



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

HELLEN KEMPFER PHILIPPSSEN

**Influência de ferro na composição de proteínas de superfície não
covalentemente ligadas de *Paracoccidioides brasiliensis*.**

**Goiânia
2011**



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 através 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):	Hellen Kempfer Philippsen		
CPF:	84335378220	E-mail:	hellenkempfer@yahoo.com.br
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? ☒ Sim ☐ Não			
Vínculo Empregatício do autor:			
Agência de fomento:	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.		Sigla: CNPq
País:	Brasil	UF:	GO CNPJ:
Título:	INFLUÊNCIA DE FERRO NA COMPOSIÇÃO DE PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE NÃO COVALENTEMENTE LIGADAS DE <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .		
Palavras-chave:	Ferro; Parede celular; Proteína.		
Título em outra língua:	INFLUENCE OF IRON IN THE COMPOSITION OF SURFACE PROTEIN NON-COVALENTLY BOUND OF <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .		
Palavras-chave em outra língua: Iron; Cell wall; Protein.			
Área de concentração: Microbiologia.			
Data defesa: (30/08/2011)			
Programa de Pós-Graduação: Medicina Tropical e Saúde Pública.			
Orientador(a):	Dra. Célia Maria de Almeida Soares		
CPF:		E-mail:	cmsoares@gmail.com

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.

Hellen Kempfer Philippsen

Data: __01__ / __11__ / __2011__

Assinatura do(a) autor(a)

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.

HELLEN KEMPFER PHILIPPSSEN

Influência de ferro na composição de proteínas de superfície não covalentemente ligadas de *Paracoccidioides brasiliensis*.

Dissertação de Mestrado 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.

Orientadora: Dra. Célia Maria de Almeida Soares

**Goiânia
2011**

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

P552i	Philippsen, Hellen Kempfer. Influência de ferro na composição de proteína de superfície não covalentemente ligados de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> [manuscrito] / Hellen Kempfer Philippsen. - 2011. xii, 57 f. : figs., tabs. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Célia Maria Almeida Soares. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia e Medicina Tropical, 2011. Bibliografia. Inclui lista de tabelas, figuras, anexos, símbolos, siglas e abreviaturas. 1. <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> – Parede celular. 2. Paracoccidioidomicose – Deficiência de ferro. I. Título. CDU: 616.992
-------	--

**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública
da Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno (a): Hellen Kempfer Philippsen

Orientador (a): Dr^a Célia Maria de Almeida Soares

Membros:

1. Dr^a. Célia Maria de Almeida Soares

2. Dr. André Kipnis

3. Dr^a. Maristela Pereira

3. Dr. Alexandre Melo Bailão

3. Dr. Clayton Luís Borges

Data: 30/08/2011

Dedico esse trabalho aos meus pais Noeli Kempfer e Ernani Philippsen, pois com muito amor e trabalho possibilitaram a caminhada para essa conquista. E também ao meu esposo Dyego Vitelli, que nesses dois anos sempre se fez presente com seu apoio constante.

AGRADECIMENTOS

À professora Célia pela oportunidade de trabalhar e aprimorar os conhecimentos. Pela orientação segura e criteriosa, principalmente pelo apoio, paciência e compreensão disponibilizados sempre, dentro de um extremo profissionalismo e competência.

Ao programa de Pós-graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, pelo apoio e dedicação aos discentes.

Aos professores Clayton Borges, Maristela Pereira e à Dr^a Ana Flávia Parente, que muito contribuíram na banca examinadora de qualificação.

As contribuições e simpatia da Dr^a Sílvia Salem.

Ao auxílio financeiro dos órgãos: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) e Secretaria de Estado de Ciência e Tecnologia do Estado de Goiás (SECTEC-GO).

Aos meus pais, Ernani e Noeli, sempre apoiando, cuidando e incentivando seus filhos com carinho, amor e dedicação. Procuraram oferecer o melhor de vocês. Minha gratidão é eterna por tudo que representam na minha vida!

Aos meus irmãos Daniely e Felipe por compartilharem momentos tão bons e serem acima dos laços sanguíneos, meus verdadeiros amigos. Tê-los como irmãos é um privilégio.

Ao meu esposo que sempre me apoiou e incentivou acima de qualquer circunstância. Pelos sacrifícios das constantes pontes aéreas, por muitas vezes depois de uma longa semana de trabalho para nos vermos apenas em um fim de semana. Sou grata por tudo e muito feliz pela família que hoje constituímos.

Ao meu lindo filhinho, com o seu sorriso franco, fofo e espontâneo me faz querer ser melhor a cada dia. Você não poderia ter vindo diferente. És perfeito e maravilhoso!

Aos amigos Maris, Thiago, Damião e Neizi. Vocês são ótimas pessoas. Agradeço a vocês pela amizade, apoio e compreensão.

Ao João por acompanhar parte dessa trajetória, sempre incentivando.

As amigas Dayane, Dacie, Luciane, Fabiane e Cristina. Não esqueço da amizade e carinho de vocês. Do apoio desinteressado, da companhia constante e dos bons momentos. Pela ajuda no decorrer do desenvolvimento do meu projeto. Da alegria da Dayane, tranquilidade da Dacie, maturidade da Luciane e Fabiane, do auxílio da Cris diariamente no proteoma, e lógico, do bom café com todas.

Sou agradecida também a Simone Weber e Ana Flávia pelo apoio constante na pesquisa. A Laura por ser sempre tão gentil. Pela dedicação do Róbson nos poucos momentos de folga. A Renata pela sua simplicidade e simpatia que conquista o carinho de todos

Aos demais amigos do laboratório, a convivência com vocês me fez aprender muito. Agradeço a todos, Amanda, Kelly, Patrícia Zambuzzi, Laurine, Elisa, Mariana, Neto, Ronney, Priscila, Alexandre, Mirelle, Clayton, Leandro, Patrícia, Juliana, Elvis, Keyla, Sheyla, Symone, Karine, pelos sorrisos, conversas e apoio no decorrer da pesquisa.

Obrigada!

SUMÁRIO

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS.....	xi
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1- INTRODUÇÃO/REVISÃO DA LITERATURA.....	1
1.1 - <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e paracoccidioidomicose.....	1
1.1.2 - Filogenia e especiação de <i>P. brasiliensis</i>	2
1.2 - A doença paracoccidioidomicose.....	3
1.3 - A parede celular de fungos.....	4
1.4 - A parede celular de <i>P. brasiliensis</i>	8
1.5 – A importância da fosforilação, glicosilação e sequência sinal das proteínas para microrganismos patogênicos.....	9
1.6 - A importância e estratégias de captação do íon ferro por fungos patogênicos no processo infectivo em mamíferos.....	10
2 - JUSTIFICATIVA.....	15
3 - OBJETIVO.....	16
4 - MÉTODOS.....	17
5 - RESULTADOS.....	23
6 - DISCUSSÃO.....	36
6.1 - HSPs são putativos fatores de virulência em fungos patogênicos e são reguladas na superfície de <i>P. brasiliensis</i> sob restrição do íon ferro.....	36
6.2 - As adesinas enolase e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase são reguladas na superfície de <i>P. brasiliensis</i> na deficiência de ferro.....	38
6.3 - A enzima fosfoglicerato quinase é induzida na superfície de <i>P. brasiliensis</i> sob restrição do íon ferro.....	39

6.4 - A proteína dissulfeto isomerase de <i>P. brasiliensis</i> deve ser endereçada à superfície pela presença de peptídeo sinal em sua cadeia de aminoácidos.....	40
6.5 - O antígeno malato desidrogenase de <i>P. brasiliensis</i> apresentou expressão induzida de duas isoformas na superfície do fungo na deficiência do íon ferro.....	40
6.6 - 14-3-3-like proteína e actina: proteínas induzidas em resposta limitação de ferro em <i>P. brasiliensis</i>	41
6.7 - Proteínas citoplasmáticas da cadeia transportadora de elétrons e envolvidas na oxidação de ácidos graxos foram reprimidas na superfície de <i>P. brasiliensis</i> na deficiência de ferro.....	41
7. CONCLUSÕES.....	43
8. REFERÊNCIAS.....	49
9. ANEXOS.....	53

TABELAS, FIGURAS E ANEXO

Figura 1 – Representação do fracionamento das proteínas de superfície da forma leveduriforme de <i>C. albicans</i>	07
Figura 2 – Fluxograma esquemático apresentando a metodologia utilizada no presente estudo.....	17
Figura 3 – Diagrama esquemático apresentando a quantidade de proteínas reguladas sob restrição de ferro identificada por PMF. PMF e MS/MS e MS/MS.....	24
Figura 4 – Análise por eletroforese bidimensional das proteínas não-covalentemente ligadas em células de leveduras nas condições em meio controle e restrição de ferro por 24h.....	24
Tabela 1 – Proteínas de superfície da parede celular <i>P. brasiliensis</i> na forma leveduriforme com expressão reprimida sob privação de ferro.....	25
Tabela 2 – Proteínas de superfície da parede celular <i>P. brasiliensis</i> na forma leveduriforme com expressão induzida sob privação de ferro.....	26
Figura 5 – Spots regulados sob restrição de ferro nos géis <i>masters</i> da condição controle e experimental.....	28
Tabela 3 - Proteínas de superfície da parede celular <i>P. brasiliensis</i> na forma leveduriforme com expressão reprimida sob privação de ferro que apresentam modificação pós-traducional.....	30
Tabela 4 - Proteínas de superfície da parede celular <i>P. brasiliensis</i> na forma leveduriforme com expressão induzida sob privação de ferro que apresentam modificação pós-traducional.....	31
Figura 5 – Gráfico em colunas apresentando o percentual de proteínas reprimidas com modificações pós traducionais sob restrição de ferro.....	32
Figura 6 – Gráfico em colunas apresentando o percentual de proteínas induzidas com modificações pós traducionais sob restrição de ferro.....	32
Tabela 5 - Modificações pós traducionais das proteínas reguladas sob restrição de Fe da superfície da parede celular <i>P. brasiliensis</i> por análises no <i>software</i> Mascot (http://www.matrixscience.com).....	34
Anexo – Manuscrito: Influence of iron in the composition of surface proteins not covalently linked of <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	54

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

2D - bidimensional

ACN - acetonitrila

ANOVA - análise de variância

ATP - adenosina trifosfato

BPS - ácido batofenantrolinadissulfônico sal dissódico

°C - graus Celsius

CHAPS - 3-(colamidopropil)dimetilamônio-1-propanosulfonato

CoA - coenzima A

DMT- via transportador de íon metal divalente¹

DTT - ditioneitról

ECM - matriz extracelular

Fe-S - ferro-enzofre

g - força centrífuga

GAPDH - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

gi – identificadores gerais de informação do banco de dados GenBank

GPI - glicosilfosfatidilinositol

h - hora

HIV - vírus da imunodeficiência humana

Hmx - heme oxigenase

HSP - proteína de resposta ao choque térmico

IPG - gradiente de pH imobilizado

kg - quilograma

kVh - quilovolts hora

M - molar

MALDI - ionização à laser assistida por matriz

MMcM - McVeigh/Morton

µg - micrograma

mg – miligrama

µL - microlitro

mL - mililitro

MS/MS - perfil de fragmentação dos íons

µM – micromolar

PCR - reação em cadeia da polimerase

PCM - paracoccidiodomicose

PMF - perfil de digestão triptica

pI - ponto isoelétrico

pH - potencial hidrogeniônico

Q - quadrupolo

SDS - dodecil sulfato de sódio

Ser- serina

TCA - ciclo do ácido tricarboxílico

TfR - receptor de transferrina

TFA - ácido trifluoracético

TIFF - Tag Image File Format

Thr -treonina

TOF - tempo de voo

Tyr -tirosina

V - volt

Vh - volt hora

RESUMO

Paracoccidioides brasiliensis é um fungo patogênico termodimórfico, agente causador da Paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica que afeta principalmente indivíduos da América Latina. Muitos fatores são necessários para que *P. brasiliensis* estabeleça infecção, como o remodelamento da parede celular e a capacidade de captar nutrientes do hospedeiro para seu metabolismo. Como o íon ferro é um cofator de diversas reações, o hospedeiro diminui a disponibilidade de íons ferro na forma livre para o patógeno. Portanto, o presente trabalho visa investigar o perfil de proteínas da parede celular de *P. brasiliensis* quando em condição de depleção do íon ferro. Para esse fim, realizou-se a extração das proteínas da parede das células de *P. brasiliensis* em meio com restrição do íon ferro. O perfil proteômico das condições experimental e controle foram obtidos por eletroforese bidimensional com posterior análise de imagens. Análises estatísticas demonstraram as proteínas reguladas nas condições de depleção de ferro, que foram submetidas à digestão trípica e identificação por espectrometria de massas. Foram identificadas 26 proteínas por perfil de digestão trípica (PMF) e/ou perfil de fragmentação dos íons (MS/MS). A maioria dessas proteínas apresenta preditas modificações pós - traducionais e apenas algumas apresentam peptídeo sinal em suas sequências, o que sugere que elas são endereçadas à superfície por vias não clássicas.

ABSTRACT

Paracoccidioides brasiliensis is a dimorphic fungus, the causative agent of paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic mycosis that affects mainly people from Latin America. In order to establish infection, many factors are required for *P. brasiliensis*, such as cell wall remodeling and the ability to capture nutrients from the host. As iron is an important cofactor of many reactions, the host reduces the availability of free iron ions to the pathogen. Therefore, this study aims to elucidate the proteomic profile of the cell wall in response to iron depletion. The extraction of surface proteins of the cell wall in iron restriction and iron replete conditions was performed and the proteomic profile was obtained by two-dimensional electrophoresis with subsequent analysis of images. Statistical analysis demonstrated proteins with differential level of expression in each condition, which were subjected to tryptic digestion and identification by mass spectrometry. It was identified 26 proteins by peptide mass fingerprint (PMF) and/or ions fragmentation (MS/MS). The majority of these proteins have post - translational modifications and only some have in their sequences signal peptide, suggesting that they are addressed to the surface by non-classical pathways.

1. INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA

1.1 – O fungo *Paracoccidioides brasiliensis*

Paracoccidioides brasiliensis é um fungo patogênico termodimórfico, descrito primeiramente por Lutz em 1908. É o agente causador da micose sistêmica humana mais prevalente na América Latina, a paracoccidioidomicose (PCM) que atinge principalmente trabalhadores rurais (Barrozo *et al.* 2009).

Por ser termodimórfico, o fungo cresce no ambiente (22 °C - 25 °C) na forma miceliana (infecciosa) e no hospedeiro (35 °C - 37 °C) na forma leveduriforme. As formas miceliana e leveduriforme apresentam características morfológicas distintas. A forma miceliana de *P. brasiliensis* é caracterizada pela presença de hifas septadas com conídios terminais ou intercalares com aparência de fios entrelaçados. Já a leveduriforme apresenta diversos núcleos e, por se reproduzir por brotamento da célula mãe, confere ao fungo um aspecto de roda de leme de navio (Queiroz-Telles *et al.* 1994). Esse termodimorfismo característico de *P. brasiliensis* está relacionado diretamente com a patogenicidade do fungo, pois, quando propágulos de micélio ou de conídeos são inalados pelo hospedeiro, o fungo transita no organismo na forma leveduriforme, podendo assim estabelecer a infecção (Brumer *et al.* 1993).

Além de infectar hospedeiros humanos, *P. brasiliensis* já foi isolado de vários animais. Estudos de detecção molecular do fungo em animais selvagens mortos encontrados em estradas e rodovias foram realizados por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (Nested-PCR) com oligonucleotídeos ITS específicos para *P. brasiliensis*. A presença do fungo foi detectada em tatu (*Dasypus sp.*), porco espinho (*Sphigurrus spinosus*), porco-da-índia (*Cavia aperea*) e guaxinim (*Procyon cancrivorus*) (Richini-Pereira *et al.* 2007). Manifestações clínicas da PCM foram observadas em cachorros (Ricci, *et al.* 2004).

A infecção de *P. brasiliensis* por humanos e demais animais provavelmente está relacionada com o nicho ecológico do fungo. Acredita-se que o provável nicho ecológico de *P. brasiliensis* seja o solo e que o fungo viva saprobicamente na natureza, pois estudos relatam o isolamento de *P. brasiliensis* do solo, água e plantas (Restrepo *et al.* 2001). Em 2007, Terçarioli e colaboradores demonstraram que o fungo apresenta capacidade de crescimento em solos arenosos e de alta umidade, chegando até

mesmo a formar conídios. Essa capacidade de formação de conídios no solo pode ser uma justificativa à alta incidência da PCM em trabalhadores do campo.

1.1.2 – Filogenia e especiação de *P. brasiliensis*

Por análises de microsatélite e análises de oito regiões de cinco genes nucleares codificantes das proteínas de *P. brasiliensis* quitina sintase, β -glicana sintase, α -tubulina, fator de ribosilação adenil e *PbGP43*, Matute e colaboradores (2006) classificaram o fungo *P. brasiliensis* em três espécies filogenéticas distintas: S1 (encontrada no Brasil, Paraguai, Argentina, Venezuela e Peru), PS2 (encontrada no Brasil e Venezuela) e a PS3 (encontrada na Colômbia). Em 2008, Carrero e colaboradores analisaram filogeneticamente 21 isolados de *P. brasiliensis* e verificaram a distinção do isolado *Pb01* dos demais 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. Os resultados sugerem que os isolados *Pb01* e IFM 54648 apresentam-se geneticamente separados dos outros isolados por um longo período de tempo. Em 2009, Teixeira e colaboradores analisaram filogeneticamente 82 isolados de *P. brasiliensis*, que incluíam aqueles estudados pela pesquisa conduzida por Matute (2006) e demais isolados que amplificavam uma sequência 5' não-traduzida do íntron 1 do gene de *hsp70*. Até a ocorrência da pesquisa conduzida por Teixeira, essa sequência era exclusiva do isolado *Pb01*. Por isso, o grupo de isolados que continham a sequência em questão foram denominados de *Pb01-like*. A distinção do grupo *Pb01-like* daqueles descritos por Matute em 2006 (PS1, PS2 e PS3) sugere a classificação do mesmo como uma nova espécie. Porém, a confirmação de regiões conservadas de um número maior de genes de mais isolados do grupo semelhante ao isolado *Pb01* deve ser realizada para confirmar a hipótese de que o grupo *Pb01-like* pertence a uma nova espécie filogenética (Teixeira *et al.* 2009).

1.2 – A doença paracoccidioidomicose

A PCM é uma doença sistêmica de alta prevalência na América Latina, onde um grande número de habitantes é acometido (Brummer *et al.* 1993). No Brasil ocorrem cerca de 80% dos casos descritos na literatura, sendo as regiões sul, sudeste e centro-oeste do país as que apresentam o maior número de registros (Paniago *et al.* 2003). Apesar de ser mais prevalente na América Latina, alguns casos já foram diagnosticados

na Ásia, Estados Unidos da América e Europa (Ajello & Polonelli, 1985). Entretanto, como o período assintomático da PCM é de aproximadamente 15,3 anos até a manifestação da doença, é difícil determinar precisamente onde ocorreu a infecção do paciente (Brummer *et al.* 1993).

Tradicionalmente a PCM atinge pessoas residentes no campo e trabalhadores de áreas rurais e pode ser uma micose oportunista em indivíduos infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). A doença é contraída a partir da inalação de propágulos de micélio e artroconídios, que são convertidos no organismo na forma leveduriforme (Brumer *et al.* 1993). Do sistema respiratório, a disseminação fúngica para demais sistemas pode ocorrer por vias hematogênica ou linfática, levando a formações de lesões (McEwen *et al.* 1995).

Nas regiões endêmicas, mais de 50% dos habitantes têm sido expostos à inalação de esporos de *P. brasiliensis* presentes no solo (Shikanai-Yasuda *et al.* 2006), porém a minoria desses desenvolve alguma forma clínica da doença, que por sua vez é dependente da resposta imune do hospedeiro. Quando os indivíduos infectados são crianças e jovens, a PCM atinge o sistema retículo endotelial e as taxas de mortalidade são elevadas, caracterizando a forma clínica aguda (ou juvenil) da doença (Franco *et al.* 1987). Já quando indivíduos adultos contraem a PCM, a progressão da doença é lenta, comprometendo primeiramente os pulmões, podendo disseminar-se posteriormente para demais órgãos, caracterizando a forma clínica crônica (adulta). A forma crônica afeta principalmente indivíduos do sexo masculino (Franco *et al.* 1987).

A predominância da PCM em indivíduos do sexo masculino na forma crônica da doença é justificada pela provável atuação do hormônio feminino 17β estradiol no processo de transição dimórfica de *P. brasiliensis* no hospedeiro. Estudos demonstraram que esse hormônio inibe a transição das formas celulares de conídio e micélio para a leveduriforme de *P. brasiliensis* (Restrepo *et al.* 1984). Trabalho posterior demonstrou que após 96 h de inoculação de conídios em camundongos fêmeas e machos, a transição de conídios para células leveduriformes foi observada apenas em camundongos machos (Aristizabal *et al.* 1998). Em outro estudo com camundongos infectados castrados e inversamente reconstituídos de hormônios sexuais (machos com 17β estradiol e fêmeas com testosterona), demonstrou-se que os camundongos machos rapidamente restringiram a proliferação de *P. brasiliensis*, enquanto que as fêmeas foram incapazes de restringir a doença (Aristizabal *et al.* 2002).

Apesar da atuação do hormônio 17β estradiol ser um importante fator da prevalência da PCM em indivíduos do sexo masculino sobre feminino, estudos têm estabelecido que a resposta imune do hospedeiro relacionada com a ação de hormônios sexuais parece possuir papel relevante contra o estabelecimento da infecção de *P. brasiliensis* no sexo feminino. Altos níveis das citocinas IL-12, IFN- γ e TNF- α , relacionadas com resistência à infecção foram produzidas por células de baço de camundongos fêmeas em resposta a estímulos com paracoccina (lectina de *P. brasiliensis* localizada na superfície celular que auxilia no processo de adesão do fungo à matriz extracelular). Células de baço de camundongos machos produziram elevados níveis da citocina IL-10. Acredita-se que estrógenos estimulam a produção de IL-12, IFN- γ e TNF- α e inibem a síntese de IL-10, que por sua vez, é estimulada pela ação da testosterona (Pinzan *et al.* 2010).

É descrito também que a citocina IFN- γ ativa macrófagos a produzirem óxido nítrico, que inibe a transição de conídios de *P. brasiliensis* para a forma leveduriforme. Após o processo de fagocitose das células leveduriformes por macrófagos, células de camundongos fêmeas apresentaram maior produção de óxido nítrico do que células de camundongos machos. Esse fato também pode estar relacionado com a maior taxa de mortalidade das células de *P. brasiliensis* em indivíduos do sexo feminino comparado ao masculino (Pinzan *et al.* 2010).

1.3 – A parede celular de fungos

A parede celular é o ponto inicial de contato entre fungos e o tecido hospedeiro. Possui importante papel na adesão, formação de biofilmes, ativação de vias de transdução de sinal dentro da célula e interações com o ambiente externo. Em fungos patogênicos, certas proteínas de parede atuam em mecanismos de virulência, como a invasão no tecido hospedeiro e fuga das células do sistema imune (Chaffin, 2008). Como as células de mamíferos não apresentam parede celular, este compartimento da célula pode ser uma promissora estrutura para novas drogas antifúngicas (Groll *et al.* 1998).

Os componentes básicos da parede celular de fungos são mananas, quitina e β -glicanas, componentes esses que são constituídos principalmente por três tipos de açúcares: manose, N-acetilglicosamina e glicose, respectivamente (Cabib *et al.* 2001). Proteínas também compõem a parede celular fúngica e estão geralmente ligadas aos carboidratos. Manoses ligadas às proteínas formam as manoproteínas e estão localizadas

na superfície externa da parede celular (Cabib *et al.* 2001). β - 1,6- glicanas ancoram a maioria das manoproteínas da parede celular e também estão associadas covalentemente às β - 1,3- glicanas e quitinas (Kollar *et al.* 1997). As manoproteínas são geralmente glicosiladas, por isso também são denominadas de glicoproteínas. Adicionalmente, existem proteínas que são ligadas aos demais componentes da parede celular por ligações não-covalentes através de pontes dissulfeto (Klis *et al.* 2002).

A parede celular dos fungos apresenta composição similar. Entretanto, os teores relativos de β - glicanas, quitina e mananas podem variar de acordo com a morfologia de cada espécie fúngica (Calderone *et al.* 1991; Sentandreu *et al.* 1991). Em *Saccharomyces cerevisiae* a parede celular representa aproximadamente 30% do peso seco total da célula; 85% da parede celular de *S. cerevisiae* é composta de polissacarídeos e 15% de manoproteínas altamente glicosiladas (Nguyen *et al.* 1998). Esse envoltório celular está disposto em camadas: uma camada interna de β -1,3- e β - 1,6- glicanas e quitina e outra camada de manoproteínas. As proteínas solúveis são ligadas a carboidratos por interações não-covalentes (Cappellaro *et al.* 1998). Proteínas com repetição interna (Pir) são covalentemente ancoradas à parede por ligação à β -1,3- glicana (Kapteyn *et al.* 1999), provavelmente via ligações éster entre o grupo γ - carboxila de resíduos de glutamato (Ecker *et al.* 2006). Glicoproteínas ligadas indiretamente a β - 1,3- glicana via β - 1,6 glicana são ancoradas através de pontes de glicosilfosfatidilinositol (GPI; Kollár *et al.* 1997). Glicoproteínas ancoradas por pontes GPI são geralmente enzimas relacionadas com a biogênese da parede celular ou com funções estruturais (de Groot *et al.* 2003).

Similarmente a *S. cerevisiae*, em *Cryptococcus neoformans*, as moléculas constituintes da parede celular são glicanas, quitinas e proteínas. As proteínas são, em geral, glicosiladas. A morfologia da parede celular consiste em uma estrutura de duas camadas, onde também existe a presença de melanina que influencia na porosidade desse envoltório celular (Reese *et al.* 2007).

Em *Candida albicans*, 80 a 90% da constituição da parede celular são mananas ou polímeros de manose associados a proteínas, β - glicanas e quitina. Proteínas e lipídeos são constituintes de menor representatividade (6 a 25% e 1 a 7%, respectivamente). β - glicanas contribuem por cerca de 50 a 60% do peso seco da parede celular e quitina 0,6 a 0,9%. Manoses são encontradas apenas em associação com proteínas e representam 40% do total de carboidratos presentes na parede celular (Brawner *et al.* 1986). Estudos realizados por microscopia eletrônica revelaram que a

parede celular de *C. albicans* é composta por várias camadas. A aparência dessa estrutura é dependente das linhagens estudadas, condições de crescimento, morfologia e das condições experimentais utilizadas para o preparo dos espécimes (Calderone *et al.* 1991; Casanova *et al.* 1992; Poulain *et al.* 1985). Estudos citoquímicos e citológicos indicaram que as múltiplas camadas da parede celular existem devido a disposição das manoproteínas em vários níveis dentro da estrutura do envoltório da célula (Cassone, 1989). Quitinas e glicanas aparecem mais concentradas na camada interna da parede celular, adjacentes à membrana plasmática, enquanto que, glicoproteínas preenchem redes de polímeros estruturais e são mais dominantes na parte externa da parede celular (Cassone, 1989).

As proteínas presentes na parede celular de *C. albicans* foram divididas em quatro tipos de frações: as proteínas associadas à superfície da parede por ligações não covalentes ou pontes dissulfeto representam a fração 1; as proteínas ligadas diretamente à β -1,3-glicana através de ligações sensíveis ao meio alcalino representam a fração 2; proteínas indiretamente ancoradas à β -1,3-glicana, via β -1,6-glicana através de âncoras de GPI representam a fração 3; e as proteínas ancoradas a quitina através de β -1,6-glicana através de GPI, a fração 4 (Pitarch *et al.* 2002). A figura 1 apresenta um esquema das quatro frações protéicas de *C. albicans*.

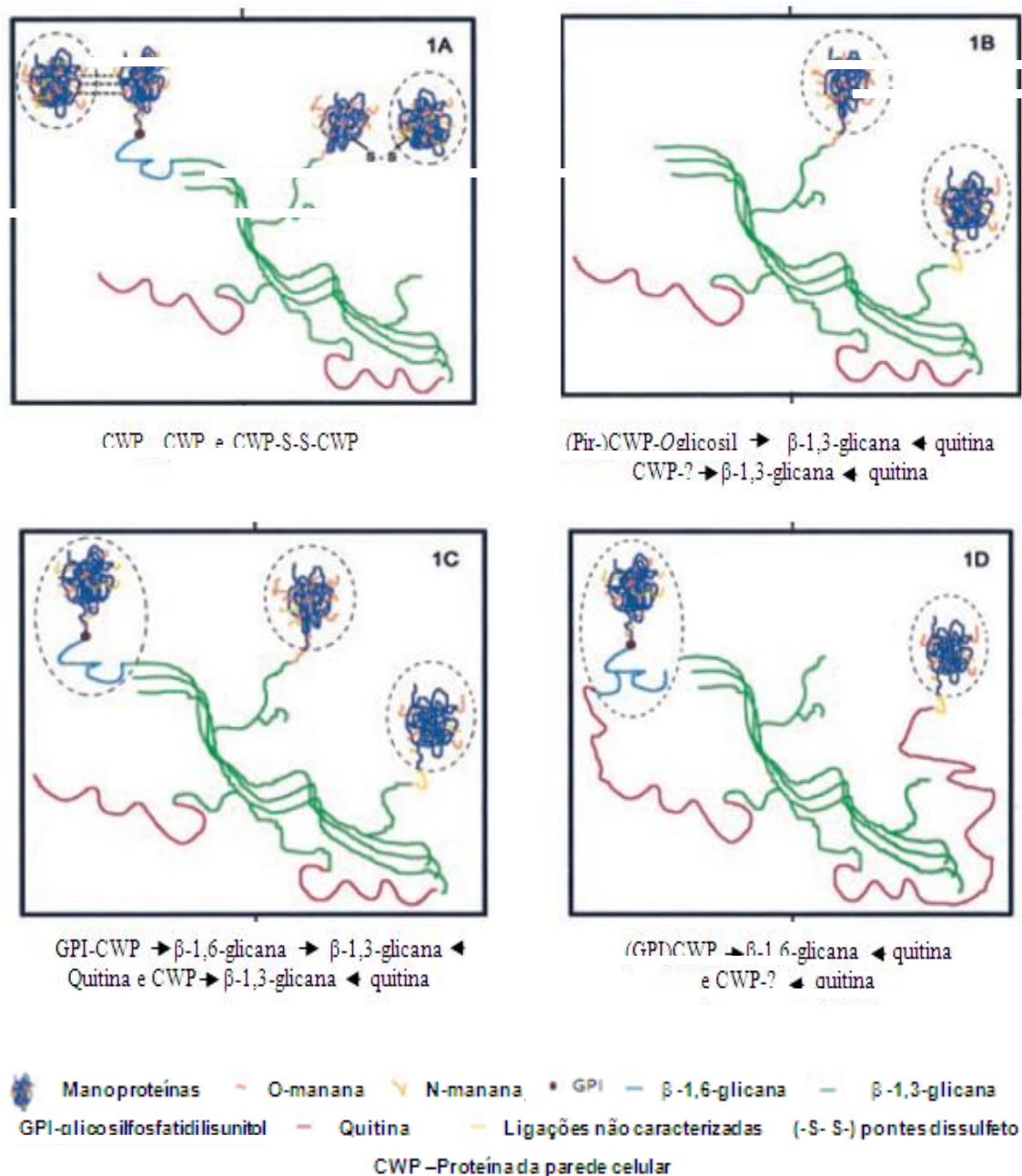


Fig. 1 – Representação do fracionamento das proteínas de superfície da forma leveduriforme de *C. albicans*. A.

Círculos representam as proteínas de superfície ligadas por pontes dissulfeto (-S-S) ou ligações não covalentes. B. Pir proteínas covalentemente ligadas à β -1,3-glicana (verde) por meio da cadeia O-glicosil (alaranjado). C. GPI-CWP covalentemente ligados a β -1,6-glicana (azul) por meio de ligação fosfodiéster ou por âncora GPI (marrom). β -1,6-glicana é ligada a β -1,3-glicana (verde), que por sua vez, pode ser ancorada por quitina (vermelho) da parede celular. D. algumas GPI-CWP podem ser ligadas diretamente a quitina por meio de β -1,6-glicana (Adaptado de Pitarch *et al*, 2002).

Essas frações são extraídas de acordo com o tipo de ligação que realizam com outros componentes da parede celular. A fração 1 é extraída com dodecil sulfato de sódio (SDS) e agentes redutores (DTT; Pitarch *et al.* 2002); a fração 2 através da quebra das ligações com β - glicanas em meio alcalino (Hidróxido de sódio – NaOH; Kapteyn *et al.* 1999 ; Mrsa *et al.* 1999) a fração 3 pela ação da enzima β -1,3-glicanase (Kapteyn *et al.* 1996; Kollar *et al.* 1997); e a fração 4 pela ação da enzima quitinase (Pitarch *et al.* 2002).

1.4 – A parede celular de *P. brasiliensis*

A forma leveduriforme de *P. brasiliensis* apresenta maior quantidade de quitina (37 - 48%) do que a miceliana (7 - 18%). A forma miceliana, por sua vez, apresenta maior quantidade de proteínas na parede celular (24 - 41%) do que a leveduriforme (7-14%). Lipídios (5 - 10%) e glicanas (36 - 47%) ocorrem em quantidades similares nas duas formas. Na forma leveduriforme, o polissacarídeo mais abundante da parede celular é a α -1,3 glicana, enquanto que, em micélio β - 1,3 glicana e galactomanana são mais predominantes. A forma miceliana apresenta parede celular com uma única camada com fibras de β - glicana, enquanto a leveduriforme possui três camadas, sendo a superfície interna composta de quitina e uma superfície externa formada por α - glicana (Kanetsuna *et al.* 1969; Tomazett *et al.* 2005).

A aderência de células do organismo patogênico no hospedeiro é fundamental na interação patógeno-hospedeiro. Durante a adesão, a parede celular entra em contato contínuo com as células hospedeiras e atua como reservatório de moléculas (Gonzalez *et al.* 2005). Em *P. brasiliensis*, várias proteínas de superfície encontradas na parede estão envolvidas na adesão e/ou em outros fatores de virulência.

Foi demonstrado que a proteína *Pbgp43* auxilia no processo de invasão e estabelecimento da infecção por *P. brasiliensis*. *Pbgp43*, localizada na superfície do fungo, é capaz de se ligar à laminina da membrana basal da matriz extracelular (ECM) de tecidos de mamíferos, funcionando com uma adesina. A laminina revestindo células leveduriformes possibilita um aumento na capacidade de invasão do fungo nos tecidos alvo e consequente destruição das células invadidas. Adicionalmente, na presença de soro anti-gp43, a virulência de *P. brasiliensis* é substancialmente reduzida (Puccia *et al.* 1998).

Em *P. brasiliensis*, a *PbGAPDH* está associada a parede celular e é capaz de se ligar a componentes da ECM. A proteína participa do processo de aderência e

internalização de células leveduriformes de *P. brasiliensis* em pneumócitos cultivados *in vitro*, o que sugere que a *PbGAPDH* potencializa o processo de infecção (Barbosa *et al.* 2006).

Também com função de adesina, a triosefosfato isomerase possui habilidade de ligação a laminina da ECM. Essa interação pode possuir importância no processo de adesão, já que, na presença de anticorpo contra essa proteína ocorreu a inibição da interação de células leveduriformes de *P. brasiliensis* com células epiteliais (Pereira *et al.* 2007)

Neto e colaboradores (2010) demonstraram que a enzima malato sintase, envolvida do ciclo do ácido tricarboxílico, está localizada também na superfície celular e interfere no processo de infecção por *P. brasiliensis*. Foi demonstrado que a enzima malato sintase participa do processo de aderência entre as células do hospedeiro e células fúngicas através da sua habilidade de ligação a fibronectina e colágeno tipos I e IV presentes na ECM.

Em estudo recente, Nogueira e colaboradores (2010) descreveram, por meio de modelo de infecção *in vitro*, que a enolase (proteína também presente na superfície de *P. brasiliensis*) parece interferir no aumento da adesão/invasão do fungo em tecidos hospedeiros devido à aparente habilidade dessa proteína em se ligar a superfície de células hospedeiras.

1.5 – A importância da fosforilação, glicosilação e sequência sinal das proteínas para microrganismos patogênicos.

As proteínas de todos os seres vivos podem ser modificadas pós traducionalmente de diferentes maneiras. Uma das modificações mais estudadas é a fosforilação das proteínas. Adicionar e remover grupo fosfato são mecanismos importantes na regulação de proteínas intracelulares. Uma série de respostas celulares que são mediadas por receptores podem ser ativadas e desativadas pelas quinases (que adicionam grupos fosfato) ou fosfatases (moléculas que removem grupos fosfato) intracelulares (Griffin & Ojeda, 1992).

As proteínas podem ser fosforiladas em resíduos de tirosina (Tyr), em resíduos de serina (Ser) e em resíduos de treonina (Thr). A fosforilação das proteínas nesses resíduos introduz grupos carregados eletricamente em uma região moderadamente apolar, mudando a natureza química protéica, o que reduz a capacidade da proteína de desenvolver sua função original. Já a desfosforilação, regulada pelas enzimas fosfatases,

hidrolisam ésteres específicos de fosfoserina, fosfotreonina ou fosfotirosina (Griffin & Ojeda, 1992; Engh & Bossemeyer, 2001). A fosforilação torna-se importante para microrganismos patogênicos devido a presença ou não de grupos fosfatos em moléculas protéicas poder determinar suas atividades, estabilidades, papéis em rotas metabólicas, transdução de sinais e localizações (Ludwig *et al.* 2006).

Além da fosforilação, a glicosilação também é um processo de modificação pós traducional importante e complexa, que consiste na adição de carboidratos nas proteínas. Atualmente tem-se definido dois tipos de glicosilação (*N*-glicosilação e a *O*-glicosilação) que são determinados de acordo com o aminoácido que se liga ao açúcar, onde a variedade de açúcares ligados, os tipos de ligações e seu grau de ramificação aumentam a complexidade desta modificação pós traducional (Ludwig *et al.* 2006).

Em geral, proteínas secretadas são glicosiladas, e aquelas que se encontram na superfície celular de microrganismos como bactérias e fungos, exercem funções importantes na patogênese destes: auxiliam na adesão, proteção contra degradação proteolítica e proteção contra o sistema imune (Szymanski & Wren, 2005). Em *P. brasiliensis*, glicosilação de proteínas auxilia o fungo no processo infectivo em murinos, protegendo o invasor contra o sistema imune desse mamífero (Almeida *et al.* 2011).

A localização das proteínas também pode ser determinada por meio de sequência sinalizadora nas mesmas. Em células de eucariotos, é conhecido que o processo clássico de secreção protéica requer o transporte das proteínas através do retículo endoplasmático e complexo golgiense. Todas essas proteínas são inicialmente direcionadas ao retículo endoplasmático por uma sequência sinal (ou peptídeo sinal), com cerca de 15 a 60 aminoácidos. A sequência sinal é frequentemente removida da proteína, uma vez que a decisão de distribuição tenha sido executada (Kirk & Ward, 2007). A maioria das proteínas com peptídeos sinais é endereçada à superfície celular pela via tradicional de secreção. Essas proteínas podem desempenhar diversas funções, podendo atuar tanto na estrutura da superfície celular como auxiliando no processo infectivo, no caso de microrganismos patogênicos (Kirk & Ward, 2007).

1.6 – A importância e estratégias de captação do íon ferro por fungos patogênicos no processo infectivo em mamíferos

O íon ferro é essencial para a maioria dos organismos vivos. Somente algumas bactérias não utilizam ferro em seu metabolismo. Essa importância é devido à sua participação em reações de transferência de elétrons, em reações ácido-base e de ser

cofator de uma variedade de proteínas constituintes de grupos heme (hemoproteínas), proteínas ferro-enxofre e de certas proteínas relacionadas com o metabolismo celular (Sutak, 2008). A habilidade de íons ferro em ganhar e perder elétrons, através do transito entre as formas Fe^{3+} e Fe^{2+} (formas férrica e ferrosa, respectivamente), confere à esse metal um alto potencial reativo, atuando em vias metabólicas importantes dos seres vivos. Em mamíferos, os íons ferro estão relacionados com moléculas de vias metabólicas da cadeia transportadora de elétrons e da respiração (Ganz & Nemeth, 2006).

Para microrganismos patogênicos, a disponibilidade de ferro tem um papel significativo no crescimento e sobrevivência dos mesmos nos tecidos do hospedeiro. Os patógenos primeiramente aderem às células do hospedeiro e concomitantemente obtêm nutrientes que são essenciais para o seu crescimento. A habilidade de captação do íon ferro é geralmente um fator importante para o sucesso no processo infectivo (Dun *et al.* 2007). Assim, mamíferos apresentam um eficiente sistema de homeostase de ferro para assegurar tanto a disponibilidade desse metal a um nível suficiente para seu metabolismo celular, como para deixar indisponíveis os íons ferro para microorganismos invasores como forma de defesa contra os patógenos (Sutak, 2008). Por tais motivos, os íons ferro livre são praticamente ausentes no sangue e em fluidos extracelulares. Os íons ferro são transportados acoplados com outras moléculas; transferrina, lactoferrina e melanotransferrina são exemplos de proteínas carreadoras de íons de ferro presentes em várias espécies de mamíferos (Sekyere *et al* 2006).

A transferrina realiza o transporte de ferro no soro de mamíferos, carregando dois átomos de ferro por molécula. A captação dos íons ferro das moléculas de transferrina pela célula ocorre mediada por receptores de transferrina: TfR1 e TfR2. A regulação da expressão desses receptores ocorre de acordo com a necessidade celular em obter ferro. TfR1 é um receptor de alta afinidade, requerido em ambientes com baixas concentrações do íon ferro, enquanto que, TfR2 é um receptor de baixa afinidade, requerido em ambientes com elevados níveis de disponibilidade de íons ferro (Aisen 2004). Esses receptores facilitam a entrada do complexo transferrina-TfR1 por endocitose. O íon ferro é liberado primeiramente para os endossomos, que são acidificados por uma bomba de prótons que reduz o pH para aproximadamente 5.5, resultando na dissociação do ferro da transferrina (Hentze *et al.* 2010). O íon ferro é então transportado através da membrana endossomal via transportador de íon metal divalente1 (DMT1; Fleming *et al.* 1997).

Lactoferrina e melanotransferrina são homólogos da transferrina, apresentando aproximadamente 37 e 39% respectivamente de similaridade de sequência com a transferrina (Richardson, 2000). A lactoferrina é uma proteína mais resistente à proteólise que a transferrina e possui capacidade de captar ferro em pH mais ácido (González-Cháves *et al.* 2009), sendo encontrada predominantemente em leite, lágrimas e outras secreções, participando do sistema antibacteriano do sistema imunológico (Ward *et al.* 2003).

A melanotransferrina apresenta expressão diferenciada das demais proteínas carreadoras de ferro. Em melanomas ela é altamente expressa em altos níveis enquanto que nas glândulas salivares e pancreáticas é encontrada com baixos níveis de expressão. Isto sugere que a melanotransferrina auxilia células tumorais no que se refere ao aumento da captação de ferro. Além de estar presente em melanomas, a melanotransferrina está também presente em tecidos normais e no soro (Dun, 2007).

Como sistema de estocagem, a proteína ferritina é a principal molécula responsável pelo armazenamento de ferro em humanos. A proteína ferritina consiste em um polímero de 24 subunidades que forma uma estrutura capaz de armazenar cerca de 4.500 átomos de ferro para serem utilizados conforme a necessidade do organismo (Dun, 2007).

Fungos patogênicos têm desenvolvido estratégias para a obtenção do íon ferro das moléculas carreadoras protéicas e da hemoglobina, que por sua vez, é a fonte mais abundante fonte de ferro em mamíferos (Bullen *et al.* 2005). Entre as estratégias de captação do íon ferro por fungos destacam-se sistemas de captação redutivo (redução do ferro inorgânico Fe^{3+} para a forma ferrosa Fe^{2+}) e sistemas de captação não redutivo de ferro do grupo heme.

A via redutiva de captação de ferro está bem descrita em alguns fungos modelo, como *S.cerevisiae*. Consiste na redução de Fe^{3+} , forma inorgânica e praticamente insolúvel, para Fe^{2+} forma muito mais solúvel em pH fisiológico que a férrica, capaz de ser absorvida pela célula fúngica. A redução de Fe^{3+} ocorre no meio extracelular pela mediação de metalorredutases. As metalorredutases são proteínas transmembrana (Philipott, 2006).

A via não redutiva consiste principalmente na captação de ferro através de moléculas denominadas de sideróforos, que são moléculas de baixa massa molecular, que atuam captando íons ferro em ambientes com baixa concentração desse metal (Jonhson 2008). Essas moléculas possuem uma extraordinária afinidade por íons ferro.

São exemplos de espécies que produzem sideróforos *Neurospora crassa*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Aspergillus fumigatus* e *C. albicans*. A produção de sideróforos não é diretamente relacionada com a patogenicidade do fungo, pois algumas espécies não patogênicas, como *S. pombe* produzem sideróforos e algumas patogênicas não os produzem. Porém, quando uma espécie patogênica produz sideróforos, geralmente essas moléculas são requeridas para a virulência (Sutak, 2008).

A extração de íons ferro dos sideróforos pelas células fúngicas ocorre por dois mecanismos. O primeiro consiste na redução por metalorredutases do Fe^{3+} (forma inorgânica ligada ao sideróforo) para Fe^{2+} , o que dissocia o íon ferro do complexo sideróforo-ferro no ambiente extracelular para assim internalizar o metal na célula. O íon ferro é então transportado por um sistema de alta afinidade composto por Fet3p/Ftr1p (Lesuisse, 1989). O segundo mecanismo consiste na internalização do complexo sideróforo-ferro na célula. O íon ferro é dissociado do complexo e o sideróforo é secretado (Froissard *et al.* 2007).

Em *P. brasiliensis*, existem evidências que esse fungo tenha a capacidade de produzir sideróforos, pois apresenta sequências ortólogas de genes responsáveis pela biossíntese dessas moléculas. A utilização de sideróforos de outros organismos por *P. brasiliensis* também é observado. Quando *P. brasiliensis* foi cultivado na presença de sideróforos de *Blastomyces dermatitidis*, ocorreu crescimento fúngico (Silva *et al.* 2011).

Em 2011, Parente e colaboradores analisaram o proteoma das proteínas citoplasmáticas de *P. brasiliensis* na forma leveduriforme sob restrição do íon ferro. Foi revelado que na deficiência desse íon, *P. brasiliensis* apresenta alteração na utilização das vias metabólicas voltadas para a geração de energia. Proteínas pertencentes ao ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), ciclo do glioxalato, ciclo do metilcitrato e da cadeia transportadora de elétrons foram potencialmente reprimidas, enquanto que, proteínas relacionadas com a via glicolítica foram induzidas. Fato que pode ser justificado: algumas reações de oxidação do ciclo do TCA ser mediado por enzimas que possuem grupos prostéticos contendo ferro (aconitase, fumarase e succinato desidrogenase); o ciclo do glioxalato e metilcitrato serem dependentes da expressão de enzimas que atuam no ciclo do TCA (succinato desidrogenase e fumarase); as enzimas 2-metilcitrato sintase e 2-metilisocitrato liase, que atuam exclusivamente no ciclo do metilcitrato foram reprimidas; muitas proteínas transportadoras de elétrons são dependentes de ferro, necessitando de grupos prostéticos ferro-enxofre para sua conformação funcional.

Então, a expressão induzida de enzimas que atuam na via glicolítica (glicoquinase, fosfoglicerato quinase, frutose-bifosfato aldolase) provavelmente constitui em um mecanismo compensatório em relação à deficiência do íon ferro.

Além da alteração na utilização de vias metabólicas relacionadas com a geração de energia, proteínas de resposta ao choque térmico (HSPs) foram induzidas (Parente *et al.* 2011), o que sugere que a deficiência de ferro causa o enovelamento incorreto das proteínas dependentes de ferro que poderiam se acumular no citoplasma, podendo ser tóxicas à célula. Assim, a indução de chaperonas pode ser importante para a detoxificação celular. Além das HSPs, as enzimas enolase, formamidade e GAPDH apresentaram indução de expressão no mesmo estudo. Essas proteínas estão presentes no citoplasma e parede celulares, sendo já descritas como putativos fatores de virulência em *P. brasiliensis* (Parente *et al.* 2011)

2. JUSTIFICATIVA

Microrganismos patogênicos necessitam captar nutrientes para obterem sucesso durante o processo infectivo. Como no hospedeiro a quantidade de nutrientes disponível para o patógeno é baixa, a adaptação do microrganismo ao novo ambiente é de fundamental importância para sua sobrevivência e sucesso da infecção no tecido alvo.

Em *P. brasiliensis* pouco é conhecido sobre as modificações de expressão das proteínas da parede celular na ausência do íon ferro e, como a parede celular fúngica é o ponto inicial de contato do fungo com as células do hospedeiro, o presente trabalho visa caracterizar as proteínas reguladas na parede celular desse patógeno sob restrição de ferro.

3. OBJETIVOS

Geral:

- Analisar o proteoma das proteínas não covalentemente ligadas à parede celular de *P. brasiliensis* reguladas sob restrição de ferro.

Específicos:

- Comparar o perfil de expressão de proteínas de superfície de *P. brasiliensis* sob restrição do íon ferro com condições normais;
- Identificar as proteínas de superfície diferencialmente expressas sob restrição do íon ferro;
- Verificar possíveis modificações pós traducionais preditas nas proteínas reguladas sob restrição de ferro por análises *in silico*.

4. MÉTODOS

O fluxograma dos experimentos realizados no trabalho é apresentado na figura 2.

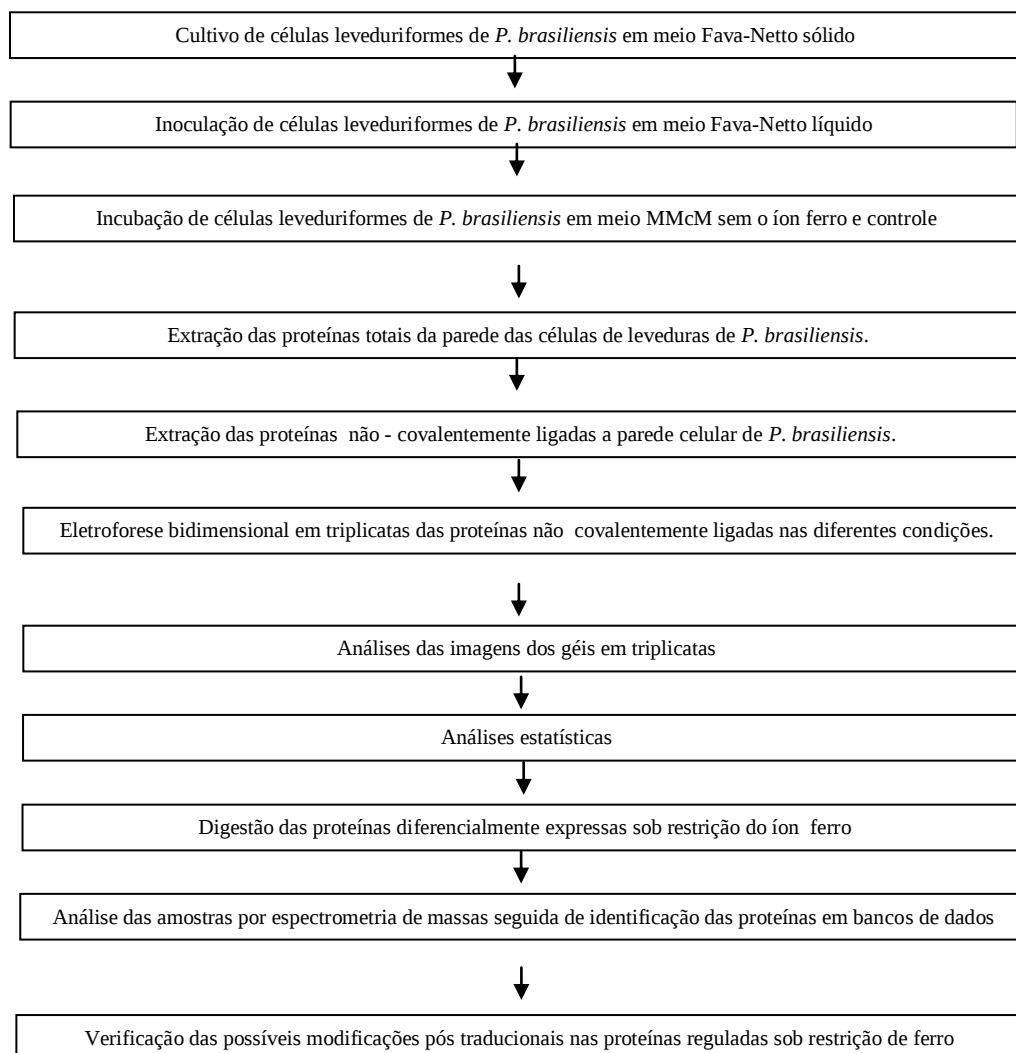


Fig.2 - Fluxograma esquemático apresentando a metodologia utilizada no presente estudo.

4.1 – Condições de cultivo de *P. brasiliensis*

P. brasiliensis, Pb01 (ATCC, MYA-826) foi utilizado nos experimentos desse estudo. As formas de leveduras foram cultivadas em meio Fava-Netto (1969) sólido (1% p/v peptona, 0.5% p/v extrato de levedura, 0.3% p/v proteose, peptona 0.5% p/v extrato de carne, 0.5% p/v NaCl, 1% p/v agar, pH 7.2) por cinco dias a 36 °C e então inoculadas em meio Fava-Netto líquido por 72 h. As células foram centrifugadas a 5.000 x g 10 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado incubado em meio McVeigh/Morton (MMcM; Restrepo & Jimenez, 1980) com 35 µM de sulfato ferroso amoniacal hexaidratado por 24 h no meio controle ou com 50 µM do quelante de ferro ácido batofenantrolinadissulfônico sal dissódico (BPS; Sigma-Aldrich) no meio sem íon ferro.

4.2 – Preparo dos extratos de proteínas

O preparo dos extratos protéicos foi realizado conforme Pitarch e colaboradores (2002), com algumas adaptações. Após 24 h de incubação das células leveduriformes de *P. brasiliensis* em meio MMcM, as células foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 min, o sobrenadante foi descartado e as células presentes no precipitado lavadas com solução salina (NaCl p/v 0,9%) por centrifugação a 10.000 x g por 10 min em cada lavagem. Esse procedimento foi realizado por três vezes, sempre descartando-se o sobrenadante e lavando-se o precipitado com solução salina. Após a última lavagem com solução salina, as células foram centrifugadas a 5.000 x g por 10 min e sobrenadante foi descartado. Então, por centrifugação a 5.000 x g por 10 min o precipitado foi lavado por cinco vezes com tampão tris-cálcio (10 mM de Tris-HCl pH 8.5, 2 mM CaCl₂), sempre descartando-se o sobrenadante e lavando-se o precipitado com o tampão. Depois das lavagens com tampão tris-cálcio, o precipitado celular foi congelado na presença de nitrogênio líquido e macerado utilizando-se gral e pistilo, até a completa pulverização celular. Ao extrato celular pulverizado foi adicionado tampão tris-cálcio e pérolas de vidro (0,45 mm), que foi submetido à agitação por 1 h a 4 °C. Após a agitação, o extrato foi centrifugado por 10 min a 10.000 x g a 4 °C. O sobrenadante com proteínas solúveis foi descartado e o precipitado (proteínas da parede) foi lavado por centrifugação a 10.000 x g por cinco vezes com água destilada gelada e posteriormente por cinco vezes com cada uma das seguintes soluções: (p/v) 5% NaCl, 2% NaCl, 1% NaCl, descartando-se sempre o sobrenadante e lavando-se o precipitado (Entretanto, na primeira lavagem do precipitado com (p/v) 5% NaCl e na

última lavagem com (p/v) 1% NaCl, alíquotas de 20 µL do sobrenadante oriundas das lavagens com tais soluções foram submetidas a análise eletroforética unidimensional em gel de acrilamida, para verificação se na última lavagem com NaCl ainda haviam proteínas citoplasmáticas na amostra). Então, as proteínas de superfície da parede celular foram extraídas por meio da incubação do precipitado da última lavagem com 1% p/v NaCl com tampão de extração (50 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 M de EDTA, 2% p/v SDS, 10mM DTT) a 100 °C com inibidor de proteases por 10 min. O extrato protéico foi centrifugado depois da fervura de 10 min. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi congelado e estocado a -20 °C.

4.3 – Eletroforese Bidimensional de Proteínas (2-DE)

O extrato de proteínas foi concentrado pelo sistema VivaspinTM GE (GE Healthcare) e quantificado (Bradford, 1976). O total de 150 µg de proteínas purificadas foi precipitado utilizando-se o sistema comercial SDS-OutTM (Thermo) para a retirada do SDS da amostra, de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, foi utilizado o sistema 2D Clean-UPTMGE (GE Healthcare), para a retirada de contaminantes não protéicos como lipídeos, sais, detergentes e ácidos nucleicos. A amostra protéica foi quantificada (Bradford, 1976) e 150 µg de proteínas foi ressuspendida em tampão de reidratação (7M de uréia, 2 M de tiouréia, 65 mM de DTT, 130 mM 3- [(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) e traços de azul de bromofenol) sob agitação por 1 h a temperatura ambiente, até se obter o volume final de 250 µL para cada condição. O material foi aplicado em tira de gradiente de pH imobilizado (IPG) de 13 cm com separação não linear (NL) de pH 3 - 11 (GE Healthcare). As tiras de IPG foram cobertas com óleo mineral e incubadas por 30 min a temperatura ambiente. Em seguida, as proteínas foram focalizadas isoeletricamente no sistema Ettan IPGphor III (GE Healthcare), a 20 °C com os seguintes parâmetros: 30 V por 13 h, 500 V por 1 h, 1000 V por 1 h, 2000 V por 1 h, 2000–5000 V por 3 h, e 8000 V por 11 h (Pitarch *et al.* 2002). Após a focalização isoeletrica as amostras foram reduzidas e alquiladas (Bjellqvist *et al.* 1993). Para a separação da segunda dimensão, as tiras de IPG foram colocadas sobre géis de poliacrilamida homogêneos (1,5 mm de espessura) em cuba de eletroforese vertical (Hoefer SE 600). Um marcador de proteínas com massa molecular conhecida foi colocado na extremidade ácida da tira IPG. As tiras IPG foram colocadas e seladas nos géis SDS-PAGE com 0,5% de agarose em tampão corrida Tris-Glicina1 X (25 mM Tris

pH 8.8, 192 mM glicina, 0,1 % [p/v] SDS) e traços de azul de bromofenol. A separação da segunda dimensão foi realizada segundo a descrição de Laemmli (1970) com tampão de corrida 1X (Tris - Glicina) nos compartimentos superior e inferior da cuba. Para a corrida eletroforética na primeira hora manteve-se o valor de 100 V e após esse tempo foi alterado para 250 V até que a linha de frente atingisse o final do gel. A temperatura foi mantida à 10° C durante toda a corrida e após o término os géis foram retirados da cuba e corados utilizando-se o sistema comercial Silver Staining kit ProteinTMGE (GE Healthcare), sem glutaraldeído. As imagens dos géis foram capturadas utilizando-se o scanner ImageScan III (GE Healthcare) e analisadas com o software Lab Scan v 3.0 (GE Healthcare).

4.4 – Análises das imagens

As imagens dos géis corados pela prata foram analisadas utilizando-se o programa Labscan v 3.0 (GE Healthcare) e as imagens foram importadas do formato Tag Image File Format (TIFF) e convertidas para o formato *mel* do programa Image Master Platinum 6.0 (GE Healthcare). O software detectou automaticamente os *spots*, os quais foram conferidos manualmente. Utilizando-se uma referência para alinhamento (*landmark*) para pareamento automático, as triplicatas dos géis para cada condição foram analisadas. Uma pasta para pareamento (*matchSet*) foi criada para se comparar *spots* entre *géis* das duas condições. Foi escolhido um gel de referência (aquele com melhor resolução de imagem) para cada condição (*master*). Foi realizado um pareamento automático utilizando-se o programa *Image Master* entre os géis *master* controle e experimental. Para os cálculos estatísticos dos níveis de expressão de cada proteína, a porcentagem do volume de cada *spot* foi determinada por meio do programa *Image Master*.

4.5 – Análises estatísticas

As análises estatísticas de comparação entre a condição de depleção do íon ferro e controle foram realizadas através do software STATISTICA versão 7 para Windows®. Para identificação das diferenças significativas nas condições estudadas, foi realizada análise de variância (ANOVA) para cada *spot*. Foram consideradas diferenças significativas *spots* com valor de $p < 0.05$ entre as condições.

4.6 – Digestão das proteínas

As proteínas selecionadas foram retiradas manualmente dos géis. Para remoção da coloração com prata, as proteínas foram imersas em uma solução contendo 15 mM de ferricianeto de potássio e 50 mM de tiosulfato de sódio por 5 min e lavados por duas vezes com água Milli-Q (Millipore) para a remoção de agentes redutores. O excesso de água foi retirado utilizando-se uma pipeta. As proteínas foram ressuspensas em 100 μ M de acetonitrila (ACN) e secadas a vácuo no equipamento *speed vaccum* (Eppendorf). As proteínas foram ressuspensas e reduzidas em 100 mM de DTT e alquiladas com 55 mM de iodoacetamida, seguido de centrifugação. Os sobrenadantes foram removidos e então as proteínas presentes no precipitado lavadas com bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) com agitação por 10 min. Os sobrenadantes foram removidos e as amostras foram desidratadas em uma solução de 100 μ M contendo 50% (p/v) de NH_4HCO_3 25 mM e 50% (v/v), de ACN com agitação de 5 min seguidas de centrifugação. As amostras foram secadas sob vácuo e incubadas por 10 min com solução de tripsina (Sequencing Grade Modified Trypsin Promega, Madison, WI, USA) 12,5 ng/mL, seguidas de centrifugação. Os sobrenadantes foram removidos e cada amostra ressuspensa com 25 μ L de solução de NH_4HCO_3 , seguido de incubação a 37 °C por 16 h. Após a digestão, as amostras foram centrifugadas, os sobrenadantes foram colocados em novos tubos e no precipitado, adicionou-se solução contendo 50 μ L de 50% (v/v) ACN, 5% (v/v) ácido trifluoroacético (TFA). As amostras foram agitadas por 30 min e sonicadas por 6 min. A solução foi retirada e combinada com aquelas retiradas após a incubação das amostras com tripsina por 16 h. Amostras foram secas sob vácuo e os peptídeos solubilizados em 2 μ L de água Milli-Q. Em seguida, os peptídeos foram cobertos com 2 μ L de 10mg/ mL de ácido alfa ciano-4-hidroxi amico em 50% (v / v) ACN, 5% (v / v) TFA. As misturas dos peptídeos foram purificadas em uma coluna cromatográfica (ZipTips C18, Millipore, Bedford, MA, USA) para posterior análise por espectrometria de massas.

4.7 – Análises das amostras por espectrometria de massas

Os peptídeos obtidos das amostras digeridas *in gel* foram analisados em espectrômetro de massas (MS) do tipo MALDI-Q-TOF (do inglês matrix assisted laser desorption/ionization; quadrupole; time-of-flight; Synapt, Waters, Manchester, UK). Os valores das massas dos espectros foram analisados com o software Mass Linx (Waters). Os dados foram processados usando NE Protein Lynx Global Server software (versão 2.1, Micromass/Waters). A identificação das proteínas foi realizada com o

software Mascot (<http://www.matrixscience.com>) no banco de dados NCBI (<http://www.uniprot.org>) e posteriormente no banco de dados de *P. brasiliensis* disponível em http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiH ome.html.

4.8 – Análises *in silico*

As sequências de aminoácidos em formato FASTA das proteínas identificadas foram analisadas nos seguintes programas: SignalP 3.0, disponível em <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>, para verificação de possível sequência sinalizadora (peptídeo sinal); NetPhos 2.0, disponível em <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>, para verificação de possíveis sítios preditos de fosforilação; NetNGlyc 1.0, disponível em <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>, para verificação de possíveis sítios preditos de *N*-glicosilação; NetOglyc 3.1, disponível em <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOglyc/> para verificação de possíveis sítios preditos de *O*-glicosilação; NetAcet, disponível em <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetAcet/>, para verificação de possíveis sítios preditos de acetilação.

Para verificação das seguintes modificações pós traducionais por espectrometria de massas – acetilação da lisina, oxidação do triptofano e sítios de fosforilação (serina, tirosina e treonina) – os valores das massas dos espectros analisados e processados previamente foram analisados no software Mascot (<http://www.matrixscience.com>) considerando nos “parâmetros de modificações pós traducionais variáveis” desse software as modificações citadas.

5. RESULTADOS

5.1- Identificação de proteínas diferencialmente expressas:

As proteínas totais da parede celular de *P. brasiliensis* na forma leveduriforme foram obtidas por maceração mecânica na presença de nitrogênio líquido, seguida de extensivas lavagens com NaCl para remoção de quaisquer proteínas citosólicas ou contaminantes que poderiam estar aderidas à parede celular. Para verificar se ocorreu total remoção de proteínas citosólicas ou contaminantes após as lavagens com NaCl, amostras do sobrenadante da primeira lavagem com (p/v) 5% NaCl e 1% NaCl foram submetidas a eletroforese unidimensional (dados não mostrados). As proteínas não-covalentemente ligadas ao envoltório foram fracionadas e 150 µg destas foram submetidas à eletroforese bidimensional em experimentos em triplicatas. Os géis foram corados por prata utilizando-se sistema comercial (Silver Staining kit ProteinTM GE). Os níveis de expressão das proteínas de superfície de *P. brasiliensis* das condições controle e com restrição de ferro foram avaliados por meio do software Image Master Platinum 6.0 (GE Healthcare). Os géis da condição controle apresentaram 180 *spots* presentes nos três géis, dos quais 37 foram considerados diferencialmente expressos por meio de análises estatísticas. Já os géis da condição sob restrição de ferro apresentaram 195 *spots* comuns nas triplicatas e por análises estatísticas, 39 *spots* apresentaram-se diferencialmente expressos. Então, um total de 76 proteínas não-covalentemente ligadas à parede celular foi diferencialmente expresso sob restrição de ferro.

Dessas 76 proteínas reguladas, foi possível a identificação de 26 proteínas por meio da associação das técnicas de digestão trípica protéica, espectrometria de massa e análise em bancos de dados. Das 26 proteínas identificadas, 8 são reprimidas e 18 induzidas. Entre as 8 proteínas reprimidas, 3 foram identificadas por PMF; 3 por PMF e MS/MS; 2 por MS/MS. Entre as 18 induzidas, 2 foram identificadas por PMF; 11 por PMF e MS/MS; 5 por MS/MS, conforme é apresentado no esquema seguinte:

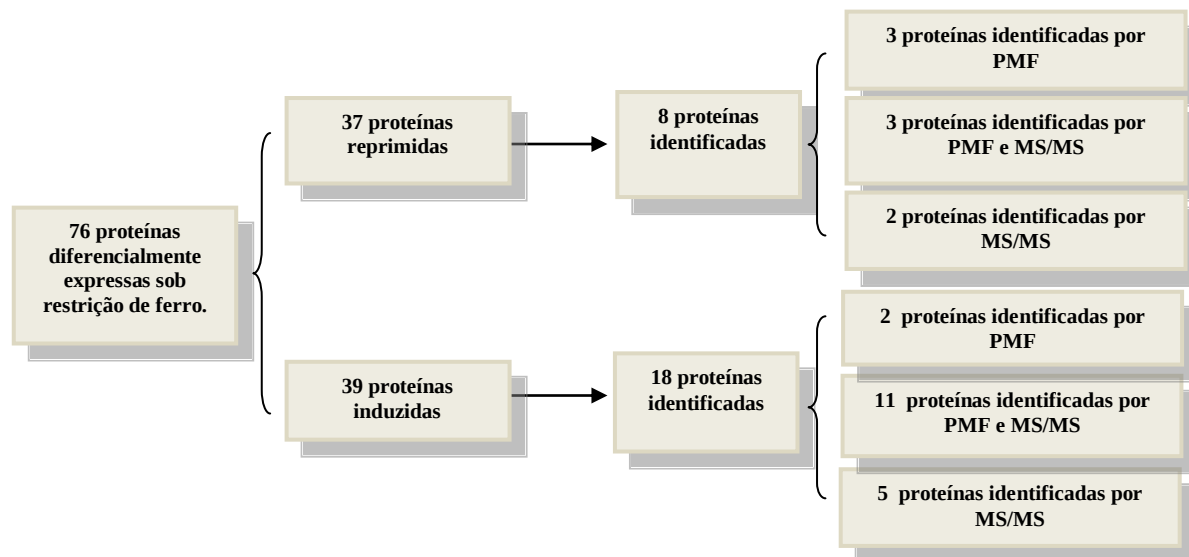


Fig. 3 – Diagrama esquemático apresentando a quantidade de proteínas reguladas sob restrição de ferro identificada por PMF, PMF e MS/MS e MS/MS.

A figura 4 apresenta os *spots* diferencialmente expressos nos géis *masters* das condições controle e experimental, respectivamente.

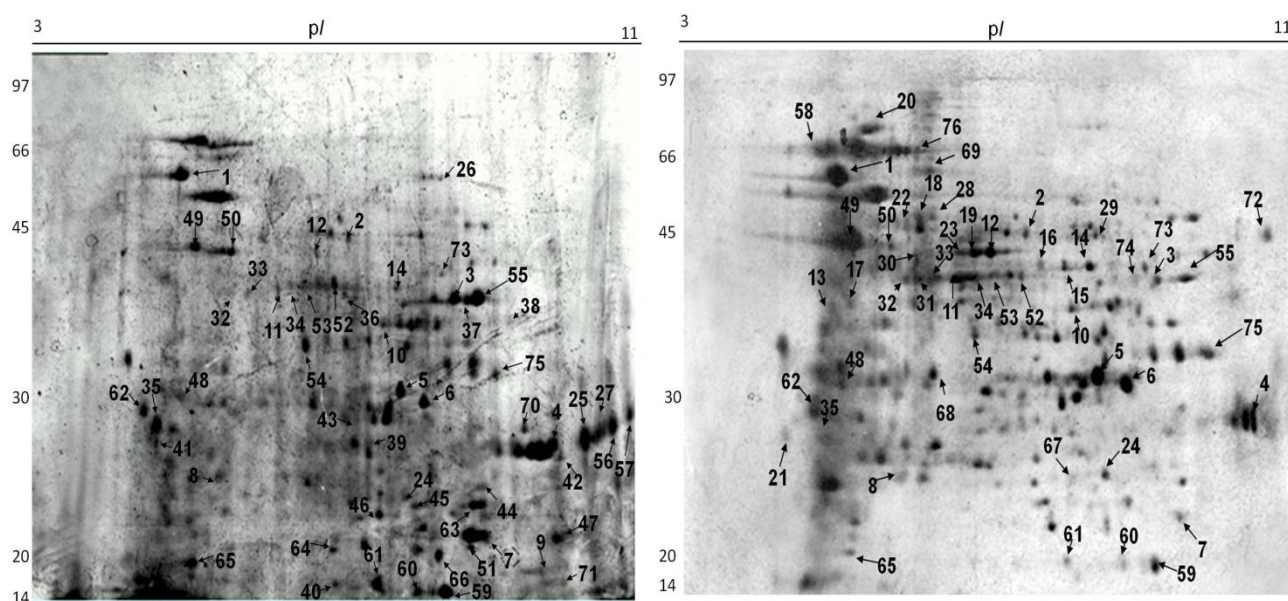


Fig. 4– Análise por eletroforese bidimensional das proteínas não-covalentemente ligadas em células de leveduras nas condições em meio controle e restrição de ferro por 24h. Perfil das proteínas em meio controle é apresentado em A e em restrição de ferro em B.

As proteínas identificadas foram organizadas em tabelas. A tabela 1 apresenta as 8 proteínas reprimidas identificadas e a tabela 2 apresenta as 18 proteínas induzidas identificadas sob condição de restrição de ferro.

Tabela 1 – Proteínas de superfície da parede celular *P. brasiliensis* na forma leveduriforme com expressão reprimida sob privação de ferro.

Número do spot	Número de acesso NCBI/BROAD	Identificação da proteína	MASCOT SCORES						
			PMF		MS/MS				
			Score	Cobertura %	Score	Número de peptídeos	MW Teórico/ Esperado	PI Teórico/ Esperado	Anova p-value
2	gi 295665123/PAAG_05249	Aldeído desidrogenase	95	47	189	6	54555/48000	5.87/7.01	1,2x10 ⁻²
3	gi 295658923/PAAG_08088	Complexo citocromo b-c1 subunidade 2	83	28	-	-	49014/40000	9.10/9.16	3,4x10 ⁻²
4	gi 295665702/PAAG_04931	Flavoproteína de transferência de elétron subunidade beta	-	-	45	1	21678/27000	9.34/10.69	3,22x10 ⁻²
7	gi 295666219/PAAG_04570	Cadeia ATP sintase mitocondrial	108	72	82	5	19653/18000	7.88/9.42	2,13x10 ⁻²
9	gi 295673804/PAAG_01307	Proteína NADH desidrogenase ferro-enxofre	121	63	-	-	32827/27000	7.79/7.28	*
25	gi 295671879/PAAG_01494	NADH-ubiquinona oxirredutase subunidade 21 kDa	-	-	37	1	426394/4500	5.17/5.80	*
26	gi 295665542/PAAG_04851	Proteína de crescimento osmótico	150	38	99	7	68041/62000	6.90/9.00	*
27	gi 295657771/PAAG_08620	ADP, ATP proteína carreadora	81	67	-	-	33533/28355	9.81/11.33	*

* spots visualizados somente em condição repleta de ferro

Tabela 2 – Proteínas de superfície da parede celular *P. brasiliensis* na forma leveduriforme com expressão induzida sob privação de ferro.

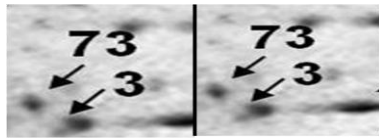
Número do spot	Número de acesso NCBI/BROAD	Identificação da proteína	MASCOT SCORES						
			PMF		MS/MS				
			Score	Cobertura %	Score	Número de peptídeos	MW Teórica/ Esperada	PI Teórico/ esperado.	Anova <i>p-value</i>
1	gi 295673162/PAAG_00986	Dissulfeto isomerase PD1	234	65	224	7	59305/62000	4.80/4.88	2,55x10 ⁻²
5	gi 295658218/PAAG_08448	Malato desidrogenase	74	44	75	3	34671/32000	6.36/8.36	4,31x10 ⁻²
6	gi 295673937/PAAG_00053	Malato desidrogenase	103	53	122	3	36022/31000	8.99/8.72	0,21x10 ⁻²
08	gi 295662873/PAAG_06255	Co-chaperona GrpE mitocondrial	-	-	49	1	28512/24500	8.89/5.81	3,46x10 ⁻²
10	gi 295658119/PAAG_08468	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	152	86	143	6	36619/35883	8.26/7.86	3,12 x10 ⁻²
11	gi 295668877/PAAG_03532	Actina	-	-	52	2	41825/44333	5.63/5.8	2,12x10 ⁻²
12	gi 146762537/PAAG_00771	Enolase	83	51	250	6	43859/48000	8.93/6.54	1,56x10 ⁻²
13	gi 30351156/PAAG_00773	14-3-3-like proteína	119	64	-	-	33677/40333	4.90/4.33	*
14	gi 295669690/PAAG_02869	Fosfoglicerato quinase	114	64	63	2	45311/45333	6.48/8.12	*
15	gi 295669690/PAAG_02869	Fosfoglicerato quinase	94	54	-	-	45311/46000	6.48/7.84	*
16	gi 295658595/PAAG_08295	Piruvato desidrogenase componente E1 subunidade alfa	98	67	80	3	45316/46333	8.62/7.77	*

17	gi 295658821/ PAAG_08037	ATP sintase subunidade beta	80	41	47	3	55181/42000	5.28/4.84	*
19	gi 295674665/ PAAG_00417	Succinil-CoA ligase subunidade alfa	119	46	-	-	34935/48000	8.54/6.55	*
20	gi 2956773716/ PAAG_01262	Hsp70-like proteína	99	44	149	5	68856/78000	5.39/5.11	*
21	gi 295665077/ PAAG_05226	Co-chaperona Hsp90 (Sba1)	-	-	46	2	21300/31333	4.23/4.02	*
22	gi 295673931/ PAAG_00050	Piruvato desidrogenase componente X	-	-	108	3	52714/53333	6.45/5.66	*
23	gi 295669794/ PAAG_02921	Fator de elongação Tu	-	-	89	3	48712/48500	6.11/6.25	*
24	gi 295666381/ PAAG_04651	Proteína nuclear ligada –GTP GSP1/Ran	67	51	50	3	24082/27600	6.90/8.28	1,68x10 ⁻²

* *spots* visualizados somente em condição de restrição de ferro

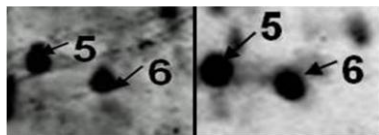
A figura 5 está apresentando *spots* regulados sob restrição de ferro nos géis *masters* da condição controle e experimental.

Gel master controle - Gel master depleção de Fe



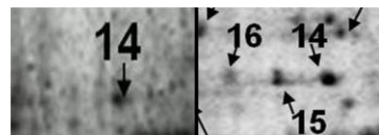
3 – Proteína reprimida. Complexo citocromo b-c1 subunidade 2 (gi|295658923)

73 – Proteína não identificada



5 – Proteína induzida. Malato desidrogenase (gi|295658218)

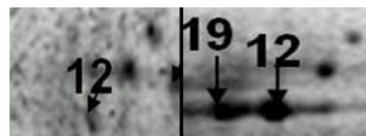
6 – Proteína induzida. Malato desidrogenase (gi|295673937)



14 – Proteína induzida. Fosfoglicerato quinase (gi|295669690)

15 – Proteína induzida. Fosfoglicerato quinase (gi|295669690)

16 – Piruvato desidrogenase componente E1 subunidade alfa (gi|295674665)



12 – Proteína induzida. Enolase (gi|146762537)

19 – Proteína induzida. Succinil-CoA ligase subunidade alfa (gi|295674665)

5.2- *Predição de modificações pós traducionais.*

Foi verificado se as proteínas reguladas sob restrição do íon ferro identificadas apresentavam sítios preditos de modificações pós traducionais (peptídeo sinal, fosforilação, *N*-glicosilação, *O*-glicosilação e acetilação). As proteínas reguladas sob restrição do íon ferro que apresentaram quaisquer dessas modificações pós traducionais citadas estão organizadas na tabela 3 (proteínas reprimidas) e na tabela 4 (proteínas induzidas). Essa predição foi realizada utilizando-se a sequência de aminoácidos das proteínas em formato FASTA com auxílio de ferramentas de bioinformática.

Tabela 3 - Proteínas de superfície da parede celular *P. brasiliensis* na forma leveduriforme com expressão reprimida sob privação de ferro que apresentam modificação pós traducional.

Número do spot	Identificação da proteína	Peptideo sinal	O-glicosilação	N-glicosilação	Fosforilação			Acetilação
					Sítios de serina	Sítios de treonina	Sítios de tirosina	
02	Aldeído desidrogenase	Não	Sim	Sim	6	7	6	Não
03	Complexo citocromo b-c1 sub-unidade 2	Não	Sim	Sim	23	6	7	Sim
04	Flavoproteína de transferência de elétron sub-unidade beta	Não	Não	Sim	4	5	1	Não
07	Cadeia ATP sintase D mitocondrial	Não	Não	Não	4	2	1	Não
09	NADH desidrogenase ferro-enxofre	Não	Sim	Sim	8	5	7	Sim
25	NADH-ubiquinona oxirredutase sub-unidade 21 kDa	Não	Sim	Sim	7	1	4	Não
26	Proteína de crescimento osmótico	Sim	Não	Sim	13	10	5	Não
27	ADP, ATP proteína carreadora	Não	Não	Não	6	5	4	Não

Tabela 4 - Proteínas de superfície da parede celular *P. brasiliensis* na forma leveduriforme com expressão induzida sob privação de ferro que apresentam modificação pós-traducional.

Número do spot	Identificação da proteína	Peptídeo Sinal	O- glicosilação	N- glicosilação	Fosforilação			Acetilação
					Sítios de serina	Sítios de treonina	Sítios de tirosina	
01	Disulfeto isomerase Pdi1	Sim	Sim	Sim	14	10	5	Não
5	Malato desidrogenase	Não	Não	Sim	9	4	2	Não
6	Malato desidrogenase	Não	Não	Sim	8	7	2	Não
08	Co-chaperona GrpE mitocondrial	Não	Sim	Não	14	3	1	Sim
10	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	Não	Não	Sim	11	5	3	Não
11	Actina	Não	Não	Sim	11	4	6	Não
12	Enolase	Não	Não	Sim	12	4	6	Não
13	14-3-3-like proteína	Não	Sim	Sim	11	6	6	Sim
14	Fosfoglicerato quinase	Não	Não	Sim	14	5	4	Sim
15	Fosfoglicerato quinase	Não	Não	Sim	14	5	4	Sim
16	Piruvato desidrogenase componente E1 subunidade alfa	Não	Sim	Não	12	4	6	Não
17	ATP sintase sub-unidade beta	Não	Não	Sim	10	6	2	Não
19	succinil-CoA ligase subunidade alfa	Não	Não	Não	11	1	1	Não
20	Hsp70-like proteína	Sim	Não	Não	13	8	4	Sim
21	Co-chaperona Hsp90 (Sba1)	Não	Não	Não	8	4	4	Não
22	Piruvato desidrogenase componente X	Não	Sim	Sim	19	6	4	Não
23	Fator de alongação Tu	Não	Não	Sim	9	10	1	Não
24	Proteína nuclear ligada –GTP GSP1/Ran	Não	Sim	Não	4	3	5	Não

A seguir, os gráficos em colunas apresentam o percentual das proteínas reguladas sob restrição de ferro que possuem modificação pós traducional.

Percentual de proteínas reprimidas com modificações pós traducionais identificadas sob restrição de ferro.

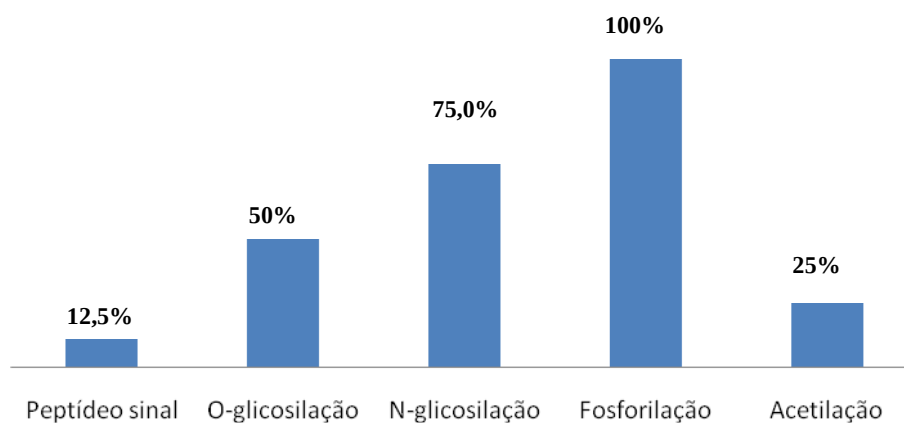


Fig. 5 – Gráfico em colunas apresentando o percentual de proteínas reprimidas com modificações pós traducionais sob restrição de ferro.

Percentual de proteínas induzidas com modificações pós traducionais identificadas sob restrição de ferro.

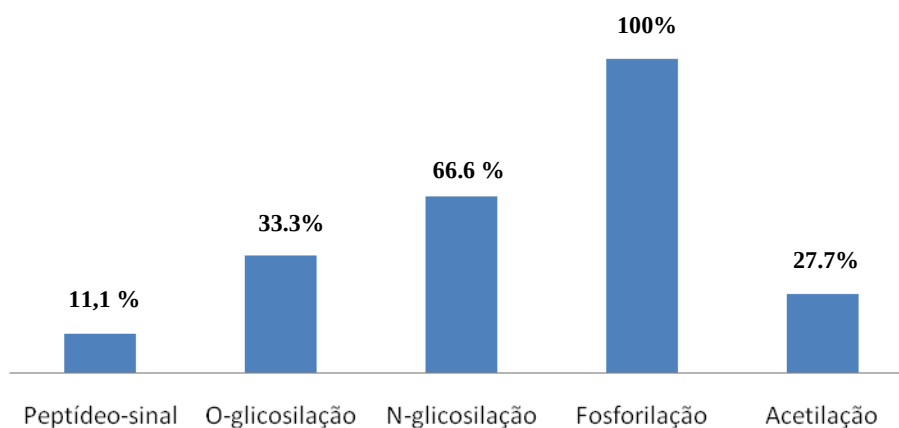


Fig. 6 – Gráfico em colunas apresentando o percentual de proteínas induzidas com modificações pós traducionais sob restrição de ferro.

Foi verificado por análise por espectrometria de massas se as proteínas diferencialmente expressas identificadas apresentavam as seguintes modificações pós traducionais: acetilação da lisina, oxidação do triptofano e sítios de fosforilação (serina, tirosina e treonina). As proteínas que apresentaram variação na porcentagem de cobertura da sequência e número de *matched* após essa análise estão sumarizadas na tabela 5. Essa análise é precisa, pois é realizada considerando os valores relativos das massas dos espectros oriundos das proteínas que sofreram digestão trípica.

Tabela 5 - Modificações pós traducionais das proteínas reguladas sob restrição de Fe da superfície da parede celular *P. brasiliensis* por análises no *software* Mascot (<http://www.matrixscience.com>).

Número do spot	Descrição da proteína	Regulação sob restrição de ferro	Modificação pós traducional*	Cobertura da sequência %	Número de <i>matched</i>
01	Dissulfeto isomerase Pdi1	Induzida	-	65	38
			Fosfo (S-T-Y)	76	57
			Acet (k)	78	60
			Oxida (HW)	71	42
03	Complexo citocromo b-c1 subunidade 2	Reprimida	-	28	09
			Fosfo (S-T)	32	13
			Oxida (HW) + Acet(k)	32	13
05	Malato desidrogenase	Induzida	-	44	16
			Fosfo (S-T)	61	22
06	Malato desidrogenase	Induzida	-	53	18
			Fosfo (S-T-Y)	61	27
07	Cadeia ATP sintase D mitocondrial	Reprimida	-	72	18
			Fosfo (S-T-Y)	88	26
09	Proteína NADH desidrogenase ferro-sulfur	Reprimida	-	63	22
			Fosfo (S-T-Y)	69	30
			Oxida (HW) + Acet(k)	87	31
10	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	Induzida	-	86	30
			Fosfo (S-T-Y)	86	35
			Oxida (HW) + Acet(k)	89	44
12	Enolase	Induzida	-	51	18
			Oxida (HW)	51	24

14	Fosfoglicerato quiinase	Induzida	-	64	24
			Fosfo (S-T-Y)	73	41
			Oxida (HW) + Acet(k)	87	46
16	Piruvato desidrogenase componente E1 subunidade alfa	Induzida	-	67	36
			Fosfo (S-T)	77	47
			Oxida (HW)+ Acet(k)	87	49
20	Hsp70-like proteína	Induzida	-	44	30
			Fosfo (S-T-Y)	44	33
			Acet (k)	52	41
26	Proteína de crescimento osmótico	Reprimida	-	41	25
			Oxida (HW)+ Acet(k)	47	28
27	ADP, ATP proteina carreadora	Reprimida	-	67	26
			Acet(k)	71	38

*Modificação pós traducional: acet(k) – acetilação da lisina; (HW) – oxidação do triptofano; fosfo (S-T-Y) – fosforilação da serina, treonina e tirosina, respectivamente.

Sob restrição do íon ferro, diversas proteínas foram reguladas na superfície celular de *P. brasiliensis*. Várias dessas proteínas apresentaram preditas modificações pós traducionais e estão presentes em outros organismos como putativos fatores de virulência. As modificações pós traducionais das proteínas controlam mecanismos de sinalização nas células e regulação biológica, por isso é dada relevância às modificações no presente estudo. Abaixo estão discutidas sobre algumas dessas proteínas detectadas na presente análise proteômica.

6.1. – HSPs são putativos fatores de virulência em fungos patogênicos e são reguladas na superfície de P. brasiliensis sob restrição do íon ferro.

Microrganismos patogênicos geralmente encontram em seus respectivos hospedeiros diferentes agentes estressores (como limitação de nutrientes) que podem prejudicar o crescimento do patógeno por, principalmente, afetar a conformação correta das proteínas e consequentemente suas funções. Assim, moléculas denominadas de proteínas de resposta ao choque térmico (HSPs) são responsáveis pela “proteção” às proteínas celulares, atuando de forma que, sem fazerem parte da estrutura final delas, auxiliam na montagem final, síntese e degradação das mesmas (Meyer, 1999).

Descritas primeiramente como proteínas de resposta ao choque térmico, verificou-se posteriormente que HSPs não atuam apenas na defesa ao calor, mas também quando as células são expostas a outros desafios metabólicos, incluindo análogos de aminoácidos, agentes modificantes de grupos sulfidrilas, diversos venenos metabólicos e estresse oxidativo (Meyer, 1999).

Além de atuarem na presença dos agentes estressores citados acima, é observado que as HSPs são reguladas na privação de metal. Em *H. capsulatum*, análises proteômicas sob privação de ferro apresentaram expressão diferenciada de 42 proteínas citoplasmáticas desse fungo. Entre as proteínas reguladas, HSP70 possuiu expressão induzida (Winters *et al.* 2008). Em *S. cerevisiae* é descrito que durante privação do íon ferro ocorre alta expressão de HSPs no citoplasma celular, fato que pode ser justificado por ocorrer um aumento de proteínas que possuem estrutura quaternária incorreta, podendo ser tóxicas à célula. Então, as HSPs devem ser expressas para reestruturar essas moléculas (Seo, 2008). Por análises proteômicas do citoplasma de *P. brasiliensis*, Parente

e colaboradores (2011) demonstraram que ocorre regulação da expressão de HSPs em condições de limitação do íon ferro. HSP70-like proteína, co-chaperona HSP90 e Hsp100 são exemplos de proteínas de choque térmico com expressão induzida nessa condição.

É evidenciado também que as HSPs desempenham importante papel no sucesso na infecção de fungos nos seus respectivos hospedeiros por estarem presentes na superfície celular. No processo infectivo de *H. capsulatum* em murinos, HSP60 é expressa na superfície da célula, participando do processo de internalização do mesmo nos tecidos do organismo hospedeiro (Gomez *et al.* 1997). Esses dados corroboram com pesquisas com *P. brasiliensis*, onde proteínas da família HSP70 e HSP90 são mais expressas na forma patogênica do que na saprofítica do fungo, o que sugere que as HSPs são necessárias na sobrevivência desse microrganismo para o estabelecimento da infecção (da Silva *et al.* 1999; Nicola *et al.* 2008).

Em 2007, Rodrigues e colaboradores realizaram um estudo da composição de proteínas em vesículas de *C. neoformans in vitro*. As análises revelaram uma composição complexa de 76 proteínas que perpassam a parede celular, que incluem moléculas relacionadas com virulência e resposta a estresse oxidativo, como chaperonas, proteínas de membrana, proteínas citoplasmáticas, proteínas mitocondriais e nucleares. Em adição, diferentes vesículas carreadoras de proteínas foram visualizadas em soro de pacientes com criptococose. HSP60, HSP70 e HSP90 foram identificadas entre aquelas localizadas nas vesículas na superfície do fungo, o que deve estar relacionado com um mecanismo de secreção de moléculas que auxiliam na patogenicidade de *C. neoformans*.

Em *C. albicans*, algumas HSPs estão presentes não apenas no espaço intracelular, mas na superfície da célula. São bem descritos como presentes na parede celular de *C. albicans* proteínas membros da família HSP90 (Matthews *et al.* 1988) e HSP70, que parecem estar relacionadas com o processo de infecção do fungo (Eroles *et al.* 1995).

No presente estudo, a proteína HSP70-like e co-chaperona Hsp90 (Sba1) foram detectadas com expressão induzida na superfície de *P. brasiliensis* na forma leveduriforme cultivado na deficiência de ferro. A presença de peptídeo sinal na HSP70-like proteína pode justificar a localização da mesma na superfície. Os dados obtidos corroboram com os estudos citados acima, onde se pode perceber que as proteínas de choque térmico, ao serem reguladas em fungos patogênicos em diferentes condições limitantes e estarem presentes na superfície de muitos deles, inclusive em *P. brasiliensis*, podem ser consideradas como putativos fatores de virulência nesses microrganismos.

6.2– As adesinas enolase e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase são reguladas na superfície de *P. brasiliensis* na deficiência de ferro.

Interações com proteínas da EMC estão relacionadas com a habilidade invasiva de diversos organismos. Assim, complexos protéicos denominados de adesinas, que reconhecem e ligam-se a receptores também protéicos na superfície da célula do hospedeiro (como laminina, colágeno, fibronectina e fibrinogênio), são geralmente expressos em microrganismos patogênicos para possibilitar a adesão nos tecidos alvo e o estabelecimento da infecção.

Adesinas são bem caracterizadas em diferentes modelos, inclusive em *P. brasiliensis*. Na bactéria *Streptococcus pyogenes* (agente causadora de faringite em mamíferos), a proteína GAPDH foi identificada como um componente protéico da parede celular, onde não é só enzimaticamente ativa, mas também serve como uma proteína de ligação a fibronectina, lisozima, miosina e actina (Pancholi *et al.* 1992; Winran & Lottenberg, 1996). Além disso, em *C. albicans*, GAPDH está localizada na camada mais externa da parede celular, onde é enzimaticamente ativa e apresenta papel de adesina para laminina (Villamon *et al.* 1999). É considerada importante antígeno de *C.albicans* (Gil-Navarro *et al.* 1997).

Em *P. brasiliensis* GAPDH foi caracterizada como adesina em 2006 por Barbosa e colaboradores. Por análises de microscopia imunoeletrônica e Western blot, GAPDH foi detectada no citoplasma e na parede celular de *P. brasiliensis*. Por ensaios de Far-Western foi demonstrado que a recombinante GAPDH liga-se a laminina, fibronectina e colágeno tipo I. Ainda no mesmo estudo, o tratamento de células de leveduras de *P. brasiliensis* com anticorpo policlonal anti-GAPDH e a incubação de pneumócitos com a proteína recombinante *in vitro*, promoveu a inibição da aderência e internalização de *P. brasiliensis* nos pneumócitos, o que sugere a contribuição dessa proteína no processo de adesão do fungo a tecidos do hospedeiro e na disseminação da infecção.

No presente estudo, a proteína GAPDH foi induzida sob restrição de ferro na superfície de *P. brasiliensis*. Em 2011, Parente e colaboradores revelaram em amostras de proteínas citoplasmáticas de *P. brasiliensis* cultivado sob restrição de ferro, que também ocorre indução da expressão dessa proteína. Assim como a adesina GAPDH, a proteína enolase foi induzida sob deficiência do íon ferro na superfície de *P. brasiliensis*. Em *C. albicans*, enolase está presente na parede celular e desempenha papel de proteção ao fungo no processo infectivo (Montagnoli *et al.* 2004; Pitarch *et al.* 2006). Na bactéria patogênica, causadora de pneumonia em humanos, *Chlamydia pneumoniae*, a enzima

enolase tem sido identificada como potencial alvo de vacina (Finco *et al.* 2005). A proteína enolase foi também encontrada na superfície de merozoítos de *Plasmodium falciparum* e caracterizada como potencial antígeno nesse protozoário (Pal-Bhowmick *et al.* 2007). Em *P. brasiliensis*, a enzima enolase é descrita como adesina por ligar-se a fibronectina (Donofrio *et al.* 2009) e por ligar-se ao plasminogênio (Nogueira *et al.* 2010). A interação *P. brasiliensis*-plasminogênio é capaz de promover a degradação de fibronectina sugerindo evidências *in vitro* para a função de plasmina ativa na superfície do fungo. Em adição, enolase recombinante (rPbEno) promoveu aumento na adesão e invasão de *P. brasiliensis* em modelo de infecção *in vitro*, potencializando a infecção, processo que parece estar relacionado com a habilidade da enolase em modificar a superfície de células do hospedeiro (Nogueira *et al.* 2010). Esses dados demonstram que a enolase é requerida no processo infectivo e sugerem provável correlação entre limitação de ferro e patogênese.

6.3– A enzima fosfoglicerato quinase é induzida na superfície de *P. brasiliensis* sob restrição do íon ferro.

Identificada com expressão induzida na superfície durante deficiência de ferro em *P. brasiliensis*, a proteína fosfoglicerato quinase encontra-se também na superfície de outros microrganismos. Em *Schistosoma mansoni*, fosfoglicerato quinase é uma proteína encontrada na superfície, candidata em potencial para o desenvolvimento de vacina contra o parasita (Lee *et al.* 1995). A fosfoglicerato quinase do grupo estreptocócico B está presente na superfície bacteriana e liga-se ao plasminogênio e actina, podendo alterar o citoesqueleto de células epiteliais do hospedeiro (Boone *et al.* 2011). Em *C. albicans* essa proteína é encontrada na parede celular. Anticorpos IgE contra antígenos de *C. albicans* reagiram com fosfoglicerato quinase em 41% das amostras de soro de pacientes com candidíase (Alloush *et al.* 1997). Em 2002, Pitarch e colaboradores identificaram em *C. albicans* a proteína em questão ancorada a parede celular por ligações não-covalentes.

Em restrição de ferro, Parente e colaboradores (2011) identificaram a enzima fosfoglicerato quinase com expressão induzida no citoplasma de *P. brasiliensis*, juntamente com outras proteínas pertencentes a via glicolítica, sugerindo que essa via é utilizada por *P. brasiliensis* para geração de energia, já que diversas proteínas da via do TCA, ciclo do glioxalato e metilcitrato são dependentes do íon ferro na sua conformação

. A presença dessa enzima regulada tanto na superfície celular de *P. brasiliensis* como intracelularmente (Parente *et al.* 2011), ainda precisa ser melhor compreendido.

6.4 – A proteína dissulfeto isomerase de *P. brasiliensis* deve ser endereçada à superfície pela presença de peptídeo sinal em sua cadeia de aminoácidos.

A proteína dissulfeto isomerase tem função de promover a formação de ligação dissulfeto nas proteínas endereçadas ao retículo endoplasmático, levando ao rearranjo de pontes dissulfeto em uma única proteína (Vitu *et al.* 2008). É encontrada na superfície de conídios de *A. fumigatus* (Abdul *et al.* 2005) e na parede celular de *C. albicans* ancorada por ligações não – covalentes (Pitarch *et al.* 2002). São descritas como proteínas de enovelamento de antígenos e alérgenos dos fungos *Aspergillus niger* e *A. fumigatus* (Liang *et al.* 2005; Nigam *et al.* 2001). Em *P. brasiliensis* essa proteína foi induzida na superfície sob restrição de ferro, possivelmente endereçada para a parede celular devido à presença de peptídeo sinal em sua estrutura.

6.5 – O antígeno malato desidrogenase de *P. brasiliensis* apresentou expressão induzida de duas isoformas na superfície do fungo na deficiência do íon ferro.

A proteína malato desidrogenase é bem descrita como importante antígeno de *P. brasiliensis*. Ela foi detectada por reação com soros de pacientes com PCM e é mais expressa na forma leveduriforme do que na miceliana do fungo (Fonseca *et al.* 2001). Em *C. neoformans*, a malato desidrogenase está presente não apenas no citoplasma celular, mas também foi encontrada na superfície em vesículas, estando relacionada com fatores de virulência do microrganismo (Rodrigues *et al.* 2007).

No presente estudo, essa proteína foi identificada em duas isoformas com diferentes *pI*. O *pI* experimental da isoforma do spot 5 é 8.36 enquanto que do spot 6 é 8.72, possivelmente devido aos preditos sítios de fosforilação que a proteína apresenta. A presença de sítios de fosforilação pode regular a atividade, estabilidade e localização da proteína (Ludwig *et al.* 2006). Além de ser fosforilada, ambas isoformas da malato desidrogenase de *P. brasiliensis* identificadas apresentaram em suas sequências possíveis sítios preditos de glicosilação, que consistem na adição de açúcares na proteína. Essas modificações podem interferir no processo de adesão e são importantes na formação de proteínas secretórias (Ludwig *et al.* 2006). A presença dessa proteína na superfície celular de *P. brasileinsis* na deficiência de ferro sugere que a mesma é endereçada para a parede celular e é requerida nessa condição limitante.

6.6 – *Proteína 14-3-3-like e actina: proteínas induzidas em resposta à limitação de ferro em P. brasiliensis.*

Células fúngicas mantêm sensores transmembrana que detectam mudanças no ambiente e iniciam sinais que são transmitidos da superfície celular para o núcleo. Por exemplo, o modelo de leveduras *S. cerevisiae* utiliza cinco cascatas de proteína quinase mitógeno-ativada (MAPK), que por sua vez regula atividades celulares (como a indução ou repressão da transcrição de genes), para responder apropriadamente às mudanças no ambiente (Chen & Thorner, 2007).

As proteínas 14-3-3 ligam-se a várias proteínas de sinalização, como as quinases e receptores transmembrana. Essas proteínas fazem parte de uma grande família que está envolvida na regulação de diversos processos, dentre eles, a organização da actina e integridade da parede celular sinalizada por vias de MAPK (Fu, 2000). Em *S. cerevisiae* os genes ortólogos a 14-3-3 (Bmh1 e Bmh2), estão envolvidos na transdução de sinal, crescimento celular e morfogênese (Nicola *et al.* 2005).

Em *P. brasiliensis*, sob restrição do íon ferro, actina e proteína 14-3-3-like são induzidas na superfície celular (presente estudo) e no citoplasma (Parente *et al.* 2011), o que sugere que a limitação de metal ativa vias sinalizadoras induzindo 14-3-3-like proteína a reorganizar a actina da parede para manter a integridade celular na presença de limitação do íon ferro.

6.7 – *Proteínas citoplasmáticas da cadeia transportadora de elétrons e envolvidas na oxidação de ácidos graxos foram reprimidas na superfície de P. brasiliensis na deficiência de ferro.*

Em eucariontes, reações redox são realizadas por complexos de proteínas mitocondriais e o conjunto dessas proteínas envolvidas é denominado de cadeia transportadora (Marcet-Houben *et al.*, 2009). A proteína ATP sintase D mitocondrial, responsável por transferir elétrons na cadeia transportadora de elétrons, apresentou expressão reprimida na limitação do íon ferro em *P. brasiliensis* na superfície, assim como a proteína citocromo b-c₁, sendo que esta última foi identificada por Parente e colaboradores (2011) com expressão reprimida no citoplasma celular na limitação do íon ferro. Essa proteína possui centros de oxi-redução dependentes de ferro. A proteína aldeído desidrogenase, envolvida na oxidação de ácidos graxos foi identificada também com expressão reprimida sob restrição do íon ferro tanto no citoplasma (Parente *et al.*

2011) quanto na superfície. Essas proteínas não apresentam sequência sinalizadora, o que sugere que elas são endereçadas para a superfície em meio repleto do íon ferro por vias não-clássicas.

7. CONCLUSÕES

A limitação do íon ferro fez com que proteínas da superfície celular de *P. brasiliensis* fossem reguladas em resposta à essa privação. Algumas dessas proteínas, tipicamente citoplasmáticas, já eram descritas na superfície do fungo e em outros modelos como putativos fatores de virulência, auxiliando na adesão, no processo infectivo e na manutenção da integridade celular. No presente trabalho, proteínas como enolase, HSP70, que já eram descritas como presentes na superfície de *P. brasiliensis*, foram reguladas na ausência do íon ferro. Entretanto, diversas proteínas que ainda não eram descritas na superfície de *P. brasiliensis* foram identificadas na superfície fúngica nessa condição. Praticamente todas essas proteínas apresentam alguma modificação pós traducional predita, o que pode explicar o endereçamento destas à superfície e/ou a presença de isoformas protéicas na parede celular. Assim, a limitação do íon ferro em *P. brasiliensis* exigiu resposta celular, que por sua vez, a nível de tradução consistiu na regulação da expressão de proteínas que foram modificadas pós traducionalmente e endereçadas para a superfície, para que, de alguma forma essas proteínas auxiliem o fungo sob essa condição limitante de metal.

8. REFERÊNCIAS

- Abdul RA, Oellerich M, Amstrong VW, Riemenschneider B, Reichard U 2006. Proteome of conidial surface associated proteins of *Aspergillus fumigatus* reflecting potential vaccine candidates and allergens. *Proteome research* 5: 954-962.
- Aisen P 2004. Transferrin receptor 1. *J Biochem Cell Biol* 36 (11):2137-43.
- Ajello L & Polonelli L 1985. Imported paracoccidioidomycosis: a publichealth problem in non – endemic areas. *Eur J Epidemiol* 1 (3):160-5.
- Alloush HM, López-Ribot JL, Masten BJ, Chaffin WL 1997. Phosphoglycerate kinase: a glycolytic enzyme present in the cell wall of *Candida albicans*. *Microbiology* 143:321–330.
- Almeida FBDR, Carvalho FC, Mariano VS, Alegre ACP, Silva RN, Hanna ES, Roque-Barreira MC 2011. Influence of n-glycosylation on the morphogenesis and growth of *Paracoccidioides brasiliensis* and on the biological activities of yeast proteins. *Plos One* 6 (12): 129-216.
- Aristizabal BH, Clemons KV, Stevens DA, Restrepo A 1998. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: in vivo inhibition in females. *Infect Immun* 66: 5587–5591.
- Aristizabal BH, Clemons KV, Cock AM, Restrepo A, Stevens DA 2002. Experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice: influence of the hormonal status of the host on tissue responses. *Med Mycol* 40: 169–178.
- Barbosa MS, Bão SN, Andreotti PF, Faria FP, Felipe MSS, Feitosa LS, Mendes-Giannini MJS, Soares CMA 2006. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. *Infect Immun* 74: 382-389.
- Barrozo LV, Mendes RP, Marques SA, Benard G, Silva ME, Bagagli E 2009. Climate and acute/subacute paracoccidioidomycosis in a hyper-endemic area in Brazil. *J Epidemiol* 38 (6):1642-9.
- Bjelqvist B, Sanchez JC, Pasquali C, Ravier F, Paquet N, Frutger S, Hughes GJ, Hiochstrasser D 1993. Micropreparative two-dimensional gel electrophoresis allowing the separation of samples containing milligram amounts of proteins. *Electrophoresis* 14: 1375-1378.

- Boone TJ, Burnham CA, Tyrrell GJ 2011. Binding of group B streptococcal phosphoglycerate kinase to plasminogen and actin. *Microb Pathog* 51:255-61
- Bradford MM 1976. A dye binding assay for protein. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Brawner DL, Cutler JE 1986. Variability in expression of cell surface antigens of *Candida albicans* during morphogenesis. *Infect. Immun* 51:337-343.
- Bullen JJ, Rogers HJ, Spalding PB, Ward CG 2005. Iron and infection: the heart of the matter. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 43: 325-330.
- Brummer E, Castaneda E, Restrepo A 1993. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev* 6 (2): 89-117.
- Cabib E, Rho D, Schmidt M, Crotti LB, Varma A 2001. The yeast cell wall septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. *Biological chemistry* 23:19679-19682.
- Calderone RA, Braun PC 1991. Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. *Microbiol Rev* 55:1-20.
- Cappellaro C, Morsa V, Tanner W 1998. New potential cell wall glucanases of *Saccharomyces cerevisiae* and their involvement in mating. *J Bacteriol* 180:5030-7.
- Carrero LL, Nino-Veja G, Teixeira MM, Carvalho MJ, Soares CMA, Pereira M, Jesuino RS, McEwen JG, Mendoza L, Taylor JW, Felipe MS, San-Blas G 2008. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. *Fungal Genet Biol* 45 (5): 605-12v.
- Casanova M, López-Ribot JL, JP Martínez, Sentandreu R 1992. Characterization of cell wall proteins from yeast and mycelial cells of *Candida albicans* by labelling with biotin: comparison with other techniques. *Infect. Immun* 60:4898-4906.
- Cassone A 1989. Cell wall of *Candida albicans*: its functions and its impact on the host. *Med. Mycol* 3:248-314.
- Chaffin WLJ 2008. *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiology and molecular Biology Reviews* 15: 1092-2172.
- Chen RE & Thorner J 2007. Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1773:1311-1340.
- da Silva SP, Borges-walmsley MI, Pereira IS, Soares CMA, Walmsley AR, Felipe MSS 1999. The differential expression and splicing of hsp70 gene during transition

- from mycelial to the infective yeast form of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mol Microbiol* 31: 1039-1050.
- de Groot PW, Hellingwerf KJ, Klis FM 2003. Genome-wide identification of fungal GPI proteins. *Yeast* 20:781-796.
- Donofrio, FC, Calil AC, Miranda ET, Almeida AM, Benard G, Soares CP, Nogueira SV, Soares CMA, Mendes-Giannini 2009. Enolase from *Paracoccidioides brasiliensis*: isolation and identification as a fibronectin-binding protein. *J. Med. Microbiol* 58:706–713.
- Dunn LL, Rahmanto SY, Richardson DR 2006. Iron uptake and metabolism the new millennium. *Cell Biology* 0962-8924.
- Ecker M, Deutzmann R, Lehle L, Mersa V, Tanner W 2006. Pir proteins of *Saccharomyces cerevisiae* are attached to β -1,3-glucan by a new protein-carbohydrate linkage. *J Biol Chem* 281:11523-11529.
- Engh RA & Bossemeyer D 2001. The protein Kinase activity modulation sites: mechanisms for cellular regulation. *Advances in Enzyme Regulation* 41-61.
- Eroles P, Sentandreu M, Elorza MV, Sentandreu R 1995. Cloning of a DNA fragment encoding part of a 70-kDa heat shock protein of *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett* 128(1):95-100.
- Fava Netto C, Vegas VS, Sciannamea JJ, Guarnieri DB 1969. Antígeno polissacarídeo do *Paracoccidioides brasiliensis*. Estudo do tempo de cultura do *P. brasiliensis* necessário ao preparo do antígeno. *Rev Inst Med Trop* 11:177–181.
- Finco O, Bonci A, Agnusdei M, Scarselli M, Petracca R, Norais N, Ferrari G, Garaguso I, Donati M, Sambri V, Cevenini R, Ratti G, Grandi G 2005. Identification of new potential vaccine candidates against *Chlamydia pneumoniae* by multiple screenings. *Vaccine* 23:1178–1188.
- Fleming MD, Trenor CC, Foernzler D, Beier DR, *et al* 1997. Microcutic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nat Genet* 16:383-86.
- Fonseca CA, Jesuino RS, Felipe MS, Cunha DA, Brito WA, Soares CMA 2001. Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect* 3 (7):535–42.
- Franco M, Tani EM, Peraçoli MT, Montenegro MR 1987. Experimental pulmonary paracoccidioidomycosis in the Syrian hamster: morphology and correlation of lesions with the immune response. *J Med Vet Mycol* 25 (5):291-300.

- Froissard M, belgared-Touze, Dias M, Buisson N, Camadro J, Haguenaue-Tsapis R, Lesuisse E 2007. Trafficking of siderophore transporters in *Saccharomyces cerevisiae* and intracellular fate of ferrioxamine B conjugates. *Traffic* 8: 1601-1616.
- Fu H, Subramanian RR, Masters SC 2000. 14-3-3 proteins: structure, function and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40:617-47.
- Ganz T, Nemeth E 2006. Regulation of iron acquisition and iron distribution in mammals *Biochim Biophys Acta* 1763(7):690-9.
- Gil-Navarro I, Gil ML, Casanova M, O'Connor JE, Martínez JP, Gozalbo D 1997. The glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is a surface antigen. *J. Bacteriol* 179:4992–4999.
- Gomez BL, Figueroa JI, Hamilton AJ, Ortiz BL, Robledo MA, *et al.* 1997. Development of a novel antigen detection test for histoplasmosis. *J Clin Microbiol* 35: 2618–2622.
- Gonzalez A, Lenzi HL, Motta EM, Caputo L, Sahaza JH, Cock AM, Rui AC, Restrepo A, Cano LE 2005. Expression of adhesion molecules in lungs of mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Microb Infect* 7:666-73.
- González-Chávez SA, Arévalo-Gallegos S, Rascón-Cru Q 2009. Lactoferrin: structure, function and applications. *Int J Antimicrob Ag* 33: 301.e1-301.
- Griffin JE & OJEDA SR 1992. Textbook of endocrine physiology. *Oxford University Press*: 66: 67 – 149.
- Groll AH, De Lucca AJ, Walsh TJ 1998. Emerging targets for the development of novel antifungal therapeutics. *Trends Microbiol.* 6: 117–124.
- Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C 2010. Two to tango: regulation of mammalian iron metabolism. *Cell* 142: 24–38.
- Johnson L 2008. Iron and siderophores in fungal – host interactions. *Mycol Res* 2: 170-183.
- Kanetsuna F, Carbonell L.M, Moreno RE, Rodriguez EJ 1969. Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* 97(3): 1036-41.
- Kapteyn JC, Montijn RC, Vink E, de la Cruz J, Llobell A, Douwes JE, Shimoi H, Lipke PN, Klis FM 1996. Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a phosphodiester-linked-1,3--1,6-glucan heteropolymer. *Glycobiology* 6, 337–345.

- Kapteyn JC, Van Den EH, Klis FM 1999. The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim. Biophys. Acta* 1426: 373–383.
- Kirk SJ & Ward TH 2007. COPII under microscope. *Semin Cell Dev Biol* 18: 435–447.
- Klis F, Mol P, Hellingwerf K, Brul S 2002. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 26: 239.
- Kollár R, Reinhold BB, Petráková E, Yeh HJ, Ashwell G, Drgonová J, Kapteyn JC, Klis FM, Cabib E 1997. Architecture of the yeast cell wall. β -1,6-glucan interconnects mannoprotein, β -1,3-glucan, and chitin. *J Biol Chem* 272:17762–17775.
- Laemmli UK 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
- Lee KW, Shalaby KA, Thakur A, Medhat A, Karim AM, LoVerde PT 1995. Cloning of the gene for phosphoglycerate kinase from *Schistosoma mansoni* and characterization of its gene product. *Mol Biochem Parasitol* 71:221–23.
- Lesuisse E, Labbe P 1989. Reductive and non-reductive mechanisms of iron assimilation by yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 147: 389–298.
- Liang Y, Li W, Zhang Y 2005. Functional analysis of tunicamycin-inducible gene A polypeptide from *Aspergillus niger*. *Biochem Cell Biol* 83 (5):654–8.
- Ludwig L, Strahl S, Tanner W. 2006. Protein glycosylation, conserved from yeast to man: a model organism helps elucidate congenital human diseases. *Angew Chem Int* 45: 6802–6818.
- Lutz A 1908. Uma mycose pseudococcidica localizada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomicoses americanas. *Brasil-Med* 22: 121–124.
- Marcet-Houben M, Gabadón T 2009. The tree versus the forest: the fungal tree of life and the topological diversity within the yeast phylome. *PLoS ONE* 4(2): e4357.
- Matute DR, McEwen JG, Puccia R, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, Rauscher JT, Restrepo A, Morais F, Nino-Vega G, Taylor JW 2006. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol* 23:65–73.
- Matute DR, Sepulveda VE, Quesada LM, Goldman G H, Taylor JW, Restrepo A, McEwen JG. 2006. Microsatellite analysis of three phylogenetic species of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol* 44 (6): 2153–7.

- McEwen JG, Garcia AM, Ortiz BL, Botero S, Restrepo A 1995. In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Arch Med Res* 26: 305-306.
- Meyer TN, da Silva AL 1999. Resposta celular ao estresse. *Med Brasil* 45 (2): 181-8.
- Montagnoli C, Sandini S, Bacci A, Romani L, La Valle R 2004. Immunogenicity and protective effect of recombinant enolase of *Candida albicans* in a murine model of systemic candidiasis. *Med. Mycol* 42:319–324.
- Mrsa V, Ecker M, Strahl-Bolsinger S, Nimtz M, Lehle L, Tanner W 1999. Deletion of new covalently linked cell wall glycoproteins alters the electrophoretic mobility of phosphorylated wall components of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 181:3076-3086.
- Neto BRDS, Silva JF, Mendes-Giannini MJ, Lenzi HL, Soares CMA, Pereira M 2009. The malate synthase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a linked surface protein that behaves as an anchorless adhesin. *BMC Microbiol* 9: 272.
- Nguyen TH, Fleet GH, Rogers PL. Composition of the cell walls of several yeast species 1998. *Appl Microbiol Biotechnol* 50:206-212.
- Nicola AM, Andrade RV, Dantas AS, Andrade PA, Arraes FBM, Fernandes L, Silva-Pereira I, Felipe MSS 2008. The stress responsive and morphologically regulated *hsp90* gene from *Paracoccidioides brasiliensis* is essential to cell viability. *BMC Microbiol* 8: 158.
- Nigam S, Sarma PV, Ghosh PC, Sarma PU 2001. Characterization of *Aspergillus fumigatus* protein disulfide isomerase family gene. *Gene* 27: 143-150.
- Nogueira SV, Fonseca FL, Rodrigues ML, Mundodi V, Abi-Chacra EA, Winters MS, Alderete JF, Soares CMA 2010. *Paracoccidioides brasiliensis* enolase is a surface protein that binds plasminogen and mediates interaction of yeast forms with host cells. *Emerging Infections* 10: 1128.
- Pal-Bhowmick I. Coppens, I, Sharma S. Gotam K 2007. Protective properties and surface localization of *Plasmodium falciparum* enolase. *Infect Immun* 75 (11): 5500-8.
- Pancholi V & Fischetti VA 1992. A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity. *J Exp Med* 176:415–426.
- Paniago AM, Aguiar J I, Aguiar ES, da Cunha RV, Pereira GR, Londero AT 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.

- Parente AF, Bailão AM, Borges CL, Parente JA, Magalhães AD, Ricart CAO, Soares CMA 2011. Iron availability alters the metabolic status of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as detected by proteomic assays. *PLoS One* 6 (7): 22810.
- Pereira LA, Bao SN, Barbosa MS, Silva JL, Felipe MS, Santana JM, Mendes-Giannini MJS, Soares CMA 2007. Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function. *FEMS Yeast Res* 7:1381–1388.
- Philpott CC 2006. Iron uptake in fungi: a system for ever source. *Biochim Biophys Acta* 1763 (7): 636-645.
- Pinzan CF, Ruas LP, Casabona-Fortunato AS, Carvalho FC, Roque-Barreira M 2010. Immunological Basis for the Gender Differences in Murine *Paracoccidioides brasiliensis* Infection. *PLoS One* 5: 10757.
- Pitarch A, Sanches M, Nombela C, Gil C 2002. Sequential fractionation and two-dimensional gel analysis unravels the complexity of dimorphic fungus *Candida albicans* cell wall proteome. *Molecular and Cellular Proteomics* 1:967–982.
- Pitarch A, Jimenez C, Nombela C, Gil C 2006. Decoding serological response to *Candida* cell wall immunome into novel diagnostic, prognostic, and therapeutic candidates for systemic candidiasis by proteomic and bioinformatic analyses. *Mol Cell Proteomics* 5:79–96.
- Poulain, D, Hopwood V, Vernes A 1985. Antigenic variability of *Candida albicans*. *Crit Rev Microbiol* 12:223–270.
- Puccia R *et al.* 1998. Exocellular proteolytic activity of *Paracoccidioides brasiliensis*: cleavage of components associated with the basement membrane. *Med Mycol* 36: 345–348.
- Queiroz-Telles FM, Franco CS, Lacaz G, Restrepo-Moreno A 1994. *Paracoccidioides brasiliensis* ultra structural. *Wdings Paracoccidioidomycosis CRC Pre*: 27–44.
- Reese AJ, Yoneda A, Breger JA, Beauvais A, Liu H, *et al.* 2007. Loss of cell wall alpha (1–3) glucan affects *Cryptococcus neoformans* from ultra structure to virulence. *Mol Microbiol* 63:1385–1398.
- Restrepo A & Jiménez BE 1980. Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium. *J Clin Microbiol* 12 (2):279-81.
- Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover EP, Feldman D, Stevens DA 1984. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides*

- brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect Immun* 46: 346-53.
- Restrepo A, McEwen JG, Castaneda E 2001. *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med Mycol* 39: 233-241.
- Ricci G, Mota FT, Wakamatsu A, Serafim RC, Borra RC, Franco M 2004. Canine paracoccidioidomycosis. *Med Mycol* 42: 379–383.
- Richardson DR 2000. The role of the membrane-bound tumour antigen, melanotransferrin, in iron uptake by the human malignant melanoma cell. *Eur J Biochem* 267: 1290–1298.
- Richini-Pereira VB, Bosco SD, Griesse, J, Theodoro RC, Macoris SA, Da Silva R.J, Barrozo L, Tavares PM, Zancoppe-Oliveira RM, Bagagli E 2007. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. *Med Mycol* 1-6.
- Rodrigues ML, Naykayasu ES, Oliveira DL, Nimrichter L, Nosanchuk JD, Almeida IC, Casadevall A 2007. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryotic cell* 58–67.
- Sekyere EO, Dunn LL, Rahmanto YS, Richardson DR 2006. Role of melanotransferrin in iron metabolism: studies using targeted gene disruption in vivo. *Blood* 107 (7): 2599-601.
- Sentandreu, R, Martínez JP, Elorza MV, Mormeneo S 1991. Relationships between dimorphism, cell wall structure, and surface activities in *Candida albicans*. *Molecular biology* 72–8867.
- Seo H, Chang Y, Chung Y, Kim K 2008. Proteomic analysis of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* upon iron deficiency induced via human H-ferritin production. *J Microbiol Biotechnol* 18: 1368–1376.
- Shikanai-Yasuda MA, de Telles Filho FQ, Mendes RP *et al.* 2006. Consenso em paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 297–310.
- Silva MG, *et al.* 2011. The homeostase of iron, copper and zinc in *Paracoccidioides brasiliensis*, *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, and *Cryptococcus gatti*: a comparative analysis. *Frontiers in Microbiology* 2:49.
- Sutak R, Lesuisse E, Tchez J, Richardson DR 2008. Crusade of iron: iron uptake in eucaryotes and significance for virulence. *Trends Microbiol* 16: 262-268.

- Szymanski CM & Wren BW 2005. Protein glycosylation in bacterial mucosal pathogens. *Nature* 3: 225-237.
- Teixeira MM, Theodoro RC, Carvalho MJA, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC, Mendonza L, Bagagli E, San-Blas G, Felipe MS 2009. Phylogenetics analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol* 52: 273-283.
- Terçarioli G, Bagagli E, Reis G, Theodoro R, Bosco S, Macoris S, Richini-Pereira V 2007. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. *BMC Microbiology* 7 (1): 92.
- Tomazzet PK, Cruz AH, Bonfim SM, Soares CM, Pereira M 2005. The cell wall of *Paracoccidioides brasiliensis*: insights from its transcriptome. *Genet Mol Res* 30: 4 (2): 309-25.
- Van Deventer HJ, Goessens WH, Van Vliet AJ, Verbrugh HA 1996. Anti-enolase antibodies partially protective against systemic candidiasis in mice. *Clin. Microbiol Infect* 2: 36–43.
- Villamon E, Gozalbo D, Martinez JP, Gil ML 1999. Purification of a biologically active recombinant glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett* 179: 61–65.
- Vitu E, Gross E, Greenblatt HM, Sevier CS, Kaiser CA, Fass D 2008. Yeast Mpd1 reveals the structural diversity of the protein disulfide isomerase family. *J Mol Biol* 384(3): 631-40.
- Ward PP *et al.* 2003. Iron status in mice carrying a targeted disruption of lactoferrin. *Mol Cell Biol* 23: 178–185.
- Winram SB & Lottenberg R 1996. The plasmin-binding protein Plr of group A streptococci is identified as glyceraldehyde-3-phosphat dehydrogenase. *Microbiology* 142: 2311–2320.
- Winters MS, Spellman DS, Chan Q, Gomez FJ, Hernandez MB, Catron B, Smulian A, Neubert TA, Deepe GS 2008. *Histoplasma capsulatum* proteome response to decreased iron Availability. *Proteome Science* 6: 36.

9. ANEXOS

MANUSCRITO: “**Influence of iron in the composition of surface proteins not covalently linked of *Paracoccidioides brasiliensis***”.

Title: Influence of iron in the composition of surface proteins not covalently linked of *Paracoccidioides brasiliensis*.

Authors: Hellen Kempfer Philippsen, Tereza Cristina Vieira de Rezende, Simone Schnneider Weber, Ana Flávia Parente, Célia Maria de Almeida Soares.

Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil; Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil

Abstract

Paracoccidioides brasiliensis is a thermo dimorphic fungus, the causative agent of paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic mycosis that affects mainly people from Latin America. In order to establish infection, many factors are required for *P. brasiliensis*, such as cell wall remodeling and the ability to capture nutrients from the host. As iron is an important cofactor of many reactions, the host reduces the availability of free iron ions to the pathogen. Therefore, this study aims to elucidate the proteomic profile of proteins not covalently linked in cell wall of *P. brasiliensis* in response to iron depletion. The extraction of proteins not covalently linked of the cell wall in iron restriction and iron replete conditions was performed and the proteomic profile was obtained by two-dimensional electrophoresis with subsequent analysis of images. Statistical analysis demonstrated seventy-six proteins with differential level of expression in each condition, which were subjected to tryptic digestion and identification by mass spectrometry. It was identified 26 proteins not covalently linked in cell wall by peptide mass fingerprint (PMF) and/or ions fragmentation (MS/MS). The majority of these proteins have predicted sites of post – translational modifications and only some have in their sequences signal peptide, suggesting that they are addressed to the surface by non-classical pathways.

Key words: cell wall, iron, protein.

Introduction

Paracoccidioides brasiliensis is a thermo dimorphic fungus, causative agent of paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic mycosis that affects mainly people from Latin America. The infection is caused through the inhalation of airborne propagules from the mycelium phase of the fungus (3). When these seedlings reach the lungs of the host, the fungus differs from yeast form, which can be conducted to other sites through the bloodstream, may establish the infection in host tissues (8).

The cell wall is initial contact point between the host cell and fungus cell. In cell wall of *P. brasiliensis*, the yeast form differs from mycelial form due: yeast form presents a larger amount of chitin (37-48%) of the mycelium (7-18%). The mycelial form, in turn, has a higher amount of proteins in cell wall (24-41%) than yeast (7-14%). Lipids (5-10%) and glucans (36-47%) occurred in similar amounts in two ways, but in yeast form, the most abundant polysaccharide cell wall is the α -1, 3 glucan, while in mycelium β -1,3 glucan and galactomannan are more prevalent. The mycelial form has cell wall with a single layer with fibers of β -glucan, while the yeast has three layers, the inner surface being composed of chitin and an outer surface composed of α -glucan (23, 58). The presence of α -glucan in the yeast form appears to be related to the escape of *P. brasiliensis* the host immune system (49).

In pathogenic fungi, cell wall structure determines the shape of fungal cell in host tissues, which requires remodeling and alterations in your organization and composition (21). Any cell wall proteins (CWPs) are involved in the adhesion and/or other virulence factors in different models (4, 45, 33). These CWPs can be linked in fungi cell wall through different types of bonds. Most of them are glycosylphosphatidyl-inositol (GPI)-modified CWPs and are thus indirectly linked to the β -1,3-glucan network (44). A different group of CWPs are linked to the β -1,3-glucan through an alkali-sensitive linkage such the proteins with internal repeats (13, 27). A third class of proteins is linked to the cell wall in a non-covalent fashion and is usually released by a reducing hot SDS treatment. In *Candida albicans*, some of these proteins are reported as putative virulence factors (44). In addition, some proteins with a clear intracellular function, such as glycolytic enzymes – important in infectious process – appear to be intrinsic components of the cell wall in *C. albicans* (44).

Some CWPs are addressed to the cell surface through of classical secretion process or by non-canonical secretion pathway. In eukaryotic cells, is known that the conventional secretion process of protein requires the transport through the endoplasmic reticulum and golgiense complex. All these proteins are initially directed to the endoplasmic reticulum by a signal sequence (or signal peptide), with about 15-60 amino acids. The signal sequence is often removed from the protein, since the distribution decision has been performed. These proteins can perform various functions, which can act both on the structure of cell surface as aiding in the infective process, in the case of pathogens (26). However, several proteins without the signal sequence and functionally active, have been described in the extracellular medium (ECM). Currently has been

described the existence of several distinct types of non-canonical pathway of proteins secretion (41, 39). Non-classical protein secretion may require vesicle release to the extracellular space, where small vesicles are formed by membrane invagination within endosomes, which generates multivesicular bodies. Multivesicular bodies usually fuse with lysosomes or can also fuse with the plasma membrane, resulting in the release of internal vesicles to the extracellular milieu as exosomes (25). Studies in *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* revealed the transport of macromolecules in vesicles (including proteins) for ECM related to virulence (48).

CWPs can also presents post translationally modified as phosphorylation and glycosylation, that can help in establish of infection in fungi pathogenic. Proteins can be phosphorylated on tyrosine residues (Tyr), on serine residues (Ser) and/or threonine residues (Thr). The phosphorylation of these residues introduces electrically charged groups in a moderately polar region, changing the chemical nature protein which reduces the capacity of the protein to develop its original function. Phosphorylation becomes important due to the presence or absence of phosphate groups in protein molecules to determine their activities, stabilities, signal transduction and locations (31). In other hand, glycosylation of proteins consists in adding carbohydrates in proteins. Currently has defined two types of glycosylation (N-glycosylation and O-glycosylation) which are determined according to the amino acid which binds to sugar, where the variety of sugars linked, the link types and the degree of branching increases complexity of post translational modification (31). In general, secreted proteins are glycosylated and have important roles in the pathogenesis in fungi: assist in adhesion, protection from proteolytic degradation and protection against the immune system (57). In *P. brasiliensis*, glycosylation of proteins helps the fungus in the infective process in mice, protecting the attacker against the immune system of mammals (2). The glycosylated enolase protein appears to interfere with the increased adhesion/invasion of *P. brasiliensis* in host tissues due to the apparent ability of this protein to bind to the surface of host cells (40).

For the establishment of infection, the pathogens need obtain nutrients which are essential for growth while adhere to host cells. The ability to capture the iron is usually an important factor for success in the infective process (12). Only some bacteria do not use iron in their metabolism. Iron is important because your participation in electron transfer reactions in acid-base reactions and is a cofactor for a variety of proteins of the heme groups (Hemeproteins), iron-sulfur proteins and certain proteins related to cell metabolism (56). Thus, mammals have an efficient system of iron homeostasis to ensure

both the availability of the metal to a level sufficient for cell metabolism, as to unavailable iron ions to invading microorganisms as a defense against pathogens (56). For these reasons, free iron ions are practically absent in the blood and extracellular fluids. The iron ions are transported in several mammalian species coupled with other molecules as transferrin, lactoferrin and melanotransferrina (51). However pathogenic fungi have developed strategies to obtain the iron ion of carrier protein molecules and hemoglobin in mammals (7). The human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus* has a well characterized iron acquisition system. Under iron starvation conditions *A. fumigatus* employs two high affinity iron uptake systems that include siderophore-assisted and reductive iron uptake (50). The fungal genome of *P. brasiliensis* contains sequences that potentially encode all the necessary enzymes for siderophore biosynthesis orthologs of *A. fumigatus* (55).

Besides an apparent iron uptake system, proteomic analysis of cytoplasmic proteins reveals that iron availability alters the metabolic status of *P. brasiliensis*. Parente *et al.* (42) observed in this fungus an increase in glycolytic pathway protein regulation while regulatory proteins of tricarboxylic acid cycle, glyoxylate and methylcitrate cycles and electron transport chain decreased in abundance under iron limiting conditions. These data suggest a remodeling of *P. brasiliensis* metabolism by prioritizing iron independent pathway. However, little is known about the changes in expression of cell wall proteins in the absence of iron ion in *P. brasiliensis*. Such fungal cell wall is the initial point of contact with the fungal host cells, this study aims to elucidate the influence of iron in the composition of surface proteins not covalently linked of *P. brasiliensis*. Proteomic profile was obtained by two-dimensional electrophoresis with subsequent analysis of images of proteins linked to the cell wall by non-covalent bonds in low iron levels compared with replete iron levels. Statistical analysis demonstrated 76 proteins with differential level of expression, which were subjected to tryptic digestion and identification by mass spectrometry. Was possible the identification of 26 proteins by peptide mass fingerprint (PMF) and/or ions fragmentation (MS/MS). The majority of these identified proteins have predicts sites of post – translational modifications and only some have in their sequences signal peptide, suggesting that they are addressed to the surface by non-classical pathways.

Materials and methods

***P. brasiliensis* strain maintenance** – *P. brasiliensis* Pb 01 (ATCC MYA-826) was used in all experiments. The yeast phase was maintained in vitro by sub culturing at 36 °C in

Fava Netto's semisolid medium (15) every 5 days. Fava Netto's semisolid medium components were as follows; 1 % (w/v) peptone, 0.5 % (w/v) yeast extract, 0.3 % (w/v) proteose peptone, 0.5 % (w/v) beef extract, 0.5 % (w/v) NaCl, 4 % (w/v) glucose, 1.2 % (w/v) agar, pH 7.2.

Iron depletion experiments – *P. brasiliensis* yeast cells were grown in McVeigh/Morton medium (MMcM) (46). The next experiments was performed basically as described previously (42) with some modifications. Iron depleted medium was supplemented with the iron chelator bathophenanthrolinedisulfonate (BPS; 50 mM) (Sigma-Aldrich, Germany). Protein extracts from yeast cells were prepared by inoculating 500 mL of Fava Netto's liquid medium with 102 cells/mL. Cultures were incubated at 36 °C under gentle shaking for 72 hours. Cells were centrifuged at 5000x *g* for 5 minutes and washed 5x in MMcM media (46) containing limited iron. Control cells were incubated at 36 °C in MMcM supplemented with 3.5 mM Fe(NH₄)₂(SO₄)₂, for 24 hours with shaking at 150 rpm. Cells subjected to iron starvation were incubated at 36 °C in MMcM medium containing 50 mM of BPS with no iron supplementation, for 24 hours with shaking at 150 rpm.

Preparation of protein extracts – Surface cell wall fractionation was performed basically as described previously (36, 24) with some modifications. Yeast cells were collected by centrifugation and washed five times with lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) containing a mixture of nuclease and protease inhibitors (serine, cysteine and calpain) (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) added to the material. Subsequently cells were resuspended in ice-cold lysis buffer and lysed mechanically with an equal volume of glass beads in a cell homogenizer (Braun, MSK). This procedure was carried out until complete cell breakage. Lysed cells were separated by centrifugation at 3000x *g* for 10 min in a cell wall fraction (pellet) and a soluble cytoplasmic fraction (supernatant). Following this, the cell wall fraction was washed five times with ice-cold water and rinsed another five times with each of the following ice-cold solutions: 5 % NaCl, 2 % NaCl, 1 % NaCl. The supernatant samples with the last washing NaCl 1% solution were subjected to electrophoresis one dimensional, prepared as follows: first, 10 ml prepared from 9 % separating gel, this containing 7.95 ml of water, 3.45 ml of acrylamide 30% solution (29.2 % acrylamide (w / v): 0.8 % N'-etilenobisacrilamida (w / v), pH 7; being acrylamide and N'-methylenebisacrylamide from Sigma), 3 ml of 2 M Tris-HCl (Gibco BRL) pH 8.8, 390 µL 20 % of SDS (USB corporation), 12 µL of TEMED (Invitrogen), 60 µL of 10 % ammonium persulfate

(Gibco BRL). After polymerization of the separating gel was added 4 % gel concentrator, this containing 4.2 ml of bidistilled water, 600 μ L of 30 % acrylamide solution (29.2 % acrylamide (w / v): 0.8 % of N'-methylenebisacrylamide (w / v), pH 7), 510 μ L of 2 M Tris-HCl, pH 8.8, 120 μ L of 20 % SDS, 9 μ L of TEMED, 60 μ L of 10 % ammonium persulfate. Initially the running electrophoretic occurred to 40V and after the samples entered the separating gel was running at 50 V. The proteins of one dimensional electrophoresis were stained using silver (PlusOneTM Silver Staining Kit, GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions. Isolated cell walls were extracted by boiling with SDS extraction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 M EDTA, 2% SDS, 10 mM DTT) for 10 min each time. This treatment was carried out once again, discarding the last extract.

2D-gel electrophoresis – Three analytical replicates were produced for each condition of non-covalent cell wall samples. The protein extract was concentrated by GE VivaspinnTM system (GE Healthcare) and measured (6). A total of 150 μ g of purified protein was precipitated using the commercial system SDS-OutTM (Thermo) for removal of SDS sample, used according to the manufacturer's instructions. For each sample 150 μ g of total protein were loaded onto the gel. The 2-D Clean-up Kit (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) was used according to the manufacturer's instructions. Proteins samples were treated with 250 μ L of buffer containing 7 M urea, 2 M thiourea, 130 mM 3- [(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), 0.002% (w/v) dithiothreitol (DTT), ampholyte-containing buffer (IPG buffer, GE Healthcare), and trace amounts of bromophenol blue (53). Samples were loaded onto a 13 cm ImmobilineTM DryStrip gel (GE Healthcare) with a linear separation range of pH 3–11. Isoelectric focusing was conducted on a using the Ettan IPGphor III Isoelectric Focusing System (GE Healthcare) at 20 °C using the following program: 30 V (active rehydration) for 13 h, 500 V for 1 h, 1000 V for 1 h, 2000 V for 1 h, 2000–5000 V for 3 h, and 8000 V for 11 h (44). Following isoelectric focusing strips were transferred to an equilibration buffer [50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M urea, 30% (v/v) glycerol, 2% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS), and 0.002% (w/v) bromophenol blue] containing 18 mM of DTT for 40 minutes as previously described (22). The strips were next transferred to a fresh equilibration buffer containing 135 mM iodoacetamide. Strips were incubated for another 40 minutes. Each IPG strip was placed on top of a polyacrylamide SDS-PAGE gel (28) and covered with agarose [0.5% (w/v) agarose in running buffer, 25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, 0.1% (w/v) SDS]. SDS-PAGE gels were run at 10 °C for 1 hour at 150 V

and increased to 250 V for 3 hours. Proteins were stained using silver (PlusOne™ Silver Staining Kit, GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions, but without glutaraldehyde.

Image analysis – Images of from three biological replications of each condition silverstained 2-D gels were captured using Imagescan (GE Healthcare) in transparent mode and the Labscan software (GE Healthcare) version 3.0. All images were imported in TIFF format (Tag Image File Format) and converted to the format of the Image Master Platinum 6.0. The spot detection was performed automatically with subsequent manual corrections to remove false positives, as described previously (47).

Statistical analysis – A one-way ANOVA post test were applied to compare the differences among the analyzed groups. All statistical calculations were performed using the software STATISTICA version 7.0 (Statsoft Inc., 2005). The results were considered significant at $p < 0.05$.

In-gel protein digestion and mass spectrometry analysis – Spots of interest were manually excised from the 2D-gel and diced into small pieces. Spots were next incubated with 250 μ L of a solution containing 15 mM potassium ferricyanide and 50 mM sodium thiosulfate for 5 minutes and washed twice with water to remove the reducing agents (54). The in-gel digestion and mass spectrometry analysis was performed as described previously (42).

In silico analysis – The amino acid sequences in FASTA format of the identified proteins were analyzed in the following programs: SignalP 3.0, available at <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> for verification of possible signal sequence (signal peptide); NetPhos 2.0, available at <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/> to investigate possible phosphorylation predicted sites; NetNGlyc 1.0, available at [http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc /](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/), to check possible N-glycosylation predicted sites; NetOglyc 3.1, available at <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/> for verification of possible O-glycosylation predicted sites.

Results

Enrichment of proteins not covalently linked of cell wall of the P. brasiliensis using extraction with DTT and hot SDS – After incubation of *P. brasiliensis* in iron replete and iron restriction in medium MMcM for 24 hours, cell walls of *P. brasiliensis* yeast form were obtained by mechanical disruption. Next, to remove any extracellular or cytosolic protein contaminants that might be adhered to the cell walls through electrostatic forces, cell walls were extensively washed with solutions of concentrations

of NaCl (5%, 2% and 1%). To verify the absence these contaminants, the supernatant samples with the last washing NaCl 1% solution were subjected to one dimensional electrophoretic gel (data not shown).

The extraction of proteins not covalently linked of cell wall of the *P. brasiliensis* in iron restriction and iron replete conditions was performed with treated in DTT and hot SDS, extracting cell surface-associated proteins of each condition. Then, the proteomic profile was obtained by two-dimensional electrophoresis with subsequent analysis of images.

Visualization, analysis and identification of protein spots on *P. brasiliensis* cell wall during iron restriction – We analyzed the overall protein profiles of the different CWPs conditions using two-dimensional PAGE. To this end, experiments were performed in triplicate with samples of each condition: 24 hours in iron replete (control) and 24 hours in iron restriction. To preview identical and reproducible protein spot patterns, a gel of each CWP condition was used as a reference 2-DE map (*master gel*; figure 1). Using the gel image software a total of 375 visible protein spots were developed on silver-stained 2-DE gels with a pH 3–11 non-linear gradient in control and in iron restriction. Statistical analysis revealed a total of 76 differentially regulated surface proteins. About 76 differentially regulated proteins, 37 proteins not covalently linked of cell wall of the *P. brasiliensis* were repressed and 39 induced in iron restriction (figure 1).

Identification iron-regulated proteins – In order to determine the identities of the protein spots determined to be differentially regulated following 2D-gel analysis, protein spots were subjected to in-gel digestion using trypsin and analyzed by MS. MS analysis following by protein bdatabase sequence matching resulted in the identification of 26 differentially expressed proteins (tables 1 and 2). 14 proteins/isoforms were identified by peptide mass fingerprinting (PMF) and confirmed by MS/MS analysis while 5 proteins were identified by PMF only and 7 by MS/MS only. Among the 26 identified proteins, 8 decreased (Table1) and 18 increased (Table 2) in abundance under iron restriction. GenBank general information identifiers (gi), PMF and MS/MS mascot scores, protein molecular weights and isoelectric points (pI) of each spot are also listed in Tables 1 and 2.

Prediction of post-translational modifications – Was verified that the proteins regulated identified under iron restriction have predicted sites of post -translational modification (phosphorylation, N-glycosylation and O-glycosylation) and signal peptide. This prediction was performed using the amino acid sequence of proteins in FASTA

format with the aid of tools of bioinformatics. Our analysis showed that: between repressed proteins identified, 12.5% have signal peptide, 50% have predicted sites of O-glycosylation and 75% are predicted sites of N-glycosylation ; among the proteins induced under iron restriction, 11.1% have signal peptide , 33.3% have predicted sites of O-glycosylation, 66.6% have predicted sites of N-glycosylation. 100% of the identified proteins have predicted phosphorylation sites. The proteins regulated in this study that had any of these post translational modifications mentioned are organized in Table 3 (repressed proteins under iron restriction) and Table 4 (induced protein under iron restriction). Graphs in columns show the percentage of proteins regulated under iron restriction having post-translational modification (figure 2, A and B).

Images – figure 1

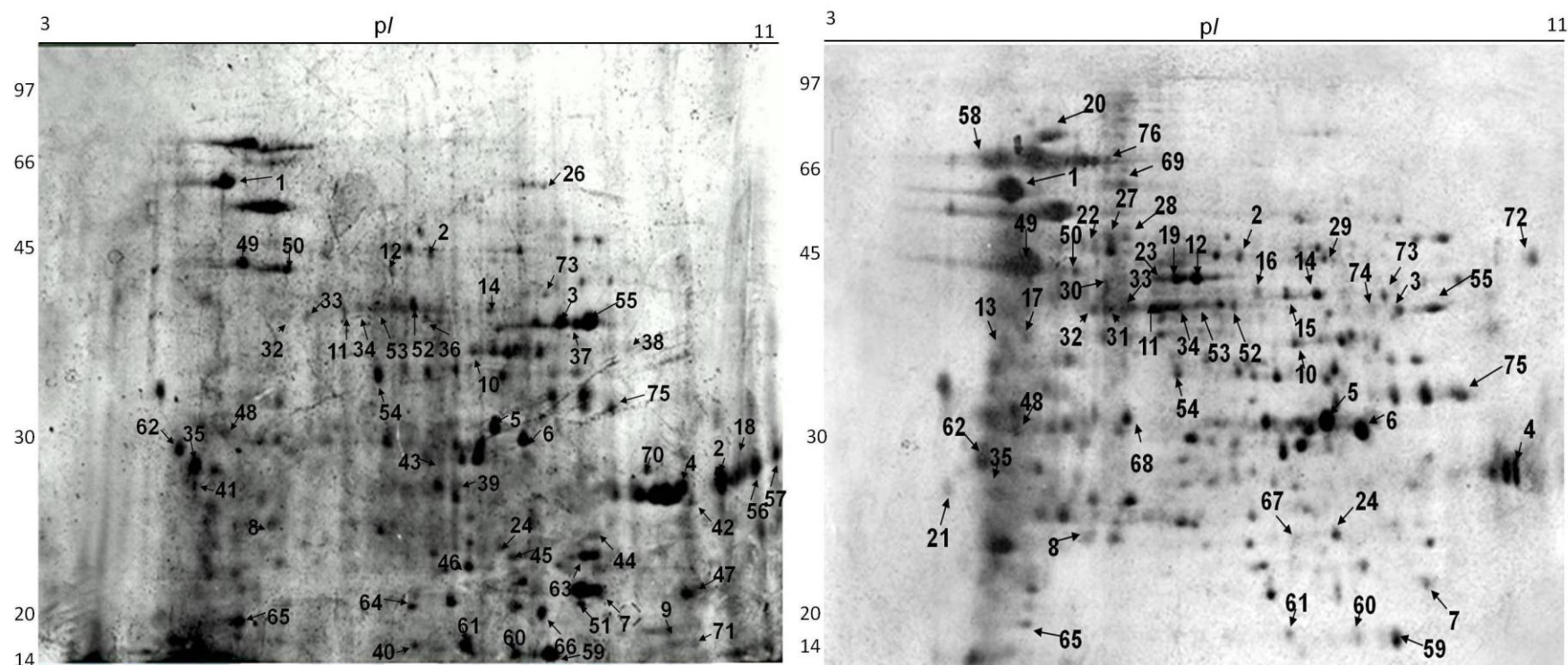


Figure 1. *P. brasiliensis* protein regulation during iron limiting conditions detected using 2D-gel analysis. Gel A represent iron rich conditions and gel B iron restriction condition both in 24 h. Yest proteins (150 µg) extracts were separated on IPG strips covering a pH range of 3–11, followed by 12% (w/v) SDS–PAGE and visualized by silver staining. 2-D gel images from three biological replications of each condition were compared to identify differential expression levels of proteins using Image master 2D Platinum software. The pH gradient is shown above the gel and the molecular mass protein standards (kDa) are indicated on the left of the gel.

Table1 – *P. brasiliensis* identified proteins with reduced expression during iron starvation.

Spot number ¹	GenBank gi ²	Protein identification	Mascot score ³	Coverage ⁴ %	Matched Peptides ⁵	MW ⁶	PI ⁷	ANOVA (p value) ⁸
2	gi 295665123	aldehyde dehydrogenase	95	47	6	54555/48000	5.87/7.01	0.012
3	gi 295658923	cytochrome b-c1 complex subunit 2	83	28	-	49014/40000	9.10/9.16	0.034
4	gi 295665702	electron transfer flavoprotein subunit beta	-	-	1	21678/27000	9.34/10.69	0.032
7	gi 295666219	ATP synthase D chain, mitochondrial	108	72	5	19653/18000	7.88/9.42	0.021
9	gi 295673804	NADH dehydrogenase iron-sulfur protein	121	63	-	32827/27000	7.79/7.28	*
18	gi 295657771	ADP, ATP carrier protein	81	67	-	33533/28355	9.81/11.33	*
25	gi 295671879	NADH-ubiquinone oxidoreductase 21 kDa subunit	-	-	1	426394/4500	5.17/5.80	*
26	gi 295665542	Osmotic growth protein	150	38	7	68041/62000	6.90/9.00	*

*Spots visualized only in iron-replete condition;

1 Spots numbers refers to Figure 1;

2 GenBank general information identifier;

3 Mascot score: score obtained from the Mascot search for each match.

4 Coverage: percent amino acid sequence coverage for the identified protein.

6 Molecular weight (theoretical/experimental);

7 Isoelectric point (theoretical/experimental);

8 ANOVA: statistically significant differences are considered with $p < 0.05$.

Table2 – *P. brasiliensis* identified proteins with increase expression during iron starvation.

Spot number ¹	GenBank gi ²	Protein identification	Mascot score ³	Coverage ⁴ %	Matched Peptides ⁵	MW ⁶	PI ⁷	ANOVA (p value) ⁸
1	gi 29567316	Disulfide isomerase Pdi1	234	65	7	59305/62000	4.80/4.88	0.025
5	gi 29565821	Malate dehydrogenase	74	44	3	34671/32000	6.36/8.36	0.043
6	gi 29567393	Malate dehydrogenase	103	53	3	36022/31000	8.99/8.72	0.021
8	gi 29566287	Mitochondrial co-chaperone GrpE	-	-	1	28512/24500	8.89/5.81	0.034
10	gi 295658119	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	152	86	6	36619/35883	8.26/7.86	0.031
11	gi 29566887	Actin	-	-	2	41825/44333	5.63/5.8	0.021
12	gi 14676253	Enolase	83	51	6	43859/48000	8.93/6.54	0.015
13	gi 30351156	14-3-3-like protein	119	64	-	33677/40333	4.90/4.33	*
14	gi 29566969	Phosphoglycerate kinase	114	64	2	45311/45333	6.48/8.12	*
15	gi 29566969	Phosphoglycerate kinase	94	54	-	45311/46000	6.48/7.84	*
16	gi 295658595	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	98	67	3	45316/46333	8.62/7.77	*
17	gi 29565882	ATP synthase subunit beta	80	41	3	55181/42000	5.28/4.84	*
19	gi 29567466	Succinyl-CoA ligase subunit alpha	119	46	-	34935/48000	8.54/6.55	*
20	gi 2956773716	Hsp70-like protein	99	44	5	68856/78000	5.39/5.11	*

21	gi 295665077	Hsp90 binding co-chaperone (Sba1)	-	-	2	21300/31333	4.23/4.02	*
22	gi 295673931	Pyruvate dehydrogenase protein X component	-	-	3	52714/53333	6.45/5.66	*
23	gi 295669794	Elongation factor Tu	-	-	3	48712/48500	6.11/6.25	*
24	gi 295666381	GTP-binding nuclear protein GSP1/Ran	67	51	3	24082/27600	6.90/8.28	0.016

*Spots visualized only in iron-depleted condition;

1Spots numbers refers to Figure 1;

2 GenBank general information identifier;

3 Mascot score: score obtained from the Mascot search for each match.

4 Coverage: percent amino acid sequence coverage for the identified protein.

6 Molecular weight (theoretical/experimental);

7 Isoelectric point (theoretical/experimental);

8 ANOVA: statistically significant differences are considered with $p < 0.05$.

Table 3 - *P. brasiliensis* identified proteins with reduced expression during iron starvation with predict sites of post-translational modifications.

Spot number ¹	Protein identification	Signal peptide ²	O-glycosylation ³	N-glycosylation ⁴	Phosphorylation ⁵		
					Serine sites	Threonine sites	Tyrosine sites
02	aldehyde dehydrogenase	No	Yes	Yes	6	7	6
03	cytochrome b-c1 complex subunit 2	No	Yes	Yes	23	6	7
04	electron transfer flavoprotein subunit beta	No	No	Yes	4	5	1
07	ATP synthase D chain, mitochondrial	No	No	No	4	2	1
09	NADH dehydrogenase iron-sulfur protein	No	Yes	Yes	8	5	7
18	ADP, ATP carrier protein	No	No	No	6	5	4
25	NADH-ubiquinone oxidoreductase 21 kDa subunit	No	Yes	Yes	7	1	4
26	Osmotic growth protein	Yes	No	Yes	13	10	5

1 Spots numbers refers to Figure 1;

2 This prediction was performed using the amino acid sequence of proteins in FASTA format with the aid of tools of bioinformatics (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>);

3 This prediction was performed using the amino acid sequence of proteins in FASTA format with the aid of tools of bioinformatics (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>);

4 This prediction was performed using the amino acid sequence of proteins in FASTA format with the aid of tools of bioinformatics (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>);

5 This prediction was performed using the amino acid sequence of proteins in FASTA format with the aid of tools of bioinformatics (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>).

Table 4 - <i>P. brasiliensis</i> identified proteins with increase expression during iron starvation with predict sites of post-translational modifications.							
Spot number ¹	Protein identification	Signal peptide ²	O-glycosylation ³	N-glycosylation ⁴	Phosphorylation ⁵		
					Serine sites	Threonine sites	Tyrosine sites
01	Disulfide isomerase Pdi1	Yes	Yes	Yes	14	10	5
05	Malate dehydrogenase	No	No	Yes	9	4	2
06	Malate dehydrogenase	No	No	Yes	8	7	2
08	Mitochondrial co-chaperone GrpE	No	Yes	No	14	3	1
10	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	No	No	Yes	11	5	3
11	Actin	No	No	Yes	11	4	6
12	Enolase	No	No	Yes	12	4	6
13	14-3-3-like protein	No	Yes	Yes	11	6	6
14	Phosphoglycerate kinase	No	No	Yes	14	5	4

15	Phosphoglycerate kinase	No	No	Yes	14	5	4
16	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	No	Yes	No	12	4	6
17	ATP synthase subunit beta	No	No	Yes	10	6	2
19	Succinyl-CoA ligase subunit alpha	No	No	No	11	1	1
20	Hsp70-like protein	Yes	No	No	13	8	4
21	Hsp90 binding co-chaperone (Sba1)	No	No	No	8	4	4
22	Pyruvate dehydrogenase protein X component	No	Yes	Yes	19	6	4
23	Elongation facto Tu	No	No	Yes	9	10	1
24	GTP-binding nuclear protein GSP1/Ran	No	Yes	No	4	3	5

1 Spots numbers refers to Figure 1;

2 This prediction was performed using the amino acid sequence of proteins in FASTA format with the aid of tools of bioinformatics (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>);

3 This prediction was performed using the amino acid sequence of proteins in FASTA format with the aid of tools of bioinformatics (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>);

4 This prediction was performed using the amino acid sequence of proteins in FASTA format with the aid of tools of bioinformatics (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>);

5 This prediction was performed using the amino acid sequence of proteins in FASTA format with the aid of tools of bioinformatics (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>).

Figure 2

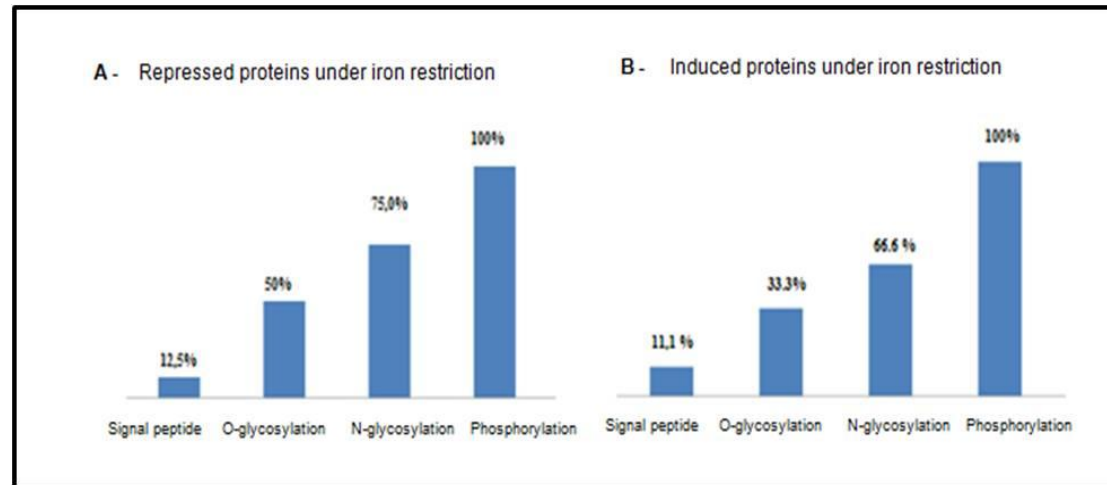


Figure 3. Graph columns showing the percentage of identified proteins with post-translational modifications under iron restriction. Repressed proteins identified (A); induced proteins identified (B).

Discussion

Under iron restriction, several proteins were regulated in cell surface of *P. brasiliensis*. Several of these proteins had predicted post-translational modifications and are present in other organisms as putative virulence factors, as is discussed below.

HSPs are putative virulence factors in pathogenic fungi and are regulated on the surface of *P. brasiliensis* under iron restriction – Pathogenic microorganisms commonly found in their respective hosts different stressors agents that may impair pathogen growth by mainly affect the correct conformation of proteins and their functions. Therefore, protein molecules called heat shock response (HSPs) are responsible for the protection to cellular proteins, when the cells are exposed to, metabolic challenges (including amino acid analogues and sulfhydryl agents modifying group), oxidative stress and elevated temperatures. The HSPs are not part of the final structure of cellular proteins, but assist in the final assembly, synthesis and degradation of these (34).

Besides acting in the presence of stress agents mentioned above, it is observed that HSPs are required by the cellular machinery in the deprivation of metal. In present study, the HSP70-like protein and Hsp90 binding co-chaperone (Sba1) showed induced expression in the surface of *P. brasiliensis* yeast when grown in iron deficiency. By proteomic analysis, Parente *et al.* (42) showed that occurs induction of expression of HSP70-like protein, heat shock protein 90, heat shock protein SSC1 (70 kDa), HSP90 Co-chaperone-AHA1 in the cytoplasm of *P. brasiliensis* under iron limitation. In cytoplasm cellular of *H. capsulatum*, proteomic analysis under iron deprivation showed induced expression of HSP70 protein (62).

Chaperones are also found on the surface of different types of fungi, aiding in the infective process. In *H. capsulatum*, HSP60 is expressed on the cell surface during the internalization process of fungus in same tissues of murine (20). In *C. albicans*, HSP90 and HSP70 family members proteins are presents in cell wall linked by non-covalent bonds and HSP70 appear to be related to the process of infection the fungus (14, 44). In *P. brasiliensis*, HSP70 and HSP90 proteins family members are expressed more than the pathogenic form of saprophytic fungi, which suggests that HSPs are necessary for the survival of this microorganism for the establishment of infection (10, 37). In addition, in serum from patients with cryptococcosis, HSP60, HSP70 and HSP90 were found located on the surface in vesicles, which may be related to a mechanism of secretion of molecules which assist the pathogenicity of *C. neoformans* (48). In this study, amino acid

sequence of the HSP70-like protein in FASTA format, with the aid of tools of bioinformatics, revealed signal peptide in its sequence, which can justify its location on the surface of *P. brasiliensis* and, Hsp90 binding co-chaperone (Sba1), showed glycosylation predict sites, but without signal peptide. This later protein should be addressed to the surface by non-classical secretion.

Adhesins enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase are regulated on the surface of *P. brasiliensis* in iron deficiency – Addition of HSPs, in present study has been show that proteins GAPDH and enolase were induced under iron limited on the surface *P. brasiliensis*. These proteins showed also induced expression in the cytoplasm cellular of *P. brasiliensis* under iron deficiency (42) and are characterized in cell wall in this pathogen with adhesin function due present capacity protein receptor binding on the surface of the host cell. GAPDH binds to laminin, fibronectin and collagen type I (4) and enolase to fibronectin (11) and plasminogen (40). These adhesins also appear to be related to the process of internalization of *P. brasiliensis* in host tissues potentiating the fungal infection (4, 40).

GAPDH and enolase are also well characterized in different models. In bacteria *Streptococcus pyogenes* (pharyngitis causing agent in mammals), GAPDH protein was identified as component of the cell wall where it is not only enzymatically active, but also serves as a binding protein to fibronectin, lysozyme, actin and myosin on host tissues (43, 61). Furthermore, in *C. albicans* GAPDH is located on the cell wall, which is enzymatically active and present role of adhesin for laminin and considered important antigens of this fungus (19, 59). In *C. albicans*, enolase protein is also present in the cell wall, anchored to the cell wall by non-covalent bonds, and plays the role of protecting the fungus in the infective process (35, 44). In bacterial pathogen causing pneumonia in humans, *Chlamydia pneumoniae*, the enzyme enolase has been identified as potential targets of vaccine (16). These data demonstrate that the enolase and GAPDH are required in the infective process in some microorganisms, and the present study summed with the Parente *et al.* (42) suggest a likely correlation between limitation of iron and pathogenesis these proteins in *P. brasiliensis*.

The enzyme phosphoglycerate kinase is induced on the surface of *P. brasiliensis* under iron restriction - Found with induced expression on the surface *P. brasiliensis* for iron deficiency, phosphoglycerate kinase protein is also found on the surface of other microorganisms. In *C. albicans* this protein is anchored to the cell wall by non-covalent bonds (44). In *Schistosoma mansoni*, phosphoglycerate kinase is a protein found on the

surface potential candidate for the development of a vaccine against the parasite (29). The phosphoglycerate kinase streptococcal group B is present on the bacterial surface and binds to plasminogen and actin, maybe alter the cytoskeleton epithelial cells of the host (5).

In iron restriction, Parente *et al.* (42) identified the enzyme phosphoglycerate kinase with induced expression in the cytoplasm of *P. brasiliensis* together with other proteins belonging to the glycolytic pathway, suggesting that this pathway is used by *P. brasiliensis* for energy generation, because several proteins the TCA cycle and glyoxylate cycle (that are dependent on the iron ion in its conformation) showed repressed expression in this condition. In present study phosphoglycerate kinase was found in surface of *P. brasiliensis* in iron restriction. This protein presents predict sites of glycosylation and phosphorylation, but no presents signal peptide, should be addressed to surface by non classical pathways. The presence of this enzyme regulated on the cell surface of *P. brasiliensis* in iron restriction suggests it is virulence factor in this condition, but still needs to be better understood.

The disulfide isomerase protein of *P. brasiliensis* is addressed on the surface possibly due the presence of signal peptide in its sequence of amino acids – Protein disulfide isomerase has a function to promote disulfide bond formation in the addressed to the endoplasmic reticulum protein, leading to the rearrangement of disulfide bonds in a single protein (Vitu *et al.* 2008). It is found on the surface of spores of *A. fumigatus* (1) and cell wall *C. albicans* anchored by non-covalent bonds (44). Are described as protein folding of antigens and allergens of *Aspergillus niger* and *A. fumigatus* (30, 38). In *P. brasiliensis* this protein was induced on the surface under iron limited, possibly sent to the cell wall due to the presence of signal peptide in its structure.

The antigen malate dehydrogenase of *P. brasiliensis* showed induced expression of two isoforms on the fungus surface in iron deficiency – The protein malate dehydrogenase is well described as an important antigen of *P. brasiliensis*. This was detected by reaction with serum from patients with PCM and was more expressed in yeast form of the fungus than in the mycelium (17). In this study, this protein was identified in two isoforms with different pI. The experimental isoform Spot 5 showed pI 8:36 while the Spot 6 showed pI 8.72, possibly due to phosphorylation predicted sites that the protein presents. The presence of predicted sites for phosphorylation may regulate the activity, stability and localization of the protein (31). Addition to being phosphorylated, both isoforms of malate dehydrogenase of *P. brasiliensis* identified,

presents in their sequences glycosylation predicted sites. These changes post-translational may affect the adhesion process and are important in the formation of secretory proteins (31). These isoforms do not present signal peptide, suggesting that they should be addressed to the surface by non-classical pathways, such as in *C. neoformans*, where malate dehydrogenase was found in vesicles on the surface, being related to virulence factors of the microorganism (48). The presence of this protein on the cell surface of *P. brasiliensis* in iron deficiency, in addition to previous studies, suggest that this protein acts as a putative virulence factor in this fungus.

14-3-3-like protein and actin: proteins induced in response to iron restriction *P. brasiliensis* - Fungal cells maintain transmembrane sensors that detect changes in the environment and start signals which are transmitted from the cell surface to the nucleus. For example, the model *Saccharomyces cerevisiae* yeast uses five cascades of mitogen-activated protein kinase (MAPK), which in turn regulate cellular activities (such as induction or repression of gene transcription), to respond properly to changes in the environment (9). 14-3-3 proteins bind to various signaling proteins, such as kinase and transmembrane receptors. These proteins are part of a large family that is involved in regulation of various processes, including the organization of actin in the cell wall signaled by MAPK pathways (18). In *S. cerevisiae*, genes orthologous to 14-3-3 (Bmh1 and Bmh2) are involved in signal transduction, cell growth and morphogenesis (37). In *P. brasiliensis*, under restriction iron, actin and protein 14-3-3-like are induced on the cell surface (this study) and in the cytoplasm (42), suggesting that the metal limitation active signaling pathways inducing 14-3-3-like protein regulate the organization of actin in the surface to maintain cell wall integrity in the limitation of iron.

Cytoplasmic proteins of the electron transport chain and involved in fatty acid oxidation were suppressed on the surface of *P. brasiliensis* in iron deficiency – In eukaryotes, redox reactions are performed by mitochondrial protein complexes and all of these proteins are involved in transport chain (32). The mitochondrial protein ATP synthase D, responsible for transferring electrons in the electron transport chain, showed on surface repressed expression in the limitation of iron in *P. brasiliensis*, as well as protein cytochrome b-c 1. The latter protein having been identified by Parente *et al.* (42) with expression repressed in the cytoplasm in limiting the iron. In addition, the aldehyde dehydrogenase protein that is involved in fatty acid oxidation was also identified with expression repressed under restriction iron in the cytoplasm (42) and on the surface (this study).

Proteomic analysis for *C. neoformans* revealed a complex composition of 76 proteins that pass the cell wall, which include molecules associated with virulence and response to oxidative stress, such as chaperones, membrane proteins, cytoplasmic proteins and some proteins typically nuclear and mitochondrial (48). In the present study, with exception cytoplasm proteins repressed observed in *P. brasiliensis* no have signal sequence (with exception of osmotic growth protein), suggesting that they are addressed to the surface in iron replete condition by non-classical pathway. However, they function e location on cell wall needs to be further elucidated.

References

1. Abdul, R.A.; Oellerich, M.; Armstrong, V.W.; Riemenschneider, B.; Reichard, U. (2006). Proteome of conidial surface associated proteins of *Aspergillus fumigatus* reflecting potential vaccine candidates and allergens. *Proteome research*. 5, 954-962.
2. Almeida, F.B.D.R.; Carvalho, F.C.; Mariano, V.S.; Alegre, A.C.P.; Silva, R.N.; Hanna, E.S.; Roque-Barreira, M.C. (2011). Influence of n-glycosylation on the morphogenesis and growth of *Paracoccidioides brasiliensis* and on the biological activities of yeast proteins. *Plos One*. 6, (12) 129-216.
3. Bagagli, E.; Bosco, S.M.G.; Theodoro, R.C.; Franco, M. (2006). Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. *Infect Genet Evol*. 6, 344-51.
4. Barbosa, M.S.; Bão, S.N.; Andreotti, P.F.; Faria, F.P.; Felipe, M.S.S.; Feitosa, L.S.; Mendes-Giannini, M.J.S.; Soares, C.M.A. (2006). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. *Infect Immun*. 74, 382-389.
5. Boone, T.J.; Burnham, C.A.; Tyrrell, G.J. (2011). Binding of group B streptococcal phosphoglycerate kinase to plasminogen and actin. *Microb Pathog*. 51, 255-61.
6. Bradford, M.M. (1976). A dye binding assay for protein. *Anal Biochem*. 72, 248-254.
7. Bullen, J.J.; Rogers, H.J.; Spalding, P.B.; Ward, C.G. (2005). Iron and infection: the heart of the matter. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 43, 325 - 330.
8. Camargo, Z.P. and M.F. Franco (2000). Current Knowledge on Pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev. Iberoam Micol*. 17, 41-48.
9. Chen, R.E. & Thorner, J. (2007). Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*. 1773, 1311-1340.
10. da Silva, S.P.; Borges-Walmsley, M.I.; Pereira, I.S.; Soares, C.M.A.; Walmsley, A.R.; Felipe, M.S.S. (1999). The differential expression and splicing of hsp70 gene during transition from mycelial to the infective yeast form of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mol Microbiol*. 31, 1039-1050.
11. Donofrio, F.C.; Calil, A.C.; Miranda, E.T.; Almeida, A.M.; Benard, G.; Soares, C.P.; Nogueira, S.V.; Soares, C.M.A.; Mendes-Giannini, A. (2009). Enolase from

Paracoccidioides brasiliensis: isolation and identification as a fibronectin-binding protein. *J. Med. Microbiol.* 58, 706-713.

12. Dunn, L.L.; Rahmanto, T.S.; Rischardson, D.R. (2006). Iron uptake and metabolism in the new millennium. *TRENDS Cell Biology.* 17 (2), 93-100.

13. Ecker, M.; Deutzmann, R.; Lehle L.; Mrsa, V.; Tanner, W. (2006). Pir proteins of *Saccharomyces cerevisiae* are attached to β -1,3-glucan by a new protein-carbohydrate linkage. *J Biol Chem.* 281, 11523-11529.

14. Eroles, P.; Sentandreu, M.; Elorza, M.V.; Sentandreu, R. (1995). Cloning of a DNA fragment encoding part of a 70-kDa heat shock protein of *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett.* 128 (1), 95-100.

15. Fava Netto, C.; Vegas, V.S.; Sciannamea, J.J.; Guarnieri, D.B. (1969). Antígeno polissacarídico do *Paracoccidioides brasiliensis*. Estudo do tempo de cultura do *P. brasiliensis* necessário ao preparo do antígeno. *Rev Inst Med Trop.* 11, 177-181.

16. Finco, O.; Bonci, A.; Agnusdei, M.; Scarselli, M.; Petracca, R.; Norais, N.; Ferrari, G.; Garaguso, I.; Donati, M.; Sambri, V.; Cevenini, R.; Ratti, G.; Grandi, G. (2005). Identification of new potential vaccine candidates against *Chlamydia pneumoniae* by multiple screenings. *Vaccine.* 23, 1178-1188.

17. Fonseca, C.A.; Jesuino, R.S.; Felipe, M.S.; Cunha, D.A.; Brito, W.A.; Soares, C.M.A. (2001). Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect.* 3 (7), 535-42.

18. Fu, H.; Subramanian, R.R.; Masters, S.C. (2000). 14-3-3 proteins: structure, function and regulation. *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40, 617-47.

19. Gil-Navarro, I.; Gil, M.L.; Casanova, M.; O'Connor, J.E.; Martínez, J.P.; Gozalbo, D. (1997). The glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is a surface antigen. *J. Bacteriol.* 179, 4992-4999.

20. Gomez, B.L.; Figueroa, J.I.; Hamilton, A.J.; Ortiz, B.L.; Robledo, M.A.; et al. (1997). Development of a novel antigen detection test for histoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2618-2622.

21. Gonzalez, A.; Lenzi, H.L.; Motta, E.M.; Caputo, L.; Sahaza, J.H.; Cock, A.M.; Rui, A.C.; Restrepo, A.; Cano, L.E. (2005). Expression of adhesion molecules in lungs of mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Microb Infect.* 7, 666-73.

22. Herbert, B.; Galvani, M.; Hamdan, M.; Olivieri, E.; MacCarthy, J.; et al. (2001). Reduction and alkylation of proteins in preparation of two-dimensional map analysis: why, when, and how? *Electrophoresis.* 22, 2046-2057.

23. Kanetsuna, F.; Carbonell, L.M.; Moreno, R.E.; Rodriguez, E.J. (1969). Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol.* 97 (3), 1036-41.
24. Kapteyn, J.C.; Montijn, R.C.; Vink, E.; de la Cruz, J.; Llobell, A.; Douwes, J.E.; Shimoi, H.; Lipke, P.N.; Klis, F.M. (1996). Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a phosphodiesterlinked-1,3--1,6-glucan heteropolymer. *Glycobiology.* 6, 337-345.
25. Keller, S.; Sanderson, M.P.; Stoeck, A.; Altevogt, P. (2006). Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunol Lett*;107:102-8.
26. Kirk, S.J. & Ward, T.H. (2007). COPII under microscope. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 18, 435-447.
27. Klis, F.M.; Boorsma, A.; De Groot, P.W. (2006). Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 23, 185-202.
28. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-685.
29. Lee, K.W.; Shalaby, K.A.; Thakur, A.; Medhat, A.; Karim, A.M.; LoVerde, P.T. (1995). Cloning of the gene for phosphoglycerate kinase from *Schistosoma mansoni* and characterization of its gene product. *Mol. Biochem. Parasitol.* 71, 221-23.
30. Liang, Y.; Lib, W.; Zhang, Y. (2005). Functional analysis of tunicamycin-inducible gene A polypeptide from *Aspergillus niger*. *Biochem. Cell Biol.* 83 (5), 654-8.
31. Ludwig, L.; Strahl, S.; Tanner, W. (2006). Protein glycosylation, conserved from yeast to man: a model organism helps elucidate congenital human diseases. *Angew Chem. Int.* 45, 6802-6818.
32. Marcet-Houben, M.; Gabadón, T. (2009). The tree versus the forest: the fungal tree of life and the topological diversity within the yeast phylome. *Plos One.* 4 (2), 4357.
33. Martínez-Gomariz, M.; Perumal, P; Mekala, S; Nombela, C.; Chaffin, W.L.; Gil, C. (2009). Proteomic analysis of cytoplasmic and surface proteins from yeast cells, hyphae, and biofilms of *Candida albicans*. *Proteomics.* 9, 0000-0000.
34. Meyer, T.N.; da Silva, A.L. (1999). Resposta celular ao estresse. *Med. Brasil.* 45.(2), 181-8.
35. Montagnoli, C.; Sandini, S.; Bacci, A.; Romani, L.; La Valle, R. (2004). Immunogenicity and protective effect of recombinant enolase of *Candida albicans* in a murine model of systemic candidiasis. *Med. Mycol.* 42, 319-324.

36. Mrsa, V.; Ecker, M.; Strahl-Bolsinger, S.; Nimtz, M.; Lehle, L.; Tanner, W. (1999). Deletion of new covalently linked cell wall glycoproteins alters the electrophoretic mobility of phosphorylated wall components of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 181, 3076-3086.
37. Nicola, A.M.; Andrade, R.V.; Dantas, A.S.; Andrade, P.A.; Arraes, F.B.M.; Fernandes, L.; Silva-Pereira, I.; Felipe, M.S.S. (2008). The stress responsive and morphologically regulated *hsp90* gene from *Paracoccidioides brasiliensis* is essential to cell viability. *BMC. Microbiol.* 8, 158.
38. Nigam, S.; Sarma, P.V.; Ghosh, P.C.; Sarma, P.U. (2001). Characterization of *Aspergillus fumigatus* protein disulfide isomerase family gene. *Gene.* 27, 143-150.
39. Nickel, W.; Seedorf, M. (2008). Unconventional Mechanisms of Protein Transport to the Cell Surface of Eukaryotic Cells. *Annu Rev. Cell. Dev. Biol.*
40. Nogueira, S.V.; Fonseca, F.L.; Rodrigues, M.L.; Mundodi, V.; Abi-Chacra, E.A.; Winters, M.S.; Alderete, J.F.; Soares, C.M.A. (2010). *Paracoccidioides brasiliensis* Enolase Is a Surface Protein That Binds Plasminogen and Mediates Interaction of Yeast Forms with Host Cells. *Emerging Infections.* 10, 1128.
41. Nombela, C.; Gil, C., Chaffin, W.L. (2006). Non-conventional protein secretion in yeast. *Trends Microbiol.* 14, 15–21.
42. Parente, A.F.; Bailão, A.M.; Borges, C.L.; Parente, J.A.; Magalhães, A.D.; Ricart, C.A.O.; Soares, C.M.A. (2011). Iron availability alters the metabolic status of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as detected by proteomic assays. *PLoS One.* 6 (7), 22810.
43. Pancholi, V. & Fischetti, V.A. (1992). A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity. *J. Exp. Med.* 176, 415–426.
44. Pitarch, A.; Sánchez, M.; Nombela, C.; Gil, C. (2002). Sequential Fractionation and two-dimensional gel analysis unravels the complexity of dimorphic fungus *Candida albicans* cell wall proteome. *Mol. Cell Proteomics.* 1, 967–982.
45. Prados-Rosales, R.; Luque-Garcia, J.L.; Martínez-López, R.; Gil, C.; Di Pietro, A. (2009). The *Fusarium oxysporum* cell wall proteome under adhesion-inducing conditions. *Proteomics* 9, 1-15.
46. Restrepo, A. and Jiménez, B.E. (1980). Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium. *J. Clin. Microbiol.* 12 (2), 279-81.

47. Rezende, T.C.V.; Borges, C.L.; Magalhães, A.D.; Sousa, M.V.; Ricart, C.A.O.; Bailão, A.M.; Soares, C.M.A. (2011). A quantitative view of the morphological phases of *Paracoccidioides brasiliensis* using proteomics. *Journal of Proteomics*. 16, 6 - 56.
48. Rodrigues, M.L.; Naykayasu, E.S.; Oliveira, D.L.; Nimrichter, L.; Nosanchuk, J.D.; Almeida, I.C.; Casadevall, A. (2007). Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryotic cell*. 17, 58–67.
49. San-Blas, G. (1982). The cell wall of fungal human pathogens: its possible role in host-parasite relationships. *Mycopathol*. 79 (3), 159-84.
50. Schrettl, M.; Bignell, E.; Kragi, C.; Joechl, C.; Rogers, T.; et al. (2004). Siderophore biosynthesis but not reductive iron assimilation is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. *J. Exp. Med*. 200, 1213–1219.
51. Sekyere, E.O.; Dunn, L.L.; Rahmanto, Y.S.; Richardson, D.R. (2006). Role of melanotransferrin in iron metabolism: studies using targeted gene disruption in vivo. *Blood*. 107 (7), 2599-601.
52. Seo, H.; Chang, Y.; Chung, Y.; Kim, K. (2008). Proteomic analysis of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* upon iron deficiency induced via human H-ferritin production. *J. Microbiol Biotechnol*. 18, 1368–1376.
53. Shaw, M.M.; Riederer, B.M. (2003). Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics*. 3, 1408–1417.
54. Shevchenko, A.; Wilm, M.; Vorm, O.; Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem*. 68 (5), 850–8.
55. Silva, M.G. et al. (2011). The homeostase of iron, copper and zinc in *Paracoccidioides brasiliensis*, *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, and *Cryptococcus gatti*: a comparative analysis. *Frontiers in Microbiology*. 2,49.
56. Sutak, R.; Lesuisse, E.; Tchez, J.; Richardson, D.R. (2008). Crusade of iron: iron uptake in eucaryotes and significance for virulence. *Trends Microbiol*. 16: 262 - 268.
57. Szymanski, C.M. and Wren, B.W. (2005). Protein glycosylation in bacterial mucosal pathogens. *Nature*. 3, 225 - 237.
58. Tomazzet, P.K.; Cruz, A.H.; Bonfim, S.M.; Soares, C.M.; Pereira, M. (2005). The cell wall of *Paracoccidioides brasiliensis*: insights from its transcriptome. *Genet. Mol. Res*. 30: 4(2): 309 - 25.

59. Villamon, E.; Gozalbo, D.; Martinez, J.P.; Gil, M.L. (1999). Purification of a biologically active recombinant glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Candida albicans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 179: 61 - 65.
60. Vitu, E.; Gross, E.; Greenblatt, H.M.; Sevier, C.S.; Kaiser, C.A.; Fass, D.(2008). Yeast Mpd1 reveals the structural diversity of the protein disulfide isomerase family. *J. Mol Biol.* 384(3): 631 - 40.
61. Winram, S.B.; Lottenberg, R. (1996). The plasmin-binding protein Plr of group A streptococci is identified as glyceraldehyde-3-phosphat dehydrogenase. *Microbiology* 142: 2311 - 2320.
62. Winters, M.S.; Spellman, D.S.; Chan, Q.; Gomez, F.J.; Hernandez, M.B.; Catron, B.; Smulian, A.; Neubert, T.A.; Deepe, G.S. (2008). *Histoplasma capsulatum* proteome response to decreased iron Availability. *Proteome Science* 6, 33.