



Universidade Federal de Goiás  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Biologia

**Análises *in vivo* e *in vitro* de interações intermoleculares da Beta-1,3-glicosiltransferase 1 de *Paracoccidioides brasiliensis***

Dissertação de Mestrado

Candidata: Elisa Flávia Luiz Cardoso Bailão  
Orientadora: Dra. Célia Maria de Almeida Soares

**Goiânia - GO  
Janeiro - 2010**



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

**Análises *in vivo* e *in vitro* de interações  
intermoleculares da Beta-1,3-glicosiltransferase 1 de  
*Paracoccidioides brasiliensis***

**Candidata: Elisa Flávia Luiz Cardoso Bailão**  
**Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Célia Maria de Almeida Soares**

**Goiânia – GO**  
**Janeiro - 2010**

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

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

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

**2. Identificação da Tese ou Dissertação**

|  |  |                              |  |
|--|--|------------------------------|--|
| Autor (a):                                     | Elisa Flávia Luiz Cardoso Bailão   |                              |  |
| E-mail:  | elisavlavia@gmail.com  |                              |  |
| Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? | <input checked="" type="checkbox"/> Sim  | <input type="checkbox"/> Não |  |
| Vínculo empregatício do autor                  |  |                              |  |
| Agência de fomento:                            |  | Sigla:                       |  |
| País:  | UF:  | CNPJ:                        |  |
| Título:  | Análises <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de interações intermoleculares da Beta-1,3-glicosiltransferase 1 de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> |                              |  |
| Palavras-chave:                                | Glicosiltransferase, duplo híbrido e <i>pull-down</i>  |                              |  |
| Título em outra língua:                        | <i>In vivo</i> and <i>in vitro</i> analysis of <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Beta-1,3-glucanoyltransferase 1 intermolecular interactions    |                              |  |
| Palavras-chave em outra língua:                | Glucanoyltransferase, two hybrid and pull-down   |                              |  |
| Área de concentração:                          | Biologia Celular e Molecular   |                              |  |
| Data defesa: (dd/mm/aaaa)                      | 28/01/2010   |                              |  |
| Programa de Pós-Graduação:                     | Biologia   |                              |  |
| Orientador (a):                                | Prof <sup>a</sup> . Dr <sup>a</sup> . Célia Maria de Almeida Soares  |                              |  |
| E-mail:  | celia@icb.ufg.br   |                              |  |
| Co-orientador (a):                             |  |                              |  |
| E-mail:  |  |                              |  |

**3. Informações de acesso ao documento:**

Liberção para disponibilizaçã<sup>1</sup>?       total       parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

Capítulos. Especifique: \_\_\_\_\_

Outras restrições: \_\_\_\_\_

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

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



Assinatura da autora

Data: 1º / 03 / 2010

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



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

***Análises in vivo e in vitro de interações intermoleculares da  
Beta-1,3-glicosiltransferase 1 de Paracoccidioides  
brasiliensis***

**Candidata: Elisa Flávia Luiz Cardoso Bailão**

**Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Célia Maria de Almeida Soares**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia.**

**Goiânia – GO**

**Janeiro - 2010**

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

Bailão, Elisa Flávia Luiz Cardoso.  
B153a Análises *in vivo* e *in vitro* de interações intermoleculares da Beta-1,3-glicosiltransferase 1 de *Paracoccidioides brasiliensis* [manuscrito] / Elisa Flávia Luiz Cardoso Bailão. - 2010.  
xix, 94 f. : il., figs, tabs.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Célia Maria de Almeida Soares.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás,  
Instituto de Ciências Biológicas, 2010.

Bibliografia.

Inclui lista de abreviaturas.

1. Glicosiltransferase. 2. Duplo híbrido. 3. *Pull-down*.  
I. Título.

CDU: 582.28

**DISSERTAÇÃO DESENVOLVIDA NO LABORATÓRIO DE BIOLOGIA  
MOLECULAR, DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA  
MOLECULAR, INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS,  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS.**

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

## **BANCA EXAMINADORA**

### **TITULARES**

**Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares**

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás

**Prof. Dr. Augusto Schrank**

Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**Prof. Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho**

Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás

### **SUPLENTE**

**Profa. Dra. Maristela Pereira**

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás

**Prof. Dr. Cirano José Ulhoa**

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás

*“A vida sem ciência é uma espécie de morte.”*

*Sócrates*

*“Uma vida sem desafios não vale a pena ser vivida.”*

*Sócrates*

*“Não pense que a cabeça aguenta se você parar.”*

*Raul Seixas*

*“Preferi a Sabedoria aos cetros e tronos e em comparação com Ela, julguei sem valor a riqueza; a Ela não igualei nenhuma pedra preciosa, pois, a seu lado, todo o ouro do mundo é um punhado de areia e, diante dela, a prata será como a lama. Amei-a mais que a saúde e a beleza, e quis possuí-la mais que a luz, pois o esplendor que dela irradia não se apaga. Todos os bens me vieram com ela, pois uma riqueza incalculável está em suas mãos.”*

*Livro da Sabedoria*

*“Há dois tipos de Sabedoria : a inferior e a superior. A sabedoria inferior é dada pelo quanto uma pessoa sabe e a superior é dada pelo quanto ela tem consciência de que não sabe.”*

*Chico Xavier*

*“Sábio é aquele que conhece os limites da própria ignorância.”*

*Sócrates*

*“Só sei que nada sei.”*

*Sócrates*

*Aos grandes amores da minha vida...*

*Ao meu pai, Jeovah Bailão, por ter me ensinado a ter disciplina e responsabilidade: “Primeiro o dever, depois o lazer”. Por ter sido meu professor em tempo integral e, dessa forma, ter sido responsável pela formação do meu caráter.*

*À minha querida mãe, Viviam Bailão, por sempre tentar me ensinar sobre os dons da paciência, da perseverança e da fé.*

*Por me amar incondicionalmente e por ser um exemplo de força, competência e dedicação.*

*Ao meu eterno companheiro, Leonardo Borges, por me dar forças para seguir a caminhada, enxugando meu pranto e abrindo meu riso. Por me ensinar que não escolhemos o amor, é ele que nos escolhe.*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus, pela benção da vida plena e abundante. Pelo repouso e descanso em momentos de fraqueza e desânimo. Por me dar força e segurança para enfrentar os desafios e os obstáculos que se colocam em meu caminho.*

*À professora Célia Maria de Almeida Soares por, em 2004, ter aceitado orientar uma jovem recém-chegada à Universidade. Nesses quase seis anos, pude amadurecer profissional e pessoalmente. Aprendi a ouvir críticas e usá-las a meu favor, a ser mais objetiva, a trabalhar em equipe, a ser perseverante e a admirar minha orientadora como profissional exemplar. Obrigada por não medir esforços para garantir financiamento para os projetos do grupo e por sempre primar pela excelência de seus alunos e de seus trabalhos. Obrigada pela paciência e disponibilidade nessa reta final. Isso foi muito importante para que eu tivesse equilíbrio e serenidade para concluir essa etapa. E, por fim, obrigada pela oportunidade de fazer parte de um grupo reconhecido internacionalmente por seus trabalhos de qualidade.*

*Aos professores Augusto Schrank e Marilene Vainstein, pela excelente receptividade em seus laboratórios. Obrigada por terem me proporcionado um mês de intenso aprendizado e amadurecimento profissional e pessoal. Obrigada pela oportunidade de ter conhecido uma realidade diferente e pessoas tão especiais. Obrigada pela dedicação à pesquisa e à educação em nosso país.*

*Às professoras Sílvia Izacc e Maristela Pereira pela boa convivência e pelas contribuições.*

*Aos meus queridos amigos Clayton Borges e Alexandre Bailão, por me ensinarem que a Ciência é mesmo cheia de percalços e, com muito bom humor, nunca terem me deixado desistir. Obrigada por sempre estarem dispostos a ajudar, por terem me ensinado tantas coisas e por terem deixado de me ensinar outras tantas, para que eu pudesse aprendê-las sozinhas, do jeito mais doloroso, mas mais eficiente. Sou muito grata a vocês.*

*Às minhas queridas amigas Mirelle Silva e Patrícia Lima, pelo abraço carinhoso a cada manhã, pelas palavras de incentivo e pelos risos constantes. Obrigada por me ajudarem a enfrentar os desafios e por terem colaborado enormemente neste trabalho. Sem vocês, a tarefa teria sido ainda mais penosa e menos divertida. Obrigada pela paciência, atenção e preocupação dispensadas a mim. Podem sempre contar com meu carinho, apoio e amizade.*

*Às irmãs Juliana e Ana Flávia Parente, pela disposição em ajudar todo o grupo e pela paciência em ensinar. Obrigada pelo carinho, pelas valiosas contribuições e por tornarem o aprendizado mais divertido e prazeroso.*

*À Sabrina Dantas, por ter me iniciado no LBM e, assim, na pesquisa. Obrigada pela paciência, atenção, apoio e carinho. Obrigada pelos momentos de desabafo e de total descontração.*

*Às colegas Kelly de Castro e Patrícia Zambuzzi, por colaborarem na organização dos estoques do laboratório e por serem tão acessíveis e responsáveis. Obrigada pelo carinho e pelo sorriso gentil.*

*Aos colegas Mariana Tomazett e Benedito Neto, pelas Presenças em minha vida. Obrigada pelo sorriso fácil e pelo olhar carinhoso. Obrigada por tornarem os congressos momentos muito divertidos.*

*Aos colegas Leandro Rodrigues e Dayane Araújo, pelo exemplo de determinação e dedicação.*

*À colega Tereza Cristina Rezende, pela valiosa contribuição na área de Proteoma em nosso laboratório e pela arte gráfica da Dissertação.*

*Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular (LBM): Luciane, Simone Weber, Sarah, Daciene, Ronney, Patrícia Kott, Renata, Sheyla, Hellen, Amanda, Priscila, Raquel, Karine, Symone, Marta, Keila, Ademar, Marco Túlio, Elvis e Edilânia, pela boa convivência, pelos sorrisos sinceros e pelas contribuições.*

*Aos “meninos” da Bioinformática, Daniel Xavier, Romeu, Kléber e Daniel Alfonso pela disposição em ajudar.*

*A Tércio Góes, pela oportunidade de colaboração.*

*À professora Ligia Borges e sua aluna Carla Loufy, pela gentileza de me receberem em seu laboratório.*

*A todos os alunos que passaram pelo LBM e deixaram saudades: Wesley, Rodrigo, Nathalie, Milce, Karinne, Bernadete, Yuri, Gabriela, Mônica Oliveira, Mônica Santiago, Aline Helena, Ludier Kesser, Lidiane, Luiz Augusto, Hérica, Regilda, Rogério Fiúza, Rogério Troian, Bruno, Glaciane, Fernanda, Christielly, Lorena, Ivian e João Guilherme.*

*Aos colegas de Porto Alegre, pela paciência, atenção e disposição em ajudar. Obrigada, em especial, à Livia, ao Charley, à Juliana e à Luciana pelo carinho e cuidado dispensados a mim.*

*Aos professores da Graduação e da Pós Graduação, pelos valiosos ensinamentos.*

*Aos colegas do Mestrado, pela boa convivência e pelas discussões em grupo. Obrigada por enriquecerem a minha formação.*

*À Gleizi dos Santos, pela disposição em ajudar, pelo olhar carinhoso e pelo abraço acolhedor.*

*À D. Dora e à Anésia, pelo cuidado com nosso laboratório e pelo sorriso fácil.*

*À minha segunda mãe, Vicelma Cardoso, pelo amor e apoio incondicionais. Obrigada por ter servido como espelho para que eu ingressasse na Vida Acadêmica.*

*A todos os meus familiares e amigos, pelo carinho, apoio e compreensão. Agradeço, em especial, aos meus avós, Belinha Cardoso e Eurípedes Luiz, por terem me ensinado a respeitar a instituição Família.*

*À D. Conceição Borges, pelo exemplo de superação e de cuidado com a Família. Obrigada por ter me acolhido com tanto carinho em sua casa.*

*À professora Eliza Maria, pelo carinho e dedicação em ensinar. Obrigada pelas valiosas lições e por ter orientado minha escolha profissional.*

*Aos professores da banca, por terem aceitado, tão prontamente, o convite para participarem da minha Defesa de Dissertação.*

*Aos órgãos financiadores de Pesquisa, pelo auxílio nos projetos. Agradeço, em especial, a CAPES, pela concessão da bolsa de Mestrado.*

## SUMÁRIO

|   |       |
|---|-------|
| LISTA DE ABREVIATURAS .....   | XIV   |
| RESUMO .....  | XVIII |
| ABSTRACT .....  | XIX   |
| <br>  |       |
| <b>I. Introdução</b>  |       |
| <b>I.1. O fungo dimórfico <i>Paracoccidioides brasiliensis</i></b> .....  | 20    |
| <b>I.2. A paracoccidioidomicose</b> .....   | 23    |
| <b>I.3. A parede celular fúngica</b> .....  | 25    |
| <b>I.4. A parede celular de <i>P. brasiliensis</i></b> .....  | 28    |
| <b>I.5. A dinâmica da parede celular e o papel das glicosiltransferases</b> .....                                 | 30    |
| <b>I.6. Interações entre proteínas</b> .....  | 38    |
| <br>  |       |
| <b>II. Justificativa</b> .....  | 42    |
| <br>  |       |
| <b>III. Objetivos</b> .....   | 43    |
| <br>  |       |
| <b>IV. Materiais e métodos</b>  |       |
| <b>IV.1. Linhagem do fungo e condições de crescimento</b> .....   | 44    |
| <b>IV.2. Rastreamento <i>in vivo</i> de interações de <i>PbGel1p</i> em uma biblioteca de duplo híbrido</b> ..... | 44    |
| <b>IV.3. Identificação dos transcritos codificantes para as interações rastreadas</b> .....                       | 45    |

|   |    |
|---|----|
| IV.4. Confirmação das interações por coimunoprecipitação .....  | 46 |
| IV.5. Expressão e purificação da proteína recombinante <i>PbGel1</i> .....  | 47 |
| IV.6. Obtenção do extrato celular de leveduras de <i>P. brasiliensis</i> .....  | 49 |
| IV.7. Isolamento de interações <i>in vitro</i> da <i>PbGel1p</i> por <i>pull-down</i> de proteína fusionada à GST ..... | 49 |
| IV.8. Proteólise e identificação dos peptídeos por espectrometria de massas .....                                       | 49 |
| <br>  |    |
| V. Resultados   |    |
| V.1. Detecção <i>in vivo</i> de possíveis proteínas ligantes a <i>PbGel1p</i> .....                                     | 51 |
| V.2. Exclusão de clones falso-positivos baseado na ativação transcricional do gene repórter <i>mell</i> .....           | 54 |
| V.3. Confirmação de interações por coimunoprecipitação .....  | 55 |
| V.4. Interações <i>PbGel1p</i> -proteínas isoladas através de ensaio de <i>pull-down</i> .....                          | 57 |
| <br>  |    |
| VI. Discussão .....   | 61 |
| <br>  |    |
| VII. Conclusões .....   | 75 |
| <br>  |    |
| VIII. Perspectivas .....  | 76 |
| <br>  |    |
| IX. Referências bibliográficas .....  | 77 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

AD – domínio de ativação transcricional

*ade2* – gene codificante para fosforibosilaminoimidazol carboxilase (via de biossíntese de adenina)

ADP – adenosina difosfato

ATP – adenosina trifosfato

BD – domínio de ligação ao DNA

CAAX, CC e CXC – C: cisteína, A: aminoácido alifático e X: aminoácido qualquer

CBM43 – módulo de ligação a carboidratos

cDNA – DNA complementar

c-Myc – fator de transcrição contendo o domínio zíper de leucina

CoA – coenzima A

DNA – ácido desoxirribonucléico

DO<sub>600</sub> – densidade óptica medida a 600 nm

DTT - 1,4-ditiotreitol

EBP – proteína de ligação a estrogênio

Epd – essencial para o desenvolvimento de pseudohifa

ER – retículo endoplasmático

FTase – farnesiltransferase

GAL4 – fator de transcrição eucariótico

Gas – glicofosfolípídeo ancorado à superfície

GDSL – motivo Glicina-Asparagina-Serina-Leucina

Gel – beta-1,3-glicosiltransferase (glicosiltransferase alongando glicana)

GGTase – geranylgeranyltransferase

GH72 – família 72 das glicosil-hidrolases

GPI – glicosilfosfatidilinositol

GST – glutathione S-transferase

GTP – guanosina trifosfato

HA – hemaglutinina

*his3* – gene codificante para imidazol glicerolfosfato desidratase (via de biossíntese de histidina)

HML – tipo reprodutivo silenciado esquerdo

HMR – tipo reprodutivo silenciado direito

HSP – proteína de choque térmico

IPTG – beta-D-1-tiogalactopiranosídeo

LB – Lúria-Bertani

*leu2* – gene codificante para beta-isopropilmalato desidrogenase (via de biossíntese de leucina)

Mal – maltose permease

Mb – megabase

*mell* – gene codificante para  $\alpha$ -galactosidase

Mph – permease de alfa-glicosídeos

mRNA – ácido ribonucléico mensageiro

MS – espectrometria de massas

NAD<sup>+</sup> – dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidado

NADH – dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido

NADP<sup>+</sup> – fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidado

NADPH – fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido

N-terminal – aminoterminal

*PbGell1p* – proteína Gell1 de *Paracoccidioides brasiliensis*

PBS – tampão fosfato-salino

PCM – paracoccidioidomicose

PCR – reação em cadeia da polimerase

PFGE – eletroforese em gel de campo pulsado

*pgap5* – pós-acoplamento da GPI à proteína 5

pH – potencial hidrogeniônico

Phr – pH-regulada

Pir – proteína com repetições internas

PPI – interação proteína-proteína

PS – espécie filogenética

Qde2 – proteína de silenciamento gênico e RNA de interferência

rDNA – DNA ribossomal

RE – retículo endoplasmático

RITS – complexo de iniciação do silenciamento transcricional mediado por RNAi

RNA – ácido ribonucléico

RNAi – RNA de interferência

RNAPII – RNA polimerase II

rRNA – RNA ribossomal

S – espécie

SDS – dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes

SH2 – homologia Src 2

Sir - regulador da informação para silenciamento

Spt6 – fator de alongamento transcricional

TCA – ácido tricarbóxico

TFA – ácido trifluoroacético

tRNA – RNA transportador

*trp1* – gene codificante para N-(5'-fosforibosil)- antranilato isomerase (via de biossíntese de triptofano)

Valor e – valor esperado

X-alfa-Gal – 5-Bromo-4-Cloro-3-Indol-D-galactopiranosídeo

## RESUMO

A parede celular de microrganismos patogênicos atua como uma barreira inicial no contato entre o parasito e o hospedeiro. Além de funcionar como uma barreira mecânica, ela abriga um arsenal de macromoléculas imunogênicas. Uma forma pela qual as proteínas estão associadas à parede celular é por meio de âncoras-GPI. A extremidade carboxila hidrofóbica da enzima  $\beta$ -1,3-glicanosiltransferase do fungo patogênico humano *Paracoccidioides brasiliensis* é característica de proteínas GPI-ancoradas. A montagem e o rearranjo de  $\beta$ -1,3-glicana são de fundamental importância porque esta molécula serve como um esqueleto sobre o qual outros polissacarídeos e proteínas da parede celular estão associados. No fungo termodimórfico *P. brasiliensis*,  $\beta$ -1,3-glicana é encontrada prioritariamente em micélio, sendo  $\alpha$ -1,3-glicana predominante em levedura. Foram rastreadas neste trabalho possíveis interações proteína-proteína realizadas pela  $\beta$ -1,3-glicanosiltransferase 1 de *P. brasiliensis* (*PbGellp*). Para isso utilizou-se a técnica de duplo-híbrido em *Saccharomyces cerevisiae*, rastreando-se uma biblioteca de cDNA do fungo *P. brasiliensis* com a enzima estudada. Adicionalmente, foi utilizado, como técnica complementar, o ensaio de *pull-down*, que isolou *in vitro* proteínas que interagem direta ou indiretamente com a *PbGellp*. Foi possível rastrear 38 produtos gênicos através do sistema de duplo híbrido e isolar três proteínas pelo ensaio de *pull-down*, identificadas por espectrometria de massas. O papel da *PbGellp* na manutenção e no remodelamento da parede celular do fungo foi indicado através da análise das interações rastreadas, como permease de  $\alpha$ -glicosídeos, fosfatase ácida, lipase da família GDSL, septina, actina, tubulina, HSP90 e piruvato quinase. Além disso, foram sugeridos a localização da *PbGellp* no núcleo das células do fungo e seu papel no silenciamento gênico mediado por alterações estruturais, por meio do rastreamento das seguintes proteínas ligantes a *PbGellp*: argonauta Qde2, fator de alongamento transcricional spt6, outros fatores transcricionais e ATP-citrato sintase. Portanto, este estudo indicou, pela primeira vez, que *PbGellp* tem localização múltipla e participa tanto de funções classicamente descritas para glicanosiltransferases, como o remodelamento da parede celular, quanto de funções recentemente descritas para essa família de proteínas, como o silenciamento transcricional sítio-específico.

## ABSTRACT

The cell wall of pathogenic microbes acts as an initial barrier that is in contact with hostile environments. Besides functioning as a mechanical barrier, it harbours an immunogenic macromolecules arsenal. One of the ways that proteins can be associated to the cell wall, it is through GPI anchor. The hydrophobic C-terminal end of the  $\beta$ -1,3-glucanosyltransferase enzyme of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* is characteristic of GPI anchored proteins. The  $\beta$ -1,3-glucan assembling and rearrangement are essential since this molecule acts as a scaffold to support cell wall proteins and polysaccharides. In the thermodimorphic fungus *P. brasiliensis*,  $\beta$ -1,3-glucan is found predominantly in mycelium form and  $\alpha$ -1,3-glucan is predominant in the yeast form. In this work, it was screened possible protein-protein interactions performed by  $\beta$ -1,3-glucanosyltransferase 1 of *P. brasiliensis* (*PbGellp*). To obtain these results, a *P. brasiliensis* cDNA library was screened with *PbGellp* using the *Saccharomyces cerevisiae* two hybrid system. In addition, *pull-down* assay was used as an *in vitro* complementary technique to isolate proteins that interact direct or indirectly with *PbGellp*. It was screened 38 gene products using two hybrid system and it was identified 3 proteins using the *pull-down* assay associated with mass spectrometry. The *PbGellp* role in the cell wall maintenance and remodeling was indicated through the analysis of screened interactions, like alpha-glucosides permease, acid phosphatase, GDLS lipase, septin, actin, tubulin, HSP90 and pyruvate kinase. Furthermore, nuclear localization of *PbGellp* and its role in the locus-specific transcriptional silencing were suggested based on such interactions: Qde2 argonaute, transcription elongation factor spt6, others transcription factors and ATP-citrate synthase. Therefore, this study indicated, for the first time, that *PbGellp* has multiple location and it participates either in roles classically described for glucanosyltransferases, as the cell wall remodeling, or in recently described functions for this family of proteins, as the locus-specific transcriptional silencing.



---



# Introdução

---

## **I. Introdução**

### **I.1. O fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis***

Em 1908, na cidade de São Paulo, Adolfo Lutz (1855 – 1940), considerado o pai da medicina tropical e da zoologia médica no Brasil, descreveu, pela primeira vez, o isolamento do agente etiológico da “hifoblastomicose pseudococcídica”. O termo “pseudococcídica” foi usado para reforçar as diferenças existentes entre o fungo recém-isolado e o agente causador da coccidioidomicose, também uma “hifoblastomicose”, que designava todas as doenças causadas por fungo dimórfico. Porém, só em 1930, Floriano de Almeida caracterizou este fungo emergente e o denominou de *Paracoccidioides brasiliensis*. Sendo a doença por ele causada oficialmente denominada de paracoccidioidomicose (PCM) em 1971, durante o primeiro simpósio sobre este tema, sediado na cidade de Medellín, na Colômbia (Lacaz, 1994).

Os fungos dimórficos são caracterizados pela mudança de uma fase filamentosa multicelular para uma unicelular, quando infectam os tecidos do hospedeiro. Essa é uma propriedade genética intrínseca de fungos como *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *P. brasiliensis*, *Coccidioides immitis*, *Coccidioides posadassi*, *Sporothrix schenckii* e *Penicillium marneffeii* (Rappleye & Goldman, 2006). A patogenicidade dos mesmos parece estar relacionada ao dimorfismo, pelo fato de linhagens incapazes de transitar morfológicamente não serem virulentas (Maresca & Kobayashi, 2000). Em contrapartida, a transição morfológica não parece prejudicar a perpetuação destes organismos, uma vez que eles podem sobreviver no solo como saprobias e crescer como micélio. Em *P. brasiliensis* esse dimorfismo está fortemente associado à mudança de temperatura sofrida pelo fungo ao penetrar o hospedeiro (San-Blas *et al.*, 2002). Dessa maneira, as duas fases deste fungo podem ser cultivadas *in vitro* apenas variando-se a temperatura de 36 °C, quando o fungo tem um aspecto de levedura, para temperaturas inferiores a 28 °C, quando se tem a fase miceliana (Bagagli *et al.*, 2006).

Macroscopicamente, a fase de levedura de *P. brasiliensis* é caracterizada por colônias rugosas, amareladas, de aspecto cerebriforme. Microscopicamente, são visualizadas células esféricas ou ovais de 2-30 µm de diâmetro, multinucleadas, apresentando paredes espessas e

birrefringentes, aparentemente duplas, e citoplasma contendo vacúolos de lipídeos. O diagnóstico histológico baseia-se no achado de estruturas fúngicas com formato de “roda de leme” que refletem células-mães em brotamento multipolar envolvidas por células-filhas periféricas (Restrepo, 1978). Já a fase miceliana, apresenta-se macroscopicamente como colônias pequenas, irregulares, esbranquiçadas ou acastanhadas. Microscopicamente, as hifas são finas (1-3  $\mu\text{m}$ ), hialinas e septadas, apresentando conídeos uninucleados terminais ou intercalares (Queiroz-Telles, 1994).

Comparações filogenéticas de dermatófitos e fungos dimórficos baseadas na subunidade ribossomal 28S classificaram *P. brasiliensis* como pertencente ao reino Fungi, filo Ascomycota, classe Plectomyceto, ordem Onygenales, família Onygenaceae, juntamente com *B. dermatitidis* e *H. capsulatum* (Leclerc *et al.*, 1994; San-Blas & Niño-Vega, 2008). Atualmente a sistemática molecular está sendo bastante utilizada para definir espécies fúngicas, antes só determinadas pela observação do fenótipo, o que subestimava o número dessas espécies. *Paracoccidioides brasiliensis* era considerada espécie única de seu gênero até se propor a existência de três diferentes clados: S1 (espécie 1, com 38 isolados), PS2 (espécie filogenética 2, com 6 isolados) e PS3 (espécie filogenética 3, com 21 isolados). PS3 é um grupo geograficamente restrito à Colômbia; PS2 é encontrada predominantemente no Brasil, nos estados de São Paulo e Minas Gerais, mas também na Venezuela; S1 está distribuída no Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela (Matute *et al.*, 2006). Análises filogenéticas posteriores revelaram que a linhagem 01 de *P. brasiliensis* (*Pb01*) distancia-se dos três clados descritos anteriormente, sugerindo que *Pb01* seja uma nova espécie do gênero *Paracoccidioides* (Carrero *et al.*, 2008). Com o estudo de mais isolados de *P. brasiliensis* foi identificado um grupo com 17 isolados similares genotipicamente, incluindo *Pb01*, que se distanciam do grupo S1/PS2/PS3, reforçando que o grupo “semelhante a *Pb01*” refere-se a uma nova espécie, que seria então denominada *Paracoccidioides lutzii*, em homenagem a Adolfo Lutz. Esta nova espécie seria endêmica da região Centro-Oeste brasileira, mais especificamente dos Estados de Goiás e Mato Grosso (Teixeira *et al.*, 2009). Porém ainda não há um consenso sobre esta questão devido a pouca informação existente sobre diferenças de morfologia, de virulência, de resistência a fungicidas, de taxa de proliferação, de resposta ao hospedeiro e de nicho entre as duas possíveis espécies.

Os nichos ecológicos de *P. brasiliensis* ainda não estão completamente esclarecidos, porém sugere-se que o fungo tenha pelo menos dois. O primeiro corresponde ao seu estado filamentosos, em que o fungo vive saprobicamente na natureza, já tendo sido isolado de solo, de água e de plantas (Restrepo *et al.*, 2001). O segundo refere-se à sua associação com animais homeotérmicos, inclusive o homem, em sua fase de levedura, podendo levar à doença. Devido ao pequeno número de isolamentos de *P. brasiliensis* do solo, acredita-se que este ambiente não seja o hábitat permanente do patógeno, vivendo ele tempo variável neste local. Presume-se que o fungo *P. brasiliensis* ocorra normalmente em ambientes úmidos, próximos a rios, onde possa ser protegido por representantes de espécies aquáticas como moluscos, anfíbios, peixes e artrópodes. Estes reservatórios aquáticos estariam fornecendo ao parasito nutrientes, umidade, competição biológica limitada e temperatura apropriada para a sobrevivência do fungo no meio ambiente. A infecção natural do fungo em alguns animais silvestres como tatus (*Dasybus novemcinctus*, *Dasybus septemcinctus* e *Cabassous centralis*) e animais domésticos, como cachorros (*Canis familiares*), também tem sido observada; entretanto estes organismos devem ser considerados hospedeiros acidentais e não reservas naturais do fungo, pois os mesmos podem ser acometidos pela doença (Conti-Diaz, 2007).

A composição genética de *P. brasiliensis* foi por muito tempo desconhecida pela indeterminação de seu estágio sexual ou teleomórfico e por este organismo, como vários outros fungos, ser refratário às análises citogenéticas clássicas (San-Blas *et al.*, 2002). Dessa forma, várias alternativas foram estudadas para elucidar esta questão. Utilizando-se a técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), foi possível identificar quatro ou cinco cromossomos estimados em 2-10 Mb, tanto de fungos isolados do meio ambiente, quanto de isolados clínicos. Desta maneira, sugeriu-se que *P. brasiliensis* apresentasse um genoma estimado no intervalo de 23-31 Mb (Cano *et al.*, 1998; Feitosa *et al.*, 2003; Montoya *et al.*, 1999; Montoya *et al.*, 1997). Por meio do uso da técnica de citometria de fluxo, estudo com 10 isolados de *P. brasiliensis* demonstrou que o fungo apresenta um genoma estimado no intervalo de 26,3 a 35,5 Mb por célula de leveduras uninucleadas. O genoma dos conídios apresentou um tamanho entre 30,2 e 30,9 Mb, não havendo, portanto, nenhuma diferença significativa com a fase de levedura (Almeida *et al.*, 2007). O genoma estrutural de três linhagens de *P. brasiliensis* (*Pb01*, *Pb03* e *Pb18*) foi realizado, confirmando a presença de cinco cromossomos em cada um. Porém o genoma da linhagem *Pb01* é o maior, tanto em

número de bases quanto em quantidade de genes, apresentando 32,94 Mb, com um total de 9.132 genes. Este projeto comparativo, designado “Genômica Comparativa de *Coccidioides* e outros Fungos Dimórficos Patogênicos”, auxilia na compreensão das diferenças existentes entre as linhagens, na caracterização de genes e de suas regiões promotoras, e no desenvolvimento de novas ferramentas biomoleculares e genéticas importantes para a elucidação da biologia de *P. brasiliensis* ([http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides\\_brasiliensis/MultiHome.html](http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html)).

## **I.2. A paracoccidioidomicose**

*P. brasiliensis* alcança o hospedeiro usualmente através da via respiratória, por inalação de propágulos de micélio, como conídios. Nos pulmões, esses propágulos convertem-se para a fase de levedura, de onde podem disseminar para diferentes órgãos e tecidos, pelas vias hematogênica e/ou linfática (Franco, 1987). Essa mudança brusca no momento da infecção requer um ajuste rápido e coordenado por parte do fungo para manter a sobrevivência dele e para capacitá-lo a invadir o hospedeiro. As mudanças morfogenéticas em fungos dimórficos são reversíveis, sendo consideradas uma forma de adaptação oportunista às condições do hospedeiro. Além disso, a conversão para uma forma diferente é um requisito para a progressão da infecção (San-Blas *et al.*, 2002; San-Blas & Niño-Vega, 2008).

A susceptibilidade do hospedeiro a *P. brasiliensis* está relacionada tanto a fatores do fungo, principalmente a virulência do isolado e a quantidade de inóculo, quanto do próprio hospedeiro (Franco, 1987). Uma vez em contato com os propágulos infecciosos de *P. brasiliensis*, a infecção pode ficar dormente, com a formação de focos quiescentes de células leveduriformes viáveis. A reativação endógena pode ocorrer dependendo de fatores genéticos e hormonais do próprio hospedeiro, como debilidade por outras patologias, alcoolismo crônico, má nutrição, fumo, imunossupressão e presença/ausência de estrogênio (Restrepo-Moreno, 2003). Foi demonstrado que o hormônio sexual feminino 17 $\beta$ -estradiol inibe seletivamente a transição de micélio para levedura em *P. brasiliensis* (Restrepo *et al.*, 1984). Foi observada também a participação deste hormônio na resistência de fêmeas de rato ao desenvolvimento inicial da PCM (Aristizabal *et al.*, 2002). Uma proteína de ligação a estrogênio (EBP) de massa molecular de 60 kDa foi identificada no citosol tanto das células

leveduriformes quanto da fase miceliana do fungo, sugerindo que ao entrar em contato com o hormônio, forma-se um complexo proteína-ligante, que inibe a conversão morfológica e, portanto, o estabelecimento e a disseminação da doença (Clemons *et al.*, 1989; Stover *et al.*, 1986). As análises do perfil transcricional de *P. brasiliensis* detectaram uma expressão preferencial do gene que codifica para a EBP na fase patogênica (Felipe *et al.*, 2005). Essas evidências permitem afirmar uma resistência inata de fêmeas à PCM, demonstrada pela taxa de 14:1 homens com relação a mulheres que desenvolvem PCM crônica nas regiões endêmicas (Restrepo-Moreno, 2003).

A PCM é uma micose sistêmica, endêmica da América Latina, distribuída do México à Argentina (Restrepo *et al.*, 2001). Dentro da região endêmica, com 90 milhões de indivíduos, 10 milhões devem estar infectados com o fungo, porém a maioria deles não apresenta a forma ativa da doença (Brummer *et al.*, 1993). Em um estudo de detecção do antígeno paracoccidioidina por reação intradérmica, revelou-se que a PCM infecção é mais comumente observada em trabalhadores rurais e fazendeiros entre 30 e 40 anos de idade (Restrepo-Moreno, 1994). Acredita-se que o trabalho com solo e plantações em área rural é fator ocupacional predisponente para a aquisição da PCM (Franco, 1987). A PCM é raramente observada em crianças e adultos jovens (3 e 10% dos casos relatados, respectivamente) e é mais frequentemente diagnosticada em homens adultos entre 30 e 60 anos de idade (Brummer *et al.*, 1993). O Brasil é o país com maior número de casos da doença (80%), seguido pela Venezuela e pela Colômbia (Brummer *et al.*, 1993). No Brasil, a PCM representa 51,2% das causas de morte entre as micoses sistêmicas, seguida por criptococose, candidose e histoplasmosse. Com relação à idade e sexo, 53,4% dos pacientes portadores da PCM possuem 30-59 anos e 87,9% são do sexo masculino. Os Estados brasileiros mais atingidos são São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Paraná e Rio Grande do Sul. (Prado *et al.*, 2009). Estima-se que, no Brasil, a taxa de incidência anual da doença seja de 1-3 por 100.000 habitantes (Restrepo *et al.*, 2001) e a taxa média anual de mortalidade seja de 0,17 por 100.000 habitantes (Prado *et al.*, 2009).

Alguns casos autóctones já foram diagnosticados na Europa, nos Estados Unidos da América e na Ásia (Joseph *et al.*, 1966; Chikamori *et al.*, 1984; Ajello & Polonelli, 1985). Estes relatos possibilitaram a determinação de um período assintomático da PCM, que é em média 15,3 anos, que ocorre após o contato do paciente com a área endêmica até a

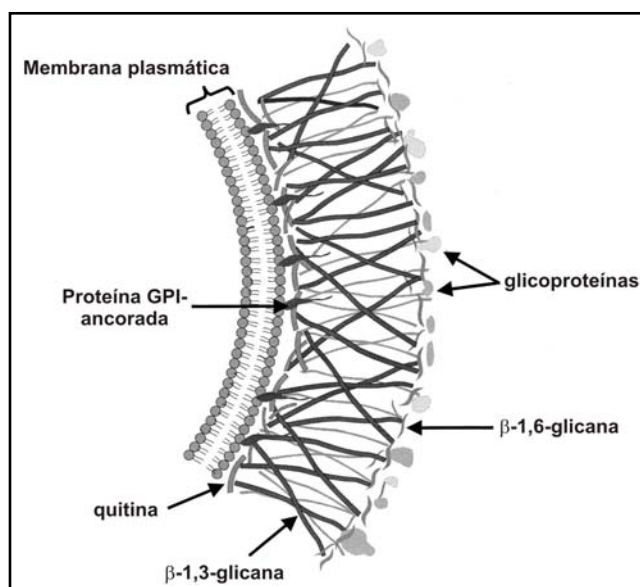
manifestação da doença (Brummer *et al.*, 1993). O longo período de latência, característico da PCM, dificulta o processo de determinação precisa do sítio onde a infecção ocorreu (Borelli, 1972).

As formas clínicas da PCM são classificadas em: aguda ou subaguda (juvenil) e crônica ou adulta (Franco, 1987). A forma aguda da micose afeta principalmente crianças e jovens e é a forma mais grave e com pior prognóstico. Seu quadro clínico caracteriza-se por um desenvolvimento rápido e por marcante envolvimento de órgãos como fígado, baço, gânglios linfáticos e medula óssea. Nesta forma, a PCM conduz à perda gradual de resposta imune celular e induz à produção de altos títulos de anticorpos específicos. A forma crônica ou adulta representa mais de 90% dos casos, sendo a maioria dos pacientes constituída por homens adultos. Ao contrário da forma aguda, o quadro clínico apresenta um desenvolvimento lento com comprometimento pulmonar evidente (Brummer *et al.*, 1993). Em aproximadamente 25% dos casos, o pulmão é o único órgão afetado - forma unifocal. Muitas vezes, com o desenvolvimento silencioso da doença, o paciente busca auxílio médico somente quando apresenta sintomas de comprometimento extrapulmonar. Nestes casos se constatam o envolvimento de órgãos como pele, mucosas das vias aéreas superiores, tubo digestivo e linfonodos - forma multifocal (Londero *et al.*, 1986; Brummer *et al.*, 1993). A forma crônica apresenta notável tendência à disseminação, sendo pouco frequente os quadros onde há somente comprometimento pulmonar (Restrepo *et al.*, 1983).

### **I.3. A parede celular fúngica**

Considerada por muito tempo um exoesqueleto inerte, a parede celular de fungos é vista hoje como uma rede tridimensional complexa e dinâmica, que muda continuamente em resposta a modificações nas condições de cultivo ou a estresses ambientais (Latgé, 2007). Essas mudanças ocorrem para garantir a proteção da célula contra diferentes pressões osmóticas e contra agressões físicas ou químicas, enquanto permitem à célula fúngica reter plasticidade adequada para crescer, dividir-se e formar uma série de tipos celulares durante o ciclo de vida do fungo. A parede celular permite também à célula interagir com o meio que a cerca, promovendo a adesão célula-célula ou célula-substrato e a ativação de vias de transdução de sinal intracelulares (Bowman & Free, 2006). Em fungos, a parede celular

contribui com aproximadamente 30% do peso seco da célula, sendo que destes, 80-90% corresponde a polissacarídeos (principalmente glicana e quitina) e o restante representa a fração protéica (Castillo *et al.*, 2008), conforme representado na **Figura 1**.



**Figura 1.** Representação esquemática da parede celular de fungos. Adaptado (<http://aem.asm.org>).

Várias categorias de proteínas de parede celular de fungos já foram identificadas: (1) GPI (glicosilfosfatidilinositol)-ancoradas – associadas à membrana plasmática por uma estrutura contendo lipídeos e oligossacarídeos. (2) Pir (proteínas com repetições internas) – associadas à parede através de uma ligação éster entre um resíduo desaminado de glutamina de suas repetições e um grupo hidroxila da  $\beta$ -1,3-glicana. Propõe-se que elas interligam as  $\beta$ -1,3-glicanas. (3) álcali-solúveis sem repetições internas – sobre as quais não se sabe como se ligam às macromoléculas da parede celular. (4) ligadas por pontes dissulfeto. (5) hidrofobinas – uma classe especial de proteínas pequenas, ricas em cisteína que podem formar aglomerados hidrofóbicos e são encontradas na parede de esporos e de hifas aéreas (de Groot *et al.*, 2009).

Com os estudos crescentes na área de proteômica, as proteínas tradicionalmente citoplasmáticas que eram consideradas contaminantes das preparações de parede celular estão ganhando aceitação como verdadeiras constituintes desta estrutura celular. Estudos com

vários fungos já identificaram proteínas citosólicas e mitocondriais como macromoléculas associadas à parede celular (Prados-Rosales *et al.*, 2009; Castillo *et al.*, 2008; de Groot *et al.*, 2007; Barbosa *et al.*, 2006; Yin *et al.*, 2005). As funções destas proteínas quando localizadas na parede celular ainda não são conhecidas.

Já as proteínas típicas da parede celular são glicoproteínas, extensivamente modificadas com N- e O-glicosilações e/ou com a adição da âncora GPI. Essas macromoléculas funcionam na manutenção da forma celular, na mediação da adesão célula-célula e célula-substrato, na proteção da célula contra substâncias exógenas, na absorção de moléculas, na transmissão de sinais intracelulares provenientes de estímulo externo e na síntese e remodelamento dos componentes da parede celular (Bowman & Free, 2006).

A quitina totaliza apenas 1-2% do peso seco da célula de levedura, porém seus polímeros cristalinos têm uma enorme resistência à tração, contribuindo para a integridade da parede celular. Este polissacarídeo ocorre na superfície celular como uma cadeia linear longa de N-acetilglicosaminas ligadas por ligações do tipo  $\beta$ -1,4 (Bowman & Free, 2006). Uma vez interrompida a síntese de quitina, a parede celular desorganiza-se, tornando a célula fúngica malformada e instável osmoticamente (Bago *et al.*, 1996).

A glicana é o maior polissacarídeo estrutural da parede celular fúngica, constituindo de 50-60% do peso seco desta estrutura (Kapteyn *et al.*, 1999). Polímeros de glicana são compostos de resíduos de glicose organizados em cadeias por vários tipos de ligações químicas, sendo que destas cerca de 65-90% são do tipo  $\beta$ -1,3. A  $\beta$ -1,3-glicana serve, então, como o principal constituinte estrutural ao qual outros componentes da parede celular estão ligados covalentemente. Dessa forma, a síntese deste polímero é requerida para a formação correta da parede celular e, assim, para o desenvolvimento normal dos fungos (Bowman & Free, 2006).

Tanto os polímeros de quitina quanto os de  $\beta$ -1,3-glicana são gerados por complexos enzimáticos associados à membrana plasmática, que lançam seu produto linear para o espaço extracelular. Esse modelo de síntese, chamado de vetorial, promove a associação das cadeias nascentes no espaço da parede celular e facilita a integração destas à estrutura em formação. Essa integração ocorre tanto em pontos de síntese ativa da parede celular, como em áreas de crescimento celular e de brotamento ou ramificação (Bowman & Free, 2006).  $\beta$ -1,3-glicana e

quitina sintases são transportadas para a membrana plasmática em uma forma inativa, onde elas são arranjadas em complexos e tornam-se ativas após o contato com ativadores residentes. Essa é uma localização perfeita para essas enzimas, já que elas usam monossacarídeos intracelulares solúveis e promovem a extrusão de produtos insolúveis para o espaço periplasmático (Latgé, 2007).

#### **I.4. A parede celular de *P. brasiliensis***

Em *P. brasiliensis*, como em outros fungos, lipídeos, quitina, glicanas e proteínas são os principais componentes da parede celular, tanto de micélio quanto da fase de levedura. Os conteúdos de lipídeos (5-10%) e de glicanas (36-47%) são bem semelhantes nos dois tipos celulares. O que difere são os conteúdos de quitina (37-48% na fase de levedura e 7-18% na fase de micélio) e de proteínas (7-14% e 24-41% nas células leveduriformes e da fase miceliana, respectivamente) (Kanetsuna *et al.*, 1969).

Microscopicamente, a parede celular da fase de levedura apresenta-se como uma bicamada grossa e birrefringente de 200-600 nm de espessura. Esta estrutura é composta basicamente de  $\alpha$ -1,3-glicana e, em menor quantidade, de  $\beta$ -1,3-glicana, sendo recoberta por mucopolissacarídeos complexos e apresentando uma elevada quantidade de quitina internamente. A parede celular de micélio também tem o aspecto de uma dupla camada, de 80-150 nm, sendo que a mais externa é composta por fibras de  $\beta$ -1,3-glicana e a mais interna é constituída de fibras rígidas de quitina (San-Blas & San-Blas, 1994).

A transição morfológica de *P. brasiliensis* é acompanhada por intensas modificações na composição da parede celular. A transição micélio-levedura, por exemplo, é acompanhada pelo aumento no conteúdo de quitina e pela mudança do tipo das ligações entre os polímeros de glicana de  $\beta$ -1,3 para  $\alpha$ -1,3 (San-Blas & San-Blas, 1994, 1977). A composição lipídica da membrana celular também sofre alterações durante a transição morfológica. Acredita-se que esta modificação é requerida para regular a atividade de proteínas integrais de membrana, como sintases (glicana e quitina sintases) e hidrolases (glicanases e quitinases), envolvidas, por sua vez, com mudanças na composição da parede celular (Borges-Walmsley *et al.*, 2002).

Alguns componentes da parede celular do fungo, como a  $\alpha$ -1,3-glicana, já foram caracterizados como importantes fatores de virulência. Durante a transição de micélio para levedura ocorre uma substituição gradual do polímero de  $\beta$ -1,3-glicana para  $\alpha$ -1,3-glicana (Kanetsuna *et al.*, 1969). Foi sugerido que fagócitos humanos produzem  $\beta$ -1,3-glicanase, capaz de digerir somente  $\beta$ -1,3-glicana, presente prioritariamente na parede celular da fase miceliana do fungo. Portanto a transformação de micélio para levedura, logo no início da infecção, deve proteger o patógeno contra a ação das enzimas  $\beta$ -glicanases fagocitárias. Isso permitiria a instalação do fungo na fase de levedura e o estabelecimento da infecção (San-Blas, 1982). Semelhantemente em *H. capsulatum*, a  $\beta$ -1,3-glicana da parede celular é mascarada pela  $\alpha$ -1,3-glicana para bloquear o reconhecimento por parte do hospedeiro via receptor dectina-1 (Rappleye *et al.*, 2007). No fungo fitopatogênico *Magnaporthe grisea*,  $\alpha$ -1,3-glicana mascara  $\beta$ -1,3-glicana e quitina e interfere com a ligação de anticorpos, lecitinas,  $\beta$ -1,3-glicanases e quitinases na parede celular da hifa infecciosa (Fujikawa *et al.*, 2009).

O tratamento de *P. brasiliensis* em sua fase de levedura com sangue (Bailão *et al.*, 2006) e plasma humanos (Bailão *et al.*, 2007) induz a expressão de genes possivelmente associados com o remodelamento da parede celular. O perfil transcricional sugere que o remodelamento estrutural é uma das maneiras pela qual o patógeno detecta e responde a mudanças na osmolaridade externa. Dessa forma, durante as rotas de disseminação hematogênica e linfática, o remodelamento da parede celular e a resposta ao estresse osmótico seriam as estratégias adaptativas preferencialmente utilizadas.

Foi identificado em transcritomas do fungo genes que codificam para proteínas envolvidas na estrutura, composição e organização da parede celular (Costa *et al.*, 2007; Bastos *et al.*, 2007; Tomazett *et al.*, 2005). Entre as sequências identificadas estão quitina sintase, glicana sintase, manossiltransferase, glicanosiltransferase, endoquitinase e exoquitinase. Além dessas proteínas tradicionalmente de parede celular, estudos têm comprovado que enzimas glicolíticas e outras proteínas abundantes no citoplasma localizam-se também na parede celular de *P. brasiliensis*, tais como a DnaJ mitocondrial (Batista *et al.*, 2006), a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Barbosa *et al.*, 2006), a triose fosfato isomerase (Pereira *et al.*, 2007) e a formamidase (Borges *et al.*, 2009).

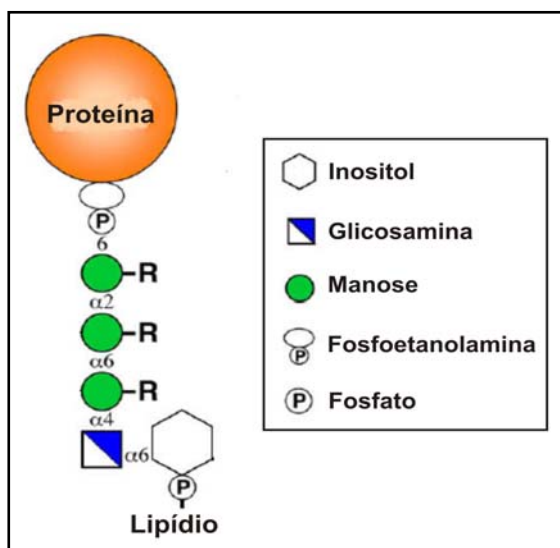
## **I.5. A dinâmica da parede celular e o papel das glicanosiltransferases**

A natureza dinâmica da parede celular fúngica deve-se à atuação coordenada de uma série de glicoproteínas presentes em sua estrutura. As funções individuais da maioria das proteínas associadas a essa estrutura não foram totalmente determinadas. Porém, baseado em análises computacionais de modelagem de proteínas e de homologia de sequências, essas proteínas foram agrupadas em duas categorias principais: enzimas associadas à parede celular e proteínas “estruturais” (Bowman & Free, 2006). Essas enzimas estão ativamente envolvidas na síntese e no remodelamento da parede celular (Rast *et al.*, 2003). Neste grupo incluem-se quitinases, glicanases e peptidases, que hidrolisam e quebram componentes da parede celular, assim como glicanosiltransferases, envolvidas na síntese e na ligação cruzada de polímeros da parede. As proteínas “estruturais” estão também incorporadas à parede celular, porém não possuem atividade enzimática. Em geral, estas proteínas são relativamente pequenas e não possuem domínios funcionais claramente definidos. Muitas destas proteínas desempenham papéis na migração celular, na adesão, no reconhecimento celular e no suporte para outros componentes da parede celular (Yin *et al.*, 2005).

A maior parte das proteínas de parede celular é integrada a ela via ligações covalentes entre carboidratos presentes nos sítios de N- e O-glicosilação e/ou nas âncoras GPI com os resíduos presentes nos polímeros de quitina ou de glicana. As proteínas GPI-ancoradas, como outras proteínas tradicionalmente de parede celular, possuem um peptídeo sinal aminoterminal em sua sequência que as direciona para a via secretória, além de possuírem vários sítios de N- e O-glicosilação e um carboxiterminal de adição da âncora GPI (Bowman & Free, 2006). Este domínio hidrofóbico da porção carboxiterminal é clivado e substituído pela âncora GPI no resíduo de aminoácido designado sítio ômega ( $\omega$ ), dentro do lúmen do retículo endoplasmático (ER) (Hamada *et al.*, 1998).

A estrutura central da âncora GPI é conservada em eucariotos e consiste de um motivo fosfatidilinositol, um grupo glicosamina, três resíduos de manose e, por fim, um grupo fosfoetanolamina (Tiede *et al.*, 1999), conforme representado na **Figura 2**. O fosfatidilinositol é ligado a um elemento lipídico, que pode ser um diacilglicerol ou uma ceramida. O inositol é ligado a um resíduo glicosamina através de uma ligação  $\alpha$ -1,6, que, por sua vez, é ligado a uma cadeia com três resíduos de manose. A fosfoetanolamina ligada ao carbono-6 da terceira

manose serve como ponto de contato com a proteína marcada, através de uma ligação amida. Esta estrutura central pode receber ainda outros resíduos de fosfoetanolamina e carboidratos acessórios, que se estendem a partir das manoses, contribuindo para a diversidade de âncoras GPI dos diferentes organismos (Richard & Plaine, 2007; Pittet & Conzelmann, 2007).



**Figura 2.** Estrutura central da âncora GPI madura de fungos. R, cadeias laterais. Adaptado (Fujita & Kinoshita, 2009).

Foi demonstrado que um mutante de *Aspergillus fumigatus* para um gene da via de biossíntese da âncora GPI apresenta parede celular anormal, defeito de crescimento da hifa, germinação conidial rápida e aberrante. Além disso, esse mutante exibiu virulência reduzida em camundongos imunocomprometidos. Dessa forma, pode-se dizer que a âncora GPI não é essencial para a viabilidade celular, mas é requerida para a integridade da parede celular, para a morfogênese e para a virulência (Li *et al.*, 2007). Isso já havia sido demonstrado de forma similar para *Neurospora crassa*. Mutantes deste fungo deficientes em diferentes genes da via de biossíntese da âncora GPI apresentaram taxas reduzidas de crescimento, padrões de crescimento de hifa alterados, lise celular aumentada e morfologia anormal. Além disso, a parede celular desses mutantes é anormalmente frágil, contém quantidade reduzida de proteínas e composição carboidrática alterada. Esses dados demonstram a importância da via de biossíntese da âncora GPI para estrutura e função apropriadas da parede celular (Bowman *et al.*, 2006).

Existem diferenças estruturais entre o fosfatidilinositol primário para a síntese da âncora GPI, o precursor GPI completo imediatamente antes da ligação à proteína e a proteína GPI-ancorada na superfície celular, sugerindo que a estrutura da âncora GPI é remodelada durante a biossíntese e após o acoplamento à proteína (Fujita & Kinoshita, 2009). Já foi demonstrado que a retenção de uma cadeia lateral de fosfoetanolamina na manose 2 da estrutura da âncora GPI em células de ovário de hamster chinês mutadas causa defeitos na exportação de proteínas GPI-ancoradas do ER. O gene responsável por esse fenótipo foi denominado de *pgap5* (pós-acoplamento da GPI à proteína 5) e existem dois homólogos a esse gene na levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Fujita *et al.*, 2009; Haass *et al.*, 2007). Em leveduras, dois tipos de remodelamento de lipídeos da âncora GPI acontecem no ER, resultando em proteínas GPI-ancoradas contendo elemento lipídico ceramida ou diacilglicerol (Sipos *et al.*, 1997). Talvez seja por isso que existam dois homólogos a *pgap5*, cada um responsável pelo reconhecimento e clivagem da cadeia lateral de fosfoetanolamina da âncora GPI contendo especificamente um dos motivos lipídicos. Outra possibilidade é que esses homólogos clivem a fosfoetanolamina ligada ou à manose 1 ou à manose 2 de forma específica. Esses resultados sugerem a importância do remodelamento da porção glicana dessa âncora para o transporte das proteínas GPI-ancoradas do ER para o Golgi, demonstrando, assim a importância da porção carboidrática nessa estrutura (Fujita & Kinoshita, 2009; Fujita *et al.*, 2009).

A síntese da âncora GPI ocorre simultaneamente à tradução e à clivagem proteolítica do propeptídeo carboxiterminal da proteína marcada para adição desta âncora (Orlean, 1997). A sequência sinal contida na proteína é reconhecida por um complexo protéico, de aproximadamente vinte proteínas diferentes, localizado na membrana do ER, conhecido como GPI transamidase. Este complexo cliva a proteína alvo no sítio  $\omega$  e medeia a transferência da estrutura central da âncora GPI para a nova região carboxiterminal da proteína. A âncora GPI serve para localizar a proteína na membrana plasmática e/ou na parede celular, além de ser importante para a estabilidade e para a funcionalidade da proteína (Bowman & Free, 2006).

As proteínas covalentemente ligadas à parede celular de fungos desempenham vários papéis na célula, muitos ainda desconhecidos. Como extensivamente revisado, já foram descritas várias funções para as proteínas GPI-ancoradas, dentre elas estão o aumento à resistência contra enzimas líticas produzidas pelas células do hospedeiro, por limitar a

porosidade da parede celular e a proteção contra a dissecação, pelo alto grau de glicosilação dessas macromoléculas. Sendo que esse padrão de glicosilação é um possível modulador da resposta imune do hospedeiro frente à infecção, o que pode possibilitar a identificação de vários sorotipos. Além disso, a maioria das adesinas clássicas já descritas possui âncora GPI, sendo a adesão um importante fator de virulência em microrganismos, por permitir a interação com o hospedeiro. As proteínas que conferem proteção contra mecanismos de defesa do hospedeiro contribuem também para a virulência do patógeno; é o caso de algumas enzimas que participam da detoxificação celular, também GPI-ancoradas e que ajudam na sobrevivência do patógeno frente ao ataque oxidativo de macrófagos. Já foram identificadas também proteínas de parede celular com âncoras GPI-modificadas que parecem facilitar a captação de ferro, sendo seus genes codificantes super-expressos em resposta à deprivação desse metal. Porém a função ainda melhor descrita para as proteínas com âncora GPI é o remodelamento da parede celular durante o crescimento celular, a formação do broto, a divisão celular, a formação das estruturas envolvidas na reprodução sexuada e durante situações de estresses, o que permite a manutenção da integridade da parede celular (De Groot *et al.*, 2005).

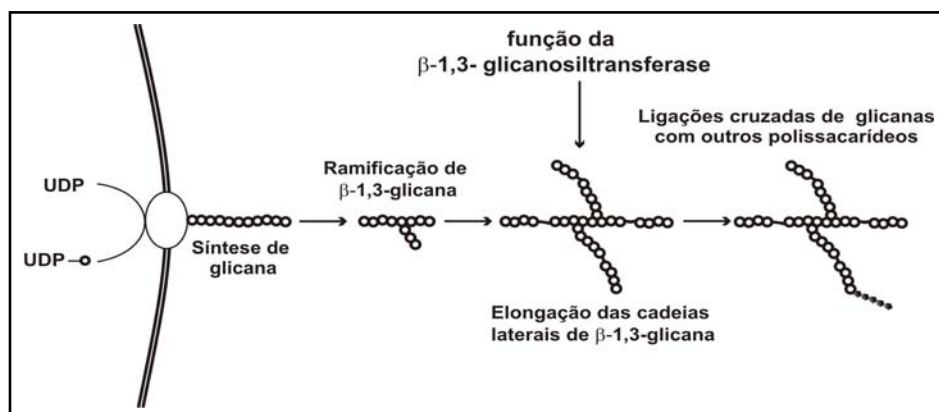
Estudos demonstraram que várias proteínas GPI-ancoradas têm atividade de transglicosidase (Mouyna *et al.*, 2000a; Rodriguez-Pena *et al.*, 2000; Kitagaki *et al.*, 2002; Cabib *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2009). Dentre elas estão as proteínas Gas (glicofosfolípido ancorado à superfície), Phr (pH-regulada), Gel (glicanosiltransferase alongando glicana) e Epd (essencial para o desenvolvimento da pseudohifa) pertencentes à família 72 das glicosil-hidrolases (GH72) (Mouyna *et al.*, 2000b). Essa família de proteínas é requerida para ramificação da hifa, para germinação do conídio, para brotamento da levedura e para manutenção do equilíbrio entre hidrólise e alongamento dos polímeros da parede celular (Mouyna *et al.*, 2000a).

As proteínas Gas/Gel consistem de uma sequência sinal, um centro catalítico, além de um domínio rico em cisteína (classificado como um módulo de ligação a carboidratos, CBM43) ou um motivo rico em serina e treonina, seguido por uma âncora GPI (Hurtado-Guerrero *et al.*, 2009). Baseado na presença ou na ausência do CBM43, a família GH72 é subdividida em GH72<sup>+</sup> e GH72<sup>-</sup>, respectivamente (Ragni *et al.*, 2007b). O genoma de *S.*

*cerevisiae* codifica para cinco proteínas (Gas1-Gas5), sendo duas delas, Gas1 e Gas2, pertencentes à subfamília GH72<sup>+</sup>. Com exceção da Gas3, a atividade de transglicosidase foi reportada a todas essas enzimas (Ragni *et al.*, 2007a; Ragni *et al.*, 2007b). O genoma de *A. fumigatus* contém sete genes (*gel1-gel7*), sendo que apenas Gel1p, Gel2p (ambas GH72<sup>-</sup>) e Gel4p (GH72<sup>+</sup>) são expressas durante o crescimento do micélio em meio rico (Mouyna *et al.*, 2005). Em *Candida albicans* cinco enzimas da família GH72, Phr1-Phr3, Pga4 e Pga5, foram detectadas. Phr1p, Phr2p e Pga5p pertencem à subfamília GH72<sup>+</sup>, enquanto Phr3p e Pga4p pertencem à GH72<sup>-</sup>. Isso demonstra que, independente da presença ou ausência do domínio CBM43, essas proteínas apresentam a mesma atividade glicanosiltransferase (Ragni *et al.*, 2007b). Diferentes enzimas GH72<sup>+</sup> e GH72<sup>-</sup> devem satisfazer as necessidades celulares de remodelar  $\beta$ -1,3-glicana em diferentes condições fisiológicas e em diferentes conformações do substrato. Isso poderia explicar a redundância das enzimas GH72 (Popolo *et al.*, 2008).

Recentemente a primeira estrutura cristalográfica de uma glicanosiltransferase, a ScGas2p, foi apresentada. Revelou-se que o centro catalítico desta enzima interage fortemente com o domínio de ligação à glicana CBM43. O sítio ativo é localizado em uma fenda rica em tirosina, que possui dois ácidos glutâmicos como resíduos catalíticos. Dados de mutagênese sítio-dirigida juntamente com esses de cristalografia sugerem que a ligação do produto no sítio acceptor é crucial para o balanço fino entre hidrólise e transglicosilação, já que a base catalítica torna-se obstruída, o que previne a entrada de uma molécula de água e, assim, a ativação de um novo passo de hidrólise (Hurtado-Guerrero *et al.*, 2009).

A enzima Gel/Gas é capaz de clivar a molécula de  $\beta$ -1,3-glicana internamente e transferir a extremidade redutora recém-gerada para uma não redutora de outra molécula de  $\beta$ -1,3-glicana em um sítio de ramificação (**Figura 3**). A geração de uma nova ligação  $\beta$ -1,3 entre estas moléculas resulta no alongamento da cadeia lateral de  $\beta$ -1,3-glicana, que serve como um esqueleto sobre o qual outros polissacarídeos (quitina e galactomanana, por exemplo) e proteínas da parede celular são aderidos (Mouyna *et al.*, 2000a).



**Figura 3.** Eventos hipotéticos envolvidos na síntese e nas modificações pós-traducionais da  $\beta$ -1,3-glicana na parede celular.  $\beta$ -1,3-glicanosiltransferase deve estar envolvida no terceiro passo: a elongação de cadeias laterais de  $\beta$ -1,3-glicana.

A função essencial dessas enzimas na morfogênese fúngica foi demonstrada por vários estudos de mutação gênica em diferentes organismos. Inicialmente, evidenciou-se que a mutação nula do gene *gas1* de *S. cerevisiae* causa vários defeitos morfológicos, como células com morfologia anormal, defeitos na maturação do brotamento e na separação celular. Além disso, as leveduras tornam-se mais sensíveis à presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) e de *Calcofluor White* e mais resistentes a enzimas hidrolíticas como zimoliase. A linhagem mutante *gas1* $\Delta$ , além de exibir um crescimento reduzido, apresenta alterações estruturais na parede celular, incluindo uma diminuição no conteúdo de glicana e um aumento no conteúdo de quitina (Ram *et al.*, 1994; Ram *et al.*, 1995; Popolo *et al.*, 1993; Popolo *et al.*, 1997). Apesar das variações nas sequências de aminoácidos, as proteínas Gell e Gel2 de *A. fumigatus* e Phr1 e Phr2 de *C. albicans* são capazes de restaurar o defeito causado pela mutação do gene *gas1*, evidenciando que todas essas proteínas catalisam a mesma reação enzimática (Vai *et al.*, 1996).

Foi demonstrado também que Gas2p e Gas4p de *S. cerevisiae* são produzidas exclusivamente durante a esporulação e que ambas as proteínas desempenham papéis redundantes na maturação da parede do esporo. O mutante duplo *gas2* $\Delta$ *gas4* $\Delta$  apresenta redução severa na eficiência de esporulação, um aumento considerável na permeabilidade a substâncias exógenas e a produção de esporos inviáveis. Análises ultraestruturais do esporo indicam que a perda de Gas2p e Gas4p afeta a correta ligação da glicana à camada de

quitosano, provavelmente devido à falta de remodelamento da camada de glicana (Ragni *et al.*, 2007a). Semelhante ao que acontece em *S. cerevisiae*, Gas4p de *Schizosaccharomyces pombe* também é dispensável para o crescimento vegetativo, mas é essencial para a formação do esporo. Mutantes *Spgas4Δ* não dão origem a esporos viáveis, sugerindo que a maturação da parede do esporo é necessária para a manutenção da viabilidade. A ausência de Gas4p induz uma diminuição dos conteúdos de  $\beta$ -1,3-glicana da parede celular, que é compensada pelo aumento da fração  $\alpha$ -glicana e manana (de Medina-Redondo *et al.*, 2008).

Em *A. fumigatus*, o rompimento do gene *gell* não resultou em fenótipo anormal, enquanto que os mutantes *gel2Δ* e *gellΔgel2Δ* exibiram crescimento reduzido, conidiogênese anormal e composição distinta da parede celular, além de serem menos virulentos que a linhagem selvagem em modelo murino de aspergilose invasiva. Esta foi a primeira vez que se demonstrou que a  $\beta$ -1,3-glicanosiltransferase é requerida tanto para a morfogênese quanto para a virulência em *A. fumigatus* (Mouyna *et al.*, 2005). Ensaio de imunoproteção de camundongos com a proteína recombinante Gell1p de *Coccidioides posadasii* demonstraram que esta molécula foi capaz de protegê-los contra a coccidioidomicose (Delgado *et al.*, 2003).

Em *C. albicans*, *phr1* é expresso em valores de pH igual ou maiores que 5,5 e *phr2* é expresso em valores de pH abaixo de 5,5 (Saporito-Irwin *et al.*, 1995; Muhlschlegel & Fonzi, 1997). Dessa forma, o mutante *phr1Δ* é avirulento em modelo murino de infecção sistêmica, com pH próximo da neutralidade; enquanto que em modelo murino de infecção vaginal, cujo pH gira em torno de 4,5, a virulência não é afetada. O contrário ocorre para o mutante *phr2Δ*, que é avirulento em modelo de infecção vaginal e não tem sua virulência afetada em modelo de infecção sistêmica. Isso sugere que Phr1p e Phr2p são essenciais para a adaptação e colonização de *C. albicans* aos diferentes nichos de pH do hospedeiro (De Bernardis *et al.*, 1998).

Em um ensaio de reatividade imunológica, as proteínas recombinantes ScGas1-5 e AfGel1-2 foram reconhecidas especificamente pelos anticorpos presentes no soro de pacientes com aspergilose e candidose. Porém essas proteínas não se demonstraram *Aspergillus*- ou *Candida*-específicas, reagindo cruzadamente com soros de pacientes infectados por esses dois patógenos, que colonizam diferentes sítios no hospedeiro. Esses resultados sugerem que essas

enzimas GPI-ancoradas são constituintes da parede celular reativos imunologicamente e que devem desempenhar um papel importante nas infecções fúngicas humanas de um modo geral (Arroyo *et al.*, 2007).

Recentemente, foi sugerido que a Gas1p de *S. cerevisiae* participa do silenciamento transcricional sítio-específico. Nesse fungo, as três regiões de cromatina silenciada são: os *loci* do tipo reprodutivo (HML e HMR), os telômeros localizados nas extremidades de cada cromossomo e o *locus* do DNA ribossomal (rDNA). O silenciamento requer quatro proteínas reguladoras da informação para silenciamento (Sir), sendo Sir1, Sir3 e Sir4 exclusivas de *S. cerevisiae* e Sir2 conservada de bactérias a humanos (Rusche *et al.*, 2003). A deleção de *gas1* não altera o padrão de silenciamento em HM e resulta em silenciamento reduzido dos telômeros e aumentado do rDNA. Nenhum outro gene apresenta este efeito *locus*-específico no silenciamento gênico da levedura. Foi demonstrado também que a atividade catalítica de Gas1p é requerida para o silenciamento normal e que seu papel no silenciamento é independente de seu papel na biogênese da parede celular, porque outros mutantes de parede celular não apresentam defeitos no silenciamento. Foi demonstrado que Gas1p interage fisicamente com Sir2p, uma deacetilase de histona, o que sugere que a glicanosiltransferase está localizada também na periferia nuclear. O modelo proposto indica que Gas1p modifica o complexo Sir através da adição de um motivo de carboidrato, alterando a capacidade do complexo em formar e manter a cromatina silenciada. Esse estudo revela um novo papel nuclear da  $\beta$ -1,3-glicanosiltransferase no silenciamento transcricional (Koch & Pillus, 2009).

Em um rastreamento do transcrito de *P. brasiliensis* em busca de sequências codificantes para proteínas potencialmente GPI-ancoradas, foram encontradas três possíveis  $\beta$ -1,3-glicanosiltransferases, denominadas Gel1-Gel3 (Castro *et al.*, 2005). Recentemente, constatou-se que tanto os transcritos codificantes para *PbGel3p*, quanto a própria proteína são mais abundantes na fase miceliana do fungo, corroborando o fato de a parede celular do micélio ser composta prioritariamente de  $\beta$ -1,3-glicana. Além disso, análises de microscopia confocal e imunoeletrônica confirmaram a localização preferencial da Gel3p na superfície da célula do fungo. Foi observado também que a proteína *PbGel3* foi capaz de complementar o fenótipo da linhagem de *S. cerevisiae gas1* $\Delta$ , sugerindo seu papel na biossíntese e na morfogênese da parede celular de *P. brasiliensis* (Castro *et al.*, 2009).

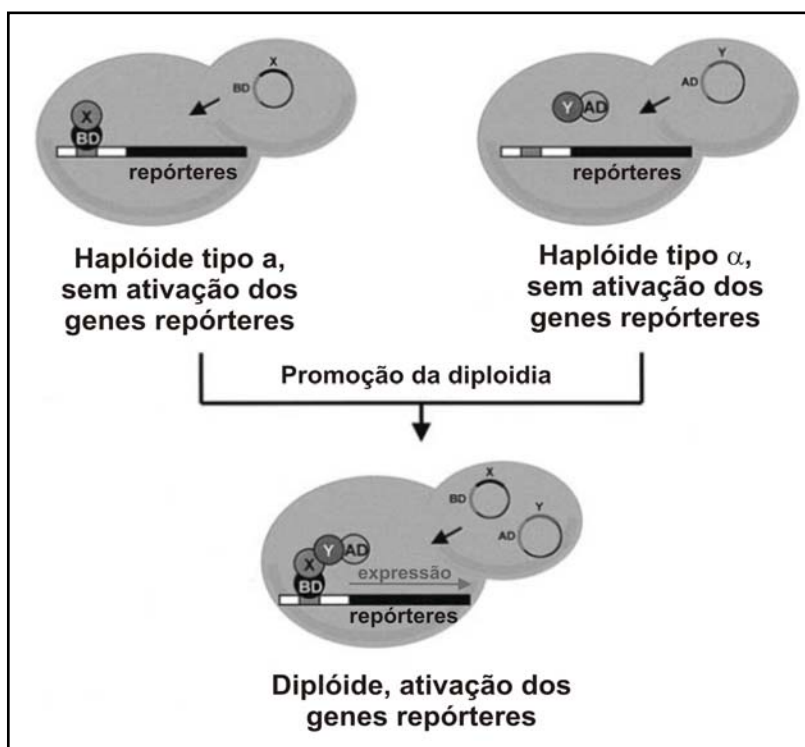
## **I.6. Interações entre proteínas**

Interações proteína-proteína (PPIs) são consideradas o esqueleto básico da organização e homeostase de qualquer organismo vivo (Misteli, 2001). A finalização dos projetos genoma de vários eucariotos superiores demonstrou que a complexidade biológica dos organismos não está acompanhada pelo aumento do número de genes. Sugere-se, então, que essa complexidade é derivada de um elevado padrão de PPIs (Claverie, 2001; Rubin, 2001). Assim um dos enfoques da era pós-genômica é a identificação dessas interações para a inferência de funções a partir de uma proteína associada que já tenha função descrita. Dessa maneira, se a função de uma proteína é conhecida, a função de sua ligante é provavelmente relacionada, conceito denominado de “culpa por associação” (Drewes & Bouwmeester, 2003). Além disso, saber a posição de uma proteína na complexa rede de interações protéicas celulares facilita a descoberta de novos alvos para drogas (Skrabanek *et al.*, 2008).

Inicialmente a detecção de PPIs era limitada a ensaios bioquímicos laboriosos como a coimunoprecipitação e a cromatografia de afinidade. Mas muitas técnicas têm sido desenvolvidas para ampliar e simplificar essa detecção. De uma maneira geral, essas técnicas de identificação de PPIs podem ser divididas em proteômicas e genômicas. As primeiras são representadas por análises de espectrometria de massas de complexos protéicos nativos purificados por captura de afinidade. Nas abordagens genômicas cada proteína de interesse codificada pelo genoma é expressa para o exame de interações mútuas. Nesta categoria incluem-se o sistema de duplo híbrido em levedura e o chip de proteínas. A metodologia de duplo híbrido em levedura possibilita mapear interações entre duas proteínas determinadas ou rastrear uma biblioteca em busca de interações para uma proteína de interesse. Os chips de proteínas são adequados para detectar tanto interações proteína-proteína, quanto proteína-lipídio e proteína-ligante (Drewes & Bouwmeester, 2003; Ito *et al.*, 2001).

O sistema de duplo híbrido em levedura foi desenvolvido originalmente por Fields e Song como uma ferramenta genética de detecção de PPIs em um ambiente celular (Fields & Song, 1989). Essa técnica é baseada no fato de que vários fatores de transcrição eucarióticos possuem dois domínios funcionalmente distintos: o de ligação ao DNA (BD) e o de ativação transcricional (AD). No sistema de duplo híbrido clássico (**Figura 4**), a “isca” é construída pela fusão de uma proteína X com o BD e a “presa” é a fusão de Y com AD. Esses vetores

quando coexpressos em *S. cerevisiae* e as proteínas X e Y interagem, há a reconstituição de um fator de transcrição funcional, que ativar a transcrição de vários genes repórteres contidos no genoma da levedura hospedeira (Auerbach *et al.*, 2002).

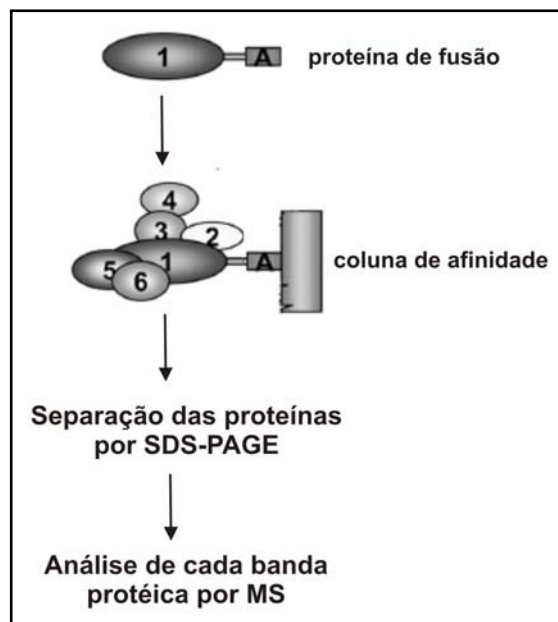


**Figura 4.** Metodologia clássica de duplo híbrido usando diplóides de *S. cerevisiae*. Construções codificantes para duas proteínas (X e Y) que possivelmente interagem, fusionadas com o domínio de ligação ao DNA (BD) e com o de ativação transcricional (AD), respectivamente, são transformadas separadamente em linhagens de tipos reprodutivos opostos (a e α). Após a promoção da diploidia, ambas as construções devem estar presentes em uma mesma célula leveduriforme, se as proteínas X e Y realmente interagirem, haverá a ativação de genes repórteres. Adaptado (Causier & Davies, 2002).

As vantagens desse sistema, além da rapidez e do baixo custo, são a facilidade de análise de interações desconhecidas de uma dada proteína, já que suas ligantes são identificadas por sequenciamento de DNA do inserto de cDNA; a maior proximidade com o que acontece naturalmente, uma vez que o rastreamento das interações é promovido *in vivo* em células de levedura; a facilidade de detecção de interações entre proteínas pouco abundantes e de PPIs fracas, com constante de dissociação acima de 70 μM (Cho *et al.*, 2004). Porém existem também algumas limitações da técnica como: as interações são forçadas a ocorrer no núcleo, inviabilizando o estudo de proteínas que possuem fortes sinais de localização para outras partes da célula, como as proteínas integrais de membrana; fatores de transcrição e outras proteínas podem autoativar a transcrição dos genes repórteres; as proteínas em estudo podem não sofrer as devidas modificações pós-traducionais, excluindo

interações dependentes dessas alterações; as interações que ocorrem na porção N-terminal da proteína podem ser prejudicadas pela presença do BD ou do AD fusionado a essa região. O uso de dois ou mais genes repórteres para verificar as interações eliminam um grande número de falso-positivos, além disso, as interações são geralmente confirmadas por métodos alternativos, como a coimunoprecipitação (Drewes & Bouwmeester, 2003; Causier & Davies, 2002).

Uma maneira alternativa de se estudar as PPIs é purificar o complexo multiprotéico por purificação de afinidade, sendo o tipo mais comum de abordagem denominado de *pull-down* (**Figura 5**). Basicamente, o *pull-down* é uma técnica *in vitro* que consiste de uma proteína isca fusionada, comumente, à glutathiona S-transferase (GST), que pode ser usada para identificar possíveis proteínas ligantes, as presas. A isca, purificada de um sistema de expressão heteróloga, por imobilização a uma resina de afinidade de glutathiona, serve como um suporte de afinidade secundário para ligação das presas. O complexo protéico purificado pode ser resolvido por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) uni ou bidimensional. As proteínas são digeridas por uma protease e os peptídeos digeridos são identificados por espectrometria de massas (MS) (Cho *et al.*, 2004).



**Figura 5.** Purificação por afinidade de complexos protéicos associada à espectrometria de massas (MS). A proteína isca é primeiramente expressa fusionada a uma proteína adjuvante no processo de purificação. Após este processo, o lisado celular é incubado com a proteína de fusão purificada. O complexo protéico é resolvido por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e cada proteína é identificada por MS. Adaptado (Cho *et al.*, 2004).

Algumas das vantagens em se utilizar o ensaio de *pull-down* associado à MS são: as interações são detectadas sob condições similares as do ambiente celular nativo; é possível estudar multicomplexos; a técnica não é restrita a um tipo celular ou a um organismo; é possível estudar a dinâmica das interações protéicas; apenas uma das proteínas do complexo é expressa como proteína de fusão, diminuindo possíveis interferências estéricas. Apesar das inúmeras vantagens, o ensaio apresenta também desvantagens como: altos custos e não identificação de algumas interações pela baixa afinidade entre as proteínas, pelo baixo nível de expressão das proteínas ligantes e pelos limites de detecção do instrumento de MS (Cho *et al.*, 2004; Drewes & Bouwmeester, 2003).

Devido à existência de vantagens e de desvantagens de cada técnica de detecção das PPIs, elas devem ser usadas de forma complementar para produzirem um mapa de PPI compreensível e de alta qualidade. Como ainda não existem ferramentas moleculares para abordagens genéticas clássicas e reversas para estudo de função gênica em *P. brasiliensis*, tem-se utilizado o estudo de PPI para inferência de funções (Borges *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2007).



---

# Justificativa

---

## **II. Justificativa**

A parede celular de microrganismos patogênicos atua como uma barreira inicial no contato entre o parasito e o hospedeiro. Além de funcionar como uma barreira mecânica, ela abriga um arsenal de macromoléculas imunogênicas e, dessa forma, a parede celular de fungos é um potencial alvo para busca de candidatos a vacinas e para estudos de inibição de macromoléculas patogênicas. Uma forma pela qual as proteínas estão associadas à parede celular é através de âncoras-GPI. As proteínas GPI-ancoradas foram reportadas em diversos microrganismos patogênicos como imunogênicas, imunoprotetoras e como importantes fatores de virulência.

A extremidade carboxila hidrofóbica de  $\beta$ -1,3-glicanosiltransferase é característica de proteínas GPI-ancoradas. Esta enzima participa do remodelamento de novos polímeros de  $\beta$ -1,3-glicana na parede celular de fungos, tanto filamentosos quanto leveduriformes. Vários estudos de mutação gênica em diferentes organismos demonstraram a função essencial dessas enzimas na morfogênese, no crescimento e na virulência fúngicos. Além disso, recentemente, foi demonstrado o papel dessa enzima no silenciamento transcricional e sugeriu-se uma nova localização dessa proteína na periferia nuclear.

Na célula, as proteínas participam de uma extensa rede de interações intermoleculares. Essas interações são dinâmicas e dependentes de uma série de sinais intra ou extracelulares. Um passo inicial para se entender a estrutura e a função de uma proteína é determinar com quais outras proteínas ela interage, o que permite estabelecer as vias metabólicas relevantes das quais a molécula alvo participa.

Dessa forma, o estudo da proteína *PbGell* e o rastreamento de suas interações intermoleculares permitem avaliar o papel dessa proteína no remodelamento da parede celular e inferir novos papéis para essa enzima e para suas proteínas ligantes.



---



# Objetivos

---

### III. Objetivo

O presente trabalho visa estudar possíveis interações proteína-proteína realizadas pela  $\beta$ -1,3-glicanosiltransferase 1 de *Paracoccidioides brasiliensis* (PbGel1p), que podem estar associadas à manutenção e ao remodelamento da parede celular do fungo, bem como a outros papéis ainda não bem estabelecidos.

Para isso foram traçadas as seguintes estratégias:

- Rastrear uma biblioteca de duplo híbrido construída em *S. cerevisiae* em busca de prováveis interações intermoleculares *in vivo* da PbGel1p;
- Identificar os transcritos que apresentaram interação com a proteína de interesse através de sequenciamento automático e análises de bioinformática;
- Confirmar *in vitro* algumas interações rastreadas pela técnica de duplo híbrido através de coimunoprecipitação;
- Isolar interações *in vitro* promovidas pela PbGel1p pela metodologia de *pull-down* de proteína fusionada à GST;
- Identificar as interações isoladas por *pull-down* através de espectrometria de massas.



# **Materiais e Métodos**

## **IV. Materiais e Métodos**

### **IV.1. Linhagem do fungo e condições de crescimento**

Foi utilizado neste estudo a linhagem 01 (ATCC MYA-826) de *P. brasiliensis*. O fungo é mantido em nosso laboratório em meio Fava-Netto (Fava-Netto, 1955) na temperatura de 36 °C para a fase de levedura e de 23 °C para a de micélio.

### **IV.2. Rastreamento *in vivo* de interações de *PbGell1p* em uma biblioteca de duplo híbrido**

O rastreamento *in vivo* de prováveis interações da *PbGell1p* com outras proteínas foi realizado utilizando a técnica de duplo híbrido em *S. cerevisiae*, cepas AH109 e Y187, segundo as instruções do sistema comercial *Matchmaker<sup>TM</sup> Library Construction & Screening* (Clontech Laboratories, Inc.). O cDNA codificante para *PbGell1p*, já obtido em nosso laboratório (número de acesso no GenBank: DQ186601), foi ligado no vetor de expressão pGBKT7 (que contém gene *trp1*, permitindo seleção em meio mínimo sem triptofano) em fase de leitura com o BD do fator transcricional de levedura GAL4. A cepa Y187 (tipo reprodutivo  $\alpha$ ), mutada para o gene *trp1*, de *S. cerevisiae* foi transformada com o vetor pGBKT7 – *Pbgell1*. Em paralelo, a biblioteca de cDNA de *P. brasiliensis*, fase de levedura, foi ligada no vetor de expressão pGADT7-Rec (que contém gene *leu2*, permitindo seleção em meio mínimo sem leucina) em fase de leitura com o AD de GAL4. O material foi introduzido na cepa AH109 (tipo reprodutivo  $\alpha$ ), mutada para o gene *leu2*. Posteriormente, as cepas transformadas, Y187 e AH109, foram inoculadas em um mesmo sistema para promoção da diploidia, o que permitiu a transcrição dos genes repórteres *ade2* e *his3* que permitiram a seleção em meio mínimo sem adenina e sem histidina. As leveduras diplóides foram, então, plaqueadas em meio auxotrófico altamente seletivo (sem triptofano, leucina, adenina e histidina) para rastreamento das interações *PbGell1p*-proteínas realizadas.

Para eliminação de falso-positivos, colônias positivas obtidas neste primeiro rastreamento foram transferidas para meio auxotrófico contendo 5-Bromo-4-Cloro-3-Indol-D-

galactopiranosídeo (X- $\alpha$ -Gal), um substrato cromogênico. Esse ensaio monitora a ativação do também gene repórter *mell*, que codifica para a enzima secretada  $\alpha$ -galactosidase. Esta enzima hidrolisa X- $\alpha$ -Gal, levando à formação de um produto final azulado, o que explica a coloração azul das colônias abrigando interações positivas.

### **IV.3. Identificação dos transcritos codificantes para as interações rastreadas**

Para a identificação dos cDNAs codificantes para proteínas que realizam interação com a *PbGel1p*, foram realizadas PCRs do material genômico obtido após aquecimento das colônias selecionadas, utilizando oligonucleotídeos específicos (senso: 5'-CTATTTCGATG ATGAAGATACCCCACCAAACCC-3' e antisenso: 5'-GTGAACTTGCGGGGTTTTTCAG TATCTACGAT-3') para o vetor pGADT7-Rec, fornecidos pelo sistema comercial *Matchmaker<sup>TM</sup> Library Construction & Screening* (Clontech). Os fragmentos de DNA obtidos após as PCRs foram purificados utilizando o sistema comercial *GFX<sup>TM</sup> PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare<sup>®</sup>) e, posteriormente, sequenciados baseado em metodologia já descrita (Sanger *et al.*, 1977), utilizando o sistema comercial de sequenciamento automático *DYEnamic<sup>TM</sup> ET Dye Terminator Kit for MegaBACE<sup>TM</sup>* (GE Healthcare<sup>®</sup>) e o sequenciador MegaBace 1000 DNA (GE Healthcare<sup>®</sup>).

As sequências de DNA foram processadas utilizando-se o programa PHRED (Ewing & Green, 1998; Ewing *et al.*, 1998), com os parâmetros de tamanho mínimo da sequência analisada e de qualidade dos nucleotídeos de 75 e 20, respectivamente. Posteriormente, as sequências que se enquadravam no padrão escolhido foram processadas pelos programas CROSSMATCH (<http://www.genome.washington.edu/UWGC/analysistools/Swat.cfm>) e CAP3 (Huang & Madan, 1999). Em seguida, foram feitas análises de identidade contra o banco do genoma estrutural de *P. brasiliensis* e contra o banco de dados público GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) por blastx (Altschul *et al.*, 1997). Os valores esperados (valores e) foram considerados relevantes quando menores que 1e-05.

#### **IV.4. Confirmação das interações por coimunoprecipitação**

Os cDNAs codificantes para *PbGel1* e para algumas das proteínas rastreadas na biblioteca de duplo híbrido foram transcritos e traduzidos *in vitro* utilizando o sistema comercial *TNT<sup>®</sup> Coupled Reticulocyte Lysate System* (Promega, Madison, USA). Os fragmentos de DNA purificados, amplificados por PCR de material genômico liberado após aquecimento das colônias selecionadas, serviram como molde para a transcrição e tradução *in vitro* na presença de <sup>35</sup>S-metionina (Perkin-Elmer, Wellesley, MA), usando um lisado de reticulócitos de coelho. Após incubação da reação por 90 minutos, a 30 °C, 5-10 µL de reação foi desnaturado a 80 °C, por 10 min, em tampão de amostra (Tris-HCl 50 mM, pH 6,8; 1,4-ditiotreitol (DTT) 100 mM; SDS 2%; azul de bromofenol 0,1%; glicerol 10%). As amostras foram resolvidas em gel de gradiente linear (4-12%) SDS-PAGE, que foi posteriormente fixado em solução de fixação (metanol 50%; ácido acético 10%) por 30 min, seco a 80 °C, por 90 min, sob vácuo, e exposto a filme autoradiográfico por 36-60 horas.

Após a visualização dos produtos de tradução em filme autoradiográfico, as amostras foram submetidas a ensaios de coimunoprecipitação *in vitro* como descrito no sistema comercial *Matchmarker CO-IP* (Clontech Laboratories, Inc.). O inserto *Pbgel1*, clonado no vetor pGBKT7, ao ser transcrito e traduzido *in vitro*, resulta na proteína *PbGel1* fusionada ao epítipo c-Myc (isca). Da mesma forma, os cDNAs clonados em pGADT7-Rec resultam em proteínas fusionadas ao epítipo hemaglutinina (HA) – presas. Para confirmar a interação entre essas proteínas, a isca e cada uma das presas foram incubadas em um mesmo sistema por 1 h, a 25 °C. Após esse período, foi adicionado o anticorpo anti-c-Myc ao sistema, que foi incubado por mais 1 h, a 25 °C. Para precipitação da interação, foram utilizadas esferas de agarose recobertas por proteína A, que têm afinidade pelo anticorpo comercial utilizado. Após diversas lavagens, para retirada das ligações inespecíficas, o complexo protéico foi eluído por aquecimento a 80 °C, por 10 min, em tampão de amostra (acima citado), e as proteínas foram resolvidas por SDS-PAGE. O gel foi fixado e, posteriormente, incubado com 20 mL de reagente de amplificação fluorográfica *NAMP100 Amersham Amplify Fluorographic Reagent* (GE Healthcare<sup>®</sup>). Após 20 min, o gel foi seco e exposto a filme autoradiográfico por 10-60 dias.

Os controles negativos foram realizados incubando cada uma das presas com o anticorpo anti-c-Myc para confirmar que a interação detectada era produto de associação entre a isca e a presa, e não um artefato de ligação da presa ao anticorpo anti-c-Myc.

#### **IV.5. Expressão e purificação da proteína recombinante *PbGell***

O cDNA codificante para *PbGell*p, clonado no vetor de expressão pGEX-4T-3 (GE Healthcare), já obtido em nosso laboratório (Castro, 2008), foi introduzido na linhagem BL21 Star<sup>TM</sup>(DE3)pLysS (Invitrogen<sup>TM</sup> Life technologies) de *Escherichia coli* por choque térmico. 50 ng do plasmídeo recombinante foi incubado com 100 µL de célula competente por 60 min, em gelo. Após o choque térmico (42 °C por 1 min e 0 °C por 2 min), as células foram recuperadas em meio Lúria-Bertani (LB) líquido (triptona 10 g, NaCl 10 g, extrato de levedura 5 g, água destilada (q.s.p.) 1.000 mL, pH 7,0) por 1 h, a 37 °C, sob agitação lenta (150 rpm). Para seleção dos transformantes, as células recuperadas foram semeadas em meio LB contendo 1,2% de ágar, 100 µg/mL de ampicilina, 34 µg/mL de cloranfenicol e 0,02 M de glicose. As placas foram incubadas a 37 °C, por 16 h.

Foram selecionadas duas colônias crescidas em meio sólido para serem inoculadas em meio LB líquido (contendo 100 µg/mL de ampicilina, 34 µg/mL de cloranfenicol e 0,02 M de glicose) e crescidas a 37 °C, por 16 h, sob agitação vigorosa (200 rpm). Foi utilizado 1% deste pré-inóculo para a preparação de um litro de inóculo em LB líquido (contendo 100 µg/mL de ampicilina, 34 µg/mL de cloranfenicol e 0,02 M de glicose), que foi incubado a 20 °C, sob agitação vigorosa até a densidade óptica medida a 600 nm (DO<sub>600</sub>) de 0,5. Para indução da síntese da proteína recombinante, foi adicionado 0,1 mM de isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e a incubação de células procedeu-se por mais 16 h, a 15 °C, sob agitação vigorosa. O controle da indução foi realizado pela não adição de IPTG a uma alíquota de 5 mL do inóculo, que foi submetido às mesmas condições de incubação do sistema de indução. Após as 16 h de incubação, as células foram recuperadas por centrifugação (2.000 x g, 10 min) e ressuspensas em 50 mL de tampão fosfato-salino (PBS) 1x (NaCl 0,14 M; KCl 2,7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM; pH 7,4). Para confirmar a indução da síntese da proteína *PbGell* fusionada à GST, 15 µL de cada amostra (controle e

indução) foram submetidos a SDS-PAGE e o gel analisado após coloração por azul brilhante de Comassie G-250. O restante da amostra foi congelado à -20 °C.

As células foram lisadas por sonicação em gelo para solubilização da proteína recombinante. Foram utilizados 20 ciclos de sonicação de 30 segundos cada e 1 min de intervalo entre eles, no Desruptor de células ultrassônico (Unique Group), com micropona de titânio catenoidal de 4 mm de diâmetro. O lisado de células foi centrifugado a 20.000 x g, por 10 min, para separação dos fragmentos celulares. Para confirmação da solubilização da *PbGellp*, alíquotas do sobrenadante e do sedimento foram analisadas por SDS-PAGE e coloração do gel por azul brilhante de Comassie G-250.

Para purificação da proteína recombinante, foi utilizado 5 mL do sobrenadante da sonicação a uma concentração de 3,6 mg/mL para incubação com 166,67 µL da resina *glutathionesepharose 4B* (GE Healthcare) por 40 min, no gelo, sob agitação suave. Essa matriz de sefarose contendo glutathiona imobilizada apresenta afinidade pela proteína GST expressa fusionada à proteína recombinante de interesse. A resina foi lavada 30 vezes com PBS 1x a 37 °C, para retirada das ligações inespecíficas, e ressuspensa em 83 µL deste mesmo tampão.

Para fins de controle experimental do *pull-down*, os mesmos procedimentos, em menor escala, foram realizados com o vetor pGEX-4T-3 para expressão apenas da proteína GST. Desta maneira, foi induzido 400 mL de inóculo de células transformadas com o plasmídeo pGEX-4T-3. As células foram lisadas por 15 ciclos de sonicação e 1,2 mL do sobrenadante deste procedimento, a uma concentração de 3,6 mg/mL, foi incubado com 40 µL de resina. Após 40 min, no gelo, sob agitação suave, a resina foi lavada cinco vezes com PBS 1x a 37 °C e ressuspensa em 1 mL deste tampão.

Alíquotas de 10 µL de ambas as resinas purificadas foram analisadas por SDS-PAGE e coloração por azul brilhante de Comassie G-250.

#### **IV.6. Obtenção do extrato celular de leveduras de *P. brasiliensis***

Células leveduriformes de *P. brasiliensis* congeladas com nitrogênio líquido foram maceradas com pistilo em um graal até a ruptura total das células. Neste momento, o macerado foi transferido para um tubo tipo Falcon e foram adicionados tampão Tris-cálcio (Tris-HCl 20 mM, pH 8,8; CaCl<sub>2</sub> 2 mM) com 1% de inibidor de proteases (*Protease Inhibitor mix 100x*, Amersham) e pérolas de vidro. Após agitação por 30 min, a 4 °C, a amostra foi centrifugada a 2.000 x g por 15 min. O sobrenadante foi transferido para tubos do tipo Eppendorf e centrifugado por mais 15 min, a 20.000 x g. O extrato protéico clarificado foi analisado por SDS-PAGE e quantificado pelo reagente de Bradford (Sigma Aldrich), usando BSA (soro-albumina bovina) como padrão.

#### **IV.7. Isolamento de interações *in vitro* da *PbGel1* por *pull-down* de proteína fusionada à GST**

Inicialmente, 6 mg do extrato protéico clarificado foi incubado com 10 µL da resina ligada somente à GST por 2 h, a 4 °C, sob agitação suave. O sistema foi centrifugado a 200 x g por 5 min. O sobrenadante, livre das ligações inespecíficas com a GST, foi incubado com 50 µL da resina ligada à proteína de fusão *PbGel1* por 3 h, a 4 °C, sob agitação suave. Ambas as resinas foram lavadas quatro vezes com PBS 1x gelado e ressuspensas em 20 µL de tampão de amostra. Após eluição do complexo protéico ligado às resinas por aquecimento a 80 °C por 10 min, as amostras foram submetidas a SDS-PAGE, juntamente com alíquotas das resinas não submetidas ao *pull-down*, como controle. O gel foi corado com *PhastGel<sup>TM</sup> Blue R* (GE Healthcare) e as proteínas exclusivas da amostra obtida após o *pull-down* com a proteína de fusão *PbGel1* foram selecionadas e retiradas do gel para identificação por espectrometria de massas (MS).

#### **IV.8. Proteólise e identificação dos peptídeos por espectrometria de massas**

As proteínas selecionadas, ainda aprisionadas na malha do gel de poliácridamida, foram lavadas com água ultrapura e incubadas em acetonitrila por 5 min. O solvente foi seco

sob vácuo e as amostras foram agitadas rapidamente em 25 mM de bicarbonato de amônio (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) contendo 10 mM de DTT e mantidas a 56 °C por 60 min para redução das pontes dissulfeto. O sobrenadante foi removido e substituído por 55 mM de iodocetamida em 25 mM de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> para alquilação dos resíduos de cisteína. Após 45 min de incubação ao abrigo da luz, a 25 °C, o sobrenadante foi retirado e foi adicionada uma solução de 25 mM de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. Após 10 min de agitação, a solução foi substituída por outra de 50% de acetonitrila em 25 mM de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> e a agitação procedeu-se por mais 5 min. Esta lavagem foi repetida e o líquido foi seco sob vácuo. Os fragmentos de gel foram reidratados com tripsina (Promega, Madison, WI) a 10 ng/μL, no gelo, por 10 min. O excesso da protease foi retirado e foi adicionado o tampão bicarbonato para incubação das amostras por 16 h, a 37 °C.

Os peptídeos resultantes da digestão triptica foram extraídos dos fragmentos do gel pela adição de uma solução 50% acetonitrila, 5% ácido trifluoroacético (TFA), agitação por 10 min e três ciclos de 1 min de sonicação em gelo, utilizando o aparelho *Sonopuls HD2200* com macroponta de titânio de 10 mm de diâmetro (Bandelin electronics). O sobrenadante foi coletado e este passo foi repetido com os fragmentos de gel. Todo o sobrenadante obtido nestes passos foi totalmente seco sob vácuo e os fragmentos peptídicos resultantes foram ressuspensos em 5 μL de água ultrapura. 2 μL das amostras foram analisadas em um espectrômetro de massas *MALDI-Synapt MS<sup>TM</sup>* (Waters-Micromass, Manchester, UK). A lista de massas dos peptídeos obtidos de cada espectro foi verificada usando a ferramenta *online* MASCOT (<http://www.matrixscience.com>), com os seguintes parâmetros: banco de dados NCBIInr; taxonomia Fungos ou todas as entradas; enzima tripsina com 0-1 clivagem perdida; modificação fixa carbamidometilação da cisteína; modificação variável oxidação da metionina; tolerância do peptídeo, em média, 50-100 ppm; *score* > 71 para Fungos e > 83 para todas as entradas.



---

# Resultados

---

## V. Resultados

### V.1. Detecção *in vivo* de possíveis proteínas ligantes a *PbGel1p*

A linhagem Y187 de *S. cerevisiae*, abrigando a isca *PbGel1p* fusionada ao BD do fator transcricional GAL4 e a linhagem AH109, abrigando uma biblioteca de cDNAs de *P. brasiliensis* na fase de levedura, expressos em fusão com o AD desse mesmo fator transcricional, foram colocadas em um mesmo sistema para a promoção da diploidia. O fator de transcrição GAL4 somente é funcional se os seus dois domínios, o de ligação e o de ativação, estiverem interagindo fisicamente. Pela técnica de duplo híbrido, isso só é possível se ambos os plasmídeos, o da isca e o da presa, estiverem presentes na linhagem diplóide e se as proteínas codificadas por esses vetores estiverem interagindo, o que aproxima os dois domínios do fator transcricional, permitindo a ativação de genes repórteres regulados por GAL4. Após a seleção dos diplóides em meio auxotrófico altamente seletivo, foram obtidos e sequenciados mais de 150 clones, em busca de possíveis proteínas que interagem com *PbGel1p*. Após análises de bioinformática, foram rejeitadas 16 sequências por tamanho e 13 por qualidade, resultando em 13 *contigs* e 25 *singlets*, que foram analisados contra bancos de dados genômicos (Genoma estatural de *P. brasiliensis* - <http://www.broadinstitute.org/> - e GenBank - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e são mostrados na **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Produtos gênicos identificados no rastreamento pela técnica de duplo híbrido, que possivelmente interagem com *Gel1p* de *P. brasiliensis*

| Produto gênico   | Organismo/<br>número de acesso <sup>a</sup>  | Valor e | Redundância | Função clássica <sup>b</sup>                         |
|--|--|---------|-------------|--|
| Componente da subunidade beta da piruvato desidrogenase E1   | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/<br>PAAG_01534.1 | 0.0     | 2           | Conversão do piruvato a acetil-CoA e CO <sub>2</sub> |
| Farnesiltransferase, subunidade alfa                         | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/<br>PAAG_00717.1 | 2e-30   | 1           | Modificação pós-traducional                          |
| Fator 3 de iniciação da tradução em eucariotos, subunidade B | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/<br>PAAG_06084.1 | 0.0     | 1           | Síntese de proteínas                                 |

| <b>Produto gênico</b>  | <b>Organismo/<br/>número de acesso<sup>a</sup></b> | <b>Valor e</b> | <b>Redundância</b> | <b>Função clássica<sup>b</sup></b>                   |
|--|--|----------------|--------------------|--|
| Fator de alongamento transcricional spt6                       | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/<br>PAAG_06021.1       | 0.0            | 1                  | Regulação da transcrição                             |
| Fator transcricional B da RNA polimerase II, subunidade 2      | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/<br>PAAG_06332.1       | 3e-26          | 1                  | Regulação da transcrição                             |
| Fator transcricional RfeF                                      | <i>Uncinocarpus reesii</i> /<br>XP_002543789       | 2e-23          | 1                  | Regulação da transcrição                             |
| Glicina desidrogenase  | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/<br>PAAG_01568.1       | 0.0            | 3                  | Catabolismo de glicina                               |
| Permease de $\alpha$ -glicosídeos MPH2/3                       | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/<br>PAAG_03768.1       | 0.0            | 1                  | Transporte de $\alpha$ -glicosídeos                  |
| Piruvato quinase   | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/<br>PAAG_06380.1       | 0.0            | 1                  | Glicólise, conversão de piruvato a fosfoenolpiruvato |
| Proteína bifuncional da biossíntese de arginina, ArgJ          | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/<br>PAAG_07327.1       | 0.0            | 2                  | Biossíntese de arginina                              |
| Proteína contendo domínio sulfatase                            | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/<br>PAAG_06408.1       | 1e-28          | 1                  | Metabolismo  |
| Proteína da família GDSL Lipase/Acilhidrolase                  | <i>P. brasiliensis</i> Pb18/<br>PADG_05353.1       | 7e-25          | 2                  | Metabolismo de lipídeo                               |
| Proteína de choque térmico (HSP90)                             | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/<br>PAAG_05679.1       | 6e-20          | 4                  | Chaperona  |
| Proteína de controle da divisão celular (septina)              | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/<br>PAAG_00182.1       | 7e-31          | 1                  | Citocinese   |
| Proteína de silenciamento gênico e RNA de interferência (Qde2) | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/<br>PAAG_03231.1       | 1e-34          | 3                  | Ligante de ácidos nucleicos                          |
| Putativa fosfatase ácida                                       | <i>P. marneffeii</i> /<br>XP_002150342             | 2e-23          | 1                  | Hidrolase  |
| Timina dioxigenase   | <i>P. brasiliensis</i> Pb03/<br>PABG_00548.1       | 0.0            | 3                  | Atividade oxidorrredutase                            |
| Tubulina, cadeia alfa-1  | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/<br>PAAG_01647.1       | 0.0            | 2                  | Integrante do citoesqueleto                          |
| Proteína hipotética conservada                                 | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/<br>PAAG_02133.1       | 2e-34          | 3                  | Desconhecida   |
| Proteína hipotética conservada                                 | <i>P. brasiliensis</i> Pb18/<br>PADG_08533.1       | 3e-07          | 68                 | Desconhecida   |

| Produto gênico                 | Organismo/<br>número de acesso <sup>a</sup>  | Valor e | Redundância | Função clássica <sup>b</sup> |
|--------------------------------|--|---------|-------------|------------------------------|
| Proteína hipotética conservada | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/<br>PAAG_08978.1 | 3e-29   | 1           | Desconhecida                 |
| Proteína hipotética conservada | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/<br>PAAG_04059.1 | 5e-25   | 1           | Desconhecida                 |
| Proteína hipotética conservada | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/<br>PAAG_07893.1 | 5e-32   | 1           | Desconhecida                 |
| Proteína hipotética conservada | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/<br>PAAG_00276.1 | 0.0     | 1           | Desconhecida                 |
| Proteína hipotética conservada | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/<br>PAAG_01477.1 | 0.0     | 1           | Desconhecida                 |
| Proteína hipotética conservada | <i>P. brasiliensis</i> Pb03/<br>PABG_01048.1 | 1e-45   | 1           | Desconhecida                 |
| Proteína predita               | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/<br>PAAG_00937.1 | 3e-33   | 1           | Desconhecida                 |
| Proteína predita               | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/<br>PAAG_00876.1 | 1e-17   | 1           | Desconhecida                 |
| Proteína predita               | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/<br>PAAG_06376.1 | 0.0     | 1           | Desconhecida                 |
| Proteína predita               | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/<br>PAAG_08744.1 | 3e-44   | 1           | Desconhecida                 |
| Proteína hipotética *          | --   | --      | 2           | Predita                      |
| Proteína hipotética *          | --   | --      | 3           | Predita                      |
| Proteína hipotética *          | --   | --      | 2           | Predita                      |
| Proteína hipotética *          | --   | --      | 1           | Predita                      |
| Proteína hipotética *          | --   | --      | 1           | Predita                      |
| Proteína hipotética *          | --   | --      | 1           | Predita                      |
| Proteína hipotética *          | --   | --      | 1           | Predita                      |
| Proteína hipotética *          | --   | --      | 1           | Predita                      |

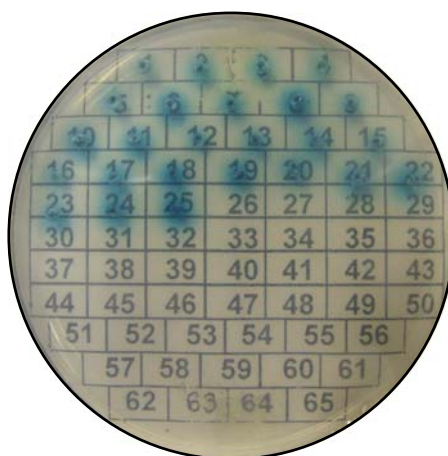
<sup>a</sup>: os números de acesso contendo os códigos PAAG, PABG e PADG referem-se ao Banco do Genoma estrutural de *P. brasiliensis* (<http://www.broadinstitute.org/>) e aqueles que contêm o código XP referem-se ao GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>);

<sup>b</sup>: função definida com base nas informações contidas no banco de dados UniProt (<http://www.uniprot.org/>);

\*: não foi encontrada identidade nos bancos de dados utilizados.

## V.2. Exclusão de clones falso-positivos baseado na ativação transcricional do gene repórter *mell*

Alguns dos clones de cDNA sequenciados foram plaqueados em meio auxotrófico altamente seletivo contendo X- $\alpha$ -Gal para observação da ativação transcricional do gene repórter *mell* de *S. cerevisiae*, um gene GAL4-regulado, codificante para a enzima alfa-galactosidase. Todos os 25 clones selecionados apresentaram ativação do gene repórter *mell*, apresentando-se azuis (**Figura 6**) e confirmando que houve interação entre a *PbGel1p* e os produtos gênicos listados na **Tabela 2**.



**Figura 6.** Colônias positivas selecionadas em meio com X- $\alpha$ -Gal, um substrato cromogênico. Esse ensaio monitora a ativação do gene repórter *mell*, que codifica para a enzima secretada  $\alpha$ -galactosidase. Esta enzima hidrolisa X- $\alpha$ -Gal, levando à formação de um produto final azulado, o que explica a coloração azul das colônias abrigando interações positivas.

**Tabela 2.** Produtos gênicos identificados no rastreamento da biblioteca de duplo híbrido e confirmadas por ativação do gene repórter *mell*, que possivelmente interagem com *PbGel1p*

| Clones de cDNA<br>(Colônias da Figura 6) | Produto gênico  | Organismo/<br>número de acesso               | Valor e |
|--|---|--|---------|
| 1 e 2*                                   | Glicina desidrogenase   | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/<br>PAAG_01568.1 | 0.0     |
| 3-5                                      | Proteína de choque térmico (HSP90)                                | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/<br>PAAG_05679.1 | 6e-20   |
| 6*                                       | Proteína de silenciamento gênico e<br>RNA de interferência (Qde2) | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/<br>PAAG_03231.1 | 1e-34   |

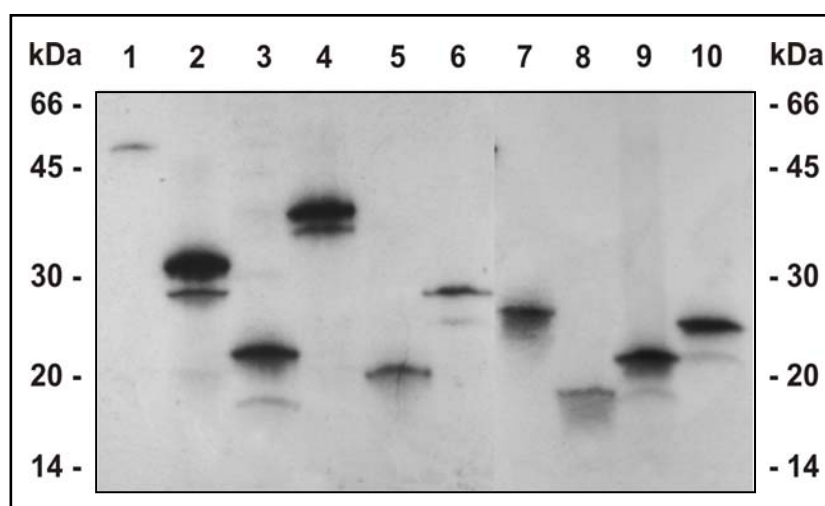
| Clones de cDNA<br>(Colônias da Figura 6) | Produto gênico  | Organismo/<br>número de acesso               | Valor e |
|--|---|--|---------|
| 7  | Fator transcricional RfeF                                       | <i>Uncinocarpus reesii</i> /<br>XP_002543789 | 2e-23   |
| 8 e 14                                   | Proteína hipotética conservada                                  | <i>P. brasiliensis</i> Pb18/<br>PADG_08533.1 | 1e-06   |
| 9-11                                     | Timina dioxigenase  | <i>P. brasiliensis</i> Pb03/<br>PABG_00548.1 | 0.0     |
| 12 e 13*                                 | Componente da subunidade beta da<br>piruvato desidrogenase E1   | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/<br>PAAG_01534.1 | 0.0     |
| 15*                                      | Permease de $\alpha$ -glicosídeos MPH2/3                        | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/<br>PAAG_03768.1 | 0.0     |
| 16*                                      | Piruvato quinase  | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/<br>PAAG_06380.1 | 0.0     |
| 17                                       | Proteína hipotética conservada                                  | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/<br>PAAG_07893.1 | 5e-32   |
| 18*                                      | Fator de alongamento transcricional<br>spt6                     | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/<br>PAAG_06021.1 | 0.0     |
| 19                                       | Tubulina, cadeia alfa-1   | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/<br>PAAG_01647.1 | 0.0     |
| 20                                       | Proteína hipotética   | <i>P. brasiliensis</i> Pb03/<br>PABG_01048.1 | 1e-45   |
| 21*                                      | Putativa fosfatase ácida  | <i>P. marneffeii</i> /<br>XP_002150342       | 2e-23   |
| 22*                                      | Proteína da família GDSL<br>Lipase/Acilhidrolase                | <i>P. brasiliensis</i> Pb18/<br>PADG_05353.1 | 7e-25   |
| 23                                       | Proteína hipotética conservada                                  | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/<br>PAAG_04059.1 | 5e-25   |
| 24                                       | Fator 3 de iniciação da tradução em<br>eucariotos, subunidade B | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/<br>PAAG_06084.1 | 0.0     |
| 25*                                      | Farnesiltransferase, subunidade alfa                            | <i>P. brasiliensis</i> Pb01/<br>PAAG_00717.1 | 2e-30   |

\*: interações confirmadas por coimunoprecipitação

### V.3. Confirmação de interações por coimunoprecipitação

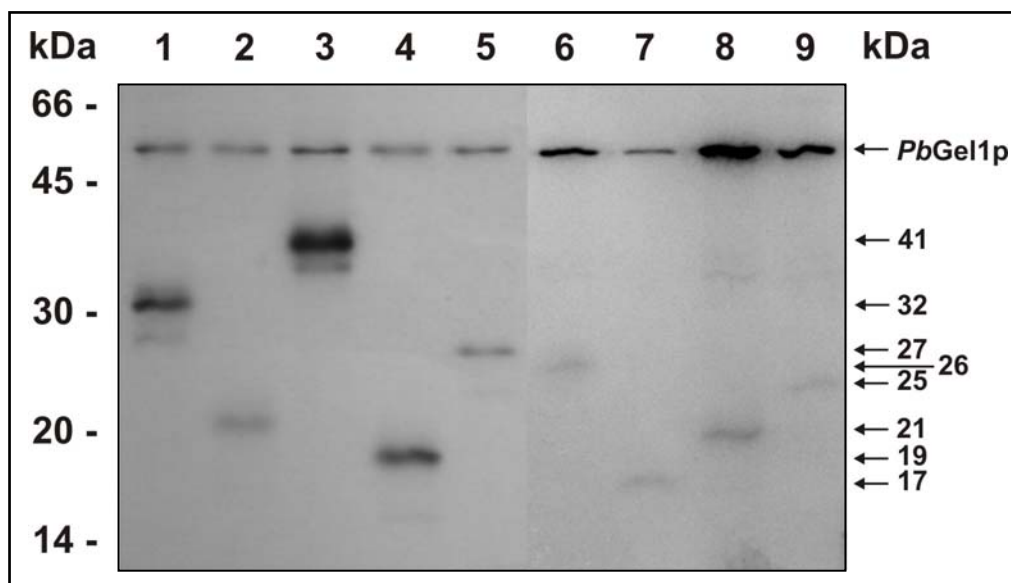
Para confirmação de algumas interações rastreadas pela técnica de duplo híbrido foi realizada a coimunoprecipitação *in vitro*. Foram escolhidas nove interações para validação da técnica *in vivo* utilizada, todas elas foram confirmadas pelo ensaio de degradação de X- $\alpha$ -Gal (clones marcados com um asterisco na **Tabela 2**). Esses clones foram escolhidos com base na anotação dos produtos gênicos que interagiram com *PbGel1p*. Proteínas de diferentes vias foram selecionadas para elucidar possíveis funções ainda desconhecidas que possam ser atribuídas a esta glicosiltransferase. Os produtos gênicos selecionados foram: glicina desidrogenase, proteína de silenciamento gênico e RNA de interferência (Qde2), piruvato desidrogenase, permease de  $\alpha$ -glicosídeos Mph2/3, piruvato quinase, fator de alongamento transcricional spt6, fosfatase ácida, proteína da família GDSL e farnesiltransferase.

Antes da coimunoprecipitação, as proteínas pesquisadas foram transcritas e traduzidas *in vitro* na presença de  $^{35}$ S-metionina, o que possibilita análise por autoradiografia (**Figura 7**). Os tamanhos dos peptídeos obtidos nesta etapa foram de: 55 kDa para *PbGel1* (isca), 32 kDa para piruvato desidrogenase, 21 kDa para permease de  $\alpha$ -glicosídeos Mph2/3, 41 kDa para fosfatase ácida, 19 kDa para proteína da família GDSL, 27 kDa para farnesiltransferase, 26 kDa para glicina desidrogenase, 17 kDa para proteína de silenciamento gênico e RNA de interferência (Qde2), 21 kDa para piruvato quinase e 25 kDa para fator de alongamento transcricional spt6.



**Figura 7.** *PbGel1p* e proteínas rastreadas sintetizadas *in vitro* na presença de  $^{35}$ S-metionina. Os géis foram expostos a filme autoradiográfico por 36-60 h. 1: a isca, *PbGel1p*, com o epítipo c-Myc. 2 a 10: as presas com o epítipo HA (2: piruvato desidrogenase; 3: permease de  $\alpha$ -glicosídeos Mph2/3; 4: fosfatase ácida; 5: proteína da família GDSL; 6: farnesiltransferase; 7: glicina desidrogenase; 8: proteína de silenciamento gênico e RNA de interferência (Qde2); 9: piruvato quinase e 10: fator de alongamento transcricional spt6).

Neste processo, a isca foi sintetizada fusionada ao epítipo c-Myc e as presas ao epítipo HA. Após incubação em um mesmo sistema, a isca e a presa interagiram e foram coimunoprecipitadas com o anticorpo comercial anti-cMyc (**Figura 8**). Como as coimunoprecipitações foram bem sucedidas, os dados obtidos no rastreamento do duplo híbrido puderam ser validados.

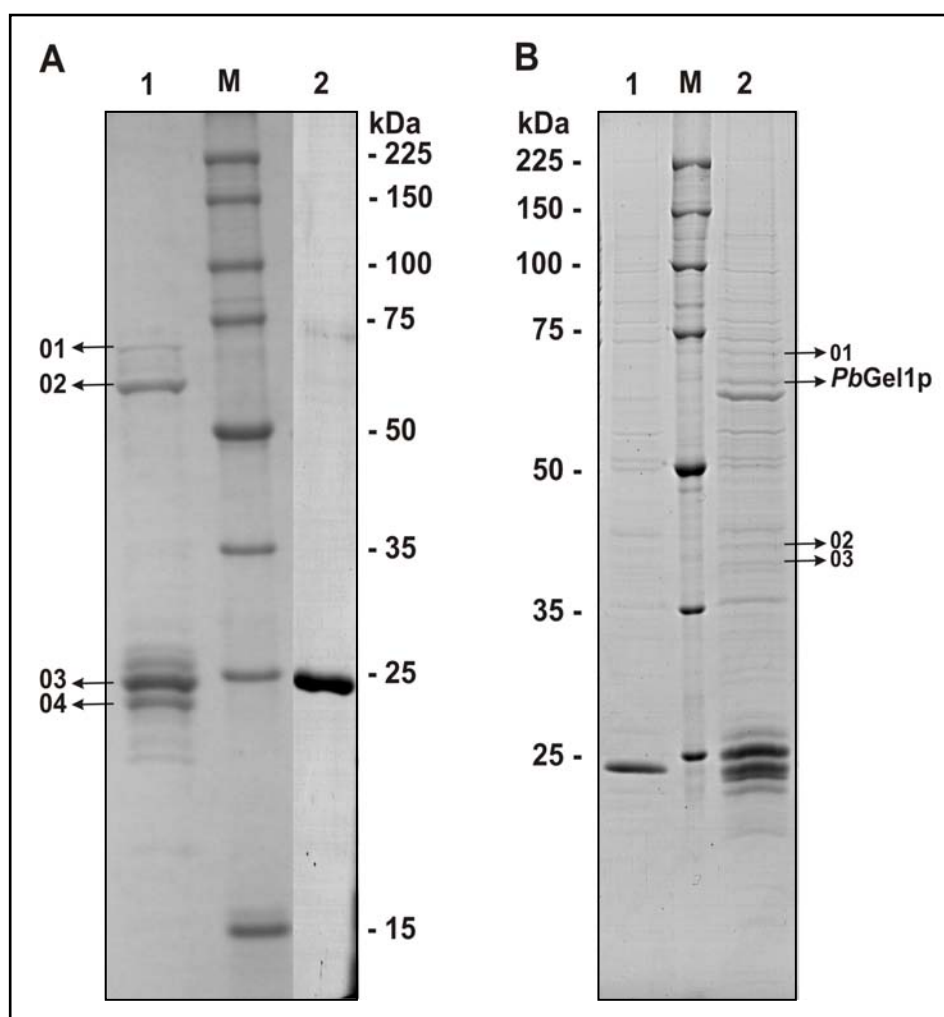


**Figura 8.** Confirmação de algumas das interações rastreadas na biblioteca de duplo híbrido por coimunoprecipitação. Após a transcrição e tradução *in vitro*, a isca e as presas foram imunoprecipitadas usando o anticorpo contra o epítipo c-Myc. Após resolução dessas interações por SDS-PAGE, os géis foram expostos a filme autoradiográfico por 10-60 dias. 1: *PbGel1p* + piruvato desidrogenase; 2: *PbGel1p* + permease de  $\alpha$ -glicosídeos Mph2/3; 3: *PbGel1p* + fosfatase ácida; 4: *PbGel1p* + proteína da família GDSL; 5: *PbGel1p* + farnesiltransferase; 6: *PbGel1p* + glicina desidrogenase; 7: *PbGel1p* + proteína de silenciamento gênico e RNA de interferência (Qde2); 8: *PbGel1p* + piruvato quinase; 9: *PbGel1p* + fator de alongamento transcricional spt6. Os números à esquerda representam os tamanhos referentes ao marcador de massa molecular utilizado e os números à direita representam os tamanhos das proteínas obtidas neste ensaio. Os controles negativos foram realizados.

#### V.4. Interações *PbGel1p*-proteínas isoladas através de ensaio de *pull-down*

Em busca de outras proteínas que pudessem interagir com a *PbGel1p*, que não tivessem sido isoladas pela metodologia de duplo híbrido, foi realizado ensaio de *pull-down* com a *PbGel1p* fusionada à GST, seguido de identificação por MS. Para isso, inicialmente, a proteína recombinante *PbGel1* foi expressa fusionada à GST e, posteriormente, purificada por uma resina de afinidade. Da mesma maneira, foi purificada a proteína GST não fusionada para ser utilizada como controle nos ensaios de *pull-down* (**Figura 9A**). A massa predita para

a proteína híbrida é de 73 kDa (47 kDa para *PbGel1p* e 26 kDa para GST), correspondente à proteína 01, de 71 kDa da **Figura 9A**. Para confirmar esse dado teórico, as proteínas 01, 03 e 04 (as duas últimas próximas à massa teórica da proteína adjuvante na purificação, 23 kDa e 22 kDa, respectivamente) foram submetidas à proteólise e à identificação por MS. Além disso, a proteína 02, de 62 kDa, foi submetida aos mesmos procedimentos. Os dados de identificação proteômica estão compilados na **Tabela 3**.



**Figura 9.** Determinação de interações *in vitro* entre a *PbGel1p* e proteínas do extrato total de células leveduriformes de *P. brasiliensis*. (A) Purificação das proteínas *PbGel1p* recombinante (canaleta 1) e GST (canaleta 2) por resina de afinidade. As proteínas numeradas, visualizadas após purificação da proteína recombinante, foram retiradas do gel e identificadas por MS (Tabela 3). (B) Após purificação das proteínas, a GST foi incubada com o extrato total de *P. brasiliensis* para remoção de proteínas ligantes inespecíficas (canaleta 1). O sobrenadante desse *pull-down* controle foi incubado com a proteína de fusão *PbGel1p*-GST purificada. O complexo protéico resultante dessa interação foi resolvido por SDS-PAGE (canaleta 2). As proteínas numeradas, exclusivas do *pull-down* teste, foram retiradas do gel e identificadas por MS (Tabela 3). M: marcador de massa molecular.

Após análise dos resultados, verificou-se que a proteína de 62 kDa, identificada como GroEL, uma chaperonina de 57 kDa de *E. coli*, é frequentemente copurificada com as proteínas fusionadas à GST (Ellis & van der Vies, 1991). Constatou-se também que a proteína 01 correspondia à *PbGel1p* e que a 03 e a 04 correspondiam à GST, talvez a última indicando uma tradução incompleta. A purificação da GST não fusionada apresentou-se bastante eficiente, como esperado (canaleta 2, **Figura 9A**).

Após purificação das proteínas, a resina ligada à GST não fusionada foi incubada com o extrato total de células leveduriformes de *P. brasiliensis* para retirada de ligações inespecíficas, que ocorrem apenas pela presença da GST. O sobrenadante desse *pull-down* controle foi removido e incubado com a resina ligada à proteína *PbGel1* recombinante, permitindo interações específicas entre proteínas de *P. brasiliensis* e a *PbGel1p*. Os complexos protéicos formados durante a incubação com as resinas foram precipitados após centrifugação e resolvidos por SDS-PAGE unidimensional (**Figura 9B**) para seleção das proteínas exclusivas do *pull-down* teste (canaleta 2, **Figura 9B**). As proteínas 01 de 74 kDa, 02 de 43 kDa e 03 de 41 kDa foram retiradas do gel e identificadas por MS (**Tabela 3**). Estas proteínas foram identificadas como ATP-citrato sintase, actina e isocitrato desidrogenase, respectivamente.

Tabela 3. Proteínas identificadas por espectrometria de massas

| Número da proteína (Figura 9) | Proteína identificada     | Origem/ número de acesso             | Score | Cobertura | Número de peptídeos encontrados | Massa teórica (kDa) | Massa calculada (kDa) |
|-------------------------------|---------------------------|--------------------------------------|-------|-----------|---------------------------------|---------------------|-----------------------|
| 01A                           | Gel1                      | <i>P. brasiliensis</i> / gi 94983887 | 74*   | 30%       | 10                              | 48,70               | 70,76**               |
| 02A                           | GroEL                     | <i>E. coli</i> / gi 38492782         | 148   | 57%       | 22                              | 55,30               | 62,44                 |
| 03A                           | Glutathiona S-transferase | Vetor de clonagem/ gi 595734         | 96    | 47%       | 14                              | 28,24               | 22,97                 |
| 04A                           | Glutathiona S-transferase | Vetor de clonagem/ gi 115600335      | 112   | 52%       | 15                              | 29,15               | 21,63                 |

| <b>Número da proteína (Figura 9)</b> | <b>Proteína identificada</b>           | <b>Origem/ número de acesso</b>                 | <b>Score</b> | <b>Cobertura</b> | <b>Número de peptídeos encontrados</b> | <b>Massa teórica (kDa)</b> | <b>Massa calculada (kDa)</b> |
|--------------------------------------|--|---|--------------|------------------|--|----------------------------|------------------------------|
| 01B                                  | ATP-citrato sintase, subunidade 1      | <i>P. brasiliensis</i><br>Pb01/<br>gi 226278535 | 72*          | 38%              | 25                                     | 72,41                      | 73,72                        |
| 02B                                  | Actina                                 | <i>P. brasiliensis</i> /<br>gi 38261088         | 88*          | 55%              | 14                                     | 41,83                      | 42,74                        |
| 03B                                  | Isocitrato desidrogenase, subunidade 1 | <i>P. brasiliensis</i><br>Pb01/<br>gi 226282369 | 82*          | 54%              | 24                                     | 42,49                      | 40,72                        |

\*: score correspondente à Taxonomia Fungos

\*\* : massa calculada referente à proteína fusionada à GST



---



# Discussão

---

## VI. Discussão

Determinar as funções de uma proteína é um dos grandes desafios da era pós-genômica. A disponibilidade de todas as sequências do genoma de *P. brasiliensis* e de várias estratégias para rastreamento de interações proteína-proteína (PPIs) permite sugerir funções de uma proteína a partir da identificação de suas ligantes. Recentemente função e localização novas estão sendo estabelecidas para as glicosiltransferases (Koch & Pillus, 2009), o que desperta o interesse no estudo das interações promovidas pela *PbGell*, permitindo a dedução de funções para esta proteína. O estudo de PPIs possibilita a obtenção de dados complexos, que compõem uma rede virtual de interações dentro de uma célula.

Algumas proteínas desempenham diferentes funções quando localizadas em diferentes compartimentos celulares, outras têm função dependente do complexo multiprotéico do qual fazem parte. Essas proteínas são denominadas de *moonlighting*, termo que se refere a uma única cadeia polipeptídica capaz de desempenhar diferentes funções, o que não inclui proteínas com a mesma função em localizações múltiplas. Se uma proteína interage com múltiplas proteínas envolvidas em diferentes vias celulares, isso sugere que essa macromolécula seja uma *moonlighting* (Jeffery, 2005). Porém, apesar de várias proteínas classicamente reportadas a certos compartimentos celulares estarem sendo encontradas em outros locais da célula, não se conhece as funções desempenhadas por muitas delas, o que não nos permite afirmar quais proteínas são verdadeiramente *moonlighting*.

Dessa forma, a classificação mais utilizada para o estudo de proteínas de superfície é: clássicas e atípicas. As proteínas clássicas são caracterizadas pela presença de um ou mais dos seguintes sinais: peptídeo sinal predito, sítios de glicosilação potenciais, marcação para a adição de âncora GPI ou repetições internas. Em contrapartida, as proteínas atípicas não possuem nenhuma dessas características, devendo atingir a superfície celular pela existência de um peptídeo sinal não-clássico ou através de uma via secretória alternativa. Estas macromoléculas são, provavelmente, retidas na superfície celular por ligações não covalentes e já foram identificadas como membros de diferentes vias que ocorrem no citoplasma da célula (Castillo *et al.*, 2008; Pitarch *et al.*, 2002).

Trabalhos recentes com vesículas de *H. capsulatum* e *Cryptococcus neoformans* revelaram uma composição protéica complexa dessas estruturas, incluindo chaperonas, proteínas mitocondriais, nucleares, citoplasmáticas e de membrana. Essas moléculas são relacionadas tanto à virulência e à resposta ao estresse, quanto à fisiologia fúngica e à arquitetura da parede celular (Albuquerque *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2008). Entre essas proteínas foi identificada uma  $\beta$ -1,3-glicanosiltransferase, indicando que essa enzima pode estar localizada não só na membrana e parede celulares, como também em sua periferia (Albuquerque *et al.*, 2008). Sugere-se que a presença de proteínas citoplasmáticas no interior dessas vesículas seja um evento aleatório devido à evaginação de parte do citoplasma (Rodrigues *et al.*, 2008), porém não se pode excluir a idéia de que algumas proteínas alcancem essas vesículas pela interação com moléculas destinadas a essas estruturas.

Em proteomas de membrana plasmática de fungos foram identificadas várias proteínas citosólicas já conhecidas como atípicas de parede celular. Dessa maneira, sugere-se que essas moléculas localizam-se temporariamente na membrana até serem direcionadas para a parede. Uma forte hipótese é que elas apresentam-se na membrana plasmática devido a interações com proteínas classicamente localizadas nesta estrutura. Outra possibilidade é que essas moléculas possuam localizações múltiplas ou, ainda, que sejam proteínas *moonlighting* (Delom *et al.*, 2006; Cabezon *et al.*, 2009).

No presente trabalho, foram rastreadas algumas proteínas classicamente descritas como localizadas na superfície celular (considerando-se do córtex citoplasmático até a periferia celular): permease de  $\alpha$ -glicosídeos Mph2/3 (Day *et al.*, 2002a), fosfatase ácida (Bernard *et al.*, 2002), proteína da família GDSL (Arpigny & Jaeger, 1999), septina (Longtine & Bi, 2003) e actina (Mulholland *et al.*, 1994). Muitas outras proteínas detectadas já foram descritas como proteínas atípicas de superfície celular e/ou foram identificadas no interior de vesículas: piruvato quinase (Cabezon *et al.*, 2009; Castillo *et al.*, 2008; Albuquerque *et al.*, 2008; Ebanks *et al.*, 2006; Delom *et al.*, 2006; Urban *et al.*, 2003; Pitarch *et al.*, 2002; Pardo *et al.*, 2000a), proteínas de choque térmico – HSPs – (Cabezon *et al.*, 2009; Castillo *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2008; Albuquerque *et al.*, 2008; Ebanks *et al.*, 2006; Delom *et al.*, 2006; Urban *et al.*, 2003; Pitarch *et al.*, 2002; Pardo *et al.*, 2000a), piruvato desidrogenase (Rodrigues *et al.*, 2008; Albuquerque *et al.*, 2008), isocitrato desidrogenase (Rodrigues *et al.*, 2008; Ebanks *et al.*, 2006), tubulina (Rodrigues *et al.*, 2008; Ebanks *et al.*, 2006), fator de

iniciação da tradução (Rodrigues *et al.*, 2008; Albuquerque *et al.*, 2008), ATP-citrato sintase e glicina desidrogenase (Albuquerque *et al.*, 2008).

Algumas das interações identificadas neste trabalho reforçam que a *PbGellp*, como outras glicanosiltransferases (Castro *et al.*, 2009; Mouyna *et al.*, 2000a), está presente na parede celular do fungo, participando da manutenção e do remodelamento dessa estrutura. Dentre elas estão as interações entre a *PbGellp* e as seguintes moléculas: permease de  $\alpha$ -glicosídeos, fosfatase ácida, lipase da família GDSL, septina, actina, tubulina, HSP90 e piruvato quinase.

A família maltose permease de *S. cerevisiae* é composta por cinco permeases, que incluem duas maltose permeases, Mal31p e Mal61p e três permeases de  $\alpha$ -glicosídeos, Agt1p, Mph2p e Mph3p. Estes dois últimos transportadores possuem sequência gênica idêntica e apresentam 75% de identidade com *mal31* e *mal61* e 53% de identidade com *agt1* (Day *et al.*, 2002a). Mph2/3p tem como substratos maltose, maltotriose,  $\alpha$ -metilglicosídeo e turanose, sendo considerada um elo entre as maltose permeases e permeases mais gerais de  $\alpha$ -glicosídeos (Day *et al.*, 2002b). As maltose permeases transportam maltose através da membrana plasmática por próton simporte, sendo que um transporte eficiente requer um gradiente de prótons intacto através dessa estrutura celular (Houghton-Larsen & Brandt, 2006). A parede celular parece ter um profundo efeito sobre o fluxo de íons extracelulares, servindo como um ponto de ligação de prótons, principalmente  $\text{Ca}^{+2}$  (Holdaway-Clarke & Hepler, 2003). Dessa forma, o remodelamento da parede celular promovido pela *PbGellp* pode ser importante para o fluxo iônico normal através da membrana plasmática e, assim, para o transporte de maltose realizado pela Mph2/3p, o que justificaria a interação rastreada entre essas duas proteínas na biblioteca de duplo híbrido e confirmada por coimunoprecipitação.

As fosfatases ácidas de fungos, de um modo geral, possuem pH ótimo ácido, são altamente glicosiladas e são reprimidas por concentrações altas de fosfato inorgânico no meio extracelular (Bernard *et al.*, 2002). Já foi reportada a presença de fosfatase ácida na superfície de células fúngicas, tanto como proteína GPI ancorada (Bernard *et al.*, 2002; Yoda *et al.*, 2000), quanto como proteína secretada associada fortemente à parede celular (Kneipp *et al.*, 2004; Kneipp *et al.*, 2003; Linnemans *et al.*, 1977; Chattaway *et al.*, 1974). As funções

específicas dessa enzima na superfície celular ainda não são conhecidas, mas acredita-se que a fosfatase ácida regule a atividade de enzimas que participam da biossíntese da parede celular. Admite-se também que essa enzima, ao fornecer fosfato a partir de polifosfatos, contribua para o tamponamento do meio extracelular, protegendo a célula contra danos causados em ambiente ácido (Kneipp *et al.*, 2004). Esses dados sugerem que a fosfatase ácida em *P. brasiliensis* contribua para a regulação da atividade e manutenção do pH ótimo das enzimas envolvidas na biossíntese e a organização dos polímeros da parede celular, o que corroboraria o fato de ter sido rastreada a interação *PbGellp*-fosfatase ácida em biblioteca de duplo híbrido, dado posteriormente confirmado por coimunoprecipitação.

As lipases pertencentes à família GDSL possuem um motivo aminoterminal Glicina-Asparagina-Serina-Leucina (GDSL) e cinco blocos conservados, contendo a tríade Serina-Asparagina-Histidina (Upton & Buckley, 1995). As lipases GDSL são enzimas hidrolíticas encontradas em procariotos e em eucariotos, com propriedades multifuncionais, podendo apresentar atividade tioesterase, protease, arilesterase e fosfolipase. Sabe-se que, em plantas, essas enzimas estão envolvidas com a degradação de polissacarídeos complexos, inclusive daqueles presentes na parede celular (Akoh *et al.*, 2004). Em microrganismos, as lipases GDSL são reportadas à periferia celular (Arpigny & Jaeger, 1999), porém sua função fisiológica não está totalmente elucidada. De maneira geral, as lipases podem servir como fatores de sobrevivência pela liberação de ácidos graxos, que diminuem o pH de um micronicho e permitem o bom funcionamento de outras enzimas (Stehr *et al.*, 2003). Dessa forma, a interação *PbGellp*-lipase GDSL, rastreada na biblioteca de duplo híbrido e confirmada por coimunoprecipitação, poderia estar ocorrendo para a promoção do remodelamento da parede celular deste microrganismo, tanto pela atuação conjunta dessas duas enzimas, como pela regulação do pH local para o bom funcionamento da *PbGellp*.

As septinas são elementos do citoesqueleto conservados em todos os eucariotos estudados, com exceção de plantas. Essas proteínas agregam-se formando filamentos que se localizam logo abaixo da membrana plasmática, ancorando-se a ela de forma ainda desconhecida (Casamayor & Snyder, 2003; Longtine & Bi, 2003). Foi demonstrado que as septinas compõem uma família de proteínas ligantes de GTP, que atuam como suportes dinâmicos e regulados para recrutamento de outras proteínas (Cao *et al.*, 2009). Em fungos, as septinas costumam organizar-se em anéis no ponto de brotamento. Como extensivamente

revisado, esses anéis parecem servir como suporte para várias proteínas envolvidas em diversos processos celulares, como seleção do sítio de brotamento, deposição de quitina, posicionamento do fuso mitótico, crescimento polarizado, citocinese, ponto de checagem morfogénico, e formação de barreira de difusão para compartimentalização de membrana celular. Além disso, as septinas são envolvidas no controle do ciclo celular e na coordenação da resposta a danos de DNA e da morfologia celular (Cao *et al.*, 2009; Longtine & Bi, 2003). Dessa forma, como as septinas desempenham importantes papéis no remodelamento da membrana plasmática e na formação e manutenção dos domínios de membrana, com diferentes composições e propriedades, seria aceitável sugerir que essa proteína estaria interagindo com a *PbGellp*, como rastreado na biblioteca de duplo híbrido, para permitir a correta localização da glicanosiltransferase nos pontos de reconstrução da parede celular.

Em fungos, a actina é importante para o transporte polarizado de vesículas secretórias, de mRNA e de organelas, para a endocitose e serve para guiar a orientação do fuso mitótico (Pruyne & Bretscher, 2000). O citoesqueleto de actina consiste de três estruturas principais: fragmentos, cabos e anéis (Banuett *et al.*, 2008; La Carbona *et al.*, 2006). Os fragmentos de actina estão localizados no córtex celular em áreas de remodelamento da parede celular e estão associados com a membrana plasmática em um local de invaginação digitiforme (Mulholland *et al.*, 1994). Os fragmentos de actina parecem funcionar na deposição da parede celular não só porque eles se concentram em áreas de deposição dessa estrutura, mas porque algumas mutações que perturbam a distribuição dos fragmentos de actina resultam em adições repetidas de parede celular na célula mãe, provavelmente pela despolarização da deposição de parede celular (Schott *et al.*, 2002). Foi demonstrado que a  $\beta$ -1,3-glicana sintase concentra-se parcialmente nos locais em que são encontrados os fragmentos de actina em brotamentos. Além disso, ao se bloquear o movimento dessas moléculas, bloqueia-se também o movimento da glicana sintase, resultando em uma parede celular irregular, que é espessa nos locais em que a enzima, juntamente com a actina, está imobilizada e fina nas outras áreas. Dessa forma, parece que os fragmentos de actina servem para distribuir uniformemente a síntese da parede celular em brotamentos (Utsugi *et al.*, 2002). Como a interação *PbGellp*-actina foi detectada pela técnica de *pull-down* neste trabalho, pode-se inferir que a actina contribua também para a correta distribuição da *Gellp* em pontos de remodelamento da parede celular de *P. brasiliensis* ou, ainda, que a *PbGellp* interaja indiretamente com a actina, tendo a  $\beta$ -1,3-

glicana sintase como intermediária, visto que a Gellp tem como substrato o produto da  $\beta$ -1,3-glicana sintase.

Os microtúbulos são polímeros de heterodímeros de  $\alpha$ - e  $\beta$ -tubulina com extremidades distintas “positiva” e “negativa”. A extremidade “negativa” está usualmente ancorada nos centros organizadores de microtúbulos, enquanto a extremidade “positiva” exibe crescimento dinâmico e capacidade de encolhimento, sendo direcionada para a extremidade celular (Martin, 2009; Desai & Mitchison, 1997). Esses componentes do citoesqueleto desempenham um importante papel na regulação da morfogênese celular, transportando para suas extremidades “positivas” um conjunto de fatores de polarização celular e posicionando o núcleo no centro da célula, o que define o sítio de divisão celular. Sugere-se que esses fatores de polarização, transportados pelos microtúbulos, formam um grande suporte que recruta o citoesqueleto de actina e organiza os domínios lipídicos de membrana na extremidade da célula (Martin, 2009). Esses domínios de membrana, detectados em sítios de crescimento polarizado, contribuem para a localização específica de algumas proteínas, dentre elas as GPI-ancoradas e os marcadores de extremidade celular (Takeshita *et al.*, 2008; Rajendran & Simons, 2005). Os mutantes para genes que codificam esses marcadores apresentam defeitos na determinação da extremidade celular diferentes das deformidades causadas pela desorganização dos domínios lipídicos de membrana, onde estão localizados esses marcadores. Isso indica que outras moléculas, além dos marcadores clássicos, estão envolvidas na determinação da extremidade celular (Fischer *et al.*, 2008). Como a *PbGellp* é uma proteína GPI-ancorada, que se acredita participar do remodelamento da parede celular, ela deve estar localizada nos domínios lipídicos de membrana, detectados em sítios de crescimento polarizado. Dessa forma, a *PbGellp* poderia ajudar também na indicação aos microtúbulos da extremidade celular, para onde se direcionam esses integrantes do citoesqueleto, o que justificaria a interação *PbGellp*-tubulina rastreada no presente trabalho, em biblioteca de duplo híbrido.

Inicialmente identificadas como proteínas cuja síntese é induzida por um aumento de temperatura, muitas HSPs já foram descritas desempenhando funções nos processos relacionados ao crescimento da célula, como divisão celular, síntese de DNA, transcrição, tradução, enovelamento e transporte de proteínas e translocação de polipeptídeos através de

membranas celulares (Mager & Ferreira, 1993). Muitas delas são sintetizadas constitutivamente, refletindo as funções celulares importantes que elas desempenham em condições não estressoras (Chaffin *et al.*, 1998). A localização celular de algumas HSPs não se restringe ao citoplasma, estando presentes também na superfície celular (Lopez-Ribot *et al.*, 1996; Lopez-Ribot & Chaffin, 1996; Matthews *et al.*, 1988). Como proteínas integrantes da parede celular de fungos, as HSPs devem desempenhar papéis na biossíntese, na secreção e na incorporação de outros componentes da parede celular nesta estrutura (Lopez-Ribot & Chaffin, 1996). A co-chaperona DnaJ, uma HSP40, já foi observada na parede celular de *P. brasiliensis*, especialmente nas regiões de brotamento (Batista *et al.*, 2006), indicando que outras chaperonas possam também ter essa localização neste fungo. Dessa forma, a interação PbGel1p-HSP90, rastreada em biblioteca de duplo híbrido, estaria ocorrendo na parede celular do fungo para a promoção do remodelamento desta estrutura.

As enzimas glicolíticas já foram extensivamente reportadas na superfície de microrganismos, inclusive de *P. brasiliensis* (Pereira *et al.*, 2007; Barbosa *et al.*, 2006; Pardo *et al.*, 2000a). Nesse local, essas proteínas podem atuar como: receptores de moléculas da matriz extracelular (Pereira *et al.*, 2007; Barbosa *et al.*, 2006; Jong *et al.*, 2003), antígenos (Pitarch *et al.*, 1999; Martinez *et al.*, 1998), proteínas constitutivas da parede celular (Fernandes *et al.*, 1992) ou enzimas ativas (Motshwene *et al.*, 2003; Gil-Navarro *et al.*, 1997). Métodos de extração de parede celular que evitam a lise celular e a contaminação deste extrato com outras frações estão sendo cada vez mais aprimorados, fornecendo confiabilidade aos dados gerados. Utilizando um método de marcação da superfície celular com um derivado de biotina que não penetra a membrana plasmática, foi identificada a piruvato quinase (Urban *et al.*, 2003). A piruvato quinase é uma enzima regulatória chave na glicólise que catalisa a transferência do grupamento fosforil do fosfoenolpiruvato para o ADP, gerando piruvato e ATP (Susan-Resiga & Nowak, 2003). Esta enzima foi também identificada em sedimento de parede celular de *C. albicans* após extração dupla com DTT/SDS e numerosas lavagens com tampão, indicando que essa proteína está covalentemente ligada à parede celular. Neste mesmo trabalho, sugeriu-se que há uma indução da síntese de piruvato quinase em resposta à transição da fase de levedura para a de hifa em *C. albicans* (Ebanks *et al.*, 2006), como já havia sido sugerido em trabalho anterior (Pitarch *et al.*, 2002). Isso pode refletir a diferença metabólica entre as duas morfologias: o remodelamento da parede celular durante a transição

para hifa pode requerer um maior gasto energético para adição de novas moléculas ou apenas para reestruturação das já existentes (Pitarch *et al.*, 2002). Em ensaio de imunoreatividade utilizando soro de pacientes com candidose sistêmica, foram identificadas quatro proteínas imunogênicas do citoplasma de *C. albicans*, dentre elas a piruvato quinase (Pardo *et al.*, 2000b). Todos esses dados sugerem que a piruvato quinase também poderia estar localizada na parede celular de *P. brasiliensis*, principalmente na fase miceliana. Nessa localidade, essa enzima estaria interagindo com a *PbGel1p* – como rastreado em biblioteca de duplo híbrido e confirmado por coimunoprecipitação.

Algumas interações parecem estar envolvidas com o possível papel das glicanosiltransferases no silenciamento transcricional sítio-específico, como sugerido para *ScGas1p* (Koch & Pillus, 2009). De acordo com o modelo proposto, essa enzima estaria presente no núcleo celular e regularia a atividade de uma deacetilase de histona, envolvida na formação e manutenção da cromatina silenciada, pela transferência de um motivo carboidrato (Koch & Pillus, 2009). As proteínas identificadas no presente trabalho como ligantes a *PbGel1p*, que possivelmente contribuem para esse recém-proposto papel da glicanosiltransferase são: a ATP-citrato sintase, a argonauta *Qde2* e o fator de alongamento transcricional *Spt6*.

A ATP-citrato sintase é uma enzima chave tanto para a ligação do metabolismo de glicose à síntese de lipídeos, por catalisar a conversão de citrato a acetil-CoA citosólico; quanto para a continuidade do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), já que nessa conversão há a regeneração do oxaloacetato, que compõe o ciclo. O acetil-CoA citosólico é o precursor para a síntese endógena de ácidos graxos, colesterol e isoprenóides, além de participar de reações de acetilação que modificam proteínas (Hatzivassiliou *et al.*, 2005; Srere, 1972). Apesar de ter sido detectada a ATP-citrato sintase no interior de vesículas do fungo *H. capsulatum* (Albuquerque *et al.*, 2008), não foi possível estabelecer nenhuma possível função para a interação *PbGel1p*-ATP-citrato sintase, isolada por ensaio de *pull-down*, na superfície celular. Sugere-se que essa interação esteja acontecendo no núcleo da célula, pelo fato de a ATP-citrato sintase já ter sido identificada no núcleo de células de eucariotos superiores (Wellen *et al.*, 2009). Neste mesmo estudo, o silenciamento dessa enzima diminuiu significativamente a acetilação das histonas H2B, H3 e H4, indicando que a enzima pode ser a maior fonte de acetil-CoA para a acetilação global de histonas. Sugere-se também que a

atividade da ATP-citrato sintase seja requerida para ligar a captação de nutrientes induzida por fator de crescimento e o metabolismo celular à acetilação de histonas, através da produção de acetil-CoA (Wellen *et al.*, 2009). Em eucariotos, a acetilação de histonas pode neutralizar a carga positiva das histonas e alterar a superfície da molécula, o que diminui a interação delas com o DNA e recruta outras proteínas para o nucleossomo, respectivamente, permitindo o acesso da maquinaria de transcrição ao DNA. Portanto, a acetilação de histonas é associada com regiões de eucromatina e a hipoacetilação, com regiões de heterocromatina (Schneider & Grosschedl, 2007; Clayton *et al.*, 2006; Rusche *et al.*, 2003). Supõe-se que a acetilação de histonas seja regulada dinamicamente por diversas classes de deacetilases e acetiltransferases de histonas, que atuam tanto de maneira pontual, gene-específica, quanto global, afetando vários nucleossomos (Clayton *et al.*, 2006; Kurdistani & Grunstein, 2003). Dessa forma, deve haver um mecanismo de regulação bastante complexo de todas as enzimas envolvidas neste processo, desde as deacetilases e as acetiltransferases até a ATP-citrato sintase e as enzimas regulatórias da via de silenciamento transcricional, para que alguns genes ou grupos gênicos sejam transcritos e outros não. Considerando a interação *PbGel1p*-ATP-citrato sintase isolada neste trabalho por *pull-down*, pode-se sugerir que exista um mecanismo bem complexo de regulação da acetilação de histonas em *P. brasiliensis* que envolve a *PbGel1p* e a ATP-citrato sintase. Essas proteínas poderiam estar interagindo direta ou indiretamente para permitir um fino balanço entre acetilação e deacetilação de histonas.

As proteínas argonautas fazem parte do sistema de RNA de interferência (RNAi), um processo de silenciamento gênico que ocorre em grande parte dos eucariotos (Fire *et al.*, 1998). Essas proteínas compõem o centro do complexo ribonucleoprotéico, que efetua: o silenciamento gênico, pela clivagem do RNA mensageiro (mRNA) alvo; a repressão traducional; ou modificações de cromatina (Jaronczyk *et al.*, 2005; Hannon, 2002). A argonauta Qde2 foi inicialmente identificada em *N. crassa*, após o isolamento de mutantes que apresentavam defeitos no fenômeno de silenciamento gênico induzido por transgene, denominado de *quelling* (Cogoni & Macino, 1997). Homólogos de *qde2* em plantas e animais estão relacionados com o silenciamento gênico, com a regulação do desenvolvimento e com o estímulo para o início da tradução (Fagard *et al.*, 2000; Benfey, 1999; Zou *et al.*, 1998; Bohmert *et al.*, 1998). Já foi demonstrado que mutantes para os componentes da maquinaria de RNAi em *S. pombe*, dentre eles o *Δago1*, mutado para um gene que codifica para uma

proteína homóloga a Qde2, apresentam um acúmulo anormal de transcritos complementares a repetições de heterocromatina centromérica e redução do silenciamento centromérico. Esses efeitos são acompanhados pela perda da metilação da lisina 9 da histona H3 e por danos no funcionamento do centrômero, que tem sua transcrição gênica aumentada (Volpe *et al.*, 2002). De acordo com o modelo proposto, o que aconteceria na linhagem selvagem seria o reconhecimento da metilação da lisina 9 da histona H3 por uma proteína de heterocromatina (Chp1p), que promoveria o recrutamento de Ago1, através do complexo de iniciação do silenciamento transcricional mediado por RNAi (RITS), que, por sua vez, contribuiria para a formação da cromatina silenciada (Martienssen *et al.*, 2005; Hansen *et al.*, 2005). Dessa forma, pode-se propor que a *PbGellp* participe da regulação do silenciamento transcricional não só dependente da acetilação de histonas (Koch & Pillus, 2009), mas também dependente da maquinaria de RNAi, interagindo com a Qde2 (como rastreado na biblioteca de duplo híbrido e confirmado por coimunoprecipitação) e regulando sua atividade.

Inicialmente identificada, em *S. cerevisiae*, como um supressor de inserção de *transposon* na região promotora de um gene repórter (Winston *et al.*, 1984), Spt6p é requerida para o alongamento transcricional, juntamente com Spt4 e Spt5 (Endoh *et al.*, 2004; Hartzog *et al.*, 1998). Estudos demonstraram que Spt6p colocaliza-se consideravelmente com a RNA polimerase II (RNAPII), sendo essencial para o alongamento da transcrição de vários genes, mas não de todos (Andrulis *et al.*, 2000; Kaplan *et al.*, 2000). Spt6p funciona como uma chaperona de histonas H3-H4 para alterar a estrutura da cromatina (Bortvin & Winston, 1996) e pode atuar, juntamente com uma chaperona H2A-H2B, para coordenar o desarranjo e o rearranjo local dos nucleossomos durante a transcrição (Belotserkovskaya *et al.*, 2003; Orphanides *et al.*, 1998). Spt6p possui um domínio SH2 com afinidade para peptídeos contendo fosfoserina, sendo importante para a interação desse fator com a RNAPII (Andrulis *et al.*, 2000; Kaplan *et al.*, 2000). A deleção genômica correspondente à porção carboxiterminal de Spt6, que contém o domínio SH2, resultou em uma diminuição da taxa de crescimento celular, aumento dos níveis da proteína Spt6 e alteração dos níveis de expressão de um conjunto de genes. Isso demonstra a importância desse domínio para a expressão gênica normal *in vivo* (Dengl *et al.*, 2009). Recentemente, a deleção de *spt6* em *C. albicans* resultou em crescimento desordenado da hifa (Al-Rawi *et al.*, 2010), porém não foi letal, como já havia sido reportado para *S. cerevisiae* (Clark-Adams & Winston, 1987). Neste

mesmo trabalho com *C. albicans*, sugeriu-se que a Spt6p estaria presente na superfície das hifas, por ter sido reconhecida por anticorpos humanos, porém o papel dessa proteína, quando localizada na superfície celular, ainda não foi elucidado. E, por isso, não foi possível estabelecer um possível papel para a interação PbGel1p-Spt6p, rastreada na biblioteca de duplo híbrido e confirmada por coimunoprecipitação, nessa localidade. O que pode ser sugerido é que essa interação, no núcleo, seja importante para o silenciamento gênico mediado por alterações estruturais, sendo que a glicanosiltransferase atuaria como uma reguladora geral do processo e a Spt6p, como efetora, exercendo o papel de chaperona de histonas e promovendo o arranjo e o desarranjo dos nucleossomos, quando conviesse.

Outras interações não puderam ser elucidadas ainda pelo pouco conhecimento do papel das proteínas ligantes a PbGel1p, quando localizadas fora de sítios clássicos. Além disso, conhece-se pouco sobre outros possíveis papéis e localizações das glicanosiltransferases, principalmente as de *P. brasiliensis*. Mais estudos são requeridos para a elucidação da função das interações envolvendo a PbGel1p e proteínas como a piruvato desidrogenase, a glicina desidrogenase, a isocitrato desidrogenase e a farnesiltransferase.

O complexo piruvato desidrogenase conecta a glicólise ao ciclo do TCA, catalisando a reação irreversível de piruvato a acetil-CoA (Patel & Roche, 1990) e é altamente conservado entre procariotos e eucariotos (Miran *et al.*, 1993; Snoep *et al.*, 1992). Os três componentes catalíticos – piruvato desidrogenase E1, dihidrolipoamida acetiltransferase E2 e dihidrolipoamida desidrogenase E3 – juntamente com a proteína ligante Pdx1 e várias coenzimas, estão presentes em múltiplas cópias e são requeridos para um complexo funcional (Vellucci *et al.*, 2007). Foi demonstrado em *Mycoplasma pneumoniae* que o componente E1, subunidade  $\beta$ , da piruvato desidrogenase, normalmente localizado na mitocôndria, encontra-se na superfície celular, promovendo a adesão do microrganismo à fibronectina (Dallo *et al.*, 2002). Estudos em *P. brasiliensis* são necessários para elucidar o papel da piruvato desidrogenase quando localizada na superfície celular desse patógeno. Dessa forma, ainda seria precipitado estabelecer alguma função para a interação PbGel1p-piruvato desidrogenase rastreada na biblioteca de duplo híbrido e confirmada por coimunoprecipitação.

O metabolismo de um carbono é uma via chave envolvida no provimento de unidades de um carbono para a biossíntese de purinas, timidilatos, serina, metionina e N-formilmetionil

tRNA (Gelling *et al.*, 2004). O catabolismo de glicina, via complexo multienzimático glicina desidrogenase, contribui para a geração de moléculas de um carbono (Ogur *et al.*, 1977). Esse complexo é composto por quatro proteínas: P, H, T e L, sendo as três primeiras exclusivas do complexo glicina desidrogenase. A quarta subunidade, uma lipoamida desidrogenase, está presente em outros complexos multienzimáticos, dentre eles, no da piruvato desidrogenase (subunidade E3) (Gelling *et al.*, 2004; Bourguignon *et al.*, 1996; Dickinson *et al.*, 1986). Apesar da redundância na biblioteca de duplo híbrido e da confirmação por coimunoprecipitação, a possível função para a interação entre a *PbGellp* e a glicina desidrogenase permanece desconhecida. Mais estudos devem ser realizados para a elucidação dessa interação.

As células eucarióticas possuem enzimas isocitrato desidrogenase distintas geneticamente, que catalisam a oxidação de isocitrato a  $\alpha$ -cetoglutarato com concomitante produção de NADH ou NADPH (Lu *et al.*, 2008). Três dessas enzimas são homodímeros NADP<sup>+</sup>-específicos, não regulados alostericamente, com 70% de identidade em suas sequências protéicas e localizadas na mitocôndria, no citoplasma e no peroxissomo (Lu *et al.*, 2008; McCammon & McAlister-Henn, 2003). A enzima NAD<sup>+</sup>-específica é mitocondrial, complexa estruturalmente, regulada alostericamente e participa do ciclo TCA (Lu *et al.*, 2008). Esta enzima é um octâmero composto por quatro subunidades *Idh1p* e quatro *Idh2p* (Cupp & McAlister-Henn, 1993). Como as isocitrato desidrogenases desempenham importante papel na regulação do fluxo do ciclo TCA em vários organismos, essas enzimas, como um grupo, são as mais variáveis do ciclo TCA em termos de estrutura e regulação (McCammon & McAlister-Henn, 2003). A isocitrato desidrogenase, por ser liberada no meio extracelular durante o crescimento logarítmico tardio de *Mycobacterium tuberculosis*, é considerada um marcador de autólise nesse organismo (Andersen *et al.*, 1991). Como a presença dessa enzima já foi reportada em fração de parede celular de *C. albicans* (Ebanks *et al.*, 2006) e em vesículas extracelulares de *C. neoformans* (Rodrigues *et al.*, 2008), é possível que a isocitrato desidrogenase esteja na superfície de microorganismos patogênicos, desempenhando funções pouco esclarecidas. Dessa forma, a função da interação, direta ou indireta, entre a *PbGellp* e a isocitrato desidrogenase, isolada pela técnica de *pull-down*, ainda não pode ser estabelecida em *P. brasiliensis*.

A prenilação de proteínas é uma modificação pós-traducional importante que facilita o ancoramento a membranas celulares, inclusive à plasmática e contribui para a realização de interações proteína-proteína (Wright & Philips, 2006; Sinensky, 2000). Já foram identificadas três preniltransferases em células eucarióticas: farnesiltransferase (FTase), geranylgeranyltransferase I (GGTase I) e geranylgeranyltransferase II (GGTase II) (Song & White, 2003). FTase e GGTase I transferem um isoprenóide de 15 ou 20 carbonos, respectivamente, para um motivo CAAX carboxiterminal (C: cisteína, A: aminoácido alifático e X: aminoácido qualquer, que contribui para a especificidade da enzima) (Lane & Beese, 2006). GGTase II reconhece, normalmente, motivos CC e CXC presentes, exclusivamente, em proteínas da família Rab e promove uma dupla geranylgeranilação (Leung *et al.*, 2007). Todas as preniltransferases são heterodímeros, compostos de subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ . FTase e GGTase I compartilham a mesma subunidade  $\alpha$  e possuem subunidades  $\beta$  homólogas (Lane & Beese, 2006). Acredita-se que a subunidade  $\alpha$  da FTase seja responsável pela atividade catalítica da enzima e para a estabilização da subunidade  $\beta$  (Andres *et al.*, 1993). Já foi demonstrado para *C. albicans* e para *C. neoformans* que a inibição da FTase não altera o crescimento vegetativo desses fungos, mas reduz diferenciação celular (Vallim *et al.*, 2004; McGeady *et al.*, 2002). Em *P. brasiliensis*, a inibição desta enzima favorece a transição levedura-micélio de maneira dose-dependente, tornando essa transição um evento independente da temperatura (Fernandes *et al.*, 2008). Porém mais estudos são necessários para a elucidação desse mecanismo em *P. brasiliensis*. Dessa forma, a função da interação PbGellp-FTase, rastreada na biblioteca de duplo híbrido e confirmada por coimunoprecipitação, ainda não pode ser estabelecida para esse fungo.

A localização múltipla de proteínas é um assunto cada vez mais abordado. Inicialmente, as proteínas clássicas de certo compartimento celular, quando identificadas em outro, eram tidas como contaminantes de preparação da fração celular. Atualmente, com a utilização de técnicas aprimoradas para evitar a contaminação de frações celulares e com a popularização da espectrometria de massas, proteínas atípicas estão sendo consideradas residentes. Essas proteínas podem estar em localizações múltiplas desempenhando sua função clássica ou funções não esperadas e, neste caso, são denominadas de proteínas *moonlighting*. Os métodos de rastreamento de interações proteína-proteína, como o duplo híbrido e o *pull-down*, dão boas perspectivas para a descoberta de novas funções de uma proteína, visto que

interações não esperadas podem indicar uma nova função para uma proteína. Porém estudos adicionais, como caracterizações bioquímicas e ensaios funcionais, são necessários antes de determinar se uma proteína é ou não uma *moonlighting*.

Neste trabalho, foram rastreadas e isoladas muitas interações intermoleculares que não ocorreriam se uma das duas proteínas ligantes não apresentasse localização múltipla, o que dificulta a interpretação dos resultados. Um fator complicador é a possibilidade de ambas as proteínas ligantes serem multilocalizadas ou, o que dificulta ainda mais a análise, serem *moonlighting*. Apesar da dificuldade de análise dos resultados obtidos, pelo presente trabalho, pode-se ratificar a contribuição da glicanosiltransferase para a manutenção e o remodelamento da parede celular de *P. brasiliensis* (Castro et al., 2009), pelas interações rastreadas entre essa enzima e a permease de  $\alpha$ -glicosídeos, a fosfatase ácida, a lipase da família GDSL, a septina, a actina, a tubulina, a HSP90 e a piruvato quinase. Destacam-se as interações isoladas entre a *PbGellp* e as proteínas actina, tubulina e septina, o que pode indicar que essa glicanosiltransferase está fortemente associada com o citoesqueleto, tendo sua localização determinada por essa trama protéica ou contribuindo para o direcionamento dessas proteínas para a extremidade celular, o que contribui para a polarização da célula. Além disso, reforça-se a indicação de que a glicanosiltransferase possa participar do silenciamento transcricional, quando localizada no núcleo da célula (Koch & Pillus, 2009), devido às inúmeras interações rastreadas entre *PbGellp* e proteínas nucleares, como a argonauta Qde2, o fator de alongamento transcricional spt6, outros fatores transcricionais e a ATP-citrato sintase, possivelmente localizada no núcleo celular. Cada vez mais, proteínas do metabolismo citoplasmático vêm sendo reportadas à superfície celular e, neste trabalho, existe uma forte indicação de que em *P. brasiliensis* ocorre o mesmo, devido a interações rastreadas entre a *PbGellp* e a piruvato desidrogenase, a piruvato quinase, a glicina desidrogenase, a timina dioxigenase, a isocitrato desidrogenase e a proteína bifuncional da biossíntese de arginina.



---



# Conclusões

---

## VII. Conclusões

Com o presente trabalho, foi possível verificar e sugerir que:

- A *PbGell1p* está possivelmente na parede celular de *P. brasiliensis*, contribuindo para sua manutenção e remodelamento. Os produtos gênicos rastreados e as proteínas identificadas que sugerem essa localização e esse papel biológico da *PbGell1p* são: permease de  $\alpha$ -glicosídeos, fosfatase ácida, lipase da família GDSL, septina, actina, tubulina, HSP90 e piruvato quinase;
- A *PbGell1p* poderia ter uma localização atípica no núcleo celular, podendo contribuir para o silenciamento gênico mediado por alterações estruturais. Os produtos gênicos rastreados e as proteínas identificadas que sugerem essa localização e esse papel biológico da *PbGell1p* são: argonauta Qde2, fator de alongamento transcricional spt6, outros fatores transcricionais e ATP-citrato sintase;
- A *PbGell1p* pode estar fortemente associada ao citoesqueleto. Isso é indicado pelas interações verificadas entre essa glicanosiltransferase e a actina, a tubulina e a septina;
- Proteínas do metabolismo citoplasmático podem localizar-se na superfície das células de *P. brasiliensis*. Isso é indicado pelas interações verificadas entre essa glicanosiltransferase e a piruvato desidrogenase, a piruvato quinase, a glicina desidrogenase, a timina dioxigenase, a isocitrato desidrogenase e a proteína bifuncional da biossíntese de arginina.



---



# Perspectivas

---

## **VIII. Perspectivas**

A partir dos resultados obtidos, as perspectivas deste trabalho são:

- Promover ensaios de citolocalização entre a *PbGel1p* e algumas das proteínas ligantes rastreadas para validação dessas interações e elucidação dos locais onde estão acontecendo essas ligações;
- Avaliar os níveis de expressão dos cDNAs codificantes para *PbGel1p* e para algumas das proteínas rastreadas neste trabalho durante a transição da fase de levedura para a de micélio de *P. brasiliensis*;
- Silenciar ou deletar o gene codificante para *PbGel1p* e comparar o perfil genômico da linhagem silenciada ou mutada com o da linhagem selvagem.



---

# Bibliografia

---

## IX. Referências bibliográficas

Ajello, L. and Polonelli, L. (1985). Imported paracoccidioidomycosis: a public health problem in non-endemic areas. **Eur J Epidemiol** 1(3): 160-165.

Akoh, C. C., Lee, G. C., Liaw, Y. C., Huang, T. H. and Shaw, J. F. (2004). GDSL family of serine esterases/lipases. **Prog Lipid Res** 43(6): 534-552.

Al-Rawi, N., Laforce-Nesbitt, S. S. and Bliss, J. M. (2010). Deletion of *Candida albicans* SPT6 Is Not Lethal but Results in Defective Hyphal Growth. **Fungal Genet Biol** *in press*.

Albuquerque, P. C., Nakayasu, E. S., Rodrigues, M. L., Frases, S., Casadevall, A., Zancop-Oliveira, R. M., Almeida, I. C. and Nosanchuk, J. D. (2008). Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. **Cell Microbiol** 10(8): 1695-1710.

Almeida, A. J., Matute, D. R., Carmona, J. A., Martins, M., Torres, I., McEwen, J. G., Restrepo, A., Leao, C., Ludovico, P. and Rodrigues, F. (2007). Genome size and ploidy of *Paracoccidioides brasiliensis* reveals a haploid DNA content: flow cytometry and GP43 sequence analysis. **Fungal Genet Biol** 44(1): 25-31.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res** 25(17): 3389-3402.

Andersen, P., Askgaard, D., Ljungqvist, L., Bennedsen, J. and Heron, I. (1991). Proteins released from *Mycobacterium tuberculosis* during growth. **Infect Immun** 59(6): 1905-1910.

Andres, D. A., Goldstein, J. L., Ho, Y. K. and Brown, M. S. (1993). Mutational analysis of alpha-subunit of protein farnesyltransferase. Evidence for a catalytic role. **J Biol Chem** 268(2): 1383-1390.

Andrulis, E. D., Guzman, E., Doring, P., Werner, J. and Lis, J. T. (2000). High-resolution localization of *Drosophila* Spt5 and Spt6 at heat shock genes *in vivo*: roles in promoter proximal pausing and transcription elongation. **Genes Dev** 14(20): 2635-2649.

Aristizabal, B. H., Clemons, K. V., Cock, A. M., Restrepo, A. and Stevens, D. A. (2002). Experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice: influence of the hormonal status of the host on tissue responses. **Med Mycol** 40(2): 169-178.

Arpigny, J. L. and Jaeger, K. E. (1999). Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. **Biochem J** 343 Pt 1: 177-183.

Arroyo, J., Sarfati, J., Baixench, M. T., Ragni, E., Guillen, M., Rodriguez-Pena, J. M., Popolo, L. and Latge, J. P. (2007). The GPI-anchored Gas and Crh families are fungal antigens. **Yeast** 24(4): 289-296.

Auerbach, D., Thaminy, S., Hottiger, M. O. and Stagljar, I. (2002). The post-genomic era of interactive proteomics: facts and perspectives. **Proteomics** 2(6): 611-623.

Bagagli, E., Bosco, S. M., Theodoro, R. C. and Franco, M. (2006). Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. **Infect Genet Evol** 6(5): 344-351.

Bago, B., Chamberland, H., Goulet, A., Vierheilig, H., Lafontaine, J. G. and Piché, Y. (1996). Effect of Nikkomycin Z, a chitin-synthase inhibitor, on hyphal growth and cell wall structure of two arbuscular-mycorrhizal fungi **Protoplasma** 192: 80-92.

Bailão, A. M., Schrank, A., Borges, C. L., Dutra, V., Molinari-Madlum, E. E. W. I., Felipe, M. S. S., Mendes-Giannini, M. J. S., Martins, W. S., Pereira, M. and Soares, C. M. A. (2006). Differential gene expression by *Paracoccidioides brasiliensis* in host interaction conditions: representational difference analysis identifies candidate genes associated with fungal pathogenesis. **Microbes Infect** 8(12-13): 2686-2697.

Bailão, A. M., Shrank, A., Borges, C. L., Parente, J. A., Dutra, V., Felipe, M. S., Fiuza, R. B., Pereira, M. and Soares, C. M. A. (2007). The transcriptional profile of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells is influenced by human plasma. **FEMS Immunol Med Microbiol** 51(1): 43-57.

Banuett, F., Quintanilla, R. H., Jr. and Reynaga-Pena, C. G. (2008). The machinery for cell polarity, cell morphogenesis, and the cytoskeleton in the Basidiomycete fungus *Ustilago maydis*-a survey of the genome sequence. **Fungal Genet Biol** 45 Suppl 1: S3-S14.

Barbosa, M. S., Bao, S. N., Andreotti, P. F., de Faria, F. P., Felipe, M. S., Feitosa, L. S., Mendes-Giannini, M. J. and Soares, C. M. (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(1): 382-389.

Bastos, K. P., Bailao, A. M., Borges, C. L., Faria, F. P., Felipe, M. S., Silva, M. G., Martins, W. S., Fiuza, R. B., Pereira, M. and Soares, C. M. (2007). The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. **BMC Microbiol** 7: 29.

Batista, W. L., Matsuo, A. L., Ganiko, L., Barros, T. F., Veiga, T. R., Freymuller, E. and Puccia, R. (2006). The *PbMDJ1* gene belongs to a conserved MDJ1/LON locus in thermodimorphic pathogenic fungi and encodes a heat shock protein that localizes to both the mitochondria and cell wall of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Eukaryot Cell** 5(2): 379-390.

Belotserkovskaya, R., Oh, S., Bondarenko, V. A., Orphanides, G., Studitsky, V. M. and Reinberg, D. (2003). FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration. **Science** 301(5636): 1090-1093.

Benfey, P. N. (1999). Stem cells: A tale of two kingdoms. **Curr Biol** 9(5): R171-172.

Bernard, M., Mouyna, I., Dubreucq, G., Debeauvais, J. P., Fontaine, T., Vorgias, C., Fuglsang, C. and Latge, J. P. (2002). Characterization of a cell-wall acid phosphatase (PhoAp) in *Aspergillus fumigatus*. **Microbiology** 148(Pt 9): 2819-2829.

Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M. and Benning, C. (1998). AGO1 defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development. **Embo J** 17(1): 170-180.

Borelli, D. (1972). Some ecological aspects of paracoccidioidomycosis. **Paracoccidioidomycosis**. Medellin, Pan Amer Hlth Org Scient Publ: 59-64.

Borges-Walmsley, M. I., Chen, D., Shu, X. and Walmsley, A. R. (2002). The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends Microbiol** 10(2): 80-87.

Borges, C. L., Parente, J. A., Barbosa, M. S., Santana, J. M., Bão, S. N., de Sousa, M. V. and Soares, C. M. (2009). Detection of a homotetrameric structure and protein-protein interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* formamidase lead to new functional insights. **FEMS Yeast Res** in press.

Bortvin, A. and Winston, F. (1996). Evidence that Spt6p controls chromatin structure by a direct interaction with histones. **Science** 272(5267): 1473-1476.

Bourguignon, J., Merand, V., Rawsthorne, S., Forest, E. and Douce, R. (1996). Glycine decarboxylase and pyruvate dehydrogenase complexes share the same dihydrolipoamide dehydrogenase in pea leaf mitochondria: evidence from mass spectrometry and primary-structure analysis. **Biochem J** 313 ( Pt 1): 229-234.

Bowman, S. M. and Free, S. J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. **Bioessays** 28(8): 799-808.

Bowman, S. M., Piwowar, A., Al Dabbous, M., Vierula, J. and Free, S. J. (2006). Mutational analysis of the glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor pathway demonstrates that GPI-anchored proteins are required for cell wall biogenesis and normal hyphal growth in *Neurospora crassa*. **Eukaryot Cell** 5(3): 587-600.

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

Cabezón, V., Llama-Palacios, A., Nombela, C., Monteoliva, L. and Gil, C. (2009). Analysis of *Candida albicans* plasma membrane proteome. **Proteomics** 9(20): 4770-4786.

Cabib, E., Blanco, N., Grau, C., Rodriguez-Pena, J. M. and Arroyo, J. (2007). Crh1p and Crh2p are required for the cross-linking of chitin to beta(1-6)glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. **Mol Microbiol** 63(3): 921-935.

Cano, M. I., Cisalpino, P. S., Galindo, I., Ramirez, J. L., Mortara, R. A. and da Silveira, J. F. (1998). Electrophoretic karyotypes and genome sizing of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Clin Microbiol** 36(3): 742-747.

Cao, L., Yu, W., Wu, Y. and Yu, L. (2009). The evolution, complex structures and function of septin proteins. **Cell Mol Life Sci** 66(20): 3309-3323.

Carrero, L. L., Nino-Vega, G., Teixeira, M. M., Carvalho, M. J., Soares, C. M., Pereira, M., Jesuino, R. S., McEwen, J. G., Mendoza, L., Taylor, J. W., Felipe, M. S. and San-Blas, G. (2008). New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. **Fungal Genet Biol** 45(5): 605-612.

Casamayor, A. and Snyder, M. (2003). Molecular dissection of a yeast septin: distinct domains are required for septin interaction, localization, and function. **Mol Cell Biol** 23(8): 2762-2777.

Castillo, L., Calvo, E., Martinez, A. I., Ruiz-Herrera, J., Valentin, E., Lopez, J. A. and Sentandreu, R. (2008). A study of the *Candida albicans* cell wall proteome. **Proteomics** 8(18): 3871-3881.

Castro, N. S., Maia, Z. A., Pereira, M. and Soares, C. M. (2005). Screening for glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome. **Genet Mol Res** 4(2): 326-345.

Castro, N. S. (2008). Proteínas de superfície de *Paracoccidioides brasiliensis*. Programa de Pós Graduação em Patologia Molecular, Faculdade de Medicina Brasília, Universidade de Brasília. **Tese (Doutorado)**: 120 p.

Castro, N. S., de Castro, K. P., Orlandi, I., Feitosa Ldos, S., Rosa e Silva, L. K., Vainstein, M. H., Bao, S. N., Vai, M. and Soares, C. M. (2009). Characterization and functional analysis of the beta-1,3-glucanosyltransferase 3 of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **FEMS Yeast Res** 9(1): 103-114.

Causier, B. and Davies, B. (2002). Analysing protein-protein interactions with the yeast two-hybrid system. **Plant Mol Biol** 50(6): 855-870.

Chaffin, W. L., Lopez-Ribot, J. L., Casanova, M., Gozalbo, D. and Martinez, J. P. (1998). Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. **Microbiol Mol Biol Rev** 62(1): 130-180.

Chattaway, F. W., Shenolikar, S. and Barlow, A. J. (1974). The release of acid phosphatase and polysaccharide- and protein-containing components from the surface of the dimorphic forms of *Candida albicans* by treatment with dithiothreitol. **J Gen Microbiol** 83(2): 423-425.

Chen, D., Janganan, T. K., Chen, G., Marques, E. R., Kress, M. R., Goldman, G. H., Walmsley, A. R. and Borges-Walmsley, M. I. (2007). The cAMP pathway is important for controlling the morphological switch to the pathogenic yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mol Microbiol** 65(3): 761-779.

Chikamori, T., Saka, S., Nagano, H., Saeki, S., Lacaz Cda, S., Rodrigues, M. C., Cassaguerra, C. M. and Braccialli, M. L. (1984). Paracoccidioidomycosis in Japan. Report of a case. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** 26(5): 267-271.

Cho, S., Park, S. G., Lee, D. H. and Park, B. C. (2004). Protein-protein interaction networks: from interactions to networks. **J Biochem Mol Biol** 37(1): 45-52.

Clark-Adams, C. D. and Winston, F. (1987). The SPT6 gene is essential for growth and is required for delta-mediated transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell Biol** 7(2): 679-686.

Claverie, J. M. (2001). Gene number. What if there are only 30,000 human genes? **Science** 291(5507): 1255-1257.

Clayton, A. L., Hazzalin, C. A. and Mahadevan, L. C. (2006). Enhanced histone acetylation and transcription: a dynamic perspective. **Mol Cell** 23(3): 289-296.

Clemons, K. V., Feldman, D. and Stevens, D. A. (1989). Influence of oestradiol on protein expression and methionine utilization during morphogenesis of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Gen Microbiol** 135(6): 1607-1617.

Cogoni, C. and Macino, G. (1997). Isolation of quelling-defective (qde) mutants impaired in posttranscriptional transgene-induced gene silencing in *Neurospora crassa*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 94(19): 10233-10238.

Conti-Diaz, I. A. (2007). On the unknown ecological niche of *Paracoccidioides brasiliensis*: our hypothesis of 1989: present status and perspectives. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** 49(2): 131-134.

Costa, M., Borges, C. L., Bailao, A. M., Meirelles, G. V., Mendonca, Y. A., Dantas, S. F., de Faria, F. P., Felipe, M. S., Molinari-Madlum, E. E., Mendes-Giannini, M. J., Fiuza, R. B., Martins, W. S., Pereira, M. and Soares, C. M. (2007). Transcriptome profiling of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast-phase cells recovered from infected mice brings new insights into fungal response upon host interaction. **Microbiology** 153(Pt 12): 4194-4207.

Cupp, J. R. and McAlister-Henn, L. (1993). Kinetic analysis of NAD(+)-isocitrate dehydrogenase with altered isocitrate binding sites: contribution of IDH1 and IDH2 subunits to regulation and catalysis. **Biochemistry** 32(36): 9323-9328.

Dallo, S. F., Kannan, T. R., Blaylock, M. W. and Baseman, J. B. (2002). Elongation factor Tu and E1 beta subunit of pyruvate dehydrogenase complex act as fibronectin binding proteins in *Mycoplasma pneumoniae*. **Mol Microbiol** 46(4): 1041-1051.

Day, R. E., Higgins, V. J., Rogers, P. J. and Dawes, I. W. (2002a). Characterization of the putative maltose transporters encoded by YDL247w and YJR160c. **Yeast** 19(12): 1015-1027.

Day, R. E., Rogers, P. J., Dawes, I. W. and Higgins, V. J. (2002b). Molecular analysis of maltotriose transport and utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Environ Microbiol** 68(11): 5326-5335.

De Bernardis, F., Muhlschlegel, F. A., Cassone, A. and Fonzi, W. A. (1998). The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans*. **Infect Immun** 66(7): 3317-3325.

De Groot, P. W., Ram, A. F. and Klis, F. M. (2005). Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. **Fungal Genet Biol** 42(8): 657-675.

de Groot, P. W., Yin, Q. Y., Weig, M., Sosinska, G. J., Klis, F. M. and de Koster, C. G. (2007). Mass spectrometric identification of covalently bound cell wall proteins from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **Yeast** 24(4): 267-278.

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

de Medina-Redondo, M., Arnaiz-Pita, Y., Fontaine, T., Del Rey, F., Latge, J. P. and Vazquez de Aldana, C. R. (2008). The beta-1,3-glycanosyltransferase gas4p is essential for ascospore wall maturation and spore viability in *Schizosaccharomyces pombe*. **Mol Microbiol** 68(5): 1283-1299.

Delgado, N., Xue, J., Yu, J. J., Hung, C. Y. and Cole, G. T. (2003). A recombinant beta-1,3-glycanosyltransferase homolog of *Coccidioides posadasii* protects mice against coccidioidomycosis. **Infect Immun** 71(6): 3010-3019.

Delom, F., Szponarski, W., Sommerer, N., Boyer, J. C., Bruneau, J. M., Rossignol, M. and Gibrat, R. (2006). The plasma membrane proteome of *Saccharomyces cerevisiae* and its response to the antifungal calcofluor. **Proteomics** 6(10): 3029-3039.

Dengl, S., Mayer, A., Sun, M. and Cramer, P. (2009). Structure and in vivo requirement of the yeast Spt6 SH2 domain. **J Mol Biol** 389(1): 211-225.

Desai, A. and Mitchison, T. J. (1997). Microtubule polymerization dynamics. **Annu Rev Cell Dev Biol** 13: 83-117.

Dickinson, J. R., Roy, D. J. and Dawes, I. W. (1986). A mutation affecting lipoamide dehydrogenase, pyruvate dehydrogenase and 2-oxoglutarate dehydrogenase activities in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Gen Genet** 204(1): 103-107.

Drewes, G. and Bouwmeester, T. (2003). Global approaches to protein-protein interactions. **Curr Opin Cell Biol** 15(2): 199-205.

Ebanks, R. O., Chisholm, K., McKinnon, S., Whiteway, M. and Pinto, D. M. (2006). Proteomic analysis of *Candida albicans* yeast and hyphal cell wall and associated proteins. **Proteomics** 6(7): 2147-2156.

Ellis, R. J. and van der Vies, S. M. (1991). Molecular chaperones. **Annu Rev Biochem** 60: 321-347.

Endoh, M., Zhu, W., Hasegawa, J., Watanabe, H., Kim, D. K., Aida, M., Inukai, N., Narita, T., Yamada, T., Furuya, A., Sato, H., Yamaguchi, Y., Mandal, S. S., Reinberg, D., Wada, T. and Handa, H. (2004). Human Spt6 stimulates transcription elongation by RNA polymerase II in vitro. **Mol Cell Biol** 24(8): 3324-3336.

Ewing, B. and Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Res** 8(3): 186-194.

Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M. C. and Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Res** 8(3): 175-185.

Fagard, M., Boutet, S., Morel, J. B., Bellini, C. and Vaucheret, H. (2000). AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. **Proc Natl Acad Sci U S A** 97(21): 11650-11654.

Fava-Netto, C. (1955). Estudos quantitativos sobre a fixação de complemento na blastomicose sul-americana, com antígeno polissacarídico. **Arq. Cir. Clin. Exp.** 18: 197-254.

Feitosa, L. S., Cisalpino, P. S., Santos, M. R., Mortara, R. A., Barros, T. F., Morais, F. V., Puccia, R., Silveira, J. F. and Camargo, Z. P. (2003). Chromosomal polymorphism, syntenic relationships, and ploidy in the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genet Biol** 39(1): 60-69.

Felipe, M. S., Andrade, R. V., Arraes, F. B., Nicola, A. M., Maranhao, A. Q., Torres, F. A., Silva-Pereira, I., Pocas-Fonseca, M. J., Campos, E. G., Moraes, L. M., Andrade, P. A., Tavares, A. H., Silva, S. S., Kyaw, C. M., Souza, D. P., Pereira, M., Jesuino, R. S., Andrade, E. V., Parente, J. A., Oliveira, G. S., Barbosa, M. S., Martins, N. F., Fachin, A. L., Cardoso, R. S., Passos, G. A., Almeida, N. F., Walter, M. E., Soares, C. M., Carvalho, M. J. and Brigido, M. M. (2005). Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. **J Biol Chem** 280(26): 24706-24714.

Fernandes, L., Paes, H. C., Tavares, A. H., Silva, S. S., Dantas, A., Soares, C. M., Torres, F. A. and Felipe, M. S. (2008). Transcriptional profile of *ras1* and *ras2* and the potential role of farnesylation in the dimorphism of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. **FEMS Yeast Res** 8(2): 300-310.

Fernandes, P. A., Keen, J. N., Findlay, J. B. and Moradas-Ferreira, P. (1992). A protein homologous to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is induced in the cell wall of a flocculent *Kluyveromyces marxianus*. **Biochim Biophys Acta** 1159(1): 67-73.

Fields, S. and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. **Nature** 340(6230): 245-246.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. and Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature** 391(6669): 806-811.

Fischer, R., Zekert, N. and Takeshita, N. (2008). Polarized growth in fungi--interplay between the cytoskeleton, positional markers and membrane domains. **Mol Microbiol** 68(4): 813-826.

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

Fujikawa, T., Kuga, Y., Yano, S., Yoshimi, A., Tachiki, T., Abe, K. and Nishimura, M. (2009). Dynamics of cell wall components of *Magnaporthe grisea* during infectious structure development. **Mol Microbiol** 73(4): 553-570.

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

Fujita, M., Maeda, Y., Ra, M., Yamaguchi, Y., Taguchi, R. and Kinoshita, T. (2009). GPI glycan remodeling by PGAP5 regulates transport of GPI-anchored proteins from the ER to the Golgi. **Cell** 139(2): 352-365.

Gelling, C. L., Piper, M. D., Hong, S. P., Kornfeld, G. D. and Dawes, I. W. (2004). Identification of a novel one-carbon metabolism regulon in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem** 279(8): 7072-7081.

Gil-Navarro, I., Gil, M. L., Casanova, M., O'Connor, J. E., Martinez, J. P. and Gozalbo, D. (1997). The glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is a surface antigen. **J Bacteriol** 179(16): 4992-4999.

Haass, F. A., Jonikas, M., Walter, P., Weissman, J. S., Jan, Y. N., Jan, L. Y. and Schuldiner, M. (2007). Identification of yeast proteins necessary for cell-surface function of a potassium channel. **Proc Natl Acad Sci U S A** 104(46): 18079-18084.

Hamada, K., Terashima, H., Arisawa, M. and Kitada, K. (1998). Amino acid sequence requirement for efficient incorporation of glycosylphosphatidylinositol-associated proteins into the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem** 273(41): 26946-26953.

Hannon, G. J. (2002). RNA interference. **Nature** 418(6894): 244-251.

Hansen, K. R., Burns, G., Mata, J., Volpe, T. A., Martienssen, R. A., Bahler, J. and Thon, G. (2005). Global effects on gene expression in fission yeast by silencing and RNA interference machineries. **Mol Cell Biol** 25(2): 590-601.

Hartzog, G. A., Wada, T., Handa, H. and Winston, F. (1998). Evidence that Spt4, Spt5, and Spt6 control transcription elongation by RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genes Dev** 12(3): 357-369.

Hatzivassiliou, G., Zhao, F., Bauer, D. E., Andreadis, C., Shaw, A. N., Dhanak, D., Hingorani, S. R., Tuveson, D. A. and Thompson, C. B. (2005). ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. **Cancer Cell** 8(4): 311-321.

Holdaway-Clarke, T. L. and Hepler, P. K. (2003). Control of pollen tube growth: role of ion gradients and fluxes. **New Phytologist** 159: 539-563.

Houghton-Larsen, J. and Brandt, A. (2006). Fermentation of high concentrations of maltose by *Saccharomyces cerevisiae* is limited by the COMPASS methylation complex. **Appl Environ Microbiol** 72(11): 7176-7182.

Huang, X. and Madan, A. (1999). CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Res** 9(9): 868-877.

Hurtado-Guerrero, R., Schuttelkopf, A. W., Mouyna, I., Ibrahim, A. F., Shepherd, S., Fontaine, T., Latge, J. P. and van Aalten, D. M. (2009). Molecular mechanisms of yeast cell wall glucan remodeling. **J Biol Chem** 284(13): 8461-8469.

Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M. and Sakaki, Y. (2001). A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. **Proc Natl Acad Sci U S A** 98(8): 4569-4574.

Jaronczyk, K., Carmichael, J. B. and Hobman, T. C. (2005). Exploring the functions of RNA interference pathway proteins: some functions are more RISCy than others? **Biochem J** 387(Pt 3): 561-571.

Jeffery, C. J. (2005). Mass spectrometry and the search for moonlighting proteins. **Mass Spectrom Rev** 24(6): 772-782.

Jong, A. Y., Chen, S. H., Stins, M. F., Kim, K. S., Tuan, T. L. and Huang, S. H. (2003). Binding of *Candida albicans* enolase to plasmin(ogen) results in enhanced invasion of human brain microvascular endothelial cells. **J Med Microbiol** 52(Pt 8): 615-622.

Joseph, E. A., Mare, A. and Irving, W. R., Jr. (1966). Oral South American blastomycosis in the United States of America. Report of a case. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 21(6): 732-737.

Kanetsuna, F., Carbonell, L. M., Moreno, R. E. and Rodriguez, J. (1969). Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Bacteriol** 97(3): 1036-1041.

Kaplan, C. D., Morris, J. R., Wu, C. and Winston, F. (2000). Spt5 and spt6 are associated with active transcription and have characteristics of general elongation factors in *D. melanogaster*. **Genes Dev** 14(20): 2623-2634.

Kapteyn, J. C., Van Den Ende, H. and Klis, F. M. (1999). The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. **Biochim Biophys Acta** 1426(2): 373-383.

Kitagaki, H., Wu, H., Shimoi, H. and Ito, K. (2002). Two homologous genes, DCW1 (YKL046c) and DFG5, are essential for cell growth and encode glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored membrane proteins required for cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Microbiol** 46(4): 1011-1022.

Kneipp, L. F., Palmeira, V. F., Pinheiro, A. A., Alviano, C. S., Rozental, S., Travassos, L. R. and Meyer-Fernandes, J. R. (2003). Phosphatase activity on the cell wall of *Fonsecaea pedrosoi*. **Med Mycol** 41(6): 469-477.

Kneipp, L. F., Rodrigues, M. L., Holandino, C., Esteves, F. F., Souto-Padron, T., Alviano, C. S., Travassos, L. R. and Meyer-Fernandes, J. R. (2004). Ectophosphatase activity in conidial forms of *Fonsecaea pedrosoi* is modulated by exogenous phosphate and influences fungal adhesion to mammalian cells. **Microbiology** 150(Pt 10): 3355-3362.

Koch, M. R. and Pillus, L. (2009). The glucanosyltransferase Gas1 functions in transcriptional silencing. **Proc Natl Acad Sci U S A** 106(27): 11224-11229.

Kurdistani, S. K. and Grunstein, M. (2003). Histone acetylation and deacetylation in yeast. **Nat Rev Mol Cell Biol** 4(4): 276-284.

La Carbona, S., Le Goff, C. and Le Goff, X. (2006). Fission yeast cytoskeletons and cell polarity factors: connecting at the cortex. **Biol Cell** 98(11): 619-631.

Lacaz, C. S. (1994). Historical evolution of the knowledge on paracoccidioidomycosis and its etiological agent, *Paracoccidioides brasiliensis*. **Paracoccidioidomycosis**. M. Franco, C. S. Lacaz, A. Restrepo-Moreno and G. B. del Negro. London, CRC Press: 1-7.

Lane, K. T. and Beese, L. S. (2006). Thematic review series: lipid posttranslational modifications. Structural biology of protein farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase type I. **J Lipid Res** 47(4): 681-699.

Latgé, J. P. (2007). The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. **Mol Microbiol** 66(2): 279-290.

Leclerc, M. C., Philippe, H. and Gueho, E. (1994). Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons. **J Med Vet Mycol** 32(5): 331-341.

Leung, K. F., Baron, R., Ali, B. R., Magee, A. I. and Seabra, M. C. (2007). Rab GTPases containing a CAAX motif are processed post-geranylgeranylation by proteolysis and methylation. **J Biol Chem** 282(2): 1487-1497.

Li, H., Zhou, H., Luo, Y., Ouyang, H., Hu, H. and Jin, C. (2007). Glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor is required in *Aspergillus fumigatus* for morphogenesis and virulence. **Mol Microbiol** 64(4): 1014-1027.

Linnemans, W. A., Boer, P. and Elbers, P. F. (1977). Localization of acid phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*: a clue to cell wall formation. **J Bacteriol** 131(2): 638-644.

Londero, A. T., Ramos, C. D. and Matte, S. W. (1986). [Actinomycotic mycetomas in Rio Grande do Sul--report of 4 cases]. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 81(1): 73-77.

Longtine, M. S. and Bi, E. (2003). Regulation of septin organization and function in yeast. **Trends Cell Biol** 13(8): 403-409.

Lopez-Ribot, J. L., Alloush, H. M., Masten, B. J. and Chaffin, W. L. (1996). Evidence for presence in the cell wall of *Candida albicans* of a protein related to the hsp70 family. **Infect Immun** 64(8): 3333-3340.

Lopez-Ribot, J. L. and Chaffin, W. L. (1996). Members of the Hsp70 family of proteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. **J Bacteriol** 178(15): 4724-4726.

Lu, Q., Minard, K. I. and McAlister-Henn, L. (2008). Dual compartmental localization and function of mammalian NADP<sup>+</sup>-specific isocitrate dehydrogenase in yeast. **Arch Biochem Biophys** 472(1): 17-25.

Mager, W. H. and Ferreira, P. M. (1993). Stress response of yeast. **Biochem J** 290 ( Pt 1): 1-13.

Maresca, B. and Kobayashi, G. S. (2000). Dimorphism in *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitidis*. **Contrib Microbiol** 5: 201-216.

Martienssen, R. A., Zaratiegui, M. and Goto, D. B. (2005). RNA interference and heterochromatin in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **Trends Genet** 21(8): 450-456.

Martin, S. G. (2009). Microtubule-dependent cell morphogenesis in the fission yeast. **Trends Cell Biol** 19(9): 447-454.

Martinez, J. P., Gil, M. L., Lopez-Ribot, J. L. and Chaffin, W. L. (1998). Serologic response to cell wall mannoproteins and proteins of *Candida albicans*. **Clin Microbiol Rev** 11(1): 121-141.

Matthews, R., Wells, C. and Burnie, J. P. (1988). Characterisation and cellular localisation of the immunodominant 47-Kda antigen of *Candida albicans*. **J Med Microbiol** 27(4): 227-232.

Matute, D. R., McEwen, J. G., Puccia, R., Montes, B. A., San-Blas, G., Bagagli, E., Rauscher, J. T., Restrepo, A., Morais, F., Nino-Vega, G. and Taylor, J. W. (2006). Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Mol Biol Evol** 23(1): 65-73.

McCammon, M. T. and McAlister-Henn, L. (2003). Multiple cellular consequences of isocitrate dehydrogenase isozyme dysfunction. **Arch Biochem Biophys** 419(2): 222-233.

McGeady, P., Logan, D. A. and Wansley, D. L. (2002). A protein-farnesyl transferase inhibitor interferes with the serum-induced conversion of *Candida albicans* from a cellular yeast form to a filamentous form. **FEMS Microbiol Lett** 213(1): 41-44.

Miran, S. G., Lawson, J. E. and Reed, L. J. (1993). Characterization of PDH beta 1, the structural gene for the pyruvate dehydrogenase beta subunit from *Saccharomyces cerevisiae*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 90(4): 1252-1256.

Misteli, T. (2001). The concept of self-organization in cellular architecture. **J Cell Biol** 155(2): 181-185.

Montoya, A. E., Moreno, M. N., Restrepo, A. and McEwen, J. G. (1997). Electrophoretic karyotype of clinical isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genet Biol** 21(2): 223-227.

Montoya, A. E., Alvarez, A. L., Moreno, M. N., Restrepo, A. and McEwen, J. G. (1999). Electrophoretic karyotype of environmental isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med Mycol** 37(3): 219-222.

Motshwene, P., Brandt, W. and Lindsey, G. (2003). Significant quantities of the glycolytic enzyme phosphoglycerate mutase are present in the cell wall of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem J** 369(Pt 2): 357-362.

Mouyna, I., Fontaine, T., Vai, M., Monod, M., Fonzi, W. A., Diaquin, M., Popolo, L., Hartland, R. P. and Latge, J. P. (2000a). Glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanosyltransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. **J Biol Chem** 275(20): 14882-14889.

Mouyna, I., Monod, M., Fontaine, T., Henrissat, B., Lechenne, B. and Latge, J. P. (2000b). Identification of the catalytic residues of the first family of beta(1-3)glucanosyltransferases identified in fungi. **Biochem J** 347 Pt 3: 741-747.

Mouyna, I., Morelle, W., Vai, M., Monod, M., Lechenne, B., Fontaine, T., Beauvais, A., Sarfati, J., Prevost, M. C., Henry, C. and Latge, J. P. (2005). Deletion of GEL2 encoding for a beta(1-3)glucanosyltransferase affects morphogenesis and virulence in *Aspergillus fumigatus*. **Mol Microbiol** 56(6): 1675-1688.

Muhlschlegel, F. A. and Fonzi, W. A. (1997). PHR2 of *Candida albicans* encodes a functional homolog of the pH-regulated gene PHR1 with an inverted pattern of pH-dependent expression. **Mol Cell Biol** 17(10): 5960-5967.

Mulholland, J., Preuss, D., Moon, A., Wong, A., Drubin, D. and Botstein, D. (1994). Ultrastructure of the yeast actin cytoskeleton and its association with the plasma membrane. **J Cell Biol** 125(2): 381-391.

Ogur, M., Liu, T. N., Cheung, I., Paulavicius, I., Wales, W., Mehnert, D. and Blaise, D. (1977). "Active" one-carbon generation in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Bacteriol** 129(2): 926-933.

Orlean, P. (1997). Biogenesis of yeast cell wall and surface components. **The Molecular Biology of Yeast Saccharomyces**. J. R. Pringle, J. R. Broch and E. W. Jones. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 3: 229-362.

Orphanides, G., LeRoy, G., Chang, C. H., Luse, D. S. and Reinberg, D. (1998). FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes. **Cell** 92(1): 105-116.

Pardo, M., Ward, M., Bains, S., Molina, M., Blackstock, W., Gil, C. and Nombela, C. (2000a). A proteomic approach for the study of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall biogenesis. **Electrophoresis** 21(16): 3396-3410.

Pardo, M., Ward, M., Pitarch, A., Sanchez, M., Nombela, C., Blackstock, W. and Gil, C. (2000b). Cross-species identification of novel *Candida albicans* immunogenic proteins by combination of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry. **Electrophoresis** 21(13): 2651-2659.

Patel, M. S. and Roche, T. E. (1990). Molecular biology and biochemistry of pyruvate dehydrogenase complexes. **Faseb J** 4(14): 3224-3233.

Pereira, L. A., Bao, S. N., Barbosa, M. S., da Silva, J. L., Felipe, M. S., de Santana, J. M., Mendes-Giannini, M. J. and de Almeida Soares, C. M. (2007). Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function. **FEMS Yeast Res** 7(8): 1381-1388.

Pitarch, A., Pardo, M., Jimenez, A., Pla, J., Gil, C., Sanchez, M. and Nombela, C. (1999). Two-dimensional gel electrophoresis as analytical tool for identifying *Candida albicans* immunogenic proteins. **Electrophoresis** 20(4-5): 1001-1010.

Pitarch, A., Sanchez, M., Nombela, C. and Gil, C. (2002). Sequential fractionation and two-dimensional gel analysis unravels the complexity of the dimorphic fungus *Candida albicans* cell wall proteome. **Mol Cell Proteomics** 1(12): 967-982.

Pittet, M. and Conzelmann, A. (2007). Biosynthesis and function of GPI proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochim Biophys Acta** 1771(3): 405-420.

Popolo, L., Vai, M., Gatti, E., Porello, S., Bonfante, P., Balestrini, R. and Alberghina, L. (1993). Physiological analysis of mutants indicates involvement of the *Saccharomyces cerevisiae* GPI-anchored protein gp115 in morphogenesis and cell separation. **J Bacteriol** 175(7): 1879-1885.

Popolo, L., Gilardelli, D., Bonfante, P. and Vai, M. (1997). Increase in chitin as an essential response to defects in assembly of cell wall polymers in the ggp1delta mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. **J Bacteriol** 179(2): 463-469.

Popolo, L., Ragni, E., Carotti, C., Palomares, O., Aardema, R., Back, J. W., Dekker, H. L., de Koning, L. J., de Jong, L. and de Koster, C. G. (2008). Disulfide bond structure and domain organization of yeast beta(1,3)-glucanosyltransferases involved in cell wall biogenesis. **J Biol Chem** 283(27): 18553-18565.

Prado, M., Silva, M. B., Laurenti, R., Travassos, L. R. and Taborda, C. P. (2009). Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 104(3): 513-521.

Prados-Rosales, R., Luque-Garcia, J. L., Martinez-Lopez, R., Gil, C. and Di Pietro, A. (2009). The *Fusarium oxysporum* cell wall proteome under adhesion-inducing conditions. **Proteomics** 9(20): 4755-4769.

Pruyne, D. and Bretscher, A. (2000). Polarization of cell growth in yeast. II. The role of the cortical actin cytoskeleton. **J Cell Sci** 113 ( Pt 4): 571-585.

Queiroz-Telles, F. (1994). *Paracoccidioides brasiliensis* ultrastructural Findings. **Paracoccidioidomycosis**. M. Franco, C. S. Lacaz, A. Restrepo-Moreno and G. Del Negro. London, CRC Press: 27-44.

Ragni, E., Coluccio, A., Rolli, E., Rodriguez-Pena, J. M., Colasante, G., Arroyo, J., Neiman, A. M. and Popolo, L. (2007a). GAS2 and GAS4, a pair of developmentally regulated genes required for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryot Cell** 6(2): 302-316.

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

Rajendran, L. and Simons, K. (2005). Lipid rafts and membrane dynamics. **J Cell Sci** 118(Pt 6): 1099-1102.

Ram, A. F., Wolters, A., Ten Hoopen, R. and Klis, F. M. (1994). A new approach for isolating cell wall mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by screening for hypersensitivity to calcofluor white. **Yeast** 10(8): 1019-1030.

Ram, A. F., Brekelmans, S. S., Oehlen, L. J. and Klis, F. M. (1995). Identification of two cell cycle regulated genes affecting the beta 1,3-glucan content of cell walls in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett** 358(2): 165-170.

Rappleye, C. A. and Goldman, W. E. (2006). Defining virulence genes in the dimorphic fungi. **Annu Rev Microbiol** 60: 281-303.

Rappleye, C. A., Eissenberg, L. G. and Goldman, W. E. (2007). *Histoplasma capsulatum* alpha-(1,3)-glucan blocks innate immune recognition by the beta-glucan receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A** 104(4): 1366-1370.

Rast, D. M., Baumgartner, D., Mayer, C. and Hollenstein, G. O. (2003). Cell-wall associated enzymes in fungi. **Phytochemistry** 64: 339-366.

Restrepo-Moreno, A. (1994). Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Paracoccidioidomycosis**. M. Franco, C. S. Lacaz, A. Restrepo-Moreno and G. Del Negro. Boca Raton, CRC Press 121-130.

Restrepo-Moreno, A. (2003). Paracoccidioidomycosis. **Clinical Mycology**. W. E. Dismukes, P. G. Pappas and J. Sobel. New York, Oxford University Press: 328-345.

Restrepo, A. (1978). Paracoccidioidomycosis. **Acta. Med. Colomb.** 3: 33-36.

Restrepo, A., Cano, L. E. and Tabares, A. M. (1983). A comparison of mycelial filtrate - and yeast lysate - paracoccidioidin in patients with paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia** 84(1): 49-54.

Restrepo, A., Salazar, M. E., Cano, L. E., Stover, E. P., Feldman, D. and Stevens, D. A. (1984). Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Infect Immun** 46(2): 346-353.

Restrepo, A., McEwen, J. G. and Castaneda, E. (2001). The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Med Mycol** 39(3): 233-241.

Richard, M. L. and Plaine, A. (2007). Comprehensive analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Candida albicans*. **Eukaryot Cell** 6(2): 119-133.

Rodrigues, M. L., Nakayasu, E. S., Oliveira, D. L., Nimrichter, L., Nosanchuk, J. D., Almeida, I. C. and Casadevall, A. (2008). Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus*

*neoformans* contain protein components associated with virulence. **Eukaryot Cell** 7(1): 58-67.

Rodriguez-Pena, J. M., Cid, V. J., Arroyo, J. and Nombela, C. (2000). A novel family of cell wall-related proteins regulated differently during the yeast life cycle. **Mol Cell Biol** 20(9): 3245-3255.

Rubin, G. M. (2001). The draft sequences. Comparing species. **Nature** 409(6822): 820-821.

Rusche, L. N., Kirchmaier, A. L. and Rine, J. (2003). The establishment, inheritance, and function of silenced chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. **Annu Rev Biochem** 72: 481-516.

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

San-Blas, G. (1982). The cell wall of fungal human pathogens: its possible role in host-parasite relationships. **Mycopathologia** 79(3): 159-184.

San-Blas, G. and San-Blas, F. (1994). Biochemistry of *Paracoccidioides brasiliensis* dimorphism. **Paracoccidioidomycosis**. M. Franco, C. S. Lacaz, A. Restrepo-Moreno and G. B. del Negro. London, CRC Press: 49-63.

San-Blas, G., Nino-Vega, G. and Iturriaga, T. (2002). *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med Mycol** 40(3): 225-242.

San-Blas, G. and Niño-Vega, G. (2008). *Paracoccidioides brasiliensis*: chemical and molecular tools for research on cell walls, antifungals, diagnosis, taxonomy. **Mycopathologia** 165(4-5): 183-195.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A** 74(12): 5463-5467.

Saporito-Irwin, S. M., Birse, C. E., Sypherd, P. S. and Fonzi, W. A. (1995). PHR1, a pH-regulated gene of *Candida albicans*, is required for morphogenesis. **Mol Cell Biol** 15(2): 601-613.

Schneider, R. and Grosschedl, R. (2007). Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression. **Genes Dev** 21(23): 3027-3043.

Schott, D., Huffaker, T. and Bretscher, A. (2002). Microfilaments and microtubules: the news from yeast. **Curr Opin Microbiol** 5(6): 564-574.

Sinensky, M. (2000). Functional aspects of polyisoprenoid protein substituents: roles in protein-protein interaction and trafficking. **Biochim Biophys Acta** 1529(1-3): 203-209.

Sipos, G., Reggiori, F., Vionnet, C. and Conzelmann, A. (1997). Alternative lipid remodelling pathways for glycosylphosphatidylinositol membrane anchors in *Saccharomyces cerevisiae*. **Embo J** 16(12): 3494-3505.

Skrabanek, L., Saini, H. K., Bader, G. D. and Enright, A. J. (2008). Computational prediction of protein-protein interactions. **Mol Biotechnol** 38(1): 1-17.

Snoep, J. L., Westphal, A. H., Benen, J. A., Teixeira de Mattos, M. J., Neijssel, O. M. and de Kok, A. (1992). Isolation and characterisation of the pyruvate dehydrogenase complex of anaerobically grown *Enterococcus faecalis* NCTC 775. **Eur J Biochem** 203(1-2): 245-250.

Song, J. L. and White, T. C. (2003). RAM2: an essential gene in the prenylation pathway of *Candida albicans*. **Microbiology** 149(Pt 1): 249-259.

Srere, P. A. (1972). The citrate enzymes: their structures, mechanisms, and biological functions. **Curr Top Cell Regul** 5: 229-283.

Stehr, F., Kretschmar, M., Kröger, C., Hube, B. and Schäfer, W. (2003). Microbial lipases as virulence factors. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** 22: 347-355.

Stover, E. P., Schar, G., Clemons, K. V., Stevens, D. A. and Feldman, D. (1986). Estradiol-binding proteins from mycelial and yeast-form cultures of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infect Immun** 51(1): 199-203.

Susan-Resiga, D. and Nowak, T. (2003). The proton transfer step catalyzed by yeast pyruvate kinase. **J Biol Chem** 278(15): 12660-12671.

Takeshita, N., Higashitsuji, Y., Konzack, S. and Fischer, R. (2008). Apical sterol-rich membranes are essential for localizing cell end markers that determine growth directionality in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. **Mol Biol Cell** 19(1): 339-351.

Teixeira, M. M., Theodoro, R. C., de Carvalho, M. J., Fernandes, L., Paes, H. C., Hahn, R. C., Mendoza, L., Bagagli, E., San-Blas, G. and Felipe, M. S. (2009). Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Mol Phylogenet Evol** 52(2): 273-283.

Tiede, A., Bastisch, I., Schubert, J., Orlean, P. and Schmidt, R. E. (1999). Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositols in mammals and unicellular microbes. **Biol Chem** 380(5): 503-523.

Tomazett, P. K., Cruz, A. H., Bonfim, S. M., Soares, C. M. and Pereira, M. (2005). The cell wall of *Paracoccidioides brasiliensis*: insights from its transcriptome. **Genet Mol Res** 4(2): 309-325.

Upton, C. and Buckley, J. T. (1995). A new family of lipolytic enzymes? **Trends Biochem Sci** 20(5): 178-179.

Urban, C., Sohn, K., Lottspeich, F., Brunner, H. and Rupp, S. (2003). Identification of cell surface determinants in *Candida albicans* reveals Tsa1p, a protein differentially localized in the cell. **FEBS Lett** 544(1-3): 228-235.

Utsugi, T., Minemura, M., Hirata, A., Abe, M., Watanabe, D. and Ohya, Y. (2002). Movement of yeast 1,3-beta-glucan synthase is essential for uniform cell wall synthesis. **Genes Cells** 7(1): 1-9.

Vai, M., Orlandi, I., Cavadini, P., Alberghina, L. and Popolo, L. (1996). *Candida albicans* homologue of GGP1/GAS1 gene is functional in *Saccharomyces cerevisiae* and contains the determinants for glycosylphosphatidylinositol attachment. **Yeast** 12(4): 361-368.

Vallim, M. A., Fernandes, L. and Alspaugh, J. A. (2004). The RAM1 gene encoding a protein-farnesyltransferase beta-subunit homologue is essential in *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology** 150(Pt 6): 1925-1935.

Vellucci, V. F., Gygax, S. E. and Hostetter, M. K. (2007). Involvement of *Candida albicans* pyruvate dehydrogenase complex protein X (Pdx1) in filamentation. **Fungal Genet Biol** 44(10): 979-990.

Volpe, T. A., Kidner, C., Hall, I. M., Teng, G., Grewal, S. I. and Martienssen, R. A. (2002). Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. **Science** 297(5588): 1833-1837.

Wellen, K. E., Hatzivassiliou, G., Sachdeva, U. M., Bui, T. V., Cross, J. R. and Thompson, C. B. (2009). ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. **Science** 324(5930): 1076-1080.

Winston, F., Chaleff, D. T., Valent, B. and Fink, G. R. (1984). Mutations affecting Ty-mediated expression of the HIS4 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics** 107(2): 179-197.

Wright, L. P. and Philips, M. R. (2006). Thematic review series: lipid posttranslational modifications. CAAX modification and membrane targeting of Ras. **J Lipid Res** 47(5): 883-891.

Yin, Q. Y., de Groot, P. W. J., Dekker, H. L., de Jong, L., Klis, F. M. and de Koster, C. G. (2005). Comprehensive proteomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. **J Biol Chem** 280: 20894-20901.

Yoda, K., Ko, J. H., Nagamatsu, T., Lin, Y., Kaibara, C., Kawada, T., Tomishige, N., Hashimoto, H., Noda, Y. and Yamasaki, M. (2000). Molecular characterization of a novel yeast cell-wall acid phosphatase cloned from *Kluyveromyces marxianus*. **Biosci Biotechnol Biochem** 64(1): 142-148.

Zou, C., Zhang, Z., Wu, S. and Osterman, J. C. (1998). Molecular cloning and characterization of a rabbit eIF2C protein. **Gene** 211(2): 187-194.