

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**  
**INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E**  
**SAÚDE PÚBLICA**

**DANIZE EUKALES MENEZES LUGO**

---

---

**Análise das interações proteína-proteína da chaperona de cobre**  
***ATX1 em *Paracoccidioides brasiliensis****

---

---

**Goiânia**

**2022**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

## **TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR**

### **VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES 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), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), 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.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

#### **Identificação do material bibliográfico**

Dissertação       Tese       Outro\*: \_\_\_\_\_

\*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

**Exemplos:** Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

#### **Nome completo do autor**

**Danize Eukales Menezes Lugo**

#### **Título do trabalho**

**Análise das interações proteína-proteína da chaperona de cobre ATX1 em  
*Paracoccidioides brasiliensis***

#### **Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador )**

Concorda com a liberação total do documento  SIM       NÃO<sup>1</sup>

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante: **a)** consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

**b)** novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica; - Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

**Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.**



Documento assinado eletronicamente por **Celia Maria De Almeida Soares, Professor do Magistério Superior**, em 06/12/2022, às 16:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **DANIZE EUKALES MENEZES LUGO, Discente**, em 16/12/2022, às 14:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3386328** e o código CRC **78235A81**.

**DANIZE EUKALES MENEZES LUGO**

---

**Análise das interações proteína-proteína da chaperona de cobreATX1 em  
*Paracoccidioides brasiliensis***

---

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre em Medicina Tropical e Saúde Pública. Área de Concentração: Ciências Básicas e Aplicadas Em Doenças Infecto-Parasitárias e Saúde Pública: Microbiologia.

Orientadora: Dra. Célia Maria de Almeida Soares.

Co-orientador: Kleber Santiago Freitas e Silva.

**Goiania 2022**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Lugo, Danize Eukales Menezes

Análise das interações proteína-proteína da chaperona de cobre ATX1 em *Paracoccidioides brasiliensis* [manuscrito] / Danize Eukales Menezes Lugo. - 2022. XLIV, 44 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Celia Maria de Almeida Soares; co orientador Dr. Kleber Santiago Freitas e Silva.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2022. Bibliografia. Anexos.

Inclui lista de figuras, lista de tabelas.

1. Metabolismo de metal; . 2. Atx1, . 3. *Paracoccidioides brasiliensis*;. 4. Interação proteína-proteína;. 5. Cobre.. I. Soares, Celia Maria de Almeida, orient. II. Título.

CDU 616-093



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

### ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

**ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE DANIZE EUKALES MENEZES LUGO** – Aos doze dia do mês de agosto do ano de 2022 (12/08 /2022), às 14h00min, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. **CELIA MARIA DE ALMEIDA SOARES** (UFG), **MARISTELA PEREIRA** (UFG) e **ALEXANDRE MELO BAILÃO** (UFG), para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada por WEBCONFERÊNCIA, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: “**Análise das interações proteína-proteína da chaperona de cobre ATX1 em *Paracoccidioides brasiliensis***”, em nível de **MESTRADO**, área de concentração em **CIÊNCIAS BÁSICAS E APLICADAS EM DOENÇAS INFECTOPARASITÁRIAS E SAÚDE PÚBLICA: MICROBIOLOGIA**, de autoria de **DANIZE EUKALES MENEZES LUGO**, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo Orientador, Profa. Dra. CELIA MARIA DE ALMEIDA SOARES, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho.

A palavra a seguir, foi concedida a autora da dissertação que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a Candidata, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1481/2017 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de PósGraduação em Medicina Tropical e Saúde Pública a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando a candidata **Aprovada** ou **Reprovada**:

<b>Banca Examinadora</b>	<b>Aprovada / Reprovada</b>
Profa. Dra. <b>Celia Maria de Almeida Soares</b>	<u>    <b>Aprovada</b>    </u>
Profa. Dra. <b>Maristela Pereira</b>	<u>    <b>Aprovada</b>    </u>
Prof. Dr. <b>Alexandre Melo Bailão</b>	<u>    <b>Aprovada</b>    </u>

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata     **Habilitada**    , (**Habilitada** ou **não Habilitada**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **MESTRA EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**, na área de concentração em **CIÊNCIAS BÁSICAS E APLICADAS EM DOENÇAS INFECTOPARASITÁRIAS E SAÚDE PÚBLICA: MICROBIOLOGIA**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às   17  h e   10  min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de dissertação e para constar eu, HELOÍSA DE SOUSA VIEIRA, secretária do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Celia Maria De Almeida Soares, Professor do Magistério Superior**, em 16/08/2022, às 14:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maristela Pereira, Professor do Magistério Superior**, em 16/08/2022, às 14:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alexandre Melo Bailao, Coordenador de Pós-graduação**, em 17/08/2022, às 12:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3094480** e o código CRC **436478A1**.

**Referência:** Processo nº 23070.041847/2022-30 SEI nº 3094480

## SUMÁRIO

---

1. INTRODUÇÃO	7
1.1. Aspectos gerais	7
1.2. Homeostase do cobre em fungos	11
1.3. A metaloproteína de Cu ATX1	14
2. JUSTIFICATIVA	17
3. OBJETIVOS	18
3.1. Objetivo geral	18
3.2. Objetivos específicos	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1. Análise de bioinformática	19
4.2. Modelagem molecular, <i>Docking</i> molecular e análise de <i>hotspot</i>	19
4.3. Microrganismos e condições de crescimento	20
4.4. Indução da produção e solubilização da proteína recombinante (rAtx1)	20
4.5. Confirmação da proteína recombinante Atx1 de <i>P. brasiliensis</i> por LC-MS/MS	21
4.6. Experimento de Pull-down	22
5. RESULTADO E DISCUSSÃO	24
5.1 Rede de interação da Atx1 de <i>P. brasiliensis</i> de acordo com o STRING	24
5.2. Indução da proteína recombinante Atx1 de <i>P. brasiliensis</i> Pb18	24
5.3 Solubilização e purificação da Atx1 de <i>P. brasiliensis</i>	25
5.4 Identificação das proteínas que interagem com Atx1 em <i>P. brasiliensis</i>	25
5.5 Interação entre Atx1 e citocromo b5	28
5.6 Interação entre Atx1 e serino-proteinase	30
6 DISCUSSÃO	33
7 CONCLUSÃO	36
8 REFERÊNCIAS	37

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1 - Morfologia do fungo <i>P. brasiliensis</i> .....	8
Figura 2 - Distribuição geográfica da paracoccidioidomicose (PCM) .....	14
Figura 3 - Homeostase de cobre em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	14
Figura 4 - Interações da Atx1 de acordo com o banco de dados STRING.....	24
Figura 5 - Indução da proteína Atx1 .....	24
Figura 6 - Modelo de interação entre Atx1 e citocromo b5.....	29
Figura 7 - Pontes de hidrogênio na interface de interação entre Atx1 e citocromo b5.....	30
Figura 8 - Modelo representativo da interação ATX1-serino proteinase .....	31

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1. Proteínas ligantes de Cu relacionadas à homeostase do metal .....	14
Tabela 2. Confirmação da purificação da Atx1 de <i>P. brasiliensis</i> por espectrometria .....	25
Tabela 3. Proteínas de provável ligação à ATX1 de <i>P. brasiliensis</i> .....	27

## RESUMO

---

A paracoccidioidomicose é a micose sistêmica de maior prevalência nas Américas, principalmente no Brasil, Colômbia, Venezuela e Argentina. A doença é causada por fungos do gênero *Paracoccidioides* que apresentam termodimorfismo. O fungo está presente no solo na forma micelial à temperatura de 28 °C e na forma de levedura no hospedeiro à 37°C. A capacidade de diferenciação é considerada um fator de virulência desse patógeno. O cobre (Cu) é um componente essencial de enzimas que realizam reações de transferência de elétrons. A homeostase desse metal foi descrita pela primeira vez em *Saccharomyces cerevisiae* e genes homólogos foram identificados em diversos organismos. Dentre esses, destaca-se o gene ATX1, relativo a uma metalochaperona de cobre, que transporta o Cu<sup>1+</sup> do Ctr1 (transportador transmembranar) para a Ccc2 (ATPase do tipo P) em uma vesícula trans-Golgi para eventual inserção na Fet3. Esta última é uma proteína de absorção de ferro de alta afinidade, dependente de Cu. Atx1 foi identificada em *S. cerevisiae* como uma pequena chaperona de Cu de 8 kDa, sendo classificada como uma molécula antioxidante. Pouco se sabe sobre o metabolismo de homeostase de Cu e a função específica do gene ATX1 em *Paracoccidioides brasiliensis*. Dessa forma, a identificação das redes de interações da Atx1 em *P. brasiliensis* pode elucidar detalhes do metabolismo de Cu nesse organismo. O objetivo principal desta pesquisa foi caracterizar por meio de ancoragem molecular, como ATX1 interage com proteínas de *P. brasiliensis* proporcionando a compreensão da biologia do fungo e visando identificar possíveis alvos terapêuticos como perspectiva futura. Um grupo de proteínas que possuem interação com Atx1 foi identificado e validado por meio de ensaios de *pull-down*. Estas proteínas fazem parte da manutenção da homeostase, interagindo com outras proteínas do metabolismo de cobre, transporte de elétrons e proteínas de detoxificação. Estas interações indicam a importância da Atx1 para manutenção da homeostase do cobre no fungo, sendo um potencial alvo para fármacos alternativos, que poderão colaborar para ampliação das opções terapêuticas.

Palavras chaves: Metabolismo de metal; Atx1, *Paracoccidioides brasiliensis*; interação proteína-proteína; Cobre.

# 1. INTRODUÇÃO

---

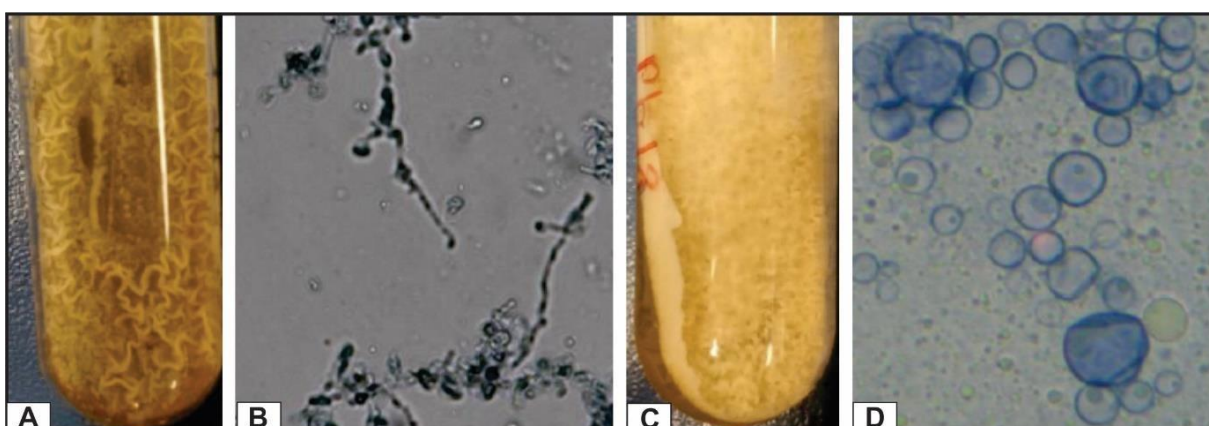
## 1.1. Aspectos gerais do gênero *Paracoccidioides*

As doenças negligenciadas são um conjunto causadas por agentes infecciosos e parasitários, que acometem principalmente populações de baixa renda, causando endemias sobretudo em países em desenvolvimento como África, Ásia e Américas (Queiroz- Telles et al., 2017). A paracoccidioidomicose (PCM) foi introduzida recentemente, na portaria nº 264, de 17 de fevereiro de 2020, no rol de doenças e condições de notificação compulsória, juntamente com a criptococose e a esporotricose humana (Nunes Mario et al., 2020)

O primeiro relato sobre a PCM. foi no dia 1º de abril de 1908. Nesse momento, o periódico *Brazil-Médico* publicava parte dos resultados, fruto de minuciosos estudos iniciados em 1905 por Adolpho Lutz (Franco et al., 1994; Pardini and Moreira, 2008). Splendore incluiu o patógeno no gênero *Zymonema* e classificou-o como uma espécie única, denominada *Zymonema brasiliensis* em 1912 (Franco et al., 1994). Lacaz e Almeida introduziram o nome *Paracoccidioides* em 1928 e em 1930 Almeida nominou o fungo como *P. brasiliensis*. Os fungos do gênero *Paracoccidioides* são os agentes etiológicos da PCM, micose sistêmica encontrada geograficamente na América do Sul e Central.

O gênero *Paracoccidioides* pertence ao filo Ascomycota, classe Euromycetes, ordem Onygenales e família *Ajellomycetaceae* (Bagagli et al., 2008). Por intermédio de análises moleculares e morfológicas de diferentes isolados, ocorreu a classificação do gênero em cinco espécies filogenéticas: *Paracoccidioides brasiliensis sensu stricto*, com ampla ocorrência em áreas geográficas do Brasil, Argentina, Peru, Paraguai e Venezuela (MATUTE et al., 2006); *Paracoccidioides americana* no Brasil e na Venezuela; *Paracoccidioides restrepiensis*, restrito apenas à Colômbia; *Paracoccidioides venezuelensis*, restrito apenas à Venezuela e *Paracoccidioides lutzii*, que inclui o isolado *Pb01-like*, endêmico da região centro-oeste do Brasil (Matute et al., 2006; Carrero et al., 2008; Teixeira et al., 2009; Turissini et al., 2017). Atualmente, duas novas espécies não cultiváveis foram descritas e nomeadas por *Paracoccidioides cetti* e *Paracoccidioides lobo* (Vilela et al., 2021).

Membros do complexo *Paracoccidioides* são fungos dimórficos que podem ser encontrados em duas formas de acordo com a temperatura, micélio ou levedura (Brummer et al., 1993). Em temperaturas entre 25-28° C, *in vitro* ou no solo o fungo é encontrado na forma miceliana (Figura 1). Nesta fase o crescimento é lento, e após 15 a 30 dias o aspecto macroscópico das colônias é aveludado/algodonoso, com uma coloração branca variando para bege (Mendes et al., 2017b) (Figura 1A). Acredita-se que o micélio seja uma forma saprobiótica do fungo, alimentando-se de matéria orgânica em decomposição, principalmente no solo. É possível caracterizar esta fase pela presença de hifas septadas e multinucleadas produtoras de conídios infecciosos (Terçarioli et al., 2007) (Figura 1B). Os conídios podem ser inalados alcançando os pulmões do hospedeiro, onde encontram condições, como a temperatura 37° C, que induzem a sua diferenciação em levedura (Figura 1C). (San-Blas et al., 2002).



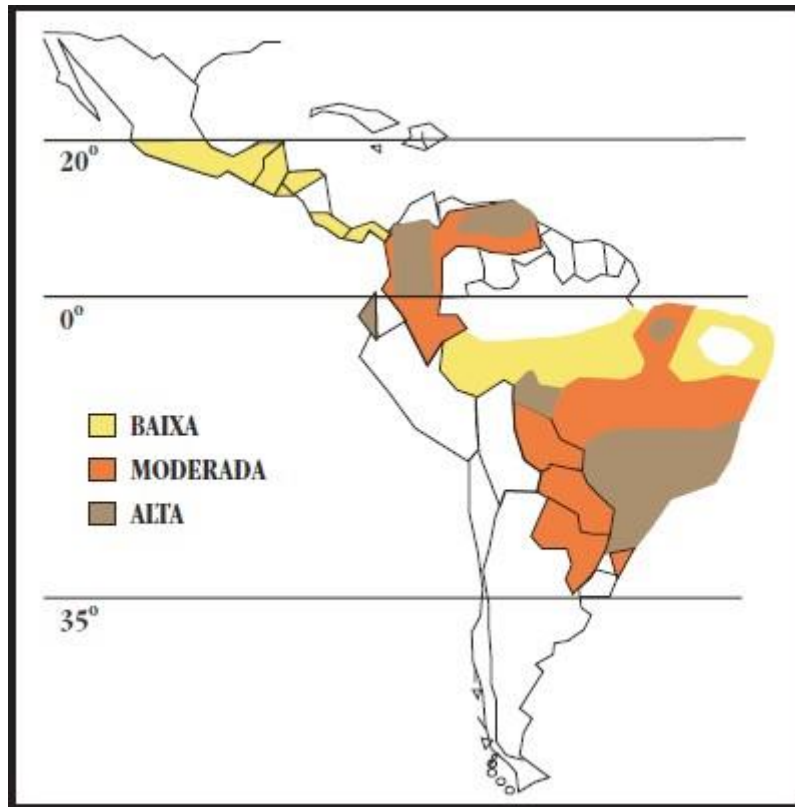
**Figura 1 - Morfologia do fungo *P. brasiliensis*.** A – Macroscopia da fase micelial mostrando o aspecto algodono das colônias; B – Microscopia da fase micelial em aumento de 400X. O micélio apresenta hifas septadas formadas por filamentos finos e multinucleadas capazes de produzir conídios. C – Macroscopia da fase leveduriformes evidenciando colônias amareladas; D – Microscopia da fase leveduriforme em aumento de 400X mostrando brotamentos múltiplos, resultado de exoesporulação, membrana birrefringente e cromatina evidente. As células apresentam tamanhos variados e formato ovalado, a partir das quais desenvolvem-se brotamentos (roda de leme); coloração por Trypan Blue (Fonte: Laboratório de Biologia Molecular – Universidade Federal de Goiás).

A fase leveduriforme do fungo, caracteriza-se por apresentar múltiplos brotamentos formados por evaginações da célula-mãe, conferindo uma de suas principais características microscópicas, o aspecto de roda de leme de navio (Figura 1D). A capacidade de transição da fase miceliana para a fase leveduriforme é considerada um fator determinante na virulência do fungo, uma vez que somente isolados capazes de realizar este processo conseguem estabelecer a infecção (San-Blas et al., 2002).

Os aspectos ecológicos de *P. brasiliensis* ainda não estão totalmente esclarecidos; observações causais, com baixa reprodutibilidade, têm sido relatados. A capacidade termodimórfica permite que os patógenos infectem uma variedade de mamíferos como tatus (Hrycyk, 2018), golfinhos (Sacristán et al., 2018; Kanegae et al., 2020), cães (Ricci et al., 2004; Fontana et al., 2010), morcegos (da Paz et al., 2018) e cavalos (Albano et al., 2015), dentre outros animais (Mendes et al., 2017a).

Os casos autóctones da PCM ocorrem exclusivamente em países da América do Sul e da América Central, em regiões tropicais e subtropicais. Os dados apontam uma distribuição que se estende desde o México até a Argentina, com maior número de casos na Colômbia, Venezuela e principalmente Brasil, (Figura 2) (San-Blas et al., 2002; Shikanai-Yasuda et al., 2006; Queiroz-Telles et al., 2017). Entretanto, casos não autóctones já foram relatados em países como Alemanha, Holanda, Áustria e Japão, representando a recrudescência característica da PCM; por se tratar de uma infecção latente pode ocorrer até 15 anos após a saída da área endêmica (Queiroz-Telles et al., 2017; Felipe et al., 2021).

A PCM constitui-se na mais importante micose sistêmica no Brasil, representando 80% dos casos totais notificados. Sua distribuição real é desconhecida, devido a fatores como o grande período de latência (média de 15,3 anos) (SHIKANAI-YASUDA, 2015). De uma maneira geral, a falta da vigilância epidemiológica dificulta a coleta de dados para determinar as áreas de incidência, prevalência e morbidade (Nunes Mario et al., 2020). Dessa maneira, os dados usados para estudar os índices epidemiológicos até então, são baseados em registros médicos e estudos de relatos de casos (Shikanai-Yasuda et al., 2017a). De 1998 a 2006, 49% dos casos registrados de internações por micoses sistêmicas são pertencentes a PCM, sendo responsável pelo maior número de internações entre essas micoses no Brasil (Shikanai-Yasuda et al., 2017a).



**Figura 2 - Distribuição geográfica da paracoccidiodomicose (PCM).** As áreas endêmicas estão distribuídas em regiões de florestas tropicais e subtropicais, compreendendo temperaturas que variam até 25°C, com chuvas de volume até 2.000 mm e umidade atmosférica alta. O Brasil possui o maior número de casos descritos da doença, acompanhado da Colômbia, Venezuela e Guatemala. (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

A infecção, que é iniciada pela inalação de esporos infecciosos, é adquirida nas duas primeiras décadas de vida, com o pico de incidência entre 10 e 20 anos de idade. A evolução para doença é incomum nessas décadas, ocorrendo mais em adultos entre 30 e 50 anos, como reativação de foco endógeno latente e depende de fatores relacionados tanto ao agente infeccioso quanto ao hospedeiro (Shikanai-Yasuda et al., 2006, 2017b). Apesar de sua alta incidência ainda não há medidas de controle e prevenção para a PCM. Portanto, se faz necessário o aprimoramento dos dados de prevalência e incidência da doença, registro de casos por notificação compulsória e uniformização de métodos sorológicos (Shikanai-Yasuda et al., 2017b).

A infecção por *Paracoccidioides* spp. pode ocorrer em ambos os sexos, mas o desenvolvimento da doença na sua forma crônica, ocorre principalmente em indivíduos do sexo masculino. A maioria são trabalhadores rurais, em idades de maior produtividade laboral que mantêm contato constante com o solo e a vegetação. Trabalhadores rurais, geralmente, estão inseridos em estratos sociais menos favorecidos e apresentam alguns fatores de risco como

tabagismo e consumo abusivo de álcool, condições de higiene, nutricionais e socioeconômicas precárias. Estas condições pré-existent exercem um papel fundamental no estabelecimento da doença, uma vez que interferem no mecanismo de defesa do hospedeiro (Shikanai-Yasuda et al., 2017b).

## 1.2. Homeostase do cobre em fungos

A vida na Terra evoluiu dentro de uma mistura complexa de compostos orgânicos e inorgânicos. O acúmulo de oxigênio levou a uma diminuição na solubilidade do ferro e a uma expansão no papel biológico do cobre (Cu), para abranger papéis similares, porém não idênticos, ao ferro na biologia (Festa and Thiele, 2011). Assim, o Cu tornou-se um oligoelemento de grande importância para praticamente todos os organismos vivos e em proliferação (Kim et al., 2008; Li et al., 2019). Este metal participa de muitos processos biológicos vitais e sua regulação precisa e rigorosa nos processos de homeostase garantem que apenas a quantidade necessária para suprir os processos biológicos essenciais sejam mantidas e ao mesmo tempo evite a toxicidade desse metal na célula (Li et al., 2019).

Nos fungos, o Cu serve como um cofator catalítico ou estrutural em uma grande variedade de enzimas. Os íons de Cu são necessários para processos que variam de fosforilação oxidativa, mobilização de ferro, formação de pigmento, além de defesa antioxidante. Na relação parasito-hospedeiro, o Cu exerce um papel essencial como agente antimicrobiano, sendo utilizado pelo sistema imunológico do hospedeiro no desenvolvimento e diferenciação de células do sistema imunológico. Além disso, apresenta propriedade antifúngica por intermédio de maquinarias de sequestro ou bombardeio do metal (Li et al., 2019). Nichos específicos dentro do hospedeiro são particularmente limitados em níveis de Cu que estão disponíveis para patógenos fúngicos invasores, como *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans*. Uma resposta de imunidade nutricional específica de cobre é evidenciada durante a infecção por *C. albicans*, onde um aumento inicial nas concentrações de cobre nos tecidos diminui à medida que a infecção progride (Mackie et al., 2016). O metabolismo do Cu é um fator importante, e respostas complexas ocorrem para manter os recursos adequados desse elemento para preservar a homeostase (Kim et al., 2008).

O Cu é um íon metálico com propriedades redox-ativo, que são essenciais para a maioria dos organismos aeróbios. Em sistemas biológicos, os íons Cu podem existir em dois estados de oxidação:  $\text{Cu}^{1+}$  (reduzido) e  $\text{Cu}^{2+}$  (oxidado). Esta atividade redox tem sido aproveitada para a catálise por uma infinidade de enzimas cujas atividades são críticas para uma ampla gama de funções bioquímicas e celulares. A química dos íons de Cu depende da valência deles, onde  $\text{Cu}^{1+}$  apresenta maior afinidade por ligantes doadores de enxofre, como cisteína ou metionina. Já o íon  $\text{Cu}^{2+}$ , possui maior afinidade eletrônica por doadores de nitrogênio, como histidina ou doadores de oxigênio, como glutamato ou aspartato (Kim et al., 2008).

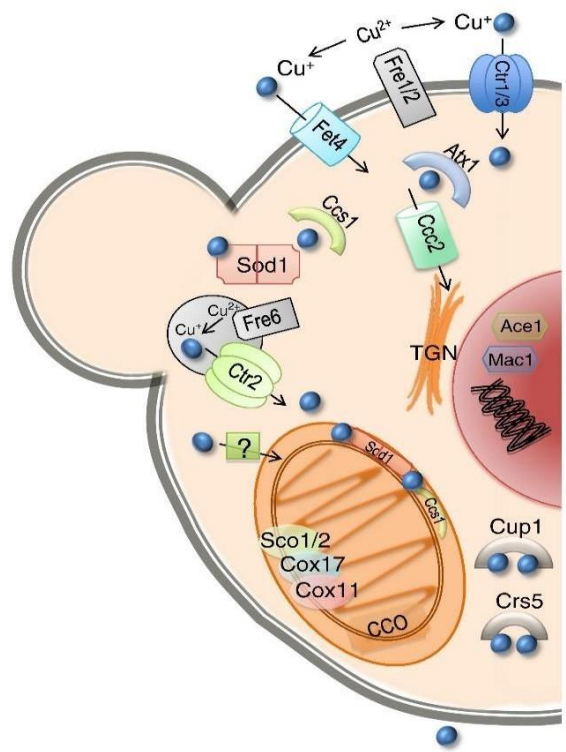
Em *S. cerevisiae* foi descrito pela primeira vez a homeostase de Cu em eucariontes unicelulares (Figura 3). Nesses organismos,  $\text{Cu}^{2+}$  é absorvido por dois transportadores de alta afinidade Ctr1 e Ctr3 (*cooper transporter protein* 1 e 3, respectivamente). Outra via de absorção, acontece após a redução do cobre  $\text{Cu}^{2+}$  na membrana plasmática, para sua forma reduzida  $\text{Cu}^{+}$  por metaloredutases de superfície celular como Fre1 e Fre2 (*Ferric/cupric reductase transmembrane component* 1 e 2, respectivamente). O íon é então absorvido por um transportador de baixa afinidade, denominado Fet4 (*low-affinity Fe<sup>2+</sup> transport protein*) (Festa & Thiele, 2011; Silva et al., 2011). Os transportadores de Cu de alta afinidade Ctr1 e Ctr3 são considerados redundantes, embora tenham sequências distintas de aminoácidos (Silva et al., 2011).

A família CTR de transportadores de Cu é composta por três domínios transmembranares, uma extremidade rica em metionina no N-terminal, um grupamento cisteína-histidina na extremidade C-terminal e um motivo MX3M (M representa resíduo de metionina e X um resíduo qualquer) no segundo domínio. Este grupamento de resíduos de metionina foi evidenciado como importante para a captação de Cu (Festa and Thiele, 2011; Silva et al., 2011). Em *P. brasiliensis*, o motivo MX3M se encontra no terceiro domínio transmembranar (Silva et al., 2011). Íons  $\text{Cu}^{+}$  livres no meio intracelular, ligam-se a uma chaperona de Cu, sendo que em *S. cerevisiae* foram identificados dois tipos de chaperonas, denominadas a Ccs1 e Atx1. Enquanto a Ccs1 se liga aos íons de cobre e os entrega especificamente à SOD1 (superóxido dismutase 1) (Brown et al., 2004), a Atx1 transporta cobre para a CCC2 (uma ATPase de transporte de Cu) e protege a célula fúngica contra espécies reativas de oxigênio (Figura 3) (Fu et al., 1995). Essas chaperonas distribuem Cu para proteínas-alvo, por meio de interações proteína-proteína, minimizando a presença de íons lábeis potencialmente tóxicos (Boal and Rosenzweig, 2009; Banci et al., 2010).

Durante sua evolução, diversos organismos utilizaram as propriedades redox dos metais Cu e ferro, seja como cofator ou determinante estrutural de proteínas que possuem funções vitais na biologia dos mesmos (Festa and Thiele, 2011). Desta forma, foram desenvolvidos mecanismos para responder a estímulos extracelulares que permitem a aquisição de nutrientes e garantir a função celular, proliferação ou diferenciação, evasão ou adaptação a estresses ambientais e defesas contra organismos concorrentes (Li et al., 2019). Organismos unicelulares, como leveduras, aumentaram a complexidade para distribuir o Cu a proteínas e compartimentos intracelulares.

A detecção do nível celular de Cu em *S. cerevisiae* é realizado pelos fatores de transcrição Ace1 e Mac1. A partir do momento em que íons de Cu estão disponíveis, Ace1 ativa o promotor de genes que codificam metalotioneínas de ligação a Cu. Além disso, a SOD1 (superóxido dismutase), protege a célula contra ROS, aumentando a capacidade de reserva de Cu no meio intracelular. Outros genes atuam na detoxificação de Cu, como FET3 e FTR1. Esses codificam a ferroxidase e a ferro ferroso permease, respectivamente. A absorção de cobre pelas proteínas fúngicas Ctr requer sua redução prévia de Cu<sup>2+</sup> para Cu<sup>+</sup>. Isso é realizado por metalorreductases de superfície celular codificadas pelos genes FRE1 e FRE7 em *S. cerevisiae* cuja expressão, sob deficiência de Cu, é regulada por Mac1. A ação antagônica do Cu em relação às atividades de Ace1 e Mac1 aponta para uma complementaridade de cada fator de transcrição para a ligação de Cu baseado em domínios ricos em resíduos de cisteína (Figura 3).

A tabela 1 lista os principais componentes da homeostase de Cu e proteínas que requerem o íon metálico em *S. cerevisiae*. O metabolismo do Cu em *Paracoccidioides* spp. ainda é pouco elucidado. Análise comparativa dos genes relacionados ao metabolismo do Cu de *S. cerevisiae*, em comparação com o banco do genoma de *P. brasiliensis*, revelaram genes homólogos codificantes de proteínas relacionadas à homeostase de Cu, como por exemplo, o fator de transcrição Mac1, o qual está presente nos genomas de *Pb01* e *Pb03*, mas não no *Pb18*; o transportador de Cu de alta afinidade (Ctr3) foi encontrado em todos os três genomas analisados. Os genes relacionados à metalochaperona (Atx1), transportador de Cu<sup>2+</sup> ATPase do tipo P (Ccc2) e as superóxido dismutases (Sod1 e Sod2) também foram encontrados nos genomas de membros do complexo *Paracoccidioides*. Homólogos do transportador de Cu de baixa afinidade da membrana vacuolar (Ctr2) estão em *Pb03* e *Pb18*, mas não em *Pb01*. Além disso, as metalotioneínas (Cup1 e Cup2) não foram identificados em *Pb01*, *Pb03* e *Pb18* (Silva et al., 2011). Verifica-se assim, a necessidade de se determinar os mecanismos que regulam a homeostase de Cu em membros do complexo *Paracoccidioides*.



**Figura 3 - Homeostase de cobre em *Saccharomyces cerevisiae*.** Homeostase de Cu Um resumo das proteínas eucarióticas envolvidas na detecção, aquisição, distribuição intracelular e mobilização de cobre (Cu). Fonte: Modificado (Nevitt et al., 2012)

Estudos realizados por Tristão *et al.* (2015), utilizando ferramentas de bioinformática, demonstraram que 25 proteínas ligantes ao Cu foram encontradas no genoma do *Pb18*. A classificação funcional dessas proteínas revelou que o transporte e a síntese de melanina são as categorias funcionais mais enriquecidas, pois foram encontrados 6 genes codificantes para transportadores de cobre e 3 para lacases. Além disso, foram encontradas duas proteínas relacionadas à resposta ao estresse oxidativo e duas isoformas da superóxido dismutase, todas Cu-dependentes (Tristão et al., 2014).

### 1.3. A metaloproteína de Cu ATX1

A família do tipo Atx1 de chaperonas de Cu é altamente conservada, com membros presentes em uma ampla variedade de organismos, variando de bactérias a eucariotos, como *Aspergillus fumigatus*, *Histoplasma capsulatum*, *C. neoformans*, *Candida glabrata*, *P. lutzii* e *P. brasiliensis* (Boal and Rosenzweig, 2009). No primeiro estudo realizado em leveduras a Atx1 foi identificada como uma pequena chaperona de Cu de 8 kDa, sendo classificada como uma

molécula antioxidante, com capacidade de suprimir os defeitos de crescimento dependentes de oxigênio produzidos em células de mutante nulo para Sod1 (Laloti et al., 2009). A metaloproteína Atx1 desempenha um papel importante no transporte de Cu intracelular, como uma chaperona transferindo o metal de transportadores específicos para a Ccc2, e posterior inserção em Fet3. Esse processo é necessário para o transporte de ferro de alta afinidade (Cankorur-Cetinkaya et al., 2016).

**Tabela 1.** Proteínas ligantes de Cu relacionadas à homeostase do metal.

<b>Proteína</b>	<b>Função</b>
<b>Reguladores transcricionais</b>	
<b>Ace1</b>	Ativação transcricional em condições de alto teor de Cu
<b>Mac1</b>	Ativador transcricional em condições de baixo teor de Cu
<b>Chaperona/armazenamento</b>	
<b>Atx1</b>	Metalochaperona, fornece Cu para ATPases
<b>Ccs</b>	Fornece Cu ao Cu/Zn à SOD1
<b>Metalotioneína</b>	Relacionado à detoxificação, ligação a metais ricos em cisteína
<b>Transportadores e receptores do compartimento da superfície celular</b>	
<b>ATPases</b>	Proteínas exportadoras Cu <sup>+</sup>
<b>Ctr</b>	Transportadores importantes de Cu <sup>+</sup>
<b>Oxidoreduases</b>	
<b>Galactose oxidase</b>	Redução de galactose
<b>Amina oxidase</b>	Oxidação de diaminas
<b>Transferência de elétrons / produção de energia / proteínas Cu</b>	
<b>Citocromo c oxidase</b>	Participa da última etapa da respiração celular
<b>NADH desidrogenase</b>	Transferência de elétrons de NADH para coenzima Q
<b>Remoção de radicais livres</b>	
<b>Cu/Zn SOD</b>	Remoção de radicais livres
<b>Oxidases</b>	
<b>Lacase</b>	Produção de melanina
<b>Ferroxidase Multi-cobre</b>	Absorção de ferro dependente de Cu
<b>Monoxigenase</b>	
<b>Tirosinase</b>	Catalisa a oxidação de fenóis, síntese de melanina

Fonte: Modificado (Festa and Thiele, 2011)

Apesar de diversos estudos apontarem o micronutriente como essencial para a vida e proliferação dos microrganismos, pouco se sabe sobre o metabolismo do Cu em *P. brasiliensis*. Pesquisa sobre a homeostase dos metais realizada por Silva *et al* (2016), identificou os motivos

conservados da família de transportadores CTR (Ctr3) no genoma de *P. brasiliensis*, sendo necessário novos estudos sobre as interações proteína-proteína da chaperona de Cu Atx1 e seu papel na homeostase do cobre.

#### 1.4 – Interatoma em fungos

Ao longo dos anos, as pesquisas na área da biologia molecular, celular, bioquímica e biofísica produziram conhecimento significativo a respeito da estrutura, conformação, função e propriedades das proteínas de forma individual. Todos esses resultados estão disponíveis em bases de dados de proteínas como o KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). De forma geral, as proteínas não agem isoladamente, uma vez que suas funções precisam ser constantemente reguladas para manter a homeostase metabólica (Fields e Song, 1989). As interações proteína-proteína são caracterizadas por relações físicas e altamente específicas entre duas proteínas ou mesmo grupo de proteínas devido ao estado fisiológico e bioquímico nos quais essas proteínas estão inseridas. As interações estabelecidas entre as proteínas compõem o interatoma do organismo e caso ocorra alguma interação que aumente a entropia celular isso poderia ser motivo para o surgimento de doenças, inclusive aquelas causadas por patógenos (De Las Rivas et. al., 2010).

As interações entre proteínas podem ocorrer de maneira transitória com intuito de estimular um determinado efeito em um curto espaço de tempo ou de maneira estável com intuito de formar complexos que realizam funções metabólicas como ocorre em certos processos enzimáticos. Dentre os principais exemplos desses tipos de interação se destacam ativação e inibição de enzimas, relação antígeno-anticorpo, interação entre domínios de proteínas distintas e entre domínios de certas proteínas e peptídeos (Mackay et al., 2007).

Uma abordagem computacional aliada ao estudo da estrutura molecular das proteínas oferecem maiores detalhes sobre a interface que permite a interação entre proteínas e sobre os complexos formados por essas interações. Os parâmetros analisados se referem à dimensão, área de solvatação, forma, resíduos de interface, hidrofobicidade, estado conformacional e formação de complexos. A análise das interfaces nas interações proteína-proteína evidencia a constituição da superfície dessas proteínas e traz indicações de quais características estão envolvidas na estabilização dos complexos formados por essas interações (Berggard et al., 2007).

Diversas propriedades das interações proteína-proteína, como regiões alostéricas e *hotspots*, têm sido empregadas em estratégias de desenho de novos fármacos para tratamento de diversas enfermidades (De Las Rivas et al., 2010). As interações entre proteínas oferecem condições promissoras de intervenção terapêutica uma vez que elas estão presentes em praticamente todos os processos metabólicos celulares. Por esse motivo, a busca por peptídeos capazes de modular interações proteína-proteína e a tentativa de identificar cavidades na superfície ou no interior de uma proteína (*binding*

*pocket*) passíveis de receber um ligante que possa inibir a interação em estudo tem sido intensificada (Stank et al., 2016). Assim, o estudo da interface das interações proteína-proteína pode fornecer informações para o desenho de peptídeos específicos na busca de possíveis agentes antifúngicos de alta eficiência e ao mesmo tempo com efeitos colaterais mínimos (Liu et al., 2017).

## 2. JUSTIFICATIVA

---

As doenças negligenciadas são, um grupo de doenças tropicais, endêmicas especialmente entre as populações pobres da África, Ásia e América Latina. Estas enfermidades, incapacitam ou matam milhões de pessoas e representam uma necessidade médica importante que permanece não atendida. A PCM predomina nas zonas rurais do Brasil e afeta principalmente os agricultores que trabalham a terra, onde o fungo está presente. A PCM consiste na micose sistêmica mais importante do Brasil, correspondendo a um número médio de 168 óbitos por ano no período de 1996 a 2006. Apesar de sua alta incidência ainda não há medidas de controle e prevenção para a PCM, o que tem mobilizado um grande grupo de pesquisadores no estudo e compreensão da biologia deste fungo.

Todos os organismos dependem de sistemas de transporte de metal eficientes para a sobrevivência. O cobre é um oligoelemento particularmente importante porque participa de reações vitais e é um cofator catalítico essencial de enzimas envolvidas em vários processos biológicos que são essenciais para a vida, regulando alterações na estrutura de proteínas, atividade catalítica e interações proteína-proteína (PPI). Desta forma, o cobre controla uma série variada de eventos bioquímicos. A conversão iônica entre  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Cu}^+$  fornece uma reação redox rica e potente, atuando como um centro reativo para diversas reações catalíticas enzimáticas críticas, como formação de melanina, respiração, absorção de ferro, transporte de ferro e desintoxicação por espécies reativas como superóxidos, o que pode modular fatores críticos de virulência de fungos.

Em diversos patógenos fúngicos o gene *ATX1* é descrito como parte da maquinaria da homeostase de Cu, porém, em *P. brasiliensis* não há estudos sobre a função específica desta metaloproteína. Levando-se em consideração a importância do Cu para o estabelecimento e manutenção da doença fúngica, a presente pesquisa busca identificar e caracterizar as interações PPIs à chaperona de Cu *Atx1*. Vale ressaltar que o estudo das PPIs é crucial para uma melhor compreensão das funções das proteínas, dos processos biológicos e vias metabólicas, o que contribuirá para elucidar aspectos desconhecidos da biologia do *P. brasiliensis*, podendo-se identificar potenciais alvos de fármacos em futuro próximo.

### 3. OBJETIVOS

---

#### 3.1. Objetivo geral

Identificar o interatoma da proteína chaperona de Cu Atx1 e selecionar alvos que permitam aumentar o conhecimento a cerca do papel destas proteínas no no metabolismo do cobre em *P. brasiliensis*.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Realizar *pull-down* para determinar as interações de Atx1 com outras proteínas de *P. brasiliensis*;
- Identificar as proteínas que interagem com Atx1 por espectrometria de massas;
- Determinar a estrutura tridimensional da Atx1 e de alvos que interagem com ela por modelagem molecular;
- Utilizar ferramentas de bioinformática para definir as regiões de interações da proteína Atx1 com cb5 e serino protease de *P. brasiliensis*;
- Determinar os *hotspots* que contribuem para a formação de complexos binários com a Atx1;
- Construir a rede de interação da Atx1 em *P.brasiliensis*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

---

### 4.1. Análise de bioinformática

O Repositório Geral Biológico para Conjuntos de Dados de Interação (BioGRID: <https://thebiogrid.org>) é um banco de dados de acesso aberto dedicado ao armazenamento de curadoria e arquivamento de proteínas, interações genéticas e químicas para as principais espécies de organismos modelo e humanos. Os números de acessos das proteínas identificadas foram analisados para suas interações usando a versão 3.5 do banco de dados BioGRID. Para realizar a análise, incluímos o nome da proteína (ATX1) e selecionamos o organismo modelo *S. cerevisiae*. Também foi utilizada a ferramenta de pesquisa de Alinhamento Local Básica (BLAST) que é um programa de pesquisa de similaridade de sequência. A interface pública do BLAST se encontra no site do NCBI (disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Para as análises foram utilizadas as sequências FASTA da proteína no organismo *S. cerevisiae*, colocando o filtro para o organismo de interesse *P. brasiliensis* e utilizando o banco de dados de sequência de proteínas não redundantes (nr), sendo consideradas apenas as sequências com *e-value* próximo de 0.

### 4.2. Modelagem molecular, Ancoragem molecular e análise de hotspot

A estrutura monomérica da proteína Atx1 e das proteínas-alvo foram modeladas pelo servidor ITASSER (ZHANG, 2008). Esse método de bioinformática é utilizado para a previsão da estrutura tridimensional de moléculas proteicas a partir da sequência de aminoácidos da proteína alvo. Os modelos de estrutura para a proteína alvo são criados a partir do banco de dados de proteínas (PDB; <https://www.rcsb.org/>) por uma técnica chamada de reconhecimento de conformação. A estrutura final é construída através da união dos fragmentos estruturais gerados pela técnica usando simulações de Monte Carlo.

Utilizou-se o servidor de predição de PPIs e interfaces de interação chamado de GRAMM-X (<http://vakser.compbio.ku.edu/resources/gramm/grammx>] para determinar as melhores conformações dos complexos proteicos da Atx1 e proteínas ligantes (Tovchigrechko and Vakser, 2006). As proteínas de escolha para análises *in silico* foram a citocromo b5 e a

serino-proteinase. Ambas proteínas estão relacionadas ao metabolismo de cobre e já foi sugerido uma possível interação física das mesmas com a Atx1. Pela primeira vez, estas interações estão sendo elucidadas em *P. brasiliensis*. Após a montagem dos complexos, o próximo passo foi identificar os aminoácidos envolvidos na interação. Usando o servidor KFC2([https://mitchell-lab.biochem.wisc.edu/KFC\\_Server/index.php](https://mitchell-lab.biochem.wisc.edu/KFC_Server/index.php)) para reconhecer todos os resíduos da interface de interação tanto da Atx1 quanto das cadeias de proteínas de ligação (Zhu and Mitchell, 2011).

Também se utilizou o servidor CoCoMAPS (<https://www.molnac.unisa.it/BioTools/cocomaps/>), o qual possibilita a análise e visualização da interface nos complexos proteicos utilizando mapas de contato intermoleculares para identificar os resíduos das proteínas de ligação que interagem com as regiões da Atx1, classificando-os como *hotspots* ou não e determinando as distâncias das ligações de hidrogênio entre os resíduos interagentes (Vangone et al., 2011). Após a identificação desses resíduos, e com o auxílio do programa de visualização molecular Pymol, foram propostas visualmente as melhores conformações das proteínas ligantes.

### 4.3. Microrganismos e condições de crescimento

Para o estudo, foi utilizada a linhagem *Pb18* na fase leveduriforme, mantida em meio *Brain Heart Infusion* (BHI) sólido em estufa à 37°C e sub-cultivada a cada 3 dias. Para os experimentos, as células leveduriformes foram cultivadas à 37°C em meio BHI líquido contendo 1% (p/v) de glicose, e mantidas sob agitação por 48 horas à 120 rpm. Para preparação de células competentes a cepa BL21 de *Escherichia coli* foi cultivada em meio Luria-Bertani (LB) [1% (p/v)], triptona, 0,5% (p/v) 1% (p/v) extrato de levedura. As células foram cultivadas até densidade óptica (DO) de 0,4. Após, lavadas com solução salina de PBS 1X, foram ressuspensas em glicerol 10% (v/v) e armazenadas em -80°C.

### 4.4. Indução da produção e solubilização da proteína recombinante (rAtx1)

Utilizou-se para a expressão heteróloga o cDNA derivado do gene ATX1 (C1G2I6) de *P. brasiliensis* (Petito et al., 2020). Para a transformação bacteriana, 100 ng do DNA foi

adicionado à suspensão de células competentes BL21 de *E. coli* e o material foi mantido no gelo por 1 minuto. Os clones a serem utilizados foram obtidos do Laboratório de Biologia Molecular da UFG, com as seguintes especificações: o vetor pET32a::*Pb18atx1* foi construído pela empresa GenOne, tendo a sequência de *Atx1* de *Pb18* como referência, usando o índice de adaptação de códon (CAI – “*Codon Adaptation Index*”), sendo que o sítio de restrição usado foi para enzima *Bam*HI. A própria empresa realizou o sequenciamento de DNA, utilizando a ferramenta BLAST para avaliar a identidade das sequências de *Atx1* do *Pb18*.

As células foram transferidas para uma cubeta de eletroporação e submetidas a um campo elétrico de 1800 V a fim de permitir a entrada do plasmídeo. Após a eletroporação, as células foram ressuspensas em 900 µL de meio LB [1% (p/v) triptona, 0,5% (p/v) extrato de levedura, 1% (p/v) NaCl] e incubadas à 37°C, sob agitação por 1 hora. Ao término da incubação, alíquotas foram plaqueadas em LB contendo 100 µg/mL ampicilina para seleção das bactérias transformantes, sendo incubadas à 37°C por 16 horas. Após esse tempo, as colônias selecionadas foram inoculadas em LB líquido contendo 100 µg/mL de ampicilina e após 16 horas, uma alíquota foi novamente inoculada em LB líquido contendo 100 µg/mL de ampicilina até atingir DO de 0,6 em 600 nm. A indução da proteína recombinante foi realizada por adição de Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) nas concentrações 0,1 mM e 0,5 mM em um intervalo de tempo de 3 horas. Após indução, as bactérias foram centrifugadas por 10 minutos a 2800 x *g* e ressuspensas em tampão PBS 1X, pH 7,3. O processo de lise foi realizado adicionando-se 500 µg/mL de lisozima por 1 hora, sob agitação constante, à temperatura ambiente. Após a lise, o extrato foi sonificado (Bandelin Sonopuls) usando cinco pulsos de 10 minutos, com intervalo de 10 minutos entre os pulsos e centrifugado posteriormente. O perfil proteico do precipitado e do sobrenadante foi analisado em gel de poliacrilamida 12%.

#### **4.5. Confirmação da proteína recombinante *Atx1* de *P. brasiliensis* por LC-MS/MS**

Com intuito de confirmar se a proteína induzida se tratava realmente da proteína *Atx1*, a fração correspondente à indução no gel de poliacrilamida 12%, foi excisada e submetida à digestão pela enzima tripsina. Para os experimentos as regiões retiradas do gel foram lavadas com 100 µL de H<sub>2</sub>O Mili-Q e 100 µL de acetonitrila 100 % foram adicionados seguido de

incubação por 10 minutos. A amostra foi desidratada à vácuo. Para confirmação da identidade da proteína recombinante, utilizou-se 150 µg de extrato proteico purificado por cromatografia, como especificado acima, adicionando 10 µL de bicarbonato de amônio (50 mM) (pH 8,5) em um tubo de micro centrífuga (Axygen). Após esta etapa, 75 µL de RapiGEST<sup>Z</sup> SF Surfactante (0,2% v/v) (Waters, Milford, MA, USA) foi adicionado às amostras, que posteriormente foram incubadas em banho seco à 80°C por 15 minutos. Para reduzir ligações dissulfeto, adicionou-se 30 µL de ditioneitol (DTT) 10 mM (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) diluído em bicarbonato de amônio a 25 mM, permanecendo o material incubado por 30 minutos à 60° C. Para a alquilação de cisteínas foram adicionados 30 µL de iodoacetamida, 55 mM (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) permanecendo as amostras por 45 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. As proteínas foram digeridas pela adição de 30 µL de tripsina 0,05 µg/µL (Promega, Madison, WI, USA) e incubadas à 37°C, em banho seco, por um período de 16 horas.

O sobrenadante contendo os peptídeos foi transferido para novos microtubos e foi adicionado 50 µL de solução de acetonitrila 50 % (v/v) e ácido trifluoroacético 5 % (v/v). O material foi agitado vigorosamente por 10 minutos. A amostra foi seca sob vácuo, logo em seguida, ressuspensa em 2 µL de água ultrapura, purificada em colunas C18 (ZipTips C18 Pipette Tips, Millipore), seguindo as orientações do fabricante e novamente concentrada a vácuo. A amostra final foi novamente ressuspensa em 20 mM de formiato de amônio, pH 10, e então submetida à análise por espectrometria de massas. Para a obtenção dos espectros de massas foi utilizado o espectrômetro *Synapt G2 HDMS<sup>TM</sup> mass spectrometer* (Waters, Manchester, UK). Os dados obtidos foram comparados com o banco de dados de *P. brasiliensis* utilizando-se o software Protein Lynx Global Server (versão 3.0.2).

#### **4.6. Experimento de *Pull-down***

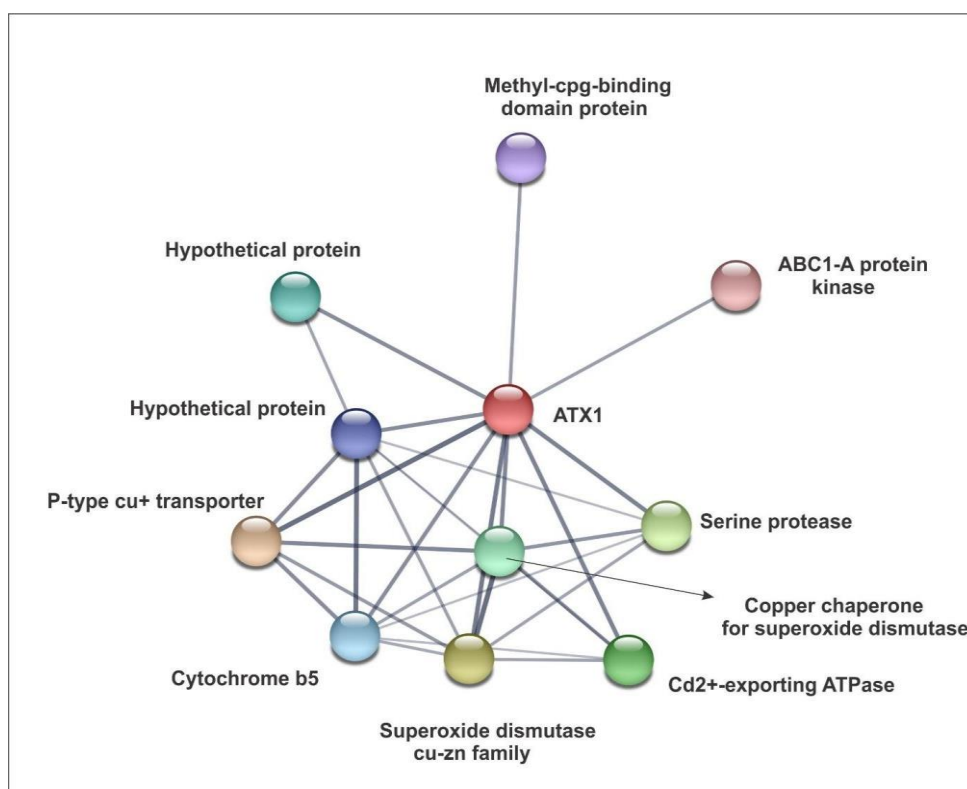
O ensaio *pull down* é um procedimento de cromatografia de afinidade que usa uma proteína isca, neste caso a Atx1 de *P. brasiliensis*. Atx1 foi imobilizada em resina de níquel do tipo Ni-NTA e incubada com uma fonte de proteínas (presas) correspondendo ao extrato proteico do fungo. O ensaio foi realizado em condições ambientais e os resultados incluem associações diretas e indiretas entre as proteínas isca e presa. Inicialmente, 300 µg de extrato de proteínas totais de células leveduriformes de *P. brasiliensis* foi incubado durante 3 horas em

gelo, sob agitação suave. Em seguida, a coluna contendo as proteínas isca e presa foi lavada com tampão por 5 vezes para reduzir interações inespecíficas ou contaminantes. A amostra eluída foi submetida à digestão trípica e os peptídeos digeridos foram separados via NanoUPLC-MS<sup>E</sup> e analisados utilizando o sistema nanoACQUITY (Waters Corporation, Milford, Manchester, RU) para identificar as possíveis proteínas que interagiram com Atx1.

## 5. RESULTADO E DISCUSSÃO

### 5.1 Rede de interação da Atx1 de *P. brasiliensis* de acordo com o STRING

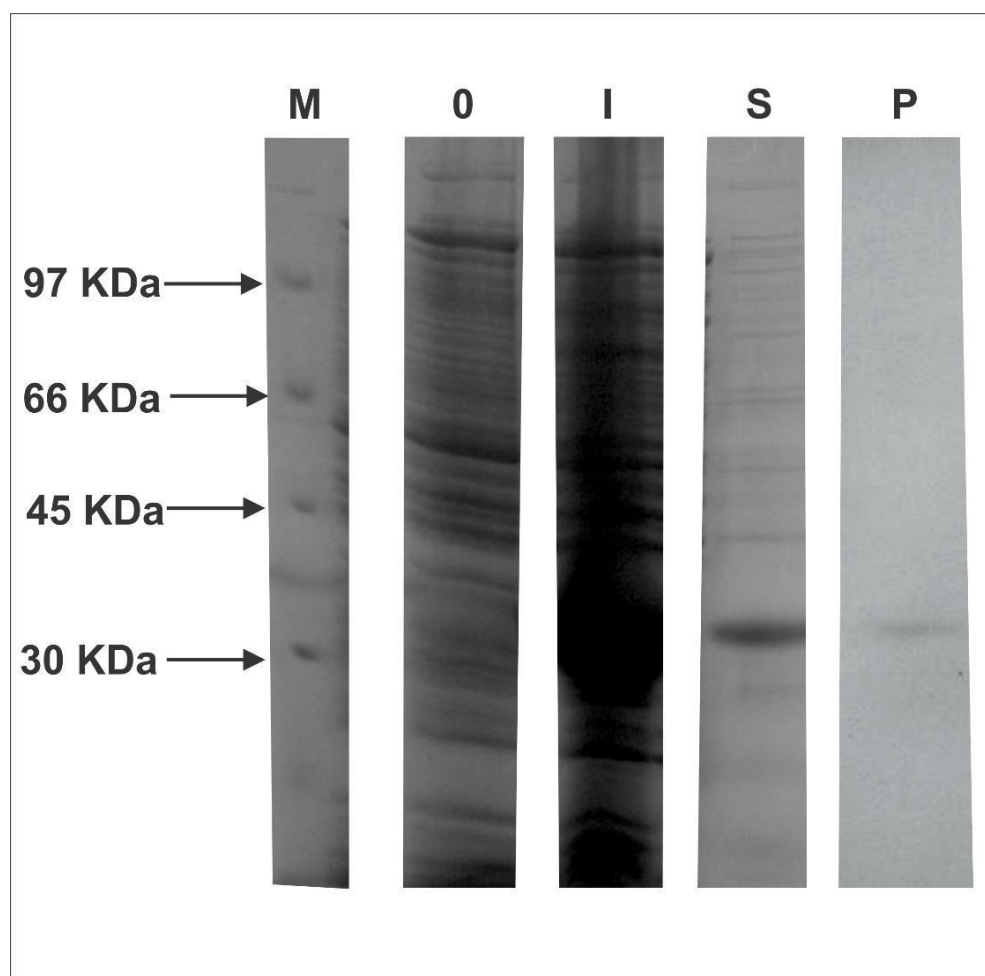
Utilizamos os dados obtidos para construir uma rede de interações proteína-proteína no banco de dados STRING (Figura 4), comparamos os nossos resultados com os obtidos no banco de dados de interação proteína-proteína e identificamos proteínas que também interagiram com Atx1 no ensaio de pull-down.



**Figura 4 Interações da Atx1 de acordo com o banco de dados STRING.** A proteína Atx1 de *P. brasiliensis* interage com 10 proteínas de acordo com o banco de dados de interação, a maioria relacionada com o metabolismo de cobre, transporte de elétrons, produção de energia e detoxificação. Dentre essas, foram identificadas no presentetrabalho a citocromo b5 e a serino protease.

### 5.2 Indução da proteína recombinante Atx1 de *P. brasiliensis* Pb18

Após a transformação das células BL21 de *E. coli* com o clone pET32a::Pb18atx1, as colônias selecionadas foram submetidas a testes de indução da expressão de Pb18atx1 por adição de IPTG. Foram testadas as concentrações de 0,1 mM e 0,5mM de IPTG no tempo de 3 horas. A proteína Atx1 fusionada com a cauda de histidina possui um peso molecular de ~30 kDa e foi induzida em todas as concentrações de IPTG (Figura 5). A melhor concentração para expressão da proteína Atx1 foi a de 0,5mM de IPTG.



**Figura 5 Indução da proteína Atx1.** Células bacterianas foram transformadas com o vetor *pET32a::Pb18atx1*. IPTG foi usado na concentração de 0,5 mM. A visualização das proteínas foi realizada pela coloração por azul de coomassie. M – marcador; 0 – tempo zero da indução; I – indução por 3 horas; S – solubilização; P – purificação

### 5.3 Solubilização e purificação da Atx1 de *P. brasiliensis* por cromatografia

Para o processo de solubilização do extrato proteico contendo Atx1 foi realizada a indução da proteína recombinante, e o precipitado e o sobrenadante foram analisados em gel de poliacrilamida 12% (Figura 5). A proteína recombinante Atx1 foi obtida na forma solúvel, evidenciando êxito no processo de solubilização. Além disso, a proteína recombinante Atx1 foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel, e eluída com tampão contendo 250 mM de imidazol, que compete com histidina, deslocando a proteína recombinante. O material da resina, das etapas de lavagem e da eluição foram analisados. Foi possível observar a ligação da proteína recombinante à resina de níquel e a fração da proteína recombinante Atx1 após a eluição. Após purificação a proteína recombinante foi concentrada e em SDS-PAGE 12% (Figura 5), em seguida excisada do gel, digerida e submetida a análise por espectrometria de massas para confirmação de sua identidade.

A confirmação por espectrometria de massas resultou na identificação da Atx1, de número de acesso C1G2I6.

**Tabela 2.** Confirmação da purificação da Atx1 de *P. brasiliensis* por espectrometria de massas.

Nome	Número de Acesso	Score	Cobertura	Peptídeos*
ATX1	C1G2I6	59595,23	83,95	6

\*Quantidade de peptídeos correspondentes a cada proteína identificada por espectrometria de massas.

#### 5.4 Identificação das proteínas que interagem com Atx1 em *P. brasiliensis*

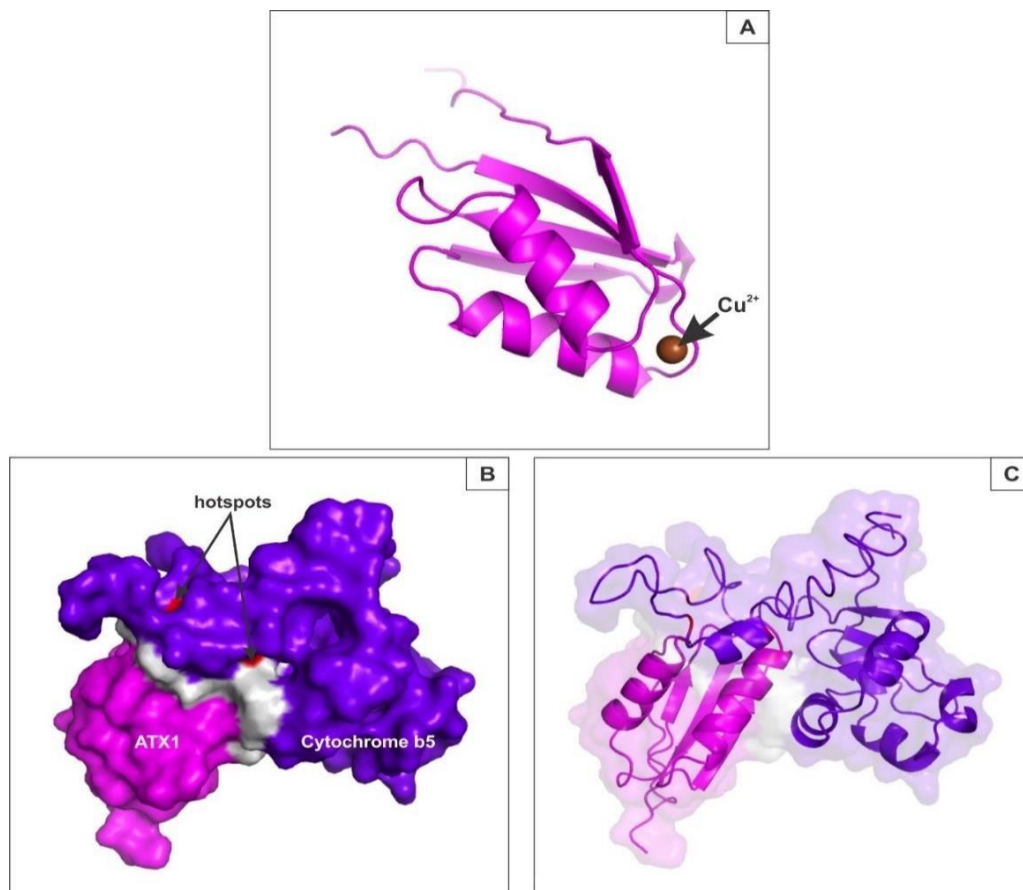
À análise proteômica identificou as proteínas de interação com Atx1 em *P. brasiliensis*. Foi realizada a classificação funcional destas proteínas, as quais estão descritas na Tabela 3. De acordo com os resultados, há dez classes funcionais de proteínas que podem interagir com a Atx1. Proteínas que foram identificadas tanto na condição controle quanto na condição experimental foram excluídas porque podem ter interagido com a cauda de histidina presente na resina e caracterizar falsos positivos. A proteína Atx1 interage com 19 proteínas, cuja classificação biológica inclui, metabolismo de aminoácidos (citrulina-aspartato ligase, adenosilhomocisteinase, aspartil aminopeptidase), metabolismo de DNA (mediador da RNA polimerase II subunidade 9, proteína Usp107 associada ao snRNP U1, proteína com domínio RRM), metabolismo secundário (isopentenil-difosfato delta-isomerase), metabolismo de carboidratos (álcool desidrogenase, aldeído desidrogenase), proteínas de ligação ao metal e função de cofator (proteína mitocondrial de manutenção de zinco), função de detoxificação (tioredoxina redutase, tioredoxina, superfamília de hidrolases HAD), citoesqueleto (cadeia alfa da tubulina), energia (subunidade H da F-ATPase, citocromo b5 de ligação ao grupo heme), destino proteico (serino proteinase) e duas proteínas hipotéticas (PADG\_07883, PADG\_04855).

**Tabela 3** - Proteínas de provável ligação à ATX1 de *P. brasiliensis*.

<b>Proteína</b>	<b>Número de Acesso</b>	<b>Score</b>	<b>Cobertura</b>	<b>Peptídeos*</b>
<b>Metabolismo de aminoácido</b>				
Citrulina-aspartato ligase	PADG_00888	797,8668	14,22	6
Adenosilhomocisteinase	PADG_01886	1375,594	27,52	14
Aspartil aminopeptidase	PADG_04167	863,7702	21,96	13
<b>Metabolismo de DNA</b>				
Mediador da RNA polimerase II subunidade 9	PADG_5110	703,6843	19,5	6
Proteína Usp107 associada ao snRNP U1	PADG_00449	1232,594	13,7	16
Proteína com domínio RRM	PADG_03788	811,2786	15,03	8
<b>Metabolismo Secundário</b>				
Isopentenil-difosfato Delta-isomerase	PADG_03449	872,7254	13,28	8
<b>C-metabolismo</b>				
Álcool desidrogenase	PADG_00221	1357,703	21,4	9
Aldeído desidrogenase	PADG_05081	1362,794	30,8	16
<b>Ligação a Metal e função de cofator</b>				
Proteína mitocondrial de manutenção de zinco	PADG_00206	2151,42	10,48	3
<b>Detoxificação</b>				
Tiorredoxina redutase	PADG_01551	1759,664	22,35	8
Tiorredoxina	PADG_03161	906,631	33,73	13
Superfamília de hidrolases HAD	PADG_02181	718,416	24,36	9
<b>Citoesqueleto</b>				
Cadeia alfa da tubulina	PADG_00128	655,5477	21,29	9
<b>Destino Proteico</b>				
Serino proteinase	PADG_07422	1204,784	5,66	4
<b>Energia</b>				
Subunidade H da F-ATPase	PADG_00688	1610,024	36,36	5
Citocromo b5	PADG_03559	955,8373	35,51	3
<b>Hipotéticas</b>				
Proteína Hipotética	PADG_07883	790,6399	35,8	4
Proteína Hipotética	PADG_04855	810,6798	20,31	10

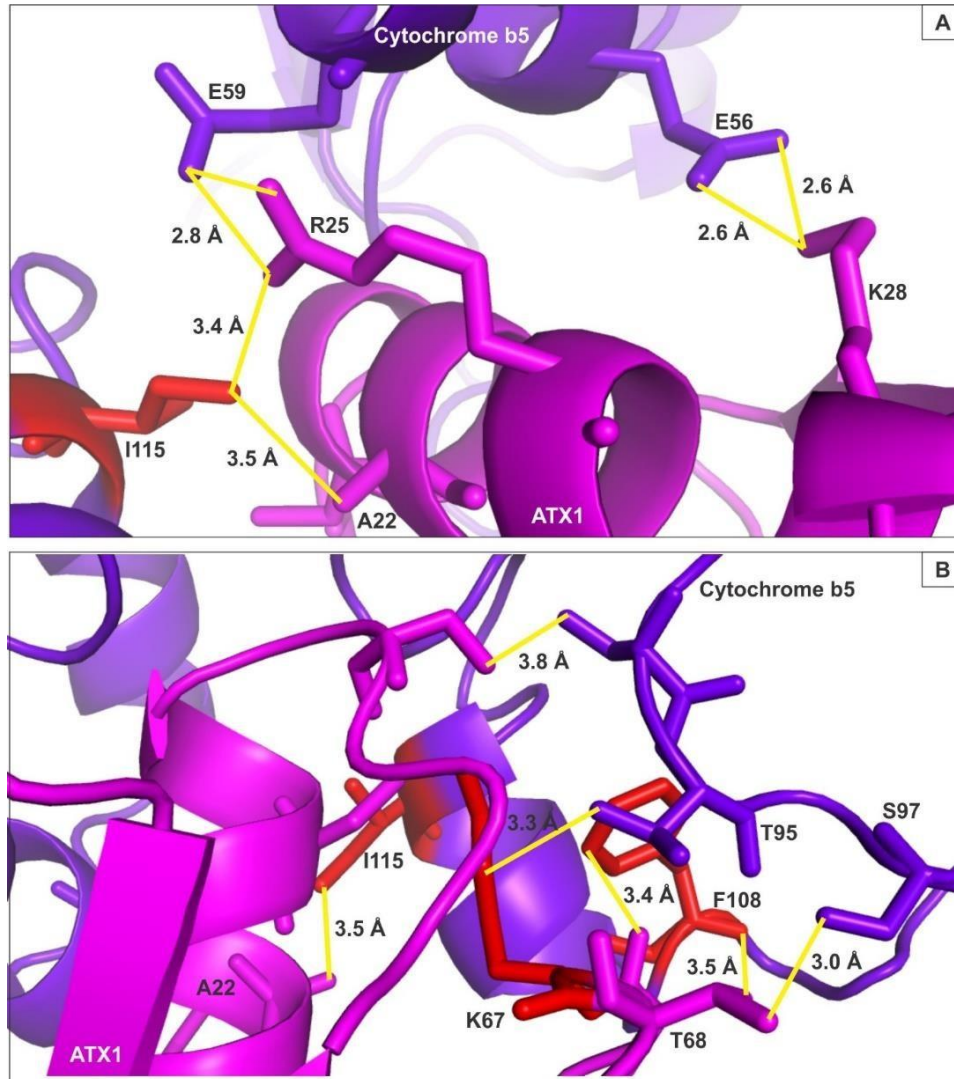
## 5.5 Interação entre Atx1 e citocromo b5

As proteínas citocromo b5 e serino proteinase foram selecionadas para ensaios *in silico* de ligação à Atx1. Essas proteínas foram selecionadas por já terem sido descritas como ligantes *in silico* da proteína Atx1, como demonstra a figura 4.. Até o momento, essa é a primeira vez que essas interações são descritas em *P. brasiliensis*, e o primeiro estudo a identificar a interface de interação entre Atx1 e esses alvos de interação. Um modelo de interação entre a Atx1 e citocromo b5 correspondente ao complexo de menor nível de energia livre está representado na figura 6. Menores níveis de energia refletem uma conformação mais estável para os complexos proteicos e correspondem a uma representação mais fidedigna de sua forma nativa (Siebenmorgen and Zacharias, 2019). A proteína Atx1 de Pb18 apresenta um motivo de associação a metais pesados e foi identificado nesta análise através do servidor InterPro (Blum et al., 2021). O domínio apresenta duas cisteínas conservadas importantes para a ligação da Atx1 ao metal e transferência desse metal a uma proteína receptora. A estrutura do domínio é bem definida e composta por uma beta-folha antiparalela de quatro cadeias e duas alfa-hélices em forma de sanduíche (Figura 6A) (Gitschier et al., 1998). A estrutura tridimensional da Atx1 de *P. brasiliensis* modelada, como mostra o resultado da modelagem molecular (Figura 6A), resultou a partir de *scores* confiáveis (C-score=0.06, TM-score =  $0.72 \pm 0.11$  e RMSD =  $3.4 \pm 2.4 \text{ \AA}$ ). Isso garante que o modelo gerado está próximo das condições *in vivo*.



**Figura 6** Modelo de interação entre Atx1 e citocromo b5. A – Estrutura secundária da Atx1 modelada mostrando a disposição do íon cobre. B – Estrutura em superfície da interação entre Atx1 e citocromo b5, evidenciando a interface de interação e alguns resíduos de hotspots. C – Estrutura em superfície do complexo ATX1-citocromo b5 e a disposição das estruturas secundárias do complexo.

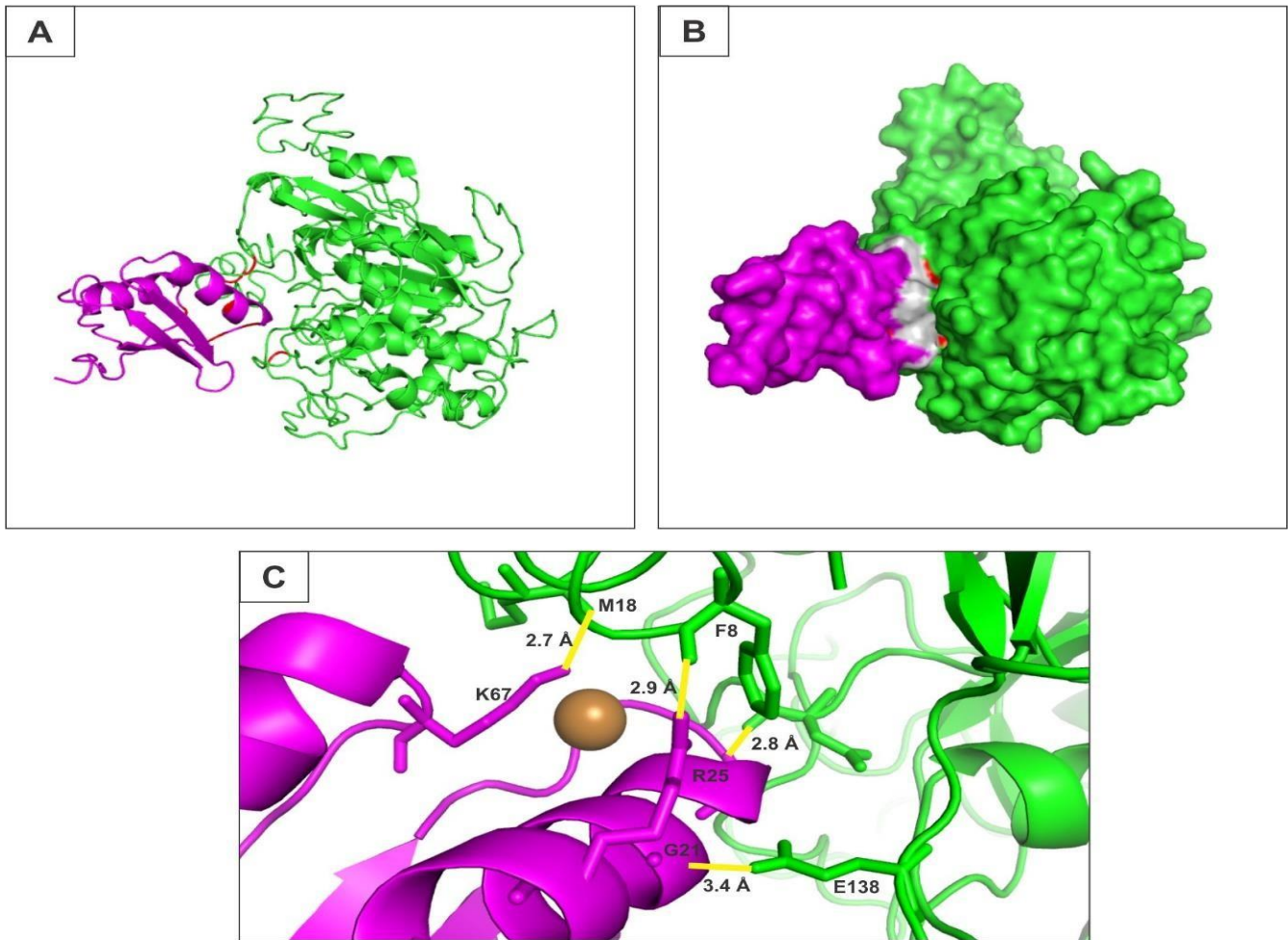
A interação entre Atx1 e citocromo b5 é favorecida pela presença de três *hotspots* principais. Desses, dois estão na superfície da interface de interação (Figura 7B) e um imerso nessa região e eles interagem por pontos de hidrogênio para manter o complexo estável. Os resíduos E (ácido glutâmico) 56 e E59 estabelecem duas pontes de hidrogênio cada um com os resíduos K28 (lisina) e R (arginina) 25 da Atx1, respectivamente. Essas interações são da ordem de 2 Å (Figura 7A). Já o resíduo I (interleucina) 115, que é um dos *hotspots* principais, estabelece duas pontes de hidrogênio, uma com o resíduo A (alanina) 22 com distância de 3.5 Å e com o R25, com distância de 3.4 Å. Os outros dois *hotspots* estão próximos e inseridos em uma região da interface onde estabelecem interações com distâncias da ordem de 3.0 Å (Figura 7B).



**Figura 7- Pontes de hidrogênio na interface de interação entre Atx1 e citocromo b5.** A – O resíduo de *hotspot* I115 forma pontes de hidrogênio com A22 e R25, e os resíduos vizinhos E56 e E59 formam pontes de hidrogênio com K28 e R25, respectivamente. B - Os resíduos K67 e F108 foram classificados como *hotspots* e interagem com resíduos presentes na interface. Essa região é o local da interface que mais contribui energeticamente para a conformação do complexo. Os resíduos em vermelho correspondem aos hotspots.

## 5.6 Interação entre Atx1 e serino-proteinase

A interação entre Atx1 e a serino-proteinase apresenta menos pontos de contato do que a interação da Atx1 com a citocromo b5, conseqüentemente a área da interface de interação no primeiro complexo é menor (Figura 8). No entanto, o número de *hotspots* no segundo complexo é maior (Figura 8A e B) e de forma interessante, a região de interação da Atx1 com a serino-proteinase é próxima ao local onde há interação com o íon cobre (Figura 8C).



**Figura 8 Modelo representativo da interação ATX1-serino proteinase.** A – Visualização em *cartoon* mostrando os resíduos de *hotspots* identificados em vermelho na interface de interação do complexo. B - Estrutura em superfície do complexo ATX1-serino proteinase com pequena área de interface, mas com considerável número de *hotspots*. C – Pontes de hidrogênio estabelecidas entre resíduos da ATX1 e serino-proteinase. Os resíduos R25 e K67 contribuem de forma mais significativa para a conformação do complexo por estabelecerem interações com distância da ordem de 2.5 Å.

## 6. DISCUSSÃO

---

O ensaio de *pull-down* possibilitou determinar algumas interações que a proteína Atx1 estabelece. As proteínas identificadas que fazem parte da classificação do metabolismo de aminoácidos sugerem a necessidade de adaptação ao hospedeiro. A proteína aspartil aminopeptidase é um exemplo de enzima que participa do metabolismo de aminoácidos e é identificada em ensaios de privação de metais nas relações patógeno-hospedeiro (ARAÚJO DANIELLE SILVA, 2019), apresentando, inclusive um sítio de ligação a metais, como por exemplo o Cu (Chen et al., 2012). A aspartil aminopeptidase está relacionada à adaptação das condições ambientais e fornece uma via não seletiva para gerar aminoácidos quando há privação de nutrientes, uma vez que ela contribui para a degradação de peptídeos tanto no citosol como em vacúolos (PARENTE-ROCHA *et al*, 2015). A adenosil-homocisteinase, outra proteína relacionada ao metabolismo de aminoácidos, já foi identificada em um trabalho realizado por Araujo *et al.* onde relata o acúmulo desta proteína em células de levedura. Esta enzima degrada S-adenosil-homocisteína, que é um forte inibidor das metiltransferases dependentes de S-adenosil-metionina (ARAÚJO DANIELLE SILVA, 2019). Além disso, já foi mostrado que os níveis de cobre podem influenciar o metabolismo da adenosil-homocisteinase. Íons  $\text{Cu}^{2+}$  livres inibem a proteína de forma não competitiva. A ligação do cobre resulta na liberação de cofatores  $\text{NAD}^+$  e aumento da atividade enzimática na presença de níveis elevados de cobre (Medici and Kieffer, 2018)

A álcool desidrogenase (ADH) catalisa a redução do acetaldeído a etanol durante a fermentação da glicose e a aldeído desidrogenase catalisa a oxidação de aldeídos e participa na desintoxicação de tais compostos. A ADH é imunogênica em vários organismos incluindo o *P. brasiliensis* (DANTAS *et al*, 2009) e foi descrita por Rezende *et al* (2011) como uma proteína expressa mais intensamente na fase de levedura em condições anaeróbias. Desta maneira, ocorre um deslocamento metabólico e consequente produção de etanol via piruvato, o qual pode ser utilizado para danificar os tecidos durante a invasão no hospedeiro (FELIPE, 2005). A interação entre Atx1 e a aldeído desidrogenase pode indicar uma via de escape para o estresse oxidativo, além da evasão da resposta imune do hospedeiro otimizando assim a proteção contra condições de estresse (GRAHL, 2011; SINGH, 2004; ABDUL, 2018).

A Atx1 também interage com a tiorredoxina e a tiorredoxina redutase, relacionadas ao reparo de proteínas danificadas por oxidação, assim como também atuam na regulação do

estado redox celular prevenindo o dano oxidativo (Thön et al., 2007). Outra proteína com funções redox é a citocromo b5 de ligação ao heme, que interage com vários parceiros proteicos. Esta habilidade se deve à sua superfície altamente dinâmica, o que pode ser visto na figura 5B. Apresenta funções que atuam na biossíntese de esterol e alongamento de ácidos graxos, constituindo um componente essencial de vários sistemas redox, normalmente ligados à membrana. Além disso, essa proteína tem sido relacionada à resistência de espécies de fungos patogênicos a fármacos azólicos (Misslinger et al., 2017).

Existem algumas evidências científicas da interação entre Atx1 e citocromo b5 (ou proteínas da família do citocromo). Foi demonstrado, por exemplo, que a Atx1 participa dos processos de transporte de cobre para o citocromo na cadeia transportadora de elétrons (Tottey et al., 2002). Em outra abordagem, foi mostrado que a atividade da Atx1 é necessária para a atividade normal do citocromo b5, principalmente em condições limitantes desse metal (Tottey et al., 2002). Além disso, em estudos de transporte de substâncias através de membranas em microrganismos, foi sugerida a alta probabilidade da interação direta entre Atx1 e citocromo c oxidase na manutenção do metabolismo de cobre nas células e no transporte de cobre para a mitocôndria (Systems et al., 2001).

Outros fatores corroboram com a hipótese de que Atx1 interaja com outras proteínas relacionadas ao metabolismo de cobre, transporte de elétrons e proteínas de detoxificação. Os motivos presentes na estrutura da Atx1 são regiões de ancoragem para metaloproteínas. O domínio associado a metais pesados, presente na Atx1, é conservado e apresenta aproximadamente 30 resíduos de aminoácidos e a estequiometria de ligação é um íon de cobre por domínio de ligação (Figura 5A). Esse domínio também está presente em proteínas que transportam ou detoxificam metais pesados, por exemplo, as ATPases, transportadores de elétrons e chaperonas de cobre (Bull and Cox, 1994).

O estudo da interface de interação entre Atx1 e citocromo b5 e Atx1 e serino-protease depende da análise de *hotspots*. Estes são resíduos da interface proteína-proteína que contribuem com a maior parte da energia livre de ligação e conseqüentemente na conformação do complexo (NURCAN TUNCBAG, 2009). Normalmente, *hotspots* aparecem em grupos na interface (WANG, 2018) e resíduos vizinhos a eles também podem estabelecer pontes de hidrogênio para diminuir a energia livre do complexo e auxiliar na conformação mais estável do mesmo (Figuras 5 e 6). Apesar das evidências de interação entre Atx1 e as duas proteínas, citocromo b5 e serino-protease, esse é primeiro estudo *in silico* que explora um possível modelo

de interação para esses complexos. Além disso, proteínas identificadas nos ensaios cromatográfico e proteômico (superóxido dismutase Cu-Zn, proteínas da família do citocromo e a serino protease), também foram identificadas pelo STRING e em outros estudos, reforçando a função da Atx1 para manutenção da homeostase de Cu em *P. brasiliensis* (SILVA, 2011; FESTA & THIELE 2011).

## 7. CONCLUSÃO

---

- O ensaio de *pull-down* determinou as interações da Atx1 com proteínas de *P.brasiliensis*;
- As proteínas que interagiram com Atx1 foram determinadas por espectrometria de massas;
- A estrutura tridimensional da Atx1 e de alvos que interagiram com ela foram determinadas por modelagem molecular;
- Ferramentas de bioinformática foram usadas para definir as regiões de interações da proteína Atx1 com cb5 e serino protease de *P. brasiliensis*;
- Os *hotspots* que contribuem para a formação de complexos binários com a Atx1 foram identificados;

Como perspectivas, acredita-se que a partir desse trabalho possa ser possível modular as regiões de interação entre Atx1 e seus alvos como forma de propor novos tratamentos contra PCM.

## 8. REFERÊNCIAS

---

- Albano, A. P. N., Klafke, G. B., Brandolt, T. M., Da Hora, V. P., Nogueira, C. E. W., Xavier, M. O., et al. (2015). Seroepidemiology of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in horses from Rio Grande do Sul, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 46, 513–517. doi: 10.1590/S1517-838246246220140559.
- Bagagli, E., Theodoro, R. C., Bosco, S. M. G., and McEwen, J. G. (2008). *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. *Mycopathologia* 165, 197–207. doi: 10.1007/s11046-007-9050-7.
- Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S., Kozyreva, T., Zovo, K., and Palumaa, P. (2010). Affinity gradients drive copper to cellular destinations. *Nature* 465, 645–648. doi: 10.1038/nature09018.
- Blum, M., Chang, H. Y., Chuguransky, S., Grego, T., Kandasamy, S., Mitchell, A., et al. (2021). The InterPro protein families and domains database: 20 years on. *Nucleic Acids Research* 49, D344–D354. doi: 10.1093/nar/gkaa977.
- Boal, A. K., and Rosenzweig, A. C. (2009). Structural Biology of Copper Trafficking. *Chemical Reviews* 109, 4760–4779. doi: 10.1021/cr900104z.
- Brown, N. M., Torres, A. S., Doan, P. E., and O'Halloran, T. V. (2004). Oxygen and the copper chaperone CCS regulate posttranslational activation of Cu,Zn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 5518–5523. doi: 10.1073/pnas.0401175101.
- Brummer, E., Castaneda, E., Restrepo, A., Microbiologia, G. De, and Bogota, S. De (1993). *Paracoccidioidomycosis : an Update*. 6, 89–117.
- Bull, P. C., and Cox, D. W. (1994). Wilson disease and Menkes disease: new handles on heavy-metal transport. *Trends in Genetics* 10, 246–252. doi: 10.1016/0168-9525(94)90172-4.
- Cankorur-Cetinkaya, A., Eraslan, S., and Kirdar, B. (2016). Transcriptomic response of yeast cells to ATX1 deletion under different copper levels. *BMC Genomics* 17, 1–14. doi: 10.1186/s12864-016-2771-6.
- Carrero, L. L., Niño-Vega, G., Teixeira, M. M., Carvalho, M. J. A., Soares, C. M. A., Pereira, M., et al. (2008). New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. *Fungal Genetics and Biology* 45, 605–612. doi: 10.1016/j.fgb.2008.02.002.
- Chen, Y., Farquhar, E. R., Chance, M. R., Palczewski, K., and Kiser, P. D. (2012). Insights into substrate specificity and metal activation of mammalian tetrahedral aspartyl aminopeptidase. *Journal of Biological Chemistry* 287, 13356–13370. doi: 10.1074/jbc.M112.347518.
- da Paz, G. S., Adorno, B. M. V., Richini-Pereira, V. B., Bosco, S. M. G., and Langoni, H. (2018). Infection by *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus* spp. and *Paracoccidioides*

- brasiliensis in bats collected in urban areas. *Transboundary and Emerging Diseases* 65, 1797–1805. doi: 10.1111/tbed.12955.
- Felipe, A., Chaves, A., Navarro, M. V., Barros, Y. N. De, Silva, R. S., Xander, P., et al. (2021). Updates in Paracoccidioides Biology and Genetic Advances in Fungus Manipulation. doi: 10.3390/jof7020116.
- Festa, R. A., and Thiele, D. J. (2011). Copper: an Essential Metal in Biology Copper in prokaryotes. *Festa RA, Thiele DJ. Copper: an Essential Metal in Biology. Current biology* 21, 877–883. doi: 10.1016/j.cub.2011.09.040.
- Fontana, F. F., dos Santos, C. T. B., Esteves, F. M., Rocha, A., Fernandes, G. F., do Amaral, C. C., et al. (2010). Seroepidemiological survey of paracoccidioidomycosis infection among urban and rural dogs from Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Mycopathologia* 169, 159–165. doi: 10.1007/s11046-009-9241-5.
- Franco, M., Lacaz, C. da S., Restrepo-Moreno, A., and Negro, G. Del eds. (1994). *PARACOCIDIOIDOMYCOSIS*. Boca Raton, FL 33487-2742: CRC Press.
- Fu, D., Beeler, T. J., and Dunn, T. M. (1995). Sequence, mapping and disruption of CCC2, a gene that cross-complements the Ca(2+)-sensitive phenotype of csg1 mutants and encodes a P-type ATPase belonging to the Cu(2+)-ATPase subfamily. *Yeast* 11, 283–292. doi: 10.1002/yea.320110310.
- Gitschier, J., Moffat, B., Reilly, D., Wood, W. I., and Fairbrother, W. J. (1998). Solution structure of the fourth metal-binding domain from the Menkes copper-transporting ATPase. *Nature Structural Biology* 5, 47–54. doi: 10.1038/nsb0198-47.
- Hrycyk, M. F. (2018). Ecologia de Paracoccidioides brasiliensis e Paracoccidioides lutzii e sua associação com o tatu Dasypus novemcinctus nos estados de São Paulo e Mato Grosso , Brasil . Ecologia de Paracoccidioides brasiliensis e Paracoccidioides lutzii e sua associação com.
- Kanegae, H., Tomino, N., Nakamura, Y., Minakawa, T., Yaguchi, T., Izawa, T., et al. (2020). Parengyodontium album Isolated from Cutaneous Lesions of a Pacific White-Sided Dolphin (Lagenorhynchus obliquidens) During Treatment for Paracoccidioidomycosis Ceti. *Mycopathologia* 185, 1021–1031. doi: 10.1007/s11046-020-00484-3.
- Kim, B.-E., Nevitt, T., and Thiele, D. J. (2008). Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nature Chemical Biology* 4, 176–185. doi: 10.1038/nchembio.72.
- Lalioi, V., Muruais, G., Tsuchiya, Y., Pulido, D., and Sandoval, I. V. (2009). Molecular mechanisms of copper homeostasis Vasiliki. *In Vivo*, 4878–4903.
- Li, C., Li, Y., and Ding, C. (2019). The Role of Copper Homeostasis at the Host-Pathogen Axis: From Bacteria to Fungi. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 175. doi: 10.3390/ijms20010175.
- London, N., Raveh, B., Cohen, E., Fathi, G., and Schueler-furman, O. (2011). Rosetta FlexPepDock web server — high resolution modeling of peptide – protein interactions. *39*, 249–253. doi: 10.1093/nar/gkr431.

- Mackie, J., Szabo, E. K., Urgast, D. S., Ballou, E. R., Childers, D. S., MacCallum, D. M., et al. (2016). Host-Imposed Copper Poisoning Impacts Fungal Micronutrient Acquisition during Systemic *Candida albicans* Infections. *PLoS One* 11, e0158683. doi: 10.1371/journal.pone.0158683.
- Matute, D. R., Sepulveda, V. E., Quesada, L. M., Goldman, G. H., Taylor, J. W., Restrepo, A., et al. (2006). Microsatellite analysis of three phylogenetic species of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Clinical Microbiology* 44, 2153–2157. doi: 10.1128/JCM.02540-05.
- Medici, V., and Kieffer, D. A. (2018). *Epigenetics relating to Wilson disease*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-810532-0.00015-X.
- Mendes, J. F., Klafke, G. B., Albano, A. P. N., Cabana, Â. L., Teles, A. J., de Camargo, Z. P., et al. (2017a). Paracoccidioidomycosis infection in domestic and wild mammals by *Paracoccidioides lutzii*. *Mycoses* 60, 402–406. doi: 10.1111/myc.12608.
- Mendes, R. P., Cavalcante, R. de S., Marques, S. A., Marques, M. E. A., Venturini, J., Sylvestre, T. F., et al. (2017b). *Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil*. doi: 10.2174/1874285801711010224.
- Misslinger, M., Gsaller, F., Hortschansky, P., Müller, C., Bracher, F., Bromley, M. J., et al. (2017). The cytochrome: B 5 CybE is regulated by iron availability and is crucial for azole resistance in *A. fumigatus*. *Metallomics* 9, 1655–1665. doi: 10.1039/c7mt00110j.
- Nevitt, T., Öhrvik, H., and Thiele, D. J. (2012). Charting the travels of copper in eukaryotes from yeast to mammals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1823, 1580–1593. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.02.011.
- Nunes Mario, D., Schwingel, D., Giroto, L. P. dos S., Malvestio, L. M. M., Jaques, P. J. da S., and Biolowons, G. K. (2020). Paracoccidioidomycosis in the northern region of Rio Grande do Sul. *Revista De Epidemiologia E Controle De Infecção* 10(4), 1–6. doi: 10.17058/reci.v10i4.15583.
- Pardini, A., and Moreira, V. (2008). Artigo de Revisão BEPA Boletim Epidemiológico Paulista. 5, 11–24.
- Petito, G., de Curcio, J. S., Pereira, M., Bailão, A. M., Paccez, J. D., Tristão, G. B., et al. (2020). Metabolic Adaptation of *Paracoccidioides brasiliensis* in Response to in vitro Copper Deprivation. *Frontiers in Microbiology* 11, 1–16. doi: 10.3389/fmicb.2020.01834.
- Queiroz-Telles, F., Fahal, A. H., Falci, D. R., Caceres, D. H., Chiller, T., and Pasqualotto, A. C. (2017). Neglected endemic mycoses. *The Lancet Infectious Diseases* 17, e367–e377. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30306-7.
- Ricci, G., Mota, F. T., Wakamatsu, A., Serafim, R. C., Borra, R. C., and Franco, M. (2004). Canine paracoccidioidomycosis. *Medical Mycology* 42, 379–383. doi: 10.1080/1369378032000141417.

- Sacristán, C., Esperón, F., Ewbank, A. C., Kolesnikovas, C. K. M., and Catão-Dias, J. L. (2018). Paracoccidioidomycosis ceti in an Atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*), Brazil. *Transboundary and Emerging Diseases* 65, 585–587. doi: 10.1111/tbed.12781.
- San-Blas, G., Niño-Vega, G., and Iturriaga, T. (2002). Paracoccidioides brasiliensis and paracoccidioidomycosis: Molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Medical Mycology*, 225–242.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A. (2015). Paracoccidioidomycosis Treatment. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 57, 31–37. doi: 10.1590/s0036-46652015000700007.
- Shikanai-Yasuda, M. A., Mendes, R. P., Colombo, A. L., de Queiroz-Telles, F., Kono, A. S. G., Paniago, A. M. M., et al. (2017a). Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 50, 715–740. doi: 10.1590/0037-8682-0230-2017.
- Shikanai-Yasuda, M. A., Mendes, R. P., Colombo, A. L., de Queiroz-Telles, F., Kono, A. S. G., Paniago, A. M. M., et al. (2017b). Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 50, 715–740. doi: 10.1590/0037-8682-0230-2017.
- Shikanai-Yasuda, M. A., Telles Filho, F. D. Q., Mendes, R. P., Colombo, A. L., Moretti, M. L., Kono, A., et al. (2006). Consenso em paracoccidioidomicose. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39, 297–310.
- Siebenmorgen, T., and Zacharias, M. (2019). Evaluation of Predicted Protein–Protein Complexes by Binding Free Energy Simulations. *Journal of Chemical Theory and Computation* 15, 2071–2086. doi: 10.1021/acs.jctc.8b01022.
- Silva, M. G., Schrank, A., Bailão, E. F. L. C., Bailão, A. M., Borges, C. L., Staats, C. C., et al. (2011). The Homeostasis of Iron, Copper, and Zinc in Paracoccidioides Brasiliensis, Cryptococcus Neoformans Var. Grubii, and Cryptococcus Gattii: A Comparative Analysis. *Frontiers in Microbiology* 2, 1–19. doi: 10.3389/fmicb.2011.00049.
- Systems, M. T., Copyright, W., Gmbh, W. V., and Isbns, K. (2001). *Microbial Transport Systems*. doi: 10.1002/3527600728.
- Teixeira, M. M., Theodoro, R. C., de Carvalho, M. J. A., Fernandes, L., Paes, H. C., Hahn, R. C., et al. (2009). Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the Paracoccidioides genus. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 52, 273–283. doi: 10.1016/j.ympev.2009.04.005.
- Terçarioli, G. R., Bagagli, E., Reis, G. M., Theodoro, R. C., Bosco, S. D. M. G., Macoris, S. A. D. G., et al. (2007). Ecological study of Paracoccidioides brasiliensis in soil: Growth ability, conidia production and molecular detection. *BMC Microbiology* 7, 1–8. doi: 10.1186/1471-2180-7-92.
- Thön, M., Al-Abdallah, Q., Hortschansky, P., and Brakhage, A. A. (2007). The thioredoxin system of the filamentous fungus Aspergillus nidulans: Impact on development and

- oxidative stress response. *Journal of Biological Chemistry* 282, 27259–27269. doi: 10.1074/jbc.M704298200.
- Tottey, S., Rondet, S. A. M., Borrelly, G. P. M., Robinson, P. J., Rich, P. R., and Robinson, N. J. (2002). A copper metallochaperone for photosynthesis and respiration reveals metal-specific targets, interaction with an importer, and alternative sites for copper acquisition. *The Journal of biological chemistry* 277, 5490–5497. doi: 10.1074/jbc.M105857200.
- Tovchigrechko, A., and Vakser, I. A. (2006). GRAMM-X public web server for protein-protein docking. *Nucleic Acids Research* 34, W310–W314. doi: 10.1093/nar/gkl206.
- Tristão, G. B., do Prado Assunção, L., dos Santos, L. P. A., Luiz Borges, C., Garcia Silva-Bailão, M., de Almeida Soares, C. M., et al. (2014). Predicting copper-, iron- and zinc-binding proteins in pathogenic 2 species of the *Paracoccidioides* genus. *Frontiers in Microbiology* 5, 1–11. doi: 10.3389/fmicb.2014.00761.
- Turissini, D. A., Gomez, O. M., Teixeira, M. M., McEwen, J. G., and Matute, D. R. (2017). Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. *Fungal Genetics and Biology* 106, 9–25. doi: 10.1016/j.fgb.2017.05.007.
- Vangone, A., Spinelli, R., Scarano, V., Cavallo, L., and Oliva, R. (2011). COCOMAPS : a web application to analyze and visualize contacts at the interface of biomolecular complexes. *27*, 2915–2916. doi: 10.1093/bioinformatics/btr484.
- Vilela, R., Huebner, M., Vilela, C., Vilela, G., Pettersen, B., Oliveira, C., et al. (2021). The taxonomy of two uncultivated fungal mammalian pathogens is revealed through phylogeny and population genetic analyses. *Scientific Reports* 11, 1–13. doi: 10.1038/s41598-021-97429-7.
- Zhu, X., and Mitchell, J. C. (2011). KFC2: A knowledge-based hot spot prediction method based on interface solvation, atomic density, and plasticity features. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* 79, 2671–2683. doi: 10.1002/prot.23094.

## ANEXO 1

KFC2 Hot Spot Prediction Server @mitchell-lab.org from Wed, 01 Dec 2021 14:47:05 EST  
 JobId: Oda2902f77f34f0fb2d73e2689dc7edd JobName: citATX ChainSet1: A ChainSet2:  
 Z

Chain	Res	Num	Class	Conf	Class	Conf	Class	Value	Class	DDG	Class	Value
A	ILE	9		-3.10		-0.93						
A	HIS	26		-0.50		-0.53						
A	ASP	27		-1.49		-0.97						
A	ASP	53		-1.94		-1.00						
A	THR	55	Hotspot	0.22		-0.46						
A	GLU	56		-0.50		-0.80						
A	GLU	59	Hotspot	0.07		-0.50						
A	ASP	60		-2.64		-0.98						
A	GLY	62		-2.73		-0.66						
A	LEU	79		-1.98		-0.84						
A	LEU	82		-2.62		-0.98						
A	PRO	83		-1.06		-0.81						
A	PRO	86		-0.98		-0.78						
A	VAL	87		-1.67		-0.98						
A	PRO	90	Hotspot	0.33		-0.65						
A	GLN	93		-2.00		-0.92						
A	SER	94		-0.84		-0.78						
A	THR	95	Hotspot	0.98		-0.38						
A	SER	97		-2.13		-0.94						
A	THR	106		-2.19		-0.99						
A	PHE	108	Hotspot	0.08	Hotspot	0.22						
A	GLY	109		-1.30		-0.76						
A	GLY	111		-2.15		-0.72						
A	VAL	112	Hotspot	0.97		-0.35						
A	ILE	115	Hotspot	1.50	Hotspot	0.06						
A	LEU	116	Hotspot	0.41		-0.16						
A	GLY	120		-2.06		-0.76						
A	ALA	121	Hotspot	0.18		-0.64						
A	GLY	123		-2.19		-0.74						
Z	ILE	12		-1.40		-0.78						
Z	SER	13		-0.62		-0.78						
Z	MET	14		-1.32		-0.48						
Z	SER	15	Hotspot	0.21		-0.54						
Z	CYS	16		-0.55		-0.73						
Z	GLY	17	Hotspot	0.14		-0.51						
Z	GLY	18		-0.29		-0.62						
Z	CYS	19	Hotspot	1.47		-0.12						
Z	SER	20		-0.59		-0.56						
Z	GLY	21		-0.83		-0.64						
Z	ALA	22		-0.08		-0.51						
Z	GLU	24		-0.01		-0.15						
Z	ARG	25		-0.78		-0.50						
Z	VAL	26		-2.31		-0.99						
Z	LYS	28		-2.65		-0.90						

Z	THR	37	-----	-3.29	-----	-0.85	-----	---	-----	---	-----	---
Z	VAL	38	-----	-3.19	-----	-0.89	-----	---	-----	---	-----	---
Z	LEU	40	-----	-0.50	-----	-0.50	-----	---	-----	---	-----	---
Z	GLU	41	-----	-1.48	-----	-0.81	-----	---	-----	---	-----	---
Z	SER	42	-----	-3.24	-----	-0.85	-----	---	-----	---	-----	---
Z	GLN	43	Hotspot	0.71	-----	-0.03	-----	---	-----	---	-----	---
Z	LYS	63	-----	-2.14	-----	-0.90	-----	---	-----	---	-----	---
Z	LYS	64	-----	-2.01	-----	-0.94	-----	---	-----	---	-----	---
Z	THR	65	-----	-0.19	-----	-0.55	-----	---	-----	---	-----	---
Z	GLY	66	-----	-0.37	-----	-0.63	-----	---	-----	---	-----	---
Z	LYS	67	Hotspot	0.82	Hotspot	0.31	-----	---	-----	---	-----	---
Z	THR	68	-----	-1.32	-----	-0.95	-----	---	-----	---	-----	---

## ANEXO 2

KFC2 Hot Spot Prediction Server @mitchell-lab.org from 01 Dec 2021 07:29:14 EDT  
 JobId: 4162e020e9aa1319d47e5b85264d83a3 JobName: serin\_protease ChainSet1: A  
 ChainSet2: B

Chain	Res	Num	Class	Conf	Class	Conf	Class	Value	Class	DDG	Class	Value
A	ARG	346	-----	-2.70	-----	-0.79	-----	---	-----	---	-----	---
A	SER	349	-----	-2.79	-----	-0.91	-----	---	-----	---	-----	---
A	TYR	351	-----	-2.07	-----	-0.69	-----	---	-----	---	-----	---
A	ARG	403	-----	-0.91	-----	-0.19	-----	---	-----	---	-----	---
A	GLU	406	-----	-2.43	-----	-0.96	-----	---	-----	---	-----	---
A	ASN	417	-----	-2.80	-----	-0.94	-----	---	-----	---	-----	---
A	LYS	444	-----	-1.35	-----	-0.86	-----	---	-----	---	-----	---
A	VAL	445	-----	-0.69	-----	-0.87	-----	---	-----	---	-----	---
A	GLY	446	-----	-0.02	-----	-0.54	-----	---	-----	---	-----	---
A	TYR	449	Hotspot	1.58	Hotspot	0.37	-----	---	-----	---	-----	---
A	ASN	450	-----	-0.57	-----	-0.80	-----	---	-----	---	-----	---
A	LEU	452	Hotspot	1.40	Hotspot	0.27	-----	---	-----	---	-----	---
A	TYR	453	Hotspot	1.22	Hotspot	0.32	-----	---	-----	---	-----	---
A	LEU	455	-----	-0.71	-----	-0.57	-----	---	-----	---	-----	---
A	PHE	456	-----	-1.45	-----	-0.71	-----	---	-----	---	-----	---
A	THR	470	-----	-2.89	-----	-0.94	-----	---	-----	---	-----	---
A	TYR	473	-----	-3.42	-----	-0.74	-----	---	-----	---	-----	---
A	ALA	475	-----	-1.36	-----	-0.89	-----	---	-----	---	-----	---
A	THR	478	-----	-1.83	-----	-0.99	-----	---	-----	---	-----	---
A	ASN	481	-----	-2.16	-----	-0.98	-----	---	-----	---	-----	---
A	GLY	482	-----	-1.52	-----	-0.71	-----	---	-----	---	-----	---
A	VAL	483	Hotspot	0.32	-----	-0.47	-----	---	-----	---	-----	---
A	LYS	484	Hotspot	1.29	Hotspot	0.22	-----	---	-----	---	-----	---
A	GLY	485	Hotspot	0.19	-----	-0.49	-----	---	-----	---	-----	---
A	PHE	486	Hotspot	0.62	Hotspot	0.06	-----	---	-----	---	-----	---
A	ASN	487	-----	-1.88	-----	-0.95	-----	---	-----	---	-----	---
A	TYR	489	Hotspot	1.03	Hotspot	0.37	-----	---	-----	---	-----	---
A	PHE	490	Hotspot	0.78	Hotspot	0.19	-----	---	-----	---	-----	---
A	LEU	492	-----	-0.56	-----	-0.20	-----	---	-----	---	-----	---
A	GLN	493	Hotspot	0.90	Hotspot	0.05	-----	---	-----	---	-----	---
A	SER	494	-----	-0.09	-----	-0.44	-----	---	-----	---	-----	---
A	TYR	495	Hotspot	0.87	Hotspot	0.35	-----	---	-----	---	-----	---
A	GLY	496	-----	-1.69	-----	-0.58	-----	---	-----	---	-----	---
A	PHE	497	-----	-1.26	-----	-0.79	-----	---	-----	---	-----	---
A	GLN	498	Hotspot	0.66	Hotspot	0.13	-----	---	-----	---	-----	---
A	THR	500	-----	-0.25	-----	-0.77	-----	---	-----	---	-----	---
A	TYR	501	Hotspot	0.69	Hotspot	0.18	-----	---	-----	---	-----	---
A	TYR	505	-----	-0.71	-----	-0.42	-----	---	-----	---	-----	---
B	ILE	73	Hotspot	0.12	-----	-0.05	-----	---	-----	---	-----	---
B	THR	74	-----	-0.18	-----	-0.56	-----	---	-----	---	-----	---
B	THR	75	-----	-1.24	-----	-0.91	-----	---	-----	---	-----	---
B	SER	78	Hotspot	0.43	-----	-0.40	-----	---	-----	---	-----	---
B	LYS	79	-----	-2.33	-----	-0.95	-----	---	-----	---	-----	---

B	LEU	82	-----	-1.87	-----	-0.79	-----	---	-----	---	-----	---
B	LYS	137	-----	-0.83	-----	-0.50	-----	---	-----	---	-----	---
B	LEU	140	-----	-0.72	-----	-0.24	-----	---	-----	---	-----	---
B	ASP	141	Hotspot	0.35	-----	-0.19	-----	---	-----	---	-----	---
B	THR	144	Hotspot	1.15	-----	-0.09	-----	---	-----	---	-----	---
B	THR	145	Hotspot	0.63	-----	-0.24	-----	---	-----	---	-----	---
B	VAL	148	Hotspot	0.84	-----	-0.15	-----	---	-----	---	-----	---
B	ALA	149	Hotspot	0.42	-----	-0.46	-----	---	-----	---	-----	---
B	THR	150	Hotspot	0.06	-----	-0.40	-----	---	-----	---	-----	---
B	CYS	152	-----	-2.87	-----	-0.89	-----	---	-----	---	-----	---
B	ASN	155	-----	-3.01	-----	-0.95	-----	---	-----	---	-----	---
B	GLY	156	-----	-1.92	-----	-0.77	-----	---	-----	---	-----	---
B	SER	157	-----	-0.93	-----	-0.65	-----	---	-----	---	-----	---
B	CYS	158	-----	-0.37	-----	-0.54	-----	---	-----	---	-----	---
B	LEU	159	-----	-0.93	-----	-0.42	-----	---	-----	---	-----	---
B	GLN	160	-----	-0.04	-----	-0.23	-----	---	-----	---	-----	---
B	PRO	163	-----	-1.21	-----	-0.81	-----	---	-----	---	-----	---
B	ASP	164	-----	-0.41	-----	-0.37	-----	---	-----	---	-----	---
B	ASN	167	-----	-1.85	-----	-0.95	-----	---	-----	---	-----	---
B	LYS	188	-----	-2.26	-----	-0.93	-----	---	-----	---	-----	---
B	ALA	192	-----	-2.36	-----	-0.91	-----	---	-----	---	-----	---
B	GLN	195	-----	-2.13	-----	-0.99	-----	---	-----	---	-----	---
B	PHE	196	-----	-1.34	-----	-0.43	-----	---	-----	---	-----	---
B	THR	302	-----	-3.20	-----	-0.89	-----	---	-----	---	-----	---
B	LEU	306	-----	-2.47	-----	-0.94	-----	---	-----	---	-----	---
B	THR	311	-----	-2.04	-----	-0.98	-----	---	-----	---	-----	---
B	PRO	312	-----	-0.12	-----	-0.40	-----	---	-----	---	-----	---
B	GLU	342	-----	-0.76	-----	-0.53	-----	---	-----	---	-----	---
B	LYS	343	Hotspot	0.53	Hotspot	0.15	-----	---	-----	---	-----	---
B	PRO	344	-----	-1.78	-----	-0.67	-----	---	-----	---	-----	---
B	THR	345	Hotspot	1.36	-----	-0.20	-----	---	-----	---	-----	---
B	ASP	346	-----	-0.41	-----	-0.66	-----	---	-----	---	-----	---
B	GLY	347	Hotspot	0.24	-----	-0.45	-----	---	-----	---	-----	---
B	ARG	348	-----	-2.09	-----	-0.69	-----	---	-----	---	-----	---
B	GLU	349	-----	-0.03	-----	-0.04	-----	---	-----	---	-----	---
B	THR	371	-----	-0.59	-----	-0.36	-----	---	-----	---	-----	---
B	THR	372	-----	-0.82	-----	-0.64	-----	---	-----	---	-----	---
B	VAL	373	-----	-1.08	-----	-0.69	-----	---	-----	---	-----	---