., Travassos, L. R., Puccia, R., Batista, W. L., Carvalho, K. C., Goldman, M. H. and Goldman, G. H. (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(6): 667-77.

Marques, S. A., Franco, M. F., Mendes, R. P., Silva, N. C., Baccili, C., Curcelli, E. D., Feracin, A. C., Oliveira, C. S., Tagliarini, J. V. and Dillon, N. L. (1983). [Epidemiologic aspects of paracoccidioidomycosis in the endemic area of Botucatu (Sao Paulo - Brazil)]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** 25(2): 87-92.

Martinez, R. (1997). Blastomicose-Sul-Americana (Paracoccidioidomicose)-
Etioepidemiologia e Ecologia. **Tratado de Infectologia**. Veronesi, R. and Focaccia, R.,
Ateneu: 1082.

Marx, H., Sauer, M., Resina, D., Vai, M., Porro, D., Valero, F., Ferrer, P. and
Mattanovich, D. (2006). Cloning, disruption and protein secretory phenotype of the
GAS1 homologue of *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiol Lett** 264(1): 40-7.

Matute, D. R., Sepulveda, V. E., Quesada, L. M., Goldman, G. H., Taylor, J. W.,
Restrepo, A. and McEwen, J. G. (2006). Microsatellite analysis of three phylogenetic
species of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Clin Microbiol** 44(6): 2153-7.

Medendorp, K., van Groningen, J. J., Vreede, L., Hetterschijt, L., van den Hurk, W. H.,
de Bruijn, D. R., Brugmans, L. and van Kessel, A. G. (2009). The mitotic arrest
deficient protein MAD2B interacts with the small GTPase RAN throughout the cell
cycle. **PLoS One** 4(9): e7020.

Moskvina, E., Imre, E. M. and Ruis, H. (1999). Stress factors acting at the level of the
plasma membrane induce transcription via the stress response element (STRE) of the
yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Microbiol** 32(6): 1263-72.

Mouyna, I., Fontaine, T., Vai, M., Monod, M., Fonzi, W. A., Diaquin, M., Popolo, L.,
Hartland, R. P. and Latge, J. P. (2000a). Glycosylphosphatidylinositol-anchored
glucanoyltransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. **J
Biol Chem** 275(20): 14882-9.

Mouyna, I., Monod, M., Fontaine, T., Henrissat, B., Lechenne, B. and Latge, J. P.
(2000b). Identification of the catalytic residues of the first family of beta(1-3)
glucanoyltransferases identified in fungi. **Biochem J** 347 Pt 3: 741-7.

Mouyna, I., Morelle, W., Vai, M., Monod, M., Lechenne, B., Fontaine, T., Beauvais,
A., Sarfati, J., Prevost, M. C., Henry, C. and Latge, J. P. (2005). Deletion of GEL2

encoding for a beta(1-3)glucanosyltransferase affects morphogenesis and virulence in *Aspergillus fumigatus*. **Mol Microbiol** 56(6): 1675-88.

Muhlschlegel, F. A. and Fonzi, W. A. (1997). PHR2 of *Candida albicans* encodes a functional homolog of the pH-regulated gene PHR1 with an inverted pattern of pH-dependent expression. **Mol Cell Biol** 17(10): 5960-7.

Munro, C. A. and Gow, N. A. (2001). Chitin synthesis in human pathogenic fungi. **Med Mycol** 39 Suppl 1: 41-53.

Muhua, L., Adames, N. R., Murphy, M. D., Shields, C. R. and Cooper, J. A. (1998). A cytokinesis checkpoint requiring the yeast homologue of an APC-binding protein. **Nature** 393(6684): 487-91.

Nather, K. and Munro, C. A. (2008). Generating cell surface diversity in *Candida albicans* and other fungal pathogens. **FEMS Microbiol Lett** 285(2): 137-45.

Navarro-Garcia, F., Sanchez, M., Nombela, C. and Pla, J. (2001). Virulence genes in the pathogenic yeast *Candida albicans*. **FEMS Microbiol Rev** 25(2): 245-68.

Nemecek, J. C., Wuthrich, M. and Klein, B. S. (2006). Global control of dimorphism and virulence in fungi. **Science** 312(5773): 583-8.

Nemecek, J. C., Wuthrich, M. and Klein, B. S. (2007). Detection and measurement of two-component systems that control dimorphism and virulence in fungi. **Methods Enzymol** 422: 465-87.

Nino-Vega, G. A., Buurman, E. T., Gooday, G. W., San-Blas, G. and Gow, N. A. (1998). Molecular cloning and sequencing of a chitin synthase gene (CHS2) of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Yeast** 14(2): 181-7.

Nino-Vega, G. A., Carrero, L. and San-Blas, G. (2004). Isolation of the CHS4 gene of *Paracoccidioides brasiliensis* and its accommodation in a new class of chitin synthases. **Med Mycol** 42(1): 51-7.

Nino-Vega, G. A., Munro, C. A., San-Blas, G., Gooday, G. W. and Gow, N. A. (2000). Differential expression of chitin synthase genes during temperature-induced dimorphic transitions in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med Mycol** 38(1): 31-9.

Ogawa K, Tsurugi J, Watanabe T. (1973) The dependence of the conformation of a (1→3)-β-D-glucan on chain-length in alkaline solution. **Carbohydr Res** 29:397–403.

Orlean, P. and Menon, A. K. (2007). Thematic review series: lipid posttranslational modifications. GPI anchoring of protein in yeast and mammalian cells, or: how we learned to stop worrying and love glycospholipids. **J Lipid Res** 48(5): 993-1011.

Paniago, A. M., Aguiar, J. I., Aguiar, E. S., da Cunha, R. V., Pereira, G. R., Londero, A. T. and Wanke, B. (2003). [Paracoccidioidomycosis: a clinical and epidemiological study of 422 cases observed in Mato Grosso do Sul]. **Rev Soc Bras Med Trop** 36(4): 455-9.

Panunto-Castelo, A., Freitas-da-Silva, G., Bragheto, I. C., Martinez, R. and Roque-Barreira, M. C. (2003). *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens: recognition by IgG from patients with different clinical forms of paracoccidioidomycosis. **Microbes Infect** 5(13): 1205-11.

Papaleo, E., Fantucci, P., Vai, M. and De Gioia, L. (2006). Three-dimensional structure of the catalytic domain of the yeast beta-(1,3)-glucan transferase Gas1: a molecular modeling investigation. **J Mol Model** 12(2): 237-48.

Pardini, G., De Groot, P. W., Coste, A. T., Karababa, M., Klis, F. M., de Koster, C. G. and Sanglard, D. (2006). The CRH family coding for cell wall glycosylphosphatidylinositol proteins with a predicted transglycosidase domain affects

cell wall organization and virulence of *Candida albicans*. **J Biol Chem** 281(52): 40399-411.

Pitarch, A., Nombela, C. and Gil, C. (2008). Cell wall fractionation for yeast and fungal proteomics. **Methods Mol Biol** 425: 217-39.

Pittet, M. and Conzelmann, A. (2007). Biosynthesis and function of GPI proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochim Biophys Acta** 1771(3): 405-20.

Popolo, L., Grandori, R., Vai, M., Lacana, E. and Alberghina, L. (1988). Immunochemical characterization of gp115, a yeast glycoprotein modulated by the cell cycle. **Eur J Cell Biol** 47(2): 173-80.

Popolo, L., Vai, M., Gatti, E., Porello, S., Bonfante, P., Balestrini, R. and Alberghina, L. (1993). Physiological analysis of mutants indicates involvement of the *Saccharomyces cerevisiae* GPI-anchored protein gp115 in morphogenesis and cell separation. **J Bacteriol** 175(7): 1879-85.

Popolo, L., Gilardelli, D., Bonfante, P., Vai, M. (1997). Increase in chitin as an essential response to defects in assembly of cell wall polymers in the *ggp1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Bacteriol.** 179:463–469.

Popolo, L. and Vai, M. (1999). The Gas1 glycoprotein, a putative wall polymer cross-linker. **Biochim Biophys Acta** 1426(2): 385-400.

Popolo, L., Gualtieri, T. and Ragni, E. (2001). The yeast cell-wall salvage pathway. **Med Mycol** 39 Suppl 1: 111-21.

Prado, M., Silva, M. B., Laurenti, R., Travassos, L. R. and Taborda, C. P. (2009). Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 104(3): 513-21.

Pryer, N. K., Salama, N. R., Schekman, R. and Kaiser, C. A. (1993). Cytosolic Sec13p complex is required for vesicle formation from the endoplasmic reticulum in vitro. **J Cell Biol** 120(4): 865-75.

Ragni, E., Coluccio, A., Rolli, E., Rodriguez-Pena, J. M., Colasante, G., Arroyo, J., Neiman, A. M. and Popolo, L. (2007b). GAS2 and GAS4, a pair of developmentally regulated genes required for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryot Cell** 6(2): 302-16.

Ragni, E., Fontaine, T., Gissi, C., Latge, J. P. and Popolo, L. (2007a). The Gas family of proteins of *Saccharomyces cerevisiae*: characterization and evolutionary analysis. **Yeast** 24(4): 297-308.

Ram, A. F., Arentshorst, M., Damveld, R. A., vanKuyk, P. A., Klis, F. M. and van den Hondel, C. A. (2004). The cell wall stress response in *Aspergillus niger* involves increased expression of the glutamine : fructose-6-phosphate amidotransferase-encoding gene (gfaA) and increased deposition of chitin in the cell wall. **Microbiology** 150(Pt 10): 3315-26.

Ram, A. F., Kapteyn, J. C., Montijn, R. C., Caro, L. H., Douwes, J. E., Baginsky, W., Mazur, P., van den Ende, H. and Klis, F. M. (1998). Loss of the plasma membrane-bound protein Gas1p in *Saccharomyces cerevisiae* results in the release of beta1,3-glucan into the medium and induces a compensation mechanism to ensure cell wall integrity. **J Bacteriol** 180(6): 1418-24.

Ram, A. F. and Klis, F. M. (2006). Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor white and Congo red. **Nat Protoc** 1(5): 2253-6.

Rapplee, C. A., Eissenberg, L. G. and Goldman, W. E. (2007). *Histoplasma capsulatum* alpha-(1,3)-glucan blocks innate immune recognition by the beta-glucan receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A** 104(4): 1366-70.

Rappleye, C. A., Engle, J. T. and Goldman, W. E. (2004). RNA interference in *Histoplasma capsulatum* demonstrates a role for alpha-(1,3)-glucan in virulence. **Mol Microbiol** 53(1): 153-65.

Restrepo, A. (1985). The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Sabouraudia** 23(5): 323-34.

Restrepo, A., McEwen, J. G. and Castaneda, E. (2001). The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Med Mycol** 39(3): 233-41.

Richard, M. L. and Plaine, A. (2007). Comprehensive analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Candida albicans*. **Eukaryot Cell** 6(2): 119-33.

Rodriguez-Pena, J. M., Cid, V. J., Arroyo, J. and Nombela, C. (2000). A novel family of cell wall-related proteins regulated differently during the yeast life cycle. **Mol Cell Biol** 20(9): 3245-55.

Rolli, E., Ragni, E., Calderon, J., Porello, S., Fascio, U. and Popolo, L. (2009). Immobilization of the glycosylphosphatidylinositol-anchored Gas1 protein into the chitin ring and septum is required for proper morphogenesis in yeast. **Mol Biol Cell** 20(22): 4856-70.

Ron, D., Chen, C. H., Caldwell, J., Jamieson, L., Orr, E. and Mochly-Rosen, D. (1994). Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the beta subunit of G proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A** 91(3): 839-43.

Roncero, C. and Duran, A. (1985). Effect of Calcofluor white and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: in vivo activation of chitin polymerization. **J Bacteriol** 163(3): 1180-5.

Roncero, C., Valdivieso, M. H., Ribas, J. C. and Duran, A. (1988). Effect of calcofluor white on chitin synthases from *Saccharomyces cerevisiae*. **J Bacteriol** 170(4): 1945-9.

Rubin-Bejerano, I., Abeijon, C., Magnelli, P., Grisafi, P. and Fink, G. R. (2007). Phagocytosis by human neutrophils is stimulated by a unique fungal cell wall component. **Cell Host Microbe** 2(1): 55-67.

Ruiz-Herrera, J., Elorza, M. V., Valentin, E. and Sentandreu, R. (2006). Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. **FEMS Yeast Res** 6(1): 14-29.

Sambrook J & Russell DW (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edn. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, Cold Spring Harbour, New York.

San-Blas, G. (1982). The cell wall of fungal human pathogens: its possible role in host-parasite relationships. **Mycopathologia** 79(3): 159-84.

San-Blas, G. (1985). *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall glucans, pathogenicity, and dimorphism. **Curr Top Med Mycol** 1: 235-57.

San-Blas, G. (1993). Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Med Vet Mycol** 31(2): 99-113.

San-Blas, G. and Nino-Vega, G. (2001). *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and host response. **Fungal pathogenesis: principles and clinical applications**. Cihlar, R. L. and Calderone, R. A. New York, Marcel Dekker: 205-242.

San-Blas, G. and Nino-Vega, G. (2008). *Paracoccidioides brasiliensis*: chemical and molecular tools for research on cell walls, antifungals, diagnosis, taxonomy. **Mycopathologia** 165(4-5): 183-95.

San-Blas, G., Nino-Vega, G. and Iturriaga, T. (2002). *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med Mycol** 40(3): 225-42.

San-Blas, G. and San-Blas, F. (1977). *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence. A review. **Mycopathologia** 62(2): 77-86.

San-Blas, G. and San-Blas, F. (1984). Molecular aspects of fungal dimorphism. **Crit Rev Microbiol** 11(2): 101-27.

Sano, A., Nishimura, K. and Miyaji, M. (1999). [The Research Encouragement Award. Effects of sex hormones on sexual difference of experimental paracoccidioidomycosis]. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi** 40(1): 1-8.

Santarius, M., Lee, C. H. and Anderson, R. A. (2006). Supervised membrane swimming: small G-protein lifeguards regulate PIPK signalling and monitor intracellular PtdIns(4,5)P₂ pools. **Biochem J** 398(1): 1-13.

Saporito-Irwin, S. M., Birse, C. E., Sypherd, P. S. and Fonzi, W. A. (1995). PHR1, a pH-regulated gene of *Candida albicans*, is required for morphogenesis. **Mol Cell Biol** 15(2): 601-13.

Serrano, R. (1988). Structure and function of proton translocating ATPase in plasma membranes of plants and fungi. **Biochim Biophys Acta** 947(1): 1-28.

Sharom, F. J. and Lehto, M. T. (2002). Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins: structure, function, and cleavage by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. **Biochem Cell Biol** 80(5): 535-49.

Shikanai-Yasuda, M. A., Telles Filho Fde, Q., Mendes, R. P., Colombo, A. L. and Moretti, M. L. (2006). [Guidelines in paracoccidioidomycosis]. **Rev Soc Bras Med Trop** 39(3): 297-310.

Siafakas, A. R., Sorrell, T. C., Wright, L. C., Wilson, C., Larsen, M., Boadle, R., Williamson, P. R. and Djordjevic, J. T. (2007). Cell wall-linked cryptococcal phospholipase B1 is a source of secreted enzyme and a determinant of cell wall integrity. **J Biol Chem** 282(52): 37508-14.

Silva, S. S., Paes, H. C., Soares, C. M., Fernandes, L. and Felipe, M. S. (2008). Insights into the pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis* from transcriptome analysis--advances and perspectives. **Mycopathologia** 165(4-5): 249-58.

Skop, A. R., Bergmann, D., Mohler, W. A. and White, J. G. (2001). Completion of cytokinesis in *C. elegans* requires a brefeldin A-sensitive membrane accumulation at the cleavage furrow apex. **Curr Biol** 11(10): 735-46.

Soares, R. B. A., Gomez, F. J., de Almeida Soares, C. M. and Deepe, G. S., Jr. (2008). Vaccination with heat shock protein 60 induces a protective immune response against experimental *Paracoccidioides brasiliensis* pulmonary infection. **Infect Immun** 76(9): 4214-21.

Souza, M. A., Tropia, M. J. and Brandao, R. L. (2001). New aspects of the glucose activation of the H(+)-ATPase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology** 147(Pt 10): 2849-55.

Suka, N., Nakashima, E., Shinmyozu, K., Hidaka, M. and Jingami, H. (2006). The WD40-repeat protein Pwp1p associates in vivo with 25S ribosomal chromatin in a histone H4 tail-dependent manner. **Nucleic Acids Res** 34(12): 3555-67.

Sundstrom, P. (2002). Adhesion in *Candida* spp. **Cell Microbiol** 4(8): 461-9.

Suter, B. et al. (2004) The origin recognition complex links replication, sister chromatid cohesion and transcriptional silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics** 167:579–591.

Svidzinski, T. I., Miranda Neto, M. H., Santana, R. G., Fischman, O. and Colombo, A. L. (1999). *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from patients with acute and chronic disease exhibit morphological differences after animal passage. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** 41(5): 279-83.

Tanaka, K., Nambu, H., Katoh, Y., Kai, M. and Hidaka, Y. (1999). Molecular cloning of homologs of RAS and RHO1 genes from *Cryptococcus neoformans*. **Yeast** 15(11): 1133-9.

Teixeira, M. M., Theodoro, R. C., de Carvalho, M. J., Fernandes, L., Paes, H. C., Hahn, R. C., Mendoza, L., Bagagli, E., San-Blas, G. and Felipe, M. S. (2009). Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Mol Phylogenet Evol** 52(2): 273-83.

Tiede, A., Bastisch, I., Schubert, J., Orlean, P. and Schmidt, R. E. (1999). Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositols in mammals and unicellular microbes. **Biol Chem** 380(5): 503-23.

Tomazett, P. K., Cruz, A. H., Bonfim, S. M., Soares, C. M. and Pereira, M. (2005). The cell wall of *Paracoccidioides brasiliensis*: insights from its transcriptome. **Genet Mol Res** 4(2): 309-25.

Tso, J. Y., Hermodson, M. A. and Zalkin, H. (1980). Primary structure of *Serratia marcescens* anthranilate synthase component II. **J Biol Chem** 255(4): 1451-7.

Valdivieso, M. H., Ferrario, L., Vai, M., Duran, A. and Popolo, L. (2000). Chitin synthesis in a gas1 mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. **J Bacteriol** 182(17): 4752-7.

Valera, E. T., Mori, B. M., Engel, E. E., Costa, I. S., Brandao, D. F., Nogueira-Barbosa, M. H., Queiroz, R. G., Silveira, V. D., Scrideli, C. A. and Tone, L. G. (2008). Fungal infection by *Paracoccidioides brasiliensis* mimicking bone tumor. **Pediatr Blood Cancer**.

Vai, M., Orlandi, I., Cavadini, P., Alberghini, L., Popolo, L. (1996) *Candida albicans* homologue of GGP1/GAS1 gene is functional in *Saccharomyces cerevisiae* and contains the determinants for glycosylphosphatidylinositol attachment. **Yeast** 12: 361–368.

Van Den Hurk, W. H., Martens, G. J., Geurts van Kessel, A. and van Groningen, J. J. (2004). Isolation and characterization of the *Xenopus laevis* orthologs of the human papillary renal cell carcinoma-associated genes PRCC and MAD2L2 (MAD2B). **Cytogenet Genome Res** 106(1): 68-73.

Vanoni M, Vai M, Popolo L & Alberghina L (1983) Structural heterogeneity in populations of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **J Bacteriol** 156: 1282–1291.

Vikis, H. G. and Guan, K. L. (2004). Glutathione-S-transferase-fusion based assays for studying protein-protein interactions. **Methods Mol Biol** 261: 175-86.

Villa, L. A., Tobon, A., Restrepo, A., Calle, D., Rosero, D. S. and Gomez, B. L. (2000). Central nervous system paracoccidioidomycosis. Report of a case successfully treated with itraconazol. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** 42(4): 231-4.

Weig, M., Jansch, L., Gross, U., De Koster, C. G., Klis, F. M. and De Groot, P. W. (2004). Systematic identification in silico of covalently bound cell wall proteins and analysis of protein-polysaccharide linkages of the human pathogen *Candida glabrata*. **Microbiology** 150(Pt 10): 3129-44.

Williams, F. E., Varanasi, U. and Trumbly, R. J. (1991). The CYC8 and TUP1 proteins involved in glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* are associated in a protein complex. **Mol Cell Biol** 11(6): 3307-16.

Won, M., Park, S. K., Hoe, K. L., Jang, Y. J., Chung, K. S., Kim, D. U., Kim, H. B. and Yoo, H. S. (2001). Rkp1/Cpc2, a fission yeast RACK1 homolog, is involved in actin

cytoskeleton organization through protein kinase C, Pck2, signaling. **Biochem Biophys Res Commun** 282(1): 10-5.

Yin, Q. Y., de Groot, P. W., Dekker, H. L., de Jong, L., Klis, F. M. and de Koster, C. G. (2005). Comprehensive proteomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: identification of proteins covalently attached via glycosylphosphatidylinositol remnants or mild alkali-sensitive linkages. **J Biol Chem** 280(21): 20894-901.

Yuyama, K., Sekino-Suzuki, N., Sanai, Y. and Kasahara, K. (2007). Translocation of activated heterotrimeric G protein Galpha(o) to ganglioside-enriched detergent-resistant membrane rafts in developing cerebellum. **J Biol Chem** 282(36): 26392-400.

Zhang, W., Cheng, G. Z., Gong, J., Hermanto, U., Zong, C. S., Chan, J., Cheng, J. Q. and Wang, L. H. (2008). RACK1 and CIS mediate the degradation of BimEL in cancer cells. **J Biol Chem** 283(24): 16416-26.

Zhang, Y., Sugiura, R., Lu, Y., Asami, M., Maeda, T., Itoh, T., Takenawa, T., Shuntoh, H. and Kuno, T. (2000). Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase Its3 and calcineurin Ppb1 coordinately regulate cytokinesis in fission yeast. **J Biol Chem** 275(45): 35600-6.