

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

WANDERSON LUCAS DA COSTA

CLONAGEM E EXPRESSÃO HETERÓLOGA, MODELAGEM E INTERAÇÕES
INTERMOLECULARES ENOLPIRUVILCHIQUMATO 3-FOSFATO SINTASE DE
Paracoccidioides brasiliensis.

GOIÂNIA
2017

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS
DE TESES E
DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei 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:

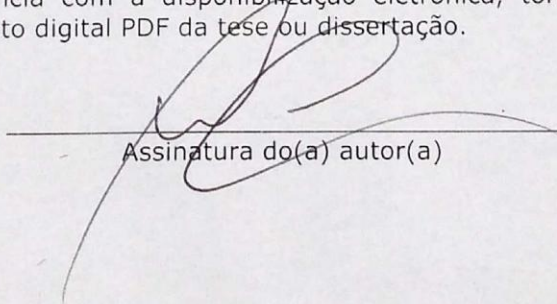
Nome completo do autor: Wanderson Lucas da Costa

Título do trabalho: Clonagem e Expressão Heteróloga, Modelagem e Interações Intermoleculares da Enolpiruvilchiquimato 3-Fosfato Sintase de *Paracoccidioides brasiliensis*.

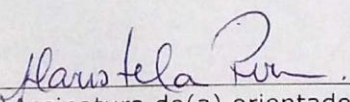
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

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


Assinatura do(a) autor(a)

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)

Data: 30 /08 /2017

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

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

WANDERSON LUCAS DA COSTA

**CLONAGEM E EXPRESSÃO HETERÓLOGA, MODELAGEM E INTERAÇÕES
INTERMOLECULARES DA ENOLPIRUVILCHIKUIMATO 3-FOSFATO SINTASE
DE *Paracoccidioides brasiliensis*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Federal de Goiás, como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maristela Pereira

GOIÂNIA
2017

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

Costa, Wanderson Lucas da
CLONAGEM E EXPRESSÃO HETERÓLOGA, MODELAGEM E
INTERAÇÕES INTERMOLECULARES DA ENOLPIRUVILCHQUIMATO
3-FOSFATO SINTASE DE *Paracoccidioides brasiliensis*. [manuscrito]
/ Wanderson Lucas da Costa. - 2017.
85 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Maristela Pereira.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto
de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Genética
e Biologia Molecular, Goiânia, 2017.

Bibliografia.
Inclui siglas, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista
de tabelas.

1. Expressão heteróloga. 2. EPSP-sintase. 3. Modelagem. 4.
Paracoccidioides brasiliensis. 5. Via do chiquimato. I. Pereira,
Maristela, orient. II. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Nº 051

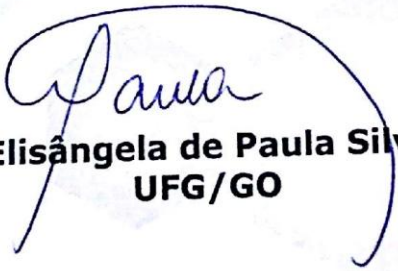
Aos sete dias do mês de julho do ano de dois mil e dezessete (07/07/2017), às 14hs00min, no (a) Anfiteatro do ICB II, reuniram-se os componentes da banca examinadora: **Profa. Dra. Maristela Pereira, Profa. Dra. Elisângela de Paula Silveira Lacerda e Prof. Dr. Bruno Junior Neves** para, em sessão pública presidida pela primeira examinadora citada, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: **"Clonagem e expressão heteróloga, modelagem e interações intermoleculares enolpiruvilchiquimato 3-fosfato sintase de *Paracoccidioides brasiliensis*."**, em nível de mestrado, área de concentração em **Genética e Biologia Molecular**, de autoria de **Wanderson Lucas da Costa**, discente do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela presidente, que fez a apresentação formal dos membros da banca. A palavra, a seguir, foi concedida ao autor da dissertação que, em cerca de 55 minutos, procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu o examinado, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da dissertação. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº 1294/2014 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, a dissertação foi aprovada, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega da versão definitiva da dissertação na secretaria do programa, com as devidas correções sugeridas pela banca examinadora, no prazo de trinta dias a contar da data da



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

defesa. Cumpridas as formalidades de pauta, às 17 horas e _____ minutos, encerrou-se a sessão de defesa e, para constar, eu, Gleizilene Braz Pereira dos Santos, Assistente em Administração do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Goiás, lavrei a presente ata que, após lida e aprovada, será assinada pelos membros da banca examinadora em três vias de igual teor.


Profa. Dra. Maristela Pereira
Presidente da Banca
UFG/GO


Profa. Dra. Elisângela de Paula Silveira Lacerda
UFG/GO


Prof. Dr. Bruno Junior Neves
UFG/GO

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, em especial à minha mãe guerreira, Geralda Lucas da Costa. Ao meu companheiro que esteve enfrentando essa batalha comigo e a todos os meus amigos que foram de grande suporte nesses últimos anos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Professora Dr^a. Maristela Pereira pela orientação e contribuição deste trabalho e na minha formação.

Aos membros da banca que se disponibilizaram aceitando o convite para dela participar, em especial a Professora Dr^a. Elisângela de Paula Silveira Lacerda, que contribuiu em muito na formação acadêmica durante a minha iniciação científica.

Gostaria de agradecer ao Dr. Bruno Neves pelo auxílio no desenvolvimento desta dissertação durante o trabalho de modelagem 3D.

Aos colegas de trabalho que também auxiliaram durante o desenvolvimento. Ao Kleber, Andreia, Thaylla, Lívia e Sheila. Obrigado pelo apoio. Aos professores que fazem parte do Laboratório de Biologia Molecular (Célia, Alexandre, Clayton, Juliana e Juliano).

Agradeço a minha família, em especial a minha mãe, que sempre me incentivou aos estudos, a minha irmã Izabel que também, junto com minha mãe, sempre fez de tudo ao seu alcance para me dar uma boa educação.

Ao meu companheiro Junior, que tem me acompanhado nessa caminhada, obrigado por toda paciência e apoio durante esse processo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa fornecida durante o desenvolvimento desta dissertação.

EPÍGRAFE

"Toda criança começa como um cientista nato. Nós é que tiramos isso delas. Só umas poucas passam pelo sistema com sua admiração e entusiasmo pela ciência intactos."

Carl Sagan

RESUMO

COSTA, W.L. **Clonagem e Expressão Heteróloga, Modelagem e Interações Intermoleculares da Enolpiruvilchiquimato 3-Fosfato Sintase de *Paracoccidioides brasiliensis***. 2017. Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas - ICB, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2017.¹

Paracoccidioides spp. são fungos termodimórficos que ao serem inalados pelo ser humano, esses conídios encontram um ambiente propício, mudando para a fase de levedura e tornando-se patogênico causando a paracoccidioidomicose (PCM), umas das micoses sistêmicas de maior prevalência no Brasil. Alguns antifúngicos são empregados no tratamento da PCM. O tratamento depende do avanço da doença e da capacidade de tolerância do paciente a cada medicamento, mas o seu tratamento pode ser por longos períodos e causando diversos efeitos colaterais no paciente. A via do chiquimato é coordenada pela ação de 7 enzimas que realizam passos consecutivos para transformar a eritrose-4-fosfato e fosfoenol piruvato (PEP) em corismato. Em micro-organismos, esta via está envolvida com a produção dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano; estes aminoácidos são essenciais à manutenção desses organismos. Neste trabalho foi realizado a clonagem em vetor pGEX4T3 e expressão heteróloga da EPSP-sintase de *Pb18* pertencente à via do chiquimato. Essa proteína foi expressa em linhagem *E. coli* (DE3) e purificada. Os anticorpos foram produzidos para análise da expressão da proteína em *Western blot*. A modelagem da EPSP-sintase foi realizada visando identificar os aminoácidos envolvidos no sítio ativo. O ensaio de *pull down*-GST com proteínas solúveis de *Pb18* possibilitou a identificação de 40 proteínas que interagem com EPSP-sintase. Essas proteínas pertencem a diferentes categorias funcionais, as quais estão envolvidas com a disponibilidade de fosfoenol piruvato, substrato necessário para o funcionamento da via do chiquimato.

Palavras chaves: Expressão heteróloga, EPSP-sintase, modelagem, *Paracoccidioides brasiliensis*, *pull down*-GST, via do chiquimato.

¹Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maristela Pereira – UFG

ABSTRACT

Paracoccidioides spp. are thermodynamic fungi that when inhaled by humans, these conidia find a favorable environment, changing to the yeast phase and becoming pathogenic causing paracoccidioidomycosis (PCM), one of the most prevalent systemic mycoses in Brazil. Some antifungals are used in the treatment of PCM. Treatment depends on the patient's progression and tolerability of each drug, but their treatment may be for long periods and cause various side effects in the patient. The chiquimate pathway is coordinated by 7 enzymes that perform consecutive steps to convert erythrose-4-phosphate and phosphoenol pyruvate (PEP) into chorismate. In microorganisms, this pathway is involved in the production of the amino acids phenylalanine, tyrosine and tryptophan; These amino acids are essential to the maintenance of these organisms. In this work, pGEX4T3 vector cloning and heterologous expression of Pb18 EPSP synthase belonging to the chiquimate pathway were performed. This protein was expressed in *E. coli* (DE3) strain and purified. Antibodies were produced for expression analysis of the protein in Western blot. The modeling of EPSP synthase was performed aiming to identify the amino acids involved in the active site. The pull down-GST assay with soluble Pb18 proteins allowed the identification of 40 proteins that interact with EPSP synthase. These proteins belong to different functional categories, which are involved with the availability of phosphoenol pyruvate, the substrate necessary for the functioning of the chiquimate pathway.

Keywords: Heterologous expression, EPSP-synthase, modeling, *Paracoccidioides brasiliensis*, pull down-GST, shikimate pathway.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Via metabólica do chiquimato. _____	22
Figura 2. Reação da enzima DAHP-sintase da via chiquimato. _____	23
Figura 3. Reação da enzima DHQ-sintase da via chiquimato. _____	24
Figura 4. Reação da enzima DHQ-deidratase da via chiquimato. _____	25
Figura 5. Reação da enzima chiquimato deidrogenase da via chiquimato. _____	26
Figura 6. Reação da enzima chiquimato quinase da via chiquimato _____	27
Figura 7. Reação da enzima EPSP-sintase da via chiquimato _____	28
Figura 8. Reação da enzima Corismato sintase da via chiquimato. _____	29
Figura 9. Mapa de clonagem do pGEX-4T3-EPSP. _____	38
Figura 10. Sequência de nucleotídeos e aminoácidos da EPSP-sintase de <i>Pb18</i> _____	47
Figura 11. Estrutura 3D do modelo da EPSP-sintase de <i>Pb18</i> . _____	51
Figura 12. Posicionamento 3D do substrato chiquimato-3-fosfato e inibidor glifosato no sítio ativo do modelo de EPSP-sintase de <i>Pb18</i> . _____	53
Figura 13. Padronização da PCR utilizando diferentes temperaturas e os seus respectivos controles negativos. _____	54
Figura 14. Gel de agarose 1% para confirmação da transformação. _____	55
Figura 15. Gel SDS-PAGE apresentando a indução da EPSP-sintase de <i>Pb18</i> . _____	56
Figura 16. Gel SDS-PAGE apresentando a eluição da EPSP-sintase de <i>Pb18</i> da resina de sefarose 4B. _____	56
Figura 17. <i>Western blot</i> com a EPSP-sintase recombinante. _____	58
Figura 18. Gel SDS-PAGE contendo proteínas de <i>Pb18</i> que interagiram com EPSP-sintase por <i>pull down</i> . _____	59
Figura 19. Gráfico com a quantidade de proteínas que formaram complexo com a EPSP-sintase de acordo com a classificação funcional (MIPS). _____	60
Figura 20. Representação esquemática dos processos metabólicos contendo proteínas que interagiram com EPSP-sintase e CS. _____	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros estatísticos obtidos antes e após a otimização estrutural do modelo de EPSP-sintase de *Pb18*. _____ 50

Tabela 2. Classificação funcional da proteínas que interagiram com EPSP-sintase no ensaio de *pull down*. _____ 60

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADP – adenosina difosfato

ATP – adenosina trifosfato

AmpR – Marca de seleção por resistência à ampicilina

Arom – proteína pentafuncional da via do chiquimato

BCIP – 5-bromo-4-cloro-3-indolylphosphate

BL21 (DE3) – linhagem de *Escherichia coli*

Blast – Base local alignment search tool

cDNA – DNA complementar

CS – Corismato sintase

C-terminal – carboxi-terminal

EPSP-sintase – Enolpiruvilchiquimato 3-fosfato sintase

GST – glutationa-S-transferase

IPTG - isopropil β -D-1-tiogalactopiranosideo

KOH – hidróxido de potássio

LC-MS – cromatografia líquida associada à espectrometria de massa

MS – espectrometria de massa

NAD⁺ - dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido

NADP⁺ – fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido

NADPH - fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidado

NotI - enzima de restrição proveniente de *Nocardia otitidis*

NCBI - National Center for Biotechnology Information

N-terminal – amino-terminal

Operon lac – operon ativo na presença de lactose

Pb18 – *Paracoccidioides brasiliensis* 18

pb – pares de bases

PCM – paracoccidioidomicose

PCR – reação em cadeia da polimerase

pGEX-4T3 – vetor de clonagem comercial

SDS-PAGE - sódio dodecil sulfato – eletroforese em gel de poliacrilamina

Tris – tris-hidroximetil-aminometano

SUMÁRIO

Dedicatória _____	06
Agradecimentos _____	07
Epígrafe _____	08
Resumo _____	09
Abstract _____	10
Lista de Figuras _____	11
Lista de Tabelas _____	12
Lista de Siglas e Abreviaturas _____	13
1.Introdução _____	18
1.1Paracoccidioides spp_____	19
1.1.1Paracoccidioidomicose _____	19
1.1.2.Tratamento da Paracoccidioidomicose _____	20
1.2 Via do chiquimato _____	21
1.2.1 Deoxi-arabino-heptulosonato-7-fosfato sintase (DAHP-sintase) _____	23
1.2.2 Deidroquinato sintase (DHQ-sintase) _____	24
1.2.3 Deidroquinato desidratase (DHQ-deidratase) _____	25
1.2.4 Chiquimato desidrogenase (SKD) _____	26
1.2.5 Chiquimato quinase (SK) _____	27
1.2.6 Enolpiruvilchiquimato 3-fosfato sintase (EPSP-sintase) _____	28
1.2.7. Corismato sintase (CS) _____	29
1.3 Interação proteína-proteína (IPP) _____	30
2 Justificativa _____	33
3 Objetivo _____	34
3.1 Objetivos específicos _____	34
4 Materiais e Métodos _____	34
4.1 Caracterização <i>in silico</i> da EPSP-sintase _____	34
4.1.1 Predição da estrutura 3D da EPSP-sintase _____	35
4.2 Clonagem e Transformação _____	36
4.2.1 Extração de RNA total e obtenção do cDNA _____	36

4.2.2 Construção dos oligonucleotídeos e amplificação da região codificadora para EPSP-sintase	37
4.2.3 Digestão do Vetor pGEX-4T3	38
4.2.4 Reação de ligação da EPSP-sintase ao vetor pGEX-4T3	39
4.2.5 Transformação por choque térmico em <i>E. Coli</i> (DE3)	39
4.3 Expressão heteróloga em <i>E. Coli</i> (DE3)	40
4.4 Purificação da proteína recombinante	41
4.5 Produção de anticorpos policlonais	42
4.6 Análise dos anticorpos através da técnica <i>Western blot</i>	42
4.7 Extração de proteínas de fungo <i>P. brasiliensis</i>	43
4.8 Análise das interações da EPSP-sintase	43
4.9 Digestão com tripsina e análise por espectrometria de massa LC-MS	44
4.10 Classificação funcional das proteínas envolvidas na interação com EPSP-sintase	45
5 Resultados e discussões	46
5.1 Análise <i>in silico</i>	46
5.2 Predição da estrutura 3D da EPSP-sintase de <i>Pb18</i>	48
5.3 Amplificação do cDNA da EPSP-sintase	54
5.4 Expressão heteróloga e purificação da EPSP-sintase de <i>Pb18</i>	55
5.5 <i>Western blot</i> para identificação da EPSP-sintase	58
5.6 Interações entre EPSP-sintase e proteínas de <i>Pb18</i>	58
5.6.1 Metabolismo de aminoácido	63
5.6.2 Metabolismo de carbono e carboidratos	64
5.6.3 Metabolismo de lipídeos e ácidos graxos	65
5.6.4 Metabolismo dos nucleotídeos e ciclo célula	65
5.6.5 Proteínas ribossomais	66
5.6.6 Dobramento, estabilização de proteínas e degradação de proteínas e peptídeos	66
5.7 Visão geral das interações proteicas da EPSP-sintase e corismato sintase	68
6 Considerações finais	71
7 Perspectivas Futuras	71

1. Introdução

1.1. *Paracoccidioides* spp.

O gênero *Paracoccidioides* era representado por uma única espécie, *Paracoccidioides brasiliensis*. Estudos que utilizaram a análise de sequência nucleotídica de 8 loci permitiram a identificação de três espécies filogeneticamente diferentes, PS2, PS3 e S1. Essas espécies possuem distribuições geográficas distintas, sendo que no Brasil e Venezuela ocorre a PS2, PS3 ocorre apenas na Colômbia enquanto que S1 possui uma maior distribuição abrangendo, Brasil, Argentina, Peru e Venezuela (MATUTE *et al.*, 2006). Posteriormente, devido à alta diversidade, a espécie S1 foi dividida em dois clados, S1a e S1b (MUNHÖZ *et al.*, 2016). Posteriormente, uma nova espécie, antes denominada Pb01-like, foi identificada através de ferramentas moleculares e atualmente é intitulada *Paracoccidioides lutzii* (TEIXEIRA *et al.*, 2009).

Paracoccidioides spp. são fungos termodimórficos, podendo ser encontrados tanto na forma de micélio como de levedura. A transição de micélio para levedura é importante para a virulência do fungo no hospedeiro (GOLDMAN *et al.*, 2003). No meio ambiente são encontrados na forma de micélio, tendo como nicho ecológico o solo e hábitos sapróbios, produzindo conídios que podem ficar no solo ou serem levados pelo vento (BOYCE & ANDRIANOPOULOS, 2015). Ao serem inalados pelo ser humano, esses conídios encontram um ambiente propício, com a temperatura adequada de 36°C, mudando para a fase de levedura e tornando-se patogênico (ARAÚJO & SOUZA, 2002; FRANCO, 1986). *Paracoccidioides* spp. já foram encontrados em animais como cachorros, tatus, gatos, onças, primatas e em fezes de morcegos e pinguins (FRANCO, 1986; MARQUES, 2013).

Paracoccidioides spp. causam a paracoccidioidomicose (PCM), umas das micoses sistêmicas de maior prevalência no Brasil. A sua ocorrência vai desde do México até a Argentina. A maior prevalência ocorre entre indivíduos que trabalham diretamente com a agricultura, por estarem em constante contato com a terra,

possibilitando a infecção pelos conídios. A região sudeste apresenta as maiores incidências de casos de PCM (MAGALHÃES *et al.*, 2014).

A incidência anual desta doença no Brasil é de 40-30 indivíduos por milhões de habitantes, e a sua taxa de morte é de 1,4 casos por milhões de habitantes por ano. O registro da doença não é compulsório, o que dificulta a obtenção de um levantamento exato sobre a epidemiologia da PCM. Além disso, ela pode ser confundida com outras doenças, o que sugere a existência de um número maior de indivíduos infectados (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).

1.1.1. Paracoccidioidomicose

A PCM pode se manifestar com lesões cutâneas na pele e oral. O fungo pode se espalhar de forma sistêmica pelo corpo humano, afetando outros órgãos como os nódulos linfáticos e até atingir o sistema nervoso do hospedeiro (MARQUES *et al.*, 2007). A PCM pode ser classificada em duas formas, a aguda e a crônica. Na forma aguda, os indivíduos mais afetados são crianças. Essa é a forma mais grave da doença, desenvolve-se rapidamente, sendo às vezes letal. A forma crônica atinge principalmente adultos, a maioria do sexo masculino (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).

A forma aguda e subaguda se caracteriza por lesões na pele, aumento do fígado e comprometimento dos nódulos linfáticos. Isso se deve a uma alta resposta dos linfócitos B e diminuição das células CD4. Nesta forma, a doença tem distribuição uniforme entre ambos os sexos. Esses pacientes têm uma evolução rápida da doença, e os indivíduos geralmente buscam ajuda entre 3 a 4 semanas após a instalação da doença no organismo (MARQUES, 2013; BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002).

A forma crônica da doença possui o diagnóstico dificultado, pois alguns sintomas podem ser atribuídos ao hábito de fumar ou ao alcoolismo, e estes são cofatores para o desenvolvimento mais rápido da doença se comparado com indivíduos que não possuem esses hábitos (SANTOS *et al.*, 2003). Nesta forma, o indivíduo apresenta uma resposta imunitária do tipo 1, produzindo citocinas, que ativarão tanto CD4 quanto CD8 que reprimirão o desenvolvimento do fungo.

Entretanto, alguns fungos podem sobreviver a essa condição levando os indivíduos a desenvolverem a PCM mais tardiamente (CHIARELLA *et al.*, 2007).

Indivíduos usuários de fumo e álcool possuem um maior risco de infecção pela PCM. A doença também já foi registrada em indivíduos portadores de HIV; nesse grupo o risco da doença é bem maior, já que estão com o sistema imunológico comprometido (SANTOS *et al.*, 2003; BELLISSIMO-RODRIGUES *et al.*, 2010).

1.1.2. Quimioterapia da paracoccidioidomicose

Alguns antifúngicos são empregados no tratamento da PCM. A escolha do medicamento e a sua dosagem depende do avanço da doença e da capacidade de tolerância do paciente a cada medicamento (AMBRÓSIO *et al.*, 2014).

O sulfametaxol/Trimetoprima deve ser administrado nas concentrações de 160-800 mg de 12/12 h, podendo chegar até 3 comprimidos por dia, nos primeiros 21 dias de início do tratamento. Posteriormente, as doses são reduzidas gradativamente. O tratamento pode perdurar por 2 a 3 anos (AMBRÓSIO *et al.*, 2014). Essa terapia apresenta diversos efeitos colaterais aos pacientes, como reações alérgicas, necroses, vômitos, náuseas e alteração na hematopoiética. Esse medicamento ocasiona um efeito colateral relativamente leve, com ocorrência em apenas 8% dos pacientes. Em adição, possui um baixo custo para a sua aplicação no sistema público de saúde. Porém, este longo período de tratamento a que é submetido o paciente, pode levar ao abandono do tratamento no tempo indevido e ocorrer a reincidência (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).

O itraconazol deve ser aplicado na dose de 200 mg por dia, sendo que há disponível no mercado apenas capsulas de 100 mg. O tratamento com itraconazol deve ser de 6 a 18 meses, podendo causar alguns distúrbios digestivos como, náuseas e vômitos. Esse medicamento apresenta uma melhor resposta para o tratamento das formas leve e moderada, porém não é um medicamento disponível na rede pública de saúde (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).

O cetoconazol pode ser empregado no caso da infecção sistêmica, com a dose diária de 400 mg, durante o período de 6 a 18 meses. Pacientes que foram

submetidos ao tratamento, mas que não tiveram uma correta adesão, e que por diversos motivos abandonaram e tiveram uma recidiva, podem ser submetidos a um novo tratamento. Dessa forma, as doses diárias podem chegar de 600 até 800 mg por dia, durante um período indeterminado (AMBRÓSIO *et al.*, 2014). O cetoconazol apresenta como efeitos colaterais, problemas hepáticos, anorexia e diminuição da libido sexual, rachaduras na pele e deve ser evitado no tratamento de mulheres grávidas devido à sua ação teratogênica (AMBRÓSIO *et al.*, 2014).

A anfotericina B deve ser usada apenas em caso da forma sistêmica; sua dose vai de 0,25 até 1 mg/kg/dia. Após uma melhora do paciente, o medicamento deve ser substituído por outro. A cura pode ser alcançada em 1 até 3 anos (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006; AMBRÓSIO *et al.*, 2014). Esse medicamento só é aplicado em casos mais graves da PCM, pois apresenta efeitos colaterais mais graves, como, anemia, calafrios, alteração na concentração de potássio celular e nefrotoxicidade (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).

1.2. Via do chiquimato

A via do chiquimato é coordenada pela ação de 7 enzimas que realizam passos consecutivos para transformar a eritrose-4-fosfato e fosfoenol piruvato (PEP) em corismato (Figura 1). O corismato é utilizado como percussor de diversos compostos aromáticos. Em micro-organismos, esta via está envolvida com a produção dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano; estes aminoácidos são essenciais à manutenção desses organismos. Em plantas, o corismato pode ser utilizado em diversas vias metabólicas para a produção de compostos alcaloides (HERRMANN & WEAVER 1999).

Esta via está presente em bactérias, fungos, protozoários e plantas, porém se encontra ausente em mamíferos, tornando-se um alvo molecular de interesse para investigação de novos fármacos. Apesar desta via estar presente em todos estes organismos, sua organização é diferente em cada grupo. Em procariotos, cada um dos passos é executado por uma enzima que é codificada por um gene diferente, enquanto que em fungos e protozoários, o primeiro e o último passo são realizados por enzimas independentes, e os passos de 2 a 6 são executados por uma proteína

pentafuncional, denominada proteína AROM (GIENTKA & DUSZKIEWICZ-REINHARD, 2009).

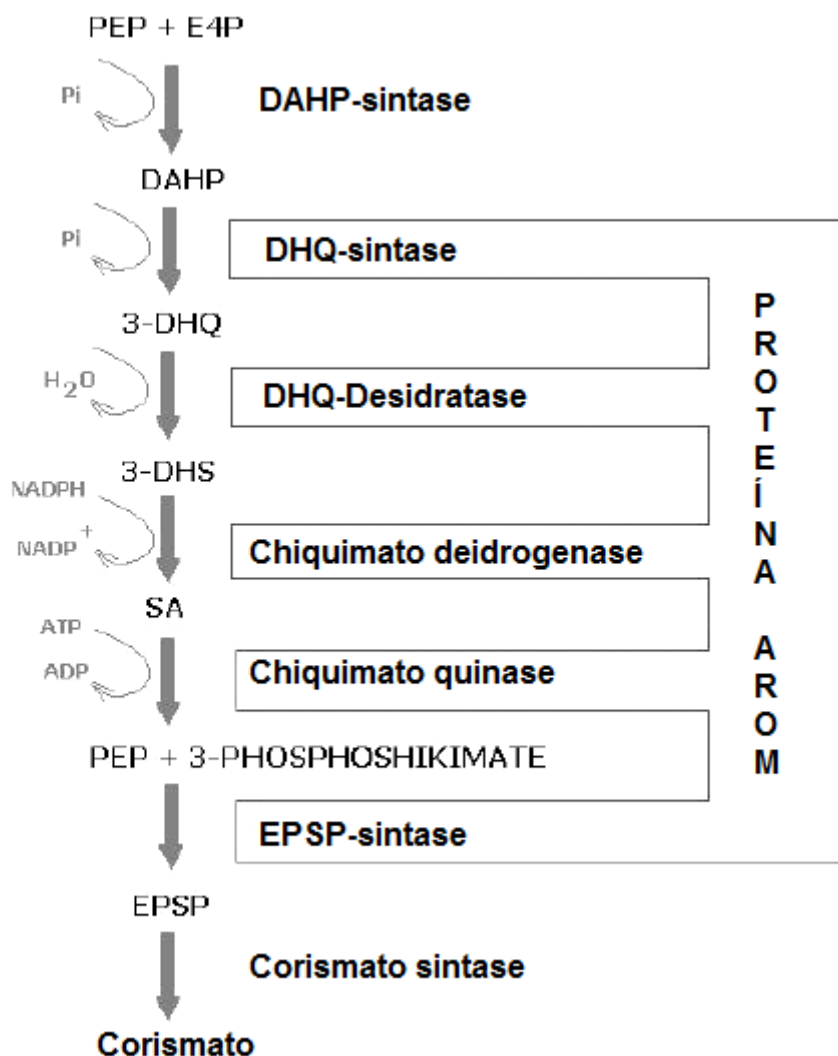


Figura 1. Via metabólica do chiquimato. Os precursores eritrose4-fosfato e fosfoenolpiruvato são convertidos no produto final corismato (Figura retirada e adaptada de GIENTKA & DUSZKIEWICZ-REINHARD, 2009).

Em plantas, os passos 2 e 3 são realizados por uma proteína bifuncional, que semelhante à pentafuncional, apresenta domínios correspondentes às das enzimas de procariotos. Acredita-se que as diversas mutações encontradas em genes da via do chiquimato de eucariotos poderiam explicar a agregação polipeptídica formando uma proteína pentafuncional (RICHARDS *et al.*, 2006). Em plantas, muitas dessas

enzimas apresentam sinais de transporte para os plastídios indicando que essa via pode ocorrer nos cloroplastos. Isso tem sido utilizado como sustentação para a hipótese de que os genes que controlam a via do chiquimato sugerem uma ancestralidade com um progenitor dos plastídios (RICHARDS *et al.*, 2006).

O corismato, o produto final da via do chiquimato, pode seguir 4 diferentes vias metabólicas que utilizarão o corismato como precursor de seus produtos. A corismato mutase utiliza o corismato na biossíntese da fenilamina e da tirosina (LIGHT *et al.*, 2012); a antranilato sintase transforma o corismato em L-glutamina na via de biossíntese do triptofano; a corismato liase usa o corismato na via de biossíntese da ubiquinona, e a aminodeoxycorismato sintase utiliza-o na via biosintética do folato (LIGHT *et al.*, 2012).

1.2.1. Deoxi-arabino-heptulosonato-7-fosfato sintase (DAHP-sintase)

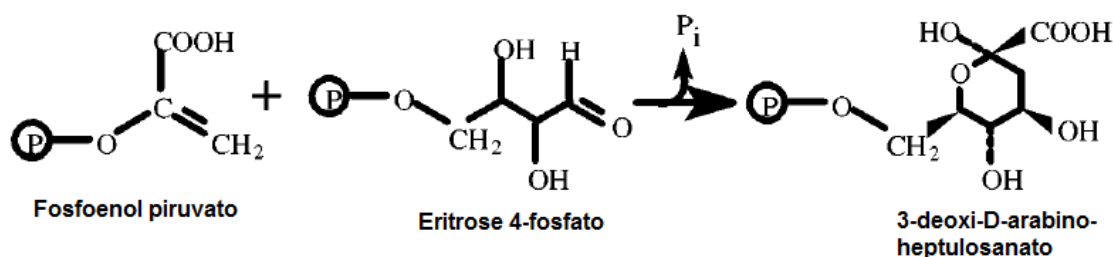


Figura 2. Reação da enzima DAHP-sintase da via chiquimato (Figura retirada e adaptada de HERRMANN & WEAVER 1999).

DAHP-sintase (E.C.2.5.1.54) é a primeira enzima da via do chiquimato sendo responsável pela catálise do fosfoenolpiruvato, proveniente da glicólise, e da eritrose-4-fosfato, proveniente da via das pentoses fosfato, dando origem ao ácido 3-deoxi-D-arabino-heptulosônico-PO₄ (Figura 2). Esta reação resulta na liberação de uma molécula de água e um fosfato inorgânico (TZIN & GALILI, 2010).

Escherichia coli e *Saccharomyces cerevisiae* possuem três e duas isoenzimas, respectivamente. Cada uma delas é sensível a um tipo de aminoácido e estes afetam a inibição da produção de DAHP-sintase tanto em *E. coli* quanto em *S. cerevisiae*. A enzima pode sofrer regulação tanto a nível transcricional quanto proteico. Aminoácidos como o triptofano e fenilamina, quando presentes em grandes

quantidades, mantêm a expressão da DAHP-sintase em níveis basais (DELEO & SPRINSON, 1975; HELMSTAEDT *et al.*, 2005).

O herbicida glifosato não tem nenhuma atividade direta na enzima DAHP-sintase; ele age como um inibidor na enzima EPSP-sintase, evitando que o substrato chiquimato seja convertido em corismato. Experimentos com células de *Galium mollugo* e *Aerobacter aerogenes* demonstraram que em altas doses de glifosato diminuem a atividade de DAHP-sintase, porém em doses baixas há um aumento na produção dessa enzima, ocasionando assim, um aumento no fluxo de carbono (AMRHEIN & STEINRUCKEN, 1980).

Testes com DNA anti sentido em células de batatas apresentaram uma redução da produção da DAHP-sintase, ocasionando assim, a redução do caule, do comprimento da haste e da lignificação do tronco, mostrando que esta enzima é importante para o bom desenvolvimento da planta (JONES *et al.*, 1995).

1.2.2. Deidroquinato sintase (DHQ-sintase)

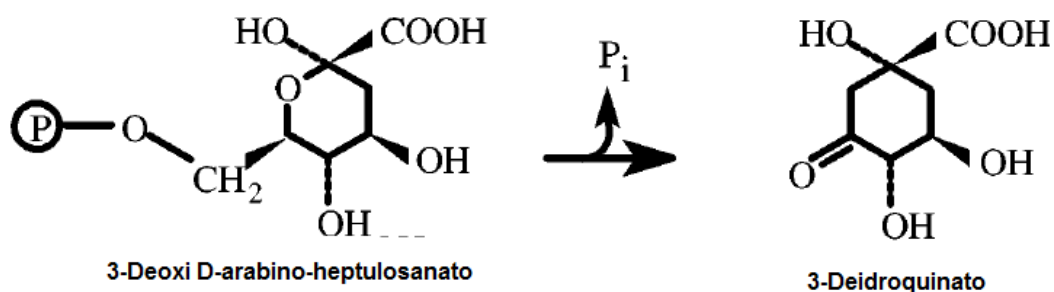


Figura 3. Reação da enzima DHQ-sintase da via chiquimato (Figura retirada e adaptada de HERRMANN & WEAVER 1999).

DHQ-sintase (E.C.4.2.3.4) catalisa o segundo passo da via do chiquimato, convertendo o 3-deoxi-D-arabino-heptolosônico- PO_4 em 3-deidroquinato (Figura 3). Esta reação é realizada pela ativação e liberação do fosfato inorgânico e requer para sua atividade a presença de NAD, bem como de metais divalentes como o Zn II e Co II (HERRMANN, 1999). Além da retirada do fosfato inorgânico, ocorre a oxidação do álcool formando um anel aberto e uma condensação aldol intramolecular. Todas

essas reações são realizadas por um único sítio ativo da enzima (GÜNEL-ÖZCAN *et al.*, 1997; HERRMANN, 1999). O gene AROB de *Salmonella typhimurium*, codificante para DHQ-sintase, está envolvido no processo de virulência, visto que o mutante foi menos virulento em camundongos do que cepa normais (GÜNEL-ÖZCAN *et al.*, 1997).

1.2.3. Deidroquinato desidratase (DHQ-deidratase)

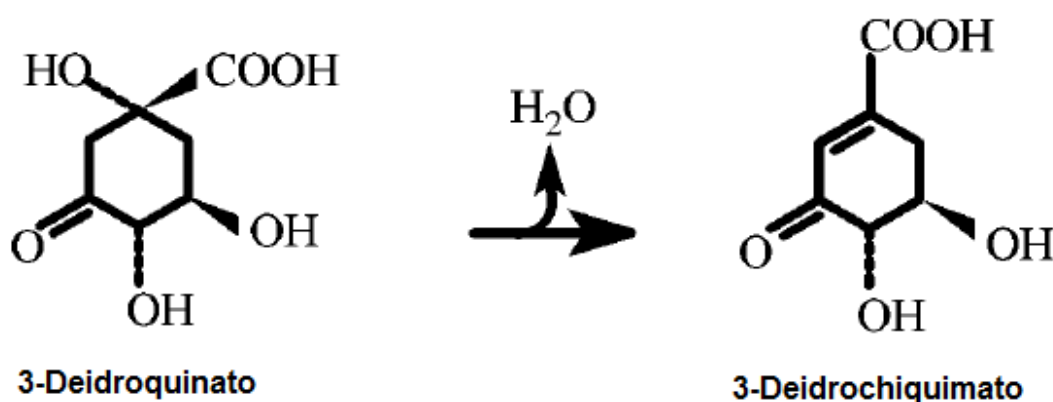


Figura 4. Reação da enzima DHQ-deidratase da via chiquimato (Figura retirada e adaptada de HERRMANN & WEAVER 1999).

O passo 3 é executado pela DHQ-deidratase (E.C.4.2.1.10), a qual converte o composto deidroquinato em deidroquinatoxiquimato (Figura 4). Esta reação ocorre através da eliminação de água e NADH. Em alguns micro-organismos, como os fungos, existem duas isoenzimas que usam o mesmo substrato e convertem no mesmo produto, porém, elas atuam em vias diferentes (HERRMANN, 1999).

A DHQ-deidratase do tipo I, está envolvida na via biosintética dos compostos quinato que são produzidos a partir do corismato, o produto da via chiquimato. O tipo I é um monômero com massa molecular de 27 kDa e catalisa a reação de liberação da água na forma cis usando um sítio ativo de lisina (LIGHT *et al.*, 2011).

A DHQ-deidratase do tipo II, participa tanto da via biosintética quanto da catabólica, ou seja, atuará tanto na via do chiquimato quanto na via de degradação

do quinato. Ela se apresenta ativa na forma de dodecâmero, possui massa molecular entre 16-18 kDa, e catalisa a reação de liberação da água através da ação trans sem utilizar o sítio ativo de lisina, o qual que é utilizado pela enzima do Tipo I (HARRIS *et al.*, 1993).

As duas enzimas são codificadas por genes diferentes. No caso da via catabólica do quinato, o gene que codifica para DHQ-deidratase tipo I está localizado no cluster gênico da via quinato, enquanto o do DHQ-deidratase tipo II está localizado no complexo AROM (HAWKINS, 1988). Apesar dessas duas enzimas apresentarem características diferentes, tanto na sequência de aminoácidos, quanto em suas propriedades físico-químicas, elas catalisam as mesmas reações. Estudos mostraram que essas duas enzimas são provenientes da evolução convergente (HAWKINS, 1987).

1.2.4. Chiquimato deidrogenase (SKD)

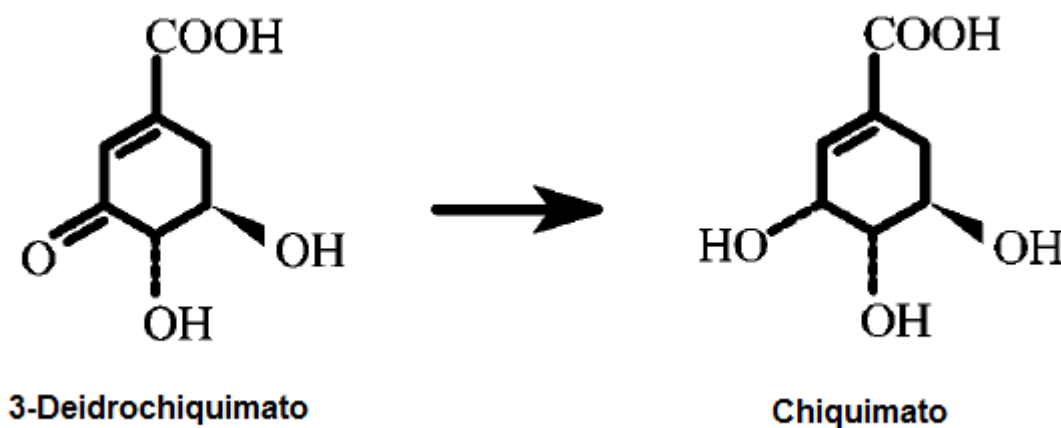


Figura 5. Reação da enzima chiquimato deidrogenase da via chiquimato (Figura retirada e adaptada de HERRMANN & WEAVER 1999).

O quarto passo da via do chiquimato é realizado pela enzima SKD (E.C. 1.1.1.25) que tem como função a redução do 3-deidroquinato em chiquimato (Figura

5). Esta reação é dependente de NADP (LEE, 2011). Em bactérias, SKD apresenta duas formas, uma que é exclusiva no uso da via do chiquimato e outra que pode atuar tanto nessa via quanto utilizar os substratos da mesma (HAN *et al.* 2006).

SKD possui massa molecular em torno de 27 kDa podendo ser encontrada tanto na forma monomérica quanto dimérica. A região N-terminal possui o sítio de ligação do substrato e a região C-terminal possui o sítio de ativação do NADP (GAN *et al.*, 2007). Outra forma da enzima também foi observada em outros organismos, sendo denominada de fechada, pois seus sítios de interações com o substrato se encontram mais no interior da enzima.

Estudos realizados com *Amycolatopsis mediterranei* mostraram que SKD está envolvida na formação do antibiótico rifamicina B. Testes com mutantes para SKD de *E. coli* demonstraram a necessidade da presença de aminoácidos para o desenvolvimento das bactérias (YU *et al.*, 2001; PITTARD; WALLACE, 1966).

1.2.5. Chiquimato quinase (SK)

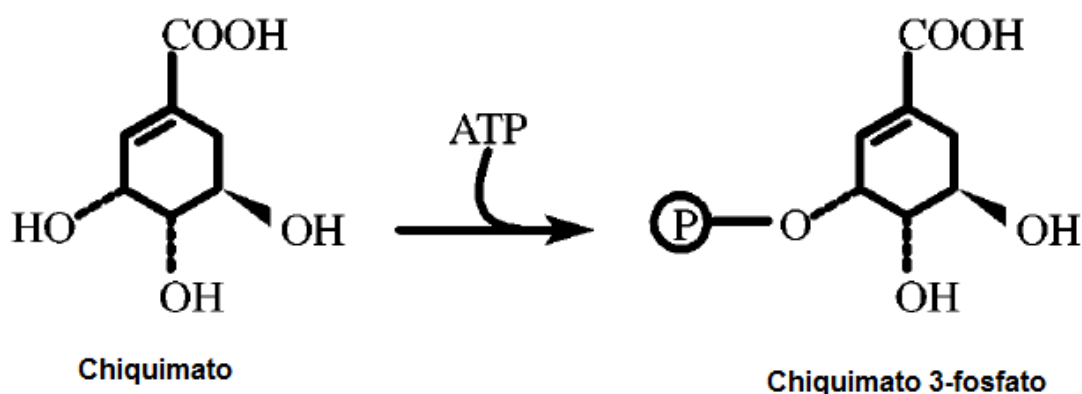


Figura 6. Reação da enzima chiquimato quinase da via chiquimato (Figura retirada e adaptada de HERRMANN & WEAVER 1999).

A SK (E.C. 2.7.1.71) é responsável pela fosforilação do composto chiquimato em chiquimato 3-fosfato, utilizando o ATP como ativador (Figura 6). Existem dois tipos desta enzima, o tipo I e o tipo II, os quais apresentam massa molecular de 19,5 kDa e *in vitro* apresentam as mesmas atividades (HERRMANN, 1999). A estrutura da SK consiste na composição de 3 domínios, o P-loop que forma um sítio de

ligação para o fosfato, os resíduos de lisinas e aspartatos que são essenciais para a ligação do ATP, e os resíduos de treonina e glutamato que formam o sítio de reconhecimento do chiquimato (ROSADO *et al.*, 2013).

Em plantas, a SK possui duas isoformas, denominadas de SKL1 e SKL2, que surgiram através de duplicação do gene SK. SKL2 tem atividade na via do chiquimato, enquanto que SKL1 não possui essa atividade; ela está envolvida possivelmente no processo de biogêneses de cloroplastos atuando em reações de fosforilação para a estabilidade proteica em plastídio (FUCILE *et al.*, 2008). Em bactérias, a SK também possui duas isoenzimas, sendo uma codificada pelo gene AROK, do tipo I, e a outra pelo gene AROL, do tipo II (CHENG *et al.*, 2005).

1.2.6. Enolpiruvilchiquimato 3-fosfato sintase (EPSP-sintase)

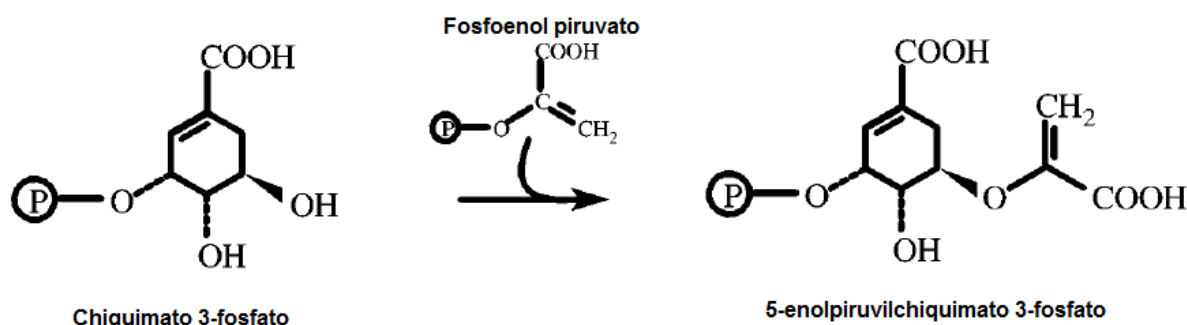


Figura 7. Reação da enzima EPSP-sintase da via chiquimato (Figura retirada e adaptada de HERRMANN & WEAVER 1999).

O sexto passo da via consiste na condensação de chiquimato 3-fosfato e fosfoenolpiruvato que serão convertidos em 5-enolpiruvilchiquimato 3-fosfato (Figura 7); nessa reação ocorre a liberação de fosfato inorgânico proveniente do fosfoenolpiruvato. Essa reação é catalisada pela EPSP-sintase (E.C. 2.5.1.19), uma enzima monomérica com massa molecular de 48 kDa em plantas (HERRMANN, 1999). EPSP-sintase é destacada por possuir um inibidor comercial já bem descrito e amplamente utilizado como herbicida, o glifosato, que é o princípio ativo de uns dos herbicidas mais utilizados comercialmente, o *Roundup* (SCHONBRUNN *et al.*, 2001). Através da ação do glifosato foi possível distinguir dois tipos de EPSP-

sintase. A classe I, que é sensível ao glifosato em pequenas doses, e a classe II, que se apresenta tolerante a elevadas doses do glifosato (DILL *et al.*, 2008). O glifosato não age diretamente na EPSP-sintase, necessitando que o substrato esteja ligado para formar um complexo ternário e impedir a formação do produto final, competindo com o substrato fosfoenolpiruvil (DILL *et al.*, 2008).

A ação do glifosato na via do chiquimato e a interferência na viabilidade de *E. coli*, *Salmonella typhimurium* e *Plasmodium falciparum* têm sido demonstradas (PENG *et al.*, 2012). O glifosato tem sido associado com o surgimento de câncer e deformações cardíacas (DE ROOS *et al.*, 2005). Entretanto, alguns autores sugerem que esses estudos não são suficientemente analisados para tal conclusão (KIMMEL *et al.*, 2013).

1.2.7. Corismato sintase (CS)

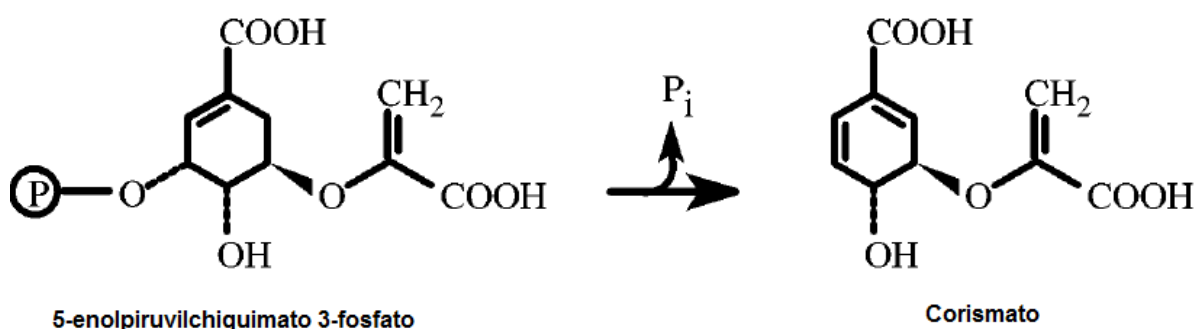


Figura 8. Reação da enzima Corismato sintase da via chiquimato (Figura retirada e adaptada de HERRMANN & WEAVER 1999).

A CS (E.C. 4.2.3.5) converte o 5-enolpiruvilchiquimato 3-fosfato em corismato, o qual é o produto final da via do chiquimato (Figura 8). Esta reação ocorre através da trans eliminação do grupo fosfato do 5-enolpiruvilchiquimato 3-fosfato e utiliza a redução de flavinas para a sua atividade. O Papel da flavina é doar elétrons para facilitar a retirada do grupo fosfato para a produção do corismato. A flavina atua junto com o substrato para formar um complexo ternário e liberar os elétrons (MACHEROUX *et al.*, 1998). Em fungos, foi detectada a necessidade de um tipo

específico de flavina redutase NADPH dependente, denominada diaforase. Essa enzima somente é ativa em condições anaeróbias, demonstrando sua importância para a manutenção do fungo, já que em condições anaeróbias o fungo pode sofrer privação de nutrientes (WHITE *et al.*, 1988; HORSBURGH *et al.*, 1996).

Em plantas, a CS possui sequência de direcionamento para os plastídios; CS somente é ativa quando essa sequência está presente. As estruturas das CS de plantas diferem das encontradas em bactérias e fungos. Nessas, as CS estão na forma de tetrâmero, enquanto que em plantas estão na forma dimérica (HENSTRAND *et al.*, 1995 a, b).

1.3. Interação proteína-proteína (IPP)

Os organismos dependem de uma gama de interações proteicas para a sua sobrevivência. Essas interações trabalham de acordo com uma máquina onde cada proteína é uma peça fundamental para a homeostase do organismo. Uma alteração nesses processos pode acarretar em sérias consequências para o organismo (BARABÁSI *et al.*, 2015).

O estudo das interações proteicas tem como objetivo determinar a sua rede de interação, uma vez que uma proteína pode se ligar a uma única proteína ou a diversas outras proteínas. Assim, essas interações podem ocorrer de diversas formas, talvez através de um único sítio de ligação ou por interação entre os seus resíduos expostos, ou seja, apresentando diferentes sítios de ligação (JOHNSON; HUMMER, 2013).

Essas interações podem afetar processos celulares como, crescimento, ciclo celular, transdução de sinal e até recrutamento de complexos proteicos para promotores específicos. Os efeitos desse processo de interação proteica podem afetar a enzima de diferentes formas, como por exemplo, propriedade cinética, mudança de afinidade pelo substrato, construção de novos sítios de ligação e inativação proteica (PHIZICKY; FIELDS, 1995).

O conhecimento dessas interações é importante para demonstrar o mapa de ação de uma proteína. Com ele é possível entender melhor o funcionamento de determinadas vias metabólicas e a consequência de sua alteração para o organismo (KOZAKOV *et al.*, 2011). Dentre essas aplicações podemos citar o estudo de mutações nas vias metabólicas, assim como o reconhecimento de proteínas que são essenciais a alguns micro-organismos e utilizá-las como alvos específicos visando o tratamento causado por estes organismos nos seres humanos (JOHNSON & HUMMER, 2013).

O estudo de interações proteicas deve o seu sucesso graças à espectrometria de massa (MS), que utiliza para a identificação de proteínas através de cromatografia por gradiente acoplado a uma espectrometria de íons. Em adição, o aumento no número de proteínas identificadas e anotadas contribuíram ainda mais para a ampliação do conhecimento nessa área (ABU-FARHA *et al.*, 2008). A partir do máximo de dados colhidos dos peptídeos, o espectrômetro de massas processa os peptídeos utilizando bancos de dados para verificar tanto sua sequência correta quanto a inversa, afim de eliminar falsos positivos (MORRIS *et al.*, 2014).

O estudo de IPP pode ser classificado em três classes, *in vitro*, *in vivo* e *in silico*. A análise *in vitro* é realizada em ambiente controlado, onde o extrato bruto proteico é colocado diretamente com a proteína alvo e geralmente é utilizado cromatografia de afinidade para separar as proteínas que interagiram com a proteína alvo. No método *in vivo* é utilizado o DNA recombinante para produzir a proteína de interesse no organismo desejado, sendo posteriormente separada por SDS-PAGE ou por cromatografia de afinidade. No método *in silico*, o estudo das interações se dá utilizando programas de simulações computacionais (RAO *et al.*, 2014).

As técnicas utilizadas para as interações proteicas *in vitro* são diversas; cada uma tem seu próprio princípio na elucidação de um determinado aspecto da interação proteica. No caso da purificação por afinidade de repetição (TAP-MS), são utilizadas duas proteínas, onde a proteína alvo substitui a proteína original no locus cromossomal e essa está marcada com um epítipo que será utilizado na cromatografia por afinidade. A adição do epítipo pode gerar alguns problemas com, por exemplo, afetar a função proteica, porém ela pode dar uma ideia melhor das

proteínas que interagem já que são executadas diretamente em células de organismos desejado (CIPAK *et al.*, 2009).

Na técnica de *pull down*, a proteína de interesse pode ser imobilizada em uma matriz com afinidade pela proteína alvo ou ser produzida com uma cauda proteica fusionada, como por exemplo, GST ou Histidina. Essa técnica possui uma maior sensibilidade podendo detectar interações fracas, porém apresenta uma desvantagem, pois, pode apresentar falso positivo, devido ao uso do de extrato bruto de proteínas; esse extrato pode conter proteínas que não se encontram no mesmo espaço físico da proteína alvo (RAO *et al.*, 2014).

Na co-imunoprecipitação é utilizado anticorpo específico de reconhecimento da proteína de interesse. Esse anticorpo é ligado a uma matriz utilizando a proteína A, proveniente de bactérias e o lisado proteico do organismo estudado é adicionado a essa matriz. Após incubação, o material é centrifugado e todas as proteínas que interagem com a proteína alvo são precipitadas (BERGGARD; LINSE; JAMES, 2007).

Outra técnica utiliza *in vitro* é o micro-arranjos de proteínas, onde a proteína de interesse será analisada em pequenos chips. Esse método apresenta uma maior sensibilidade, especificidade e ainda permite a análise de diferentes proteínas com um menor número de amostras. A aplicação desse método compreende três categorias: A primeira é a análise dos níveis de expressão da proteína, onde anticorpos específicos para a proteína alvo são acoplados aos micros chips nos quais são colocadas as amostras. Em seguida, é inserido um segundo anticorpo denominado repórter, o qual irá se ligar aos anticorpos primários quando estes estiverem ligados a alguma proteína, podendo esta ser quantificada ou identificada. A segunda auxilia na elucidação da função proteica, consistindo na fixação da proteína alvo em lâminas de vidro. Esse método pode fornecer informações como, sítios de ligação, interação entre enzima e substrato e tipos de reações bioquímicas. Na terceira categoria a fase reversa faz basicamente o contrário da primeira categoria. A amostra é espalhada em uma lâmina de vidro depois submetida a uma solução contendo diferentes anticorpos que reconhecerão diferentes tipos de tecido ou proteínas, tudo em uma única amostra (SUTANDY *et al.*, 2014).

Outro ensaio amplamente utilizado no estudo de interações proteicas é o sistema dois híbridos, o qual consiste na utilização das propriedades da proteína GAL4 que possui dois domínios, um responsável pela ligação ao DNA e outro pela ligação ao complexo de transcrição. É necessária a construção de dois plasmídeos onde um terá a proteína “isca”, e o outro, o domínio de ativação da proteína GAL4; esses vetores são introduzidos em leveduras. A interação entre essas duas proteínas resultará na ativação de um gene repórter presente no plasmídeo; neste caso é utilizado o gene *LacZ*. As interações proteicas podem ser facilmente analisadas através da atividade da enzima β -galactosidase com a adição do corante X-gal. Esse método permite um estudo mais abrangente das interações proteicas de uma única vez. Entretanto, teria como desvantagem a ocorrência do processo dentro do núcleo, então detectaria apenas proteínas que têm atividades dentro do nuclear (RODRÍGUEZ-NEGRETE; BEJARANO; CASTILLO, 2014).

2. Justificativa

A PCM é uma doença endêmica na América Latina e a mais importante micose sistêmica no Brasil. A via do chiquimato é importante para a sobrevivência de fungos e é ausente no ser humano, tornando-se assim, um bom candidato a alvo farmacológico no tratamento da PCM e outras micoses. Essa via tem sido estudada em plantas e bactérias, entretanto, não há relatos de estudos em *Paracoccidioides* spp.. Dessa forma, o estudo das interações proteicas da EPSP-sintase, uma das enzimas da via do chiquimato, deverá auxiliar no entendimento das funções dessa enzima, bem como na busca de compostos inibidores dessas interações visando a descoberta de novos antifúngicos.

3. Objetivo

Este trabalho teve como objetivo realizar a caracterização e expressão heteróloga da proteína EPSP-sintase proveniente de *P. brasiliensis* a fim de identificar suas interações proteicas, bem como obter a sua estrutura 3D que deverá ser utilizada futuramente na triagem virtual de inibidores.

3.1. Objetivos específicos

- Caracterizar a EPSP-sintase através de análises *in silico*;
- Realizar a modelagem molecular da proteína EPSP-sintase;
- Clonar o gene da EPSP-sintase em vetor pGEX-4T3, produzir a proteína recombinante em *E. coli* BL21 *pLysS* e purificá-la;
- Produzir anticorpos policlonais para a EPSP-sintase em camundongos;
- Identificar as proteínas de *P. brasiliensis* que interagem com a EPSP-sintase.

4. Materiais e Métodos

4.1. Caracterização *in silico* da EPSP-sintase

A análise *in silico* foi realizada a partir da sequência de aminoácidos da proteína Arom, correspondente ao sítio catalítico da EPSP-sintase, de *Pb18*, proveniente do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (XM_010757716). A composição de aminoácidos, massa molecular e ponto isoelétrico foram identificados utilizando o *web-software* ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>). A identificação de domínio, família, sítios

funcionais e padrões associados à proteína foi realizada utilizando o PROSITE (<http://prosite.expasy.org/>).

A predição de peptídeo sinal e seu respectivo sítio de clivagem foi realizada através do SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). A localização subcelular foi predita utilizando o TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>).

4.1.1. Predição da estrutura 3D da EPSP-sintase

A estrutura 3D da EPSP-sintase foi predita utilizando a estratégia de modelagem por homologia. A sequência de aminoácidos da EPSP-sintase (PADG_00875) foi extraída da base de dados UniProt (APWEILER *et al.*, 2004) e submetida ao estudo de modelagem por homologia no servidor automatizado SWISS-MODEL (BORDOLI *et al.*, 2009; BIASINI *et al.*, 2014). A modelagem consistiu basicamente de quatro etapas: (i) identificação e seleção de proteínas-molde disponíveis na base de dados *Protein Data Bank* (BERMAN *et al.*, 2000), (ii) alinhamento das sequências, (iii) construção das coordenadas 3D e (iv) validação/seleção do melhor modelo utilizando parâmetros de seleção iniciais como a estimativa global de qualidade do modelo (GMQE, do inglês, *Global Model Quality Estimation*) e função de pontuação QMEAN (BENKERT *et al.*, 2009). O GMQE representa uma estimativa de qualidade que combina propriedades do alinhamento proteína-molde. Já a função de pontuação QMEAN4 estima a qualidade global do modelo baseando-se na combinação linear de quatro descritores estruturais: geometria local, dois potenciais de interação dependentes de distância (baseados em todos os átomos), e potencial de solvatação (BENKERT *et al.*, 2009).

Após construção do modelo inicial, a estrutura predita foi submetida ao processo de otimização geométrica e estereoquímica no servidor KoBa^{MIN} (CHOPRA *et al.*, 2008; CHOPRA *et al.*, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2012). O protocolo de refinamento foi realizado em duas etapas: (i) minimização de energia usando um potencial de força média baseado em conhecimento e (ii) correção estereo-química.

Após o processo de otimização, o modelo estrutural foi ainda submetido ao módulo *Protein Preparation Wizard*, disponível no pacote de programas MAESTRO versão 9.3 (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2014). Nesta etapa, foi realizada a correção das ordens de ligação e adição de hidrogênios e definição dos estados de protonação em pH 7.0 ± 1.0 (para ambos: aminoácidos, substrato e cofator) utilizando o programa Epik versão 2.7 (SHELLEY *et al.*, 2007). Ao final deste processo, a estrutura foi novamente submetida a uma nova minimização de energia utilizando o campo de força OPLS-2005 (BANKS *et al.*, 2005).

Com o objetivo de avaliar a qualidade dos ângulos *phi* (ϕ) e *psi* (ψ) da cadeia principal (análise de Ramachandran) e dos ângulos *chi* (χ) dos rotâmeros de cadeia lateral, a estrutura 3D da EPSP-sintase foi submetida a uma análise estatística de qualidade utilizando o servidor MolProbity (CHEN *et al.*, 2010). Ao final deste processo, o programa gráfico PyMOL versão 1.3 (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2010) foi utilizado para a visualização, análise estrutural e construção das imagens.

4.2. Clonagem e Transformação

4.2.1. Extração de RNA total e obtenção do cDNA

Leveduras de *Pb18* (ATCC 32069) foram cultivadas em meio Fava-Netto líquido (FAVA-NETTO, 1955) por 36 h à 36°C, sob agitação à 130 rpm. As células foram centrifugadas a 2.000 *g* por 15 min e lavadas com PBS 1X. As células foram submetidas à extração com trizol (Invitrogen) (VAN BURIK *et al.*, 1998). As amostras resuspendidas em água foram quantificadas em NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Para a construção do cDNA foi utilizado o kit High-capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo Fisher Scientific). Os reagentes utilizados na reação de síntese do cDNA foram: 2 μ L de 10x RT buffer, 0,8 μ L de 25x dNTP mix, 10 μ L de RT Random primers, 1 μ L de Multiscribe Reverse Transcriptase, 4,2 μ L de água livre de nucleasse e 10 μ L de RNA (10 μ M). As condições da PCR foram: ciclo 1, 25°C por

10 min, ciclo 2, 25°C por 120 min, ciclo 3, 85°C por 5 min e 4º ciclo 4°C ∞. Para confirmar a obtenção do cDNA, foi realizada uma PCR com oligonucleotídeos para o gene da tubulina. A reação foi realizada com 5 µL de água miliQ, 2 µL de cada oligonucleotídeo senso e antisenso (1 µM), 10 µL de cDNA (10 µM) e 10 µL de *green tag*. As condições de ciclagem foram: ciclo 1, 94°C por 5 min, ciclo 2, 94°C por 20 s, ciclo 3, 60°C por 20 s, ciclo 4, 72°C por 20 s, ciclo 5, 72 °C por 5 min e ciclo 6, 4 °C ∞, o ciclo de 2, 3 e 4 foram repetidos 40 vezes. Em seguida foi realizada a eletroforese em gel de agarose, a 1% para visualização das bandas. As amostras de cDNA foram armazenadas em freezer a -80 °C.

4.2.2. Construção dos oligonucleotídeos e amplificação da região codificadora para EPSP-sintase

A sequência do complexo AROM de *Pb18* (NW_011371358; 5061 pb) foi obtida nos bancos de dados NCBI. O blastx foi realizado visando encontrar a sequência proteica correspondente à penta funcional AROM (número de acesso NW_011371358). Assim, foi verificado que a sequência proteica possui 1.599 aminoácidos. A região corresponde ao gene da EPSP-sintase foi selecionada, e realizado novamente o blastn visando identificar sua sequência de nucleotídeos. Assim, verificou-se que a sequência da EPSP-sintase possui 1.288 pb (número de acesso no NCBI: XM_010757716). Baseado na sequência de nucleotídeos, os oligonucleotídeos foram construídos para amplificação da região específica do complexo Arom correspondente à EPSP-sintase.

Os oligonucleotídeos senso e anti senso utilizados para amplificação da região codificadora da EPSP sintase foram desenhados utilizando a plataforma “Primer design tool for infusion HD Cloning Kit” da Clontech (http://www.clontech.com/US/Products/Cloning_and_Competent_Cells/Cloning_Resources/Online_In-Fusion_Tools). Nessa plataforma, foi inserida a sequência de nucleotídeos da EPSP-sintase de *P. brasiliensis*, a enzima de restrição *Bam*HI e também a sequência de nucleotídeos do vetor de clonagem pGEX4-T3.

Os oligonucleotídeos construídos possuem características específicas para a utilização do kit de clonagem Infusion da clontec. Os dois oligonucleotídeos construídos foram acrescidos de 15 pb, os quais são reconhecidos pela recombinase. Os oligonucleotídeos senso e antisenso estão a seguir: '5-GGT TCC GCG TGG ATC CCT GAA TGT CAC CTG CAC AC-3' e antisenso '5-GGG AAT TCG GGG ATC CCT GAG CTA GGG TGT TCC A-3'.

A PCR foi realizada utilizando 4,5 µL de água miliQ, 1 µL de cada oligonucleotídeo senso e antisenso (1 µM), 1 µL de cDNA (10 µM) e 7,5 µL de *Green tag*. As condições de ciclagem foram: ciclo 1, 94 °C por 5 min, ciclo 2, 94 °C por 20 s, ciclo 3, X °C (onde X representa a variação de temperatura de 54 °C a 59 °C) por 1 min, ciclo 4, 72 °C por 1 min e 30 s, ciclo 5, 72 °C por 5 min e ciclo 6, 4 °C ∞, o ciclo de 2, 3 e 4 foram repetidos 39 vezes. O produto foi visualizado em gel de agarose 1%. O produto obtido da PCR utilizando o cDNA da EPSP-sintase foi purificado utilizando o kit "QIAquick PCR Purification" (Qiagen), quantificados em Nanodrop e armazenados em freezer a -20 °C. O sequenciamento foi realizado visando confirmar que o fragmento amplificado era referente à EPSP-sintase.

4.2.3. Digestão do Vetor pGEX-4T3

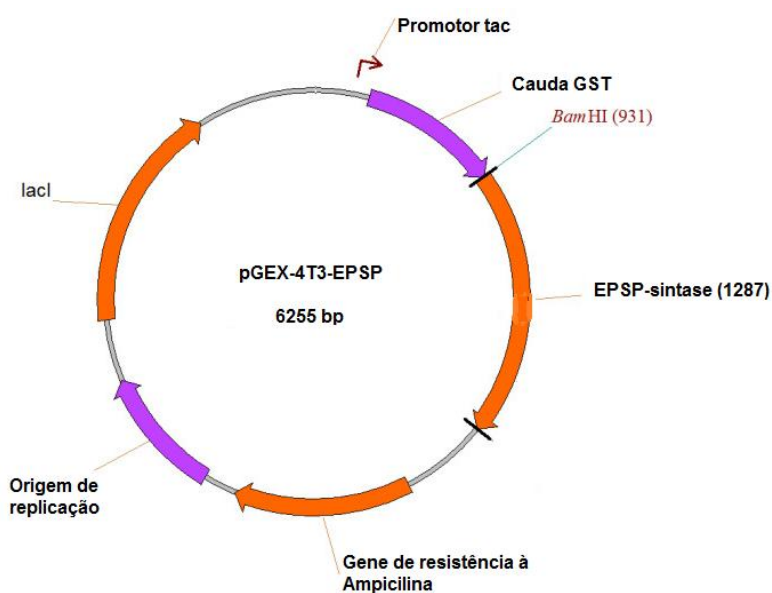


Figura 9. Mapa de clonagem do pGEX-4T3-EPSP.

O programa GeneRunner foi utilizado para seleção da enzima a ser utilizada na clivagem do inserto e clonagem no vetor pGEX-4T3. O kit “QIAprep Spin Miniprep” (Qiagen) foi utilizado para purificação do plasmídeo. A digestão do vetor foi realizada utilizando a enzima de restrição *Bam*HI (Thermo Scientific) com incubação por 2 h a 37 °C, seguindo as orientações do fabricante, sendo confirmada em gel de agarose 1% onde foram observados os padrões do vetor intacto e digerido. Posteriormente, foi realizada a purificação e quantificação do vetor em Nanodrop (Figura 9).

4.2.4. Reação de ligação da EPSP-sintase ao vetor pGEX-4T3

Como já dito anteriormente, os oligonucleotídeos construídos para amplificação da EPSP-sintase, possuem 15 pb adicionais no sentido 5' correspondente ao vetor pGEX-4T3. O produto gerado a partir da amplificação do cDNA, agora possui uma complementariedade com o vetor; essas regiões são reconhecidas por uma enzima com atividade exonuclease 3'- 5' que realiza a ligação do vetor com o inserto, dando origem ao DNA recombinante (Figura 9). Para essa reação foi utilizado 2 µL de 5X In-Fusion HD enzyme premix, 3 µL de vetor digerido (150 ng), 0,5 µL de fragmento EPSP-sintase (50 ng) e 4,5 µL de água miliQ. A reação foi incubada por 15 min à 50 °C, colocada no gelo e em seguida realizada a transformação em células competentes.

4.2.5. Transformação por choque térmico em *E. Coli* (DE3)

Para a transformação, foi utilizado 40 µL de células *E. Coli* (DE3) e 2,5 µL da reação acima. As células foram incubadas no gelo por 30 min e submetidas à temperatura de 42 °C por 45 s e retornadas ao gelo por 2 min. As células foram

resuspendidas em meio Luria-Bertani (LB) líquido (10 g triptona, 5 g extrato de levedura, 5 g NaCl, 4 M de NaOH pH 7 e H₂O destilada para volume total de 1000 mL) e incubada em temperatura de 37 °C por 1 h sob agitação de 125-137 rpm. Após esse período, foram cultivadas em placas de petri contendo meio LB sólido suplementado de 10% de glicose, 25 mg/mL de ampicilina e 34 mg/mL de cloranfenicol.

Após o crescimento por 16 h, foi observado o crescimento apenas das bactérias resistentes à ampicilina, visto que a linhagem *E. coli* não possui resistência a tal antibiótico; apenas células contendo o pGEX4T3 cresceram, visto que o vetor contém o gene de resistência a esse antibiótico.

Para confirmar os transformantes, foi realizada uma PCR e o produto da reação foi analisado em gel de agarose 1%. Após confirmação, o plasmídeo foi extraído da célula com o kit de extração miniprep da QIAGEN. O plasmídeo foi purificado e digerido novamente com a enzima *Bam*HI, e o produto da reação foi analisado em gel de agarose 1% visando confirmar a liberação do inserto.

4.3. Expressão heteróloga em *E. Coli* (DE3)

Para indução, as células foram cultivadas por 12 h em 10 mL de meio LB líquido contendo 25 mg/mL de ampicilina e 34 mg/mL de clorafenicol. Após esse período, as células foram transferidas para frascos erlenmeyer contendo as mesmas concentrações de ampicilina e clorafenicol e cultivadas à 37 °C, sob agitação de 130 rpm até atingir a fase estacionária, D.O. entre 0,4 e 0,6 de absorbância. Nesse momento, foi adicionado 1 mM de IPTG e retornado para mesmas condições anteriores por 1 h. As células foram centrifugadas por 10 min a 17.900 *g* e ressuspendidas em PBS 1x. A indução da EPSP-sintase foi confirmada em gel unidimensional SDS-PAGE e as alíquotas foram armazenadas à -20 °C. A proteína induzida foi retirada do gel SDS-PAGE e digerida para identificação por espectrometria de massas.

4.4. Purificação da proteína recombinante

As amostras coletadas foram colocadas em tubo para extração contendo 100 µg/mL de lisozima e pérolas de vidro e incubadas por 1 h em gelo sobre agitação. Logo após esse período, foram submetidas à sonicação por ultrassom 4 vezes por 10 min, 1 min no vórtex e 5 min no gelo. Em seguida, a amostra foi passada em seringa e centrifugada a 17.900 g por 15 min separando a parte solúvel da insolúvel.

Para o processo de liberação dos corpos de inclusão da proteína produzida, foi usado parte do protocolo sugerido por YANG *et al.* (2011). Nesta etapa, foi adicionado ao pellet contendo a proteína, 1 mL de tampão 0,1 M tris HCl pH 8,5, contendo 8 M de ureia, agitado por 5 min e deixado em repouso por 1 h em temperatura ambiente. As amostras foram dialisadas por 12 h em 50 mM de tampão Hepes e 75 mM de NaCl com pH 8,5, uma vez que o ponto isoelétrico da EPSP-sintase é de aproximadamente 7,5. As amostras foram corridas no gel unidimensional SDS-PAGE.

O pGEX-4T3 possui a GST, a qual é acoplada à proteína de interesse; a GST possui afinidade pela resina sefarose 4B, permitindo assim, a purificação da proteína de interesse em um único passo através da cromatografia de afinidade. A resina foi preparada de acordo com o protocolo do fabricante e então, 500 µL da proteína dialisa foi adicionada a 200 µL da resina e incubada no gelo por 3 h sob agitação. Após esse período, a resina foi lavada 3 vezes com tampão PBS 1x.

Para a eluição da resina, foi utilizada a solução de 10 mM de glutatona reduzida e 50 mM de tris-Hcl pH 8. O mesmo volume de resina foi aplicado do tampão de eluição, assim, 200 µL de tampão de eluição foram adicionados a 200 µL da resina, deixado em agitação leve por 10 min e centrifugados a 800 g por 5 min. Esse processo foi realizado por 3 vezes, e o sobrenadante contendo a proteína foi analisado em gel SDS-PAGE. As amostras foram então armazenadas à -20°C.

4.5. Produção de anticorpos policlonais

A proteína recombinante foi separada em gel SDS-PAGE, o qual foi corado com azul de comassie; a região correspondente à proteína recombinante, foi retirada do gel e macerada em grinder com PBS 1x. Na fase de produção de anticorpos específicos para o teste de *Western blot*, foram utilizados cinco camundongos *swiss*, dos quais quatro foram imunizados três vezes, através da injeção de 100 µL da solução de macerado, e um camundongo permaneceu como controle pré-imune. O gel de acrilamida foi utilizado como agente coadjuvante para estimulação do sistema imune.

Após o período de imunização, os camundongos foram anestesiados utilizando uma solução contendo 200 µL de cetamina, 500 µL de xilasina completando para 1 mL com água destilada. Foi utilizado 100 µL desta solução para cada camundongos. Através da punção cardíaca foi retirado aproximadamente 1 mL de sangue que foi centrifugado a 6.800 *g* por 5 min; o soro foi removido e adicionado o mesmo volume de glicerol para armazenamento em glicerol 50% à -20°C.

4.6. Análise dos anticorpos através da técnica *Western blot*

A proteína recombinante foi quantificada utilizando o método de Bradford (1976) e analisada em gel SDS-PAGE. A proteína foi transferida por 12 h para a membrana de nitrocelulose de 0,2 µm (GE Healthcare) à 4 °C, utilizando uma corrente de 20 V. Após transferência, a membrana foi corada com o corante Rouge-Ponceau, para verificar se houve realmente a transferência da proteína. A membrana foi lavada com água destilada, incubada em tampão de bloqueio com leite desnatado 5% diluído em tampão contendo PBS 1x e tween-20 0,1% por 12 h. Em seguida, foi lavada com tampão de lavagem por 3 vezes, contendo PBS 1x e tween-20 0,1%.

A membrana foi incubada por 2 h em tampão de bloqueio contendo anticorpos primários na proporção de 100:1000 à temperatura ambiente. A membrana foi incubada novamente por 1 h e 30 min com tampão de bloqueio e anticorpos secundários anti-IgG de camundongos na proporção de 1: 5000 à temperatura ambiente. Em seguida, foi lavada com tampão de lavagem por 15 min por 3 vezes. Para verificar a interação entre os anticorpos e a proteína, em seguida foi adicionada a solução de revelação contendo BCIP 0,3% e NBT 6,6% em tampão de fosfatase alcalina, contendo NaCl 100 mM; MgCl 2 5 mM; Tris-HCl 2 mM pH 9,5.

4.7. Extração de proteínas de fungo *P. brasiliensis*

Células leveduriformes de *Pb18* foram cultivadas em meio Fava-Netto sólido (FAVA-NETTO, 1955) à 37 °C por 5 dias. Depois foram transferidas para a cultura em meio Fava-Netto líquido (FAVA-NETTO, 1955) sob agitação a 128 rpm por 48 h. A cultura foi transferidas para tubos de 50 mL, centrifugadas a 2.000 *g* por 15 min e ressuspensas em PBS 1x. As células foram colocadas em tubos com pérolas de vidro e tampão de extração tris-cálcio (20 mM Tris-HCl pH 8.8, 2 mM CaCl₂) e levadas ao *bead beater* por 1 min e em seguida no gelo por 5 min; todo esse processo foi repetido três vezes. As amostras foram centrifugadas a 20.000 *g*. O sobrenadante foi analisado em gel SDS-PAGE e quantificado por Bradford (1976).

4.8. Análise das interações da EPSP-sintase

Cerca de 3 mg do extrato proteico de células leveduriformes de *Pb18* foram incubadas com 60 µL da resina ligada à GST por 2 h à 4 °C sob agitação leve. A resina foi centrifugada a 500 *g* por 5 min e o sobrenadante foi incubado com 60 µL da resina ligada à EPSP-sintase fusionada à GST por 2 h à 4 °C seguido de mais 2 h à temperatura ambiente, ambas sob agitação. A incubação com a resina ligada à

GST foi utilizada como controle a fim de eliminar interações inespecíficas de proteínas que interagem com a GST e não apenas com a EPSP-sintase. Após incubação, a resina ligada à GST e ligada à EPSP-sintase foi centrifugada à 500 g por 5 min e lavada com PBS 1X gelado por 4 vezes.

Para análise das proteínas em espectrômetro de massas associado à cromatografia líquida, a resina ligada à EPSP-sintase e à GST foram eluídas em tampão de eluição (10 mM de glutatona reduzida em 50 mM tris-HCl, pH 8,0) por 10 min à temperatura ambiente e então centrifugadas nas mesmas condições anteriores. A eluição foi repetida por mais 2 vezes. O recuperado total de proteínas foi submetido à digestão trípica. Para concentrar as amostras eluídas, estas foram liofilizadas e ressuspensas em 20 µL de tampão de NH_4HCO_3 (50 mM pH 8,5) para realização da digestão com tripsina.

4.9. Digestão com tripsina e análise por espectrometria de massa LC-MS

A digestão enzimática das proteínas foi realizada adicionando-se 25 µL de uma solução 0,2% v/v de RapiGEST™ SF Surfactante (Waters) em cada amostra. As duas amostras foram agitadas em vórtex e incubadas por 15 min à 80 °C. Após esse período, foram rapidamente centrifugadas e 2,5 µL de Ditioneitol (DTT) (100 mM) (GE) foi adicionado a fim de reduzir as pontes dissulfeto. As amostras foram agitadas em vórtex e incubadas por 30 min à 60 °C. Em seguida, foram resfriadas à 25 °C e 2,5 µL de iodoacetamida (300 mM) (GE) foram adicionados a fim de alquilar as cisteínas, seguido de agitação em vórtex e repouso por 30 min à 25 °C e protegidas da luz. As proteínas foram digeridas com 10 µL de tripsina (Promega) na concentração 0,05 µg/µL, seguido por agitação em vórtex e incubação por 16 h à 37 °C. Após esse período, foram adicionados 10 µL de uma solução de ácido trifluoroacético 5% (Sigma-Aldrich) visando precipitar o RapiGEST™ e finalizar a atividade da tripsina, seguido de agitação em vórtex e incubação a 37°C por 90 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 18.000 g por 30 min a 4°C e o sobrenadante transferido para um novo tubo de 1,5 mL que foi novamente

centrifugado para evitar contaminação com o precipitado no sobrenadante. Esse tubo foi então colocado em *speed vacuum* (Eppendorf) até completa secagem da amostra. As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C até serem submetidas à LC-MS (cromatografia líquida associada a espectrometria de massas). Os peptídeos obtidos foram ressuspensos em 50 µL de formiato de amônio (20 mM) pH 10 com 80 mol/µL de solução padrão (fosforilase B padrão MassPREP™; Waters).

Os peptídeos tripticos foram separados através de cromatografia líquida de alta eficiência em nano escala utilizando o sistema ACQUITY UPLC® M-Class (Waters) e posteriormente analisados em espectrômetro de massas Synapt G1 MSTM (Waters) com fonte nano eletrospray (ESI) e dois analisadores de massa. As amostras foram processadas e analisadas utilizando o software ProteinLynx Global Server version 3.0.2 (PLGS) (Waters). As amostras foram analisadas em triplicata. Após o processamento, cada íon apresenta um tempo de retenção de massa exata (EMRT), e peso molecular foi deduzido com base na razão carga/massa (m/z). Os espectros processados foram comparados com sequências de proteínas de *Pb18* (Broad Institute; <http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides/MultiHome.html>) juntamente com suas respectivas sequências reversas.

4.10. Classificação funcional das proteínas envolvidas na interação com EPSP-sintase

As proteínas identificadas por espectrometria de massas foram classificadas em categorias funcionais de acordo com o MIPS (Functional Catalogue Database) (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/funcatDB/>), utilizando o banco de dados Pedant (http://pedant.gsf.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method=analysis&Db=p3_p2873_3_Par_brasi_Pb18). As proteínas hipotéticas foram submetidas à ferramenta BlastP (Basic Local Alignment Search Tool) do NCBI para busca de similaridades de sequência visando sua anotação.

5. Resultados e discussões

5.1 Análise *in silico*

A sequência de nucleotídeos e de proteína predita da EPSP-sintase de *Pb18* foi obtida no NCBI. A massa molecular e o ponto isoelétrico foram identificados utilizando o *web-software* ProtParam. A identificação de domínio, família, sítios funcionais e padrões associados à proteína foi realizada utilizando o PROSITE. A predição de peptídeo sinal e seu respectivo sítio de clivagem foi realizada através do SignalP. A localização subcelular foi predita utilizando o TargetP.

Através dessas análises *in silico*, verificou-se que a EPSP-sintase de *Pb18* é composta por 429 aminoácidos, apresentando massa molecular de 45,8 kDa e ponto isoelétrico de 7,5. O aminoácido alanina é o mais abundante em sua composição (10%), seguido de leucina (9,3%), glicina (8,9%), serina (8,2%) e treonina (8,4%). A composição da estrutura secundária da enzima EPSP-sintase é formada basicamente de α -Hélices (30%) e folhas- β (17%). Esses achados corroboram com a ideia de conservação entre as espécies, visto que em *Arabidopsis* a sua constituição é de 31% de α -Hélice e 17% de Folha- β (GARG et al., 2014). A sequência de nucleotídeos e de aminoácidos da EPSP-sintase é apresentada na Figura 2.

A fosforilação das enzimas é importante, pois, desempenham papéis fundamentais em suas atividades biológicas, podendo alterar sua conformação e sua afinidade por determinados substratos (BELTRÃO, 2009). Um total de 48 sítios de fosforilação foi encontrado na EPSP-sintase; as suas respectivas posições na sequência de aminoácidos foram identificadas (Figura 10). Os sítios de fosforilação foram identificados em 21 treoninas (posições 1, 22, 34, 39, 81, 87, 91, 104, 142, 178, 211, 248, 278, 289, 290, 360, 377, 382 e 426), 21 serinas (posições 7, 9, 20, 31, 50, 53, 70, 83, 97, 101, 144, 160, 188, 201, 209, 258, 286, 288, 299, 316 e 376) e 6 tirosinas (posições 75, 130, 162, 191, 216, 223). Os aminoácidos treonina, serina

e tirosina são conhecidos como sítios importantes no processo de fosforilação; a presença desses sítios indica que a EPSP-sintase poderia ser modificada nesses locais e isso poderia afetar a sua regulação e função no organismo (GROBAN *et al.*, 2006). Os sítios encontrados aqui foram preditos em análises *in silico*, assim, estudos mais específicos precisam ser realizados para determinar qual a real importância desses sítios para EPSP-sintase.

```

1  T* P P G S K S* I S* N R A L V L A A L G S* G T* C R I K N L
1  aca ccc cca gga tgc aaa agt atc tca aat cgg gcc ctt gtc ctt gcg gca ctt ggg tca ggc aca tgt cgc atc aaa aat ctc
29 L H S* D D T* E V M L T* A L E R L G A A T F S* W E S* Q G E
85 ctg cat tca gac gat act gag gtt atg ctt act gcc ctt gag cgt tta ggg gcc gcc aca ttc tca tgg gaa agtc agg gtg agg
57 V L V V N G N G G R M V A S* P K E L Y* L G N A G T* A S* R
169 tgc tgc tgg tca atg gca acg gtg gta gga tgg tgg cta gcc cca aag aat tat acc tag gaa acg ctg gga cgg cct cac ggt
85 F L T* T V A T* L A Q K G S* V A S S* V L T* G N A R M K Q R
252 tcc tga cta cgg tgc cta ctc tgc ccc aaa aag gga gtg tgc ctt caa gtg tcc tta cag gaa atg cac gga tga agc aaa ggc
113 P I G D L V D A L K A N G A D I E Y* L E N P K S L P L K
336 cca tgc gcg atc tag ttg acg ctc tca agg cca acg ggg ctg ata tgc agt acc tgc aaa atc cga aga gtc ttc cac tca aga
141 I T* A S* G G F A G G E M R L D A K V S S* Q Y* V S S L L M
421 tta ctg ctt ctg gag gct ttg ctg gtg ggg aga tgc gtc ttg atg cca aag tat cat ctc aat atg ttt cct cat tgc tga tgt
169 C A P Y A K E P V T* L R L V G G K P V S* Q L Y* V D M T T
505 gcg ctc cct atg caa aag agc cag tga ctc tac gtc ttg tgg gtg gca agc ctg ttt ctc aac ttt acg tgc aca tga cca ctgc
197 A M M R S* F G I D V K K S* E T* E E H T Y* H I P R G V Y* K
589 tat gat gag gtc gtt cgg cat cga cgt caa aaa atc tga aac gga aga gca cac tta tca tat ccc tgc tgg tgt cta taa gaa
225 N P A E Y V V E S D A S S A T Y P L A I A A M T* G T S C
673 ccc tgc gga ata tgt tgt tga aag tga tgc cag ctc ggc cac ata ccc ctt ggc gat tgc ggc tat gac ggg cac ttc ctg cac
253 T I P N I G S* K S L Q G D A R F A I E V L R P M G C T* V
757 cat ccc gaa tat tgg ttc caa gtc ctt gca agg cga tgc ccg att cgc cat tga ggt gct gcg acc tat ggg atg cac cgt gaa
281 N Q T D F S* T S* V T* G T A G G K L K S* L P T I D M E P M
841 tca aac aga ctt ctc aac ttc ggt gac tgg aac tgc tgg tgg aaa act caa atc act tcc tac cat aga cat gga gcc tat gac
309 T* D A F L T A S* V L A A V A R G Q G S N H T T R I C G I
924 tga cgc att cct tac tgc ttc agt cct tgc tgc cgt ggc aag agg tca ggg atc gaa tca cac tac acg gat atg cgg tat cgc
337 A N Q R V K E C N R I K A M K D E L A K F G V T* C R E
1.008 aaa cca gag ggt caa aga atg caa tgc aat taa agc aat gaa gga tga act tgc caa att tgg cgt cac ttg tgc gga gca
364 H D D G L E I D G I D R S* T* L R H P T* E G V F C Y D D H
1.089 tga cga tgg tct tga aat tga tgg tat cga ccg ttc gac tct gcg tca tcc gac aga agg tgt gtt ttg cta tga tga cca tgc
392 R V A M S F S V L A L V A P Q P T L I L E K E C V G K
1173 cgt agc aat gag ttt cag cgt cct tgc att ggt tgc tcc gca gcc aac gct gat cct tga aaa gga atg cgt agg gaa aac
419 T W P G W W N T* L A Q
1254 gtg gcc cgg ctg gtg gaa cac cct agc tca cag

```

Figura 10. Sequência de nucleotídeos e aminoácidos da EPSP-sintase de *Pb18*. Os sítios de fosforilação estão marcados com (*) e destacados em vermelho.

Muitas proteínas possuem peptídeo sinal, o qual indica qual o destino da proteína; esse sinal está localizado na porção N-terminal da proteína. A presença

desse sinal indica que elas devem ser direcionadas para cloroplastos, mitocôndria, retículo plasmático ou secretada, tendo a sua função diretamente ligada ao seu destino (KUNZE & BERGER, 2015). As análises realizadas utilizando os programas SignalP e TargetP mostraram que a EPSP-sintase não possui peptídeo sinal, assim, sua função é executada no citoplasma celular. Em plantas, a EPSP-sintase possui peptídeo sinal para cloroplasto, indicando que a sua atuação se encontra nessa organela celular (GEIGER & FUCHS, 2002). A indicação de que a EPSP-sintase estaria localizada no citoplasma, apresenta uma vantagem para o uso dessa proteína como alvo molecular para novos fármacos, pois a sua presença nesse ambiente celular poderia facilitar o acesso aos futuros inibidores para esta proteína.

5.2. Predição da estrutura 3D da EPSP-sintase de *Pb18*

Estudos de modelagem por homologia representam uma abordagem útil para a predição de estruturas 3D de proteínas. Esta abordagem baseia-se em padrões de conservação gerais que têm sido observados, em nível estrutural, no processo de evolução biológica, obedecendo aos seguintes padrões: (a) homologia entre sequências de aminoácidos implica em semelhança estrutural e funcional; (b) proteínas homólogas apresentam regiões internas conservadas (principalmente constituídas de elementos de estrutura secundária: α -hélices e folhas- β); (c) as principais diferenças estruturais entre proteínas homólogas ocorrem nas regiões externas (alças) que ligam os elementos de estrutura secundária.

O processo de predição de estruturas 3D de proteínas utilizando esta estratégia está fundamentado no princípio de que a conformação de uma estrutura molde (elucidada por técnicas experimentais como cristalografia de raios-X ou ressonância magnética molecular) pode ser transferida à estrutura desejada (homólogo sem dados experimentais). Entretanto, é necessário que entre ambas as sequências (alvo-molde), haja certo grau de identidade. Geralmente são considerados significantes moldes com identidade sequencial acima de 30% para com a proteína-alvo.

Tendo em vista a ausência de dados estruturais experimentais sobre a EPSP-sintase de *Pb18*, modelos por homologia foram construídos utilizando o servidor automatizado SWISS-MODEL. Durante a busca por possíveis moldes, observou-se que nenhum dos moldes identificados apresentava cobertura satisfatória com a sequência completa da proteína. Todavia, constatou-se que o subdomínio estrutural/catalítico apresentava cobertura satisfatória, e consequentemente poderia ser predito. Assim, uma vez selecionado os moldes, o próximo passo foi a construção de modelos 3D.

Avaliação da qualidade dos modelos gerados é uma etapa essencial do processo de modelagem por homologia. Não somente a qualidade da estrutura predita deve ser avaliada, mas também a da estrutura molde. Assim, possíveis erros no procedimento de predição da proteína alvo podem ser verificados. Dados estes requisitos, o melhor modelo foi gerado utilizando como molde a estrutura da EPSP-sintase de *Vibrio cholerae* (identidade sequencial: 43,90%; cobertura: 93,00%; código PDB: 3NVS) uma vez que apresentou parâmetros de qualidade globais satisfatórios, ou seja, valores de GMQE e QMEAN4 iguais a 0,72 e -2,82, respectivamente.

Após obtenção do modelo inicial de EPSP-sintase de *Pb18*, o mesmo foi submetido à correção geométrica, estereoquímica e dos estados de protonação dos resíduos de aminoácidos. Em seguida, uma avaliação de qualidade do modelo otimizado foi realizada no servidor MolProbity, onde são verificados parâmetros como comprimentos e ângulos de ligação, quiralidade, planaridade de ligações peptídicas, entre outros. A Tabela 1, apresenta os parâmetros obtidos antes e após a otimização da estrutura da EPSP-sintase de *Pb18*.

Como pode ser observado, tal procedimento levou a uma melhora significativa de todos os parâmetros avaliados. A avaliação da qualidade estereoquímica do modelo, realizada através da análise de Ramachandran, mostra que 94,12% dos aminoácidos estão dentro de regiões permitidas para os ângulos de torção dos seus resíduos, ao passo que apenas 1,41% estão em regiões não permitidas. A permanência destes “outliers” provavelmente consiste em erros no processo de modelagem ou no processo de cristalografia de raios-X, utilizado para determinar a estrutura do molde. Entretanto, vale ressaltar que todos os resíduos de aminoácido

em regiões desfavoráveis encontram-se distantes do sítio catalítico da enzima. Por outro lado, a análise *Clashscore* (pontuação: 0,00) demonstrou boa qualidade da estrutura em relação à existência de conflitos estéricos, ou seja, problemas decorrentes da sobreposição não natural de dois ou mais átomos não ligados em uma estrutura proteica.

Tabela 1. Parâmetros estatísticos obtidos antes e após a otimização estrutural do modelo de EPSP-sintase de *Pb18*.

Parâmetros	Modelo inicial	Modelo otimizado	Referencial
<i>Clashscore</i>	7,45	0,00	–
Pontuação MolProbity	2,08	1,02	–
Ligações ruins	0,03%	0,00%	0,00%
Ângulos ruins	1,21%	0,50%	<0,10%
Desvios C β	1,29%	1,03%	0,00%
Rotâmeros desfavoráveis	2,02%	1,45%	<0,30%
Rotâmeros favoráveis	94,80%	96,24%	>98,00%
<i>Outliers</i> (Ramachandram)	1,65%	1,41%	<0,05%
Favoráveis (Ramachandram)	93,18%	94,12%	>98,00%

A estrutura 3D do modelo da EPSP-sintase de *Pb18* está representada na Figura 11A. O alinhamento 3D entre o modelo gerado e o seu molde (código PDB: 3NVS, Figura 11B), utilizando os átomos de carbono alfa (C α), apresenta desvio quadrático médio (RMSD) igual a 0,46 (Figura 11B). Este valor indica uma alta similaridade 3D entre as estruturas em questão e uma estimativa da correta predição estrutural da EPSP-sintase de *Pb18*. Apenas as regiões formadas por alças (destacadas pelos círculos coloridos em verde) apresentam alta variabilidade em suas posições atômicas. Estas apresentam quantidades maiores de aminoácidos, ou seja, inserções obtidas durante o processo de evolução.

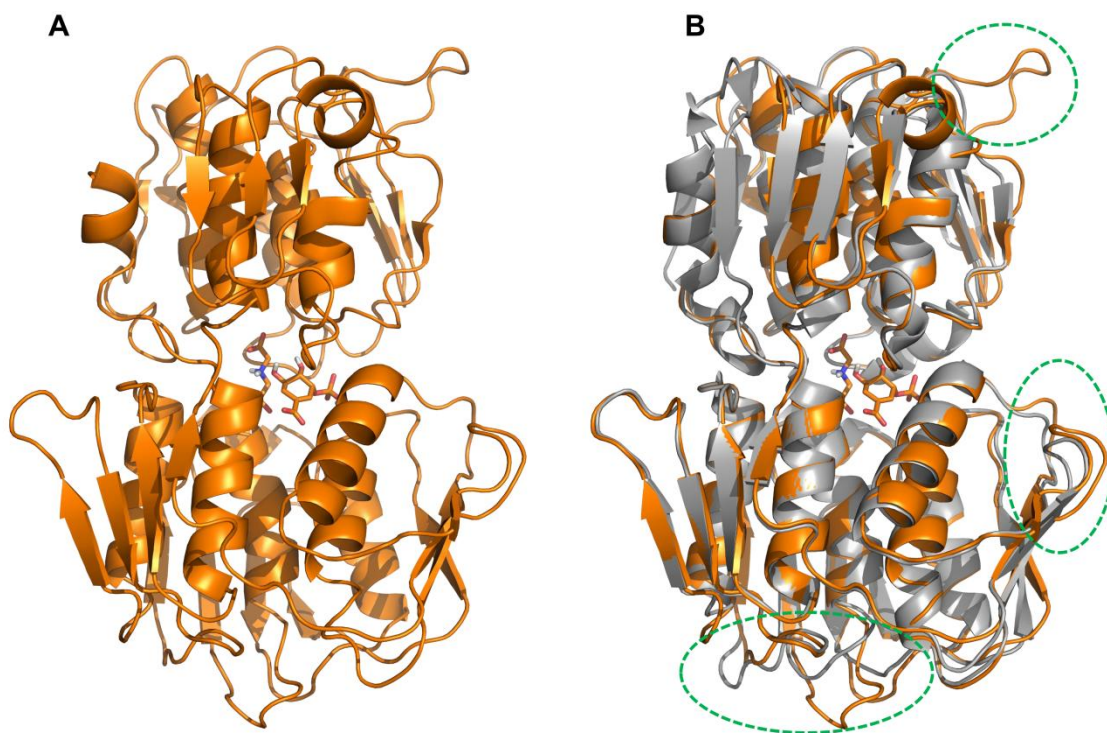


Figura 11. Estrutura 3D do modelo da EPSP-sintase de *Pb18*. (A, representada na cor laranja) e alinhamento estrutural com o molde EPSP-sintase de *Vibrio cholerae* (B, código PDB: 3NVS, representado na cor cinza). Círculos tracejados em verde representam regiões de alça com alta variabilidade em suas posições atômicas. Imagens geradas utilizando o programa PyMOL.

Uma vez apresentando um sítio ativo altamente conservado em relação ao seu molde, os ligantes foram transferidos para o modelo utilizando as coordenadas de ligação à EPSP-sintase de *V. cholerae* (molde utilizado no processo de modelagem por homologia). Vale ressaltar que o estado de conservação entre os sítios ativos de ambas as proteínas reforça a necessidade de uma avaliação experimental da atividade inibitória do composto glifosato (inibidor co-cristalizado da enzima EPSP-sintase de *V. cholerae*) sobre a enzima EPSP-sintase de *Pb18*, tendo em vista o conceito de que sítios ativos semelhantes tendem a acomodar os mesmos ligantes.

Após correção das estruturas, definição dos estados de protonação dos ligantes e minimização de energia, os aminoácidos que compõem o sítio ativo do modelo 3D da EPSP-sintase de *Pb18* foram identificados a partir de um raio de até 4,0 Å de distância do substrato chiquimato-3-fosfato (S3P) e inibidor glifosato (Figura

12A). Assim, foi possível identificar a orientação espacial dos resíduos que compõem esta região do modelo e que formam ligações de hidrogênio e interações iônicas com ambos, substrato e inibidor.

Como pode ser observado nas Figuras 12A e 12B, o grupo carboxilato do substrato chiquimato-3-fosfato forma uma ligação de hidrogênio com o resíduo Ser12 e uma interação iônica com o resíduo Arg16, ao passo que os resíduos Lys347 e Asp315 formam ligações de hidrogênio com as hidroxilas conectadas ao anel. Ligações de hidrogênio também foram observadas pela interação do grupo fosfato com Ser164, Ser165, Ser193 e Thr314.

Ligado nas proximidades do sítio catalítico, o inibidor glifosato (inibição não competitiva/mista, Figuras 12A e 12C) também forma ligações de hidrogênio entre o grupo fosfato e os resíduos Lys11, Gly85, Arg117 e Gly166, ao passo que sua amina secundária no estado protonado forma uma interação iônica com o resíduo Glu348. Interações iônicas também são observadas entre o grupo carboxilato e os resíduos Lys11, Arg351, His396 e Arg397.

Em organismos como *Petunia hybrida* e *Bacillus subtilis* já foram realizados experimentos com mutações para o resíduo de lisina que foram convertidos em arginina. A mudança do aminoácido lisina para arginina que se encontra próximo ao sítio catalítico da enzima fez com que esses organismos adquirissem resistência ao glifosato. A modificação nesse aminoácido causa uma perda de afinidade ao glifosato (SELVAPANDIYAN *et al.*, 1995; ZHOU *et al.*, 2006; HUYNH *et al.*, 1988).

Outro estudo com mutações de substituições dos aminoácidos na região catalítica da EPSP-sintase de *Rahnella aquatilis* treonina-lisina, arginina-valina, arginina-glicina, serina-valina, leucina-valina e glicina-lisina, mostra que essas substituições de aminoácidos levam a um aumento da sensibilidade da EPSP-sintase ao glifosato. Foi observado ainda, que essas mutações levam a uma pequena perda de afinidade pelo substrato S3P e o PEP (TIAN *et al.*, 2011). O conhecimento da presença desses aminoácidos no sítio ativo da EPSP-sintase poderá ser utilizado e aplicado em futuros estudos, como bases moleculares e estruturais para a triagem virtual de inibidores da EPSP-sintase de *Pb18* bem como para o planejamento e otimização estrutural dos inibidores existentes. A EPSP-

sintase vem sendo descrita como potencial alvo para o desenho de novos compostos para o tratamento de doenças negligenciadas (TZIN *et al.*, 2010).

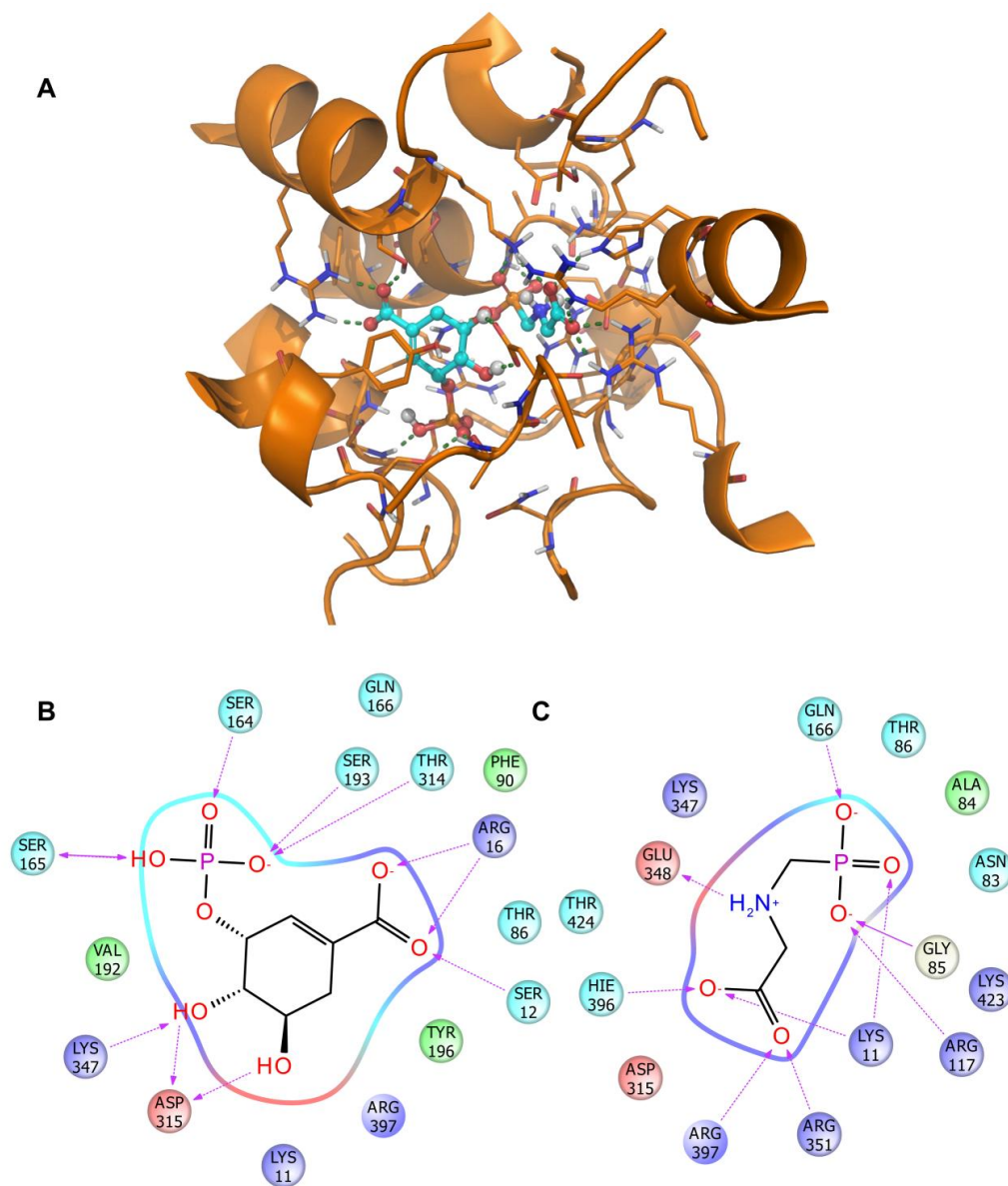


Figura 12. Posicionamento 3D do substrato chiquimato-3-fosfato e inibidor glifosato no sítio ativo do modelo de EPSP-sintase de *Pb18*. (A) e mapas 2D representando as ligações de hidrogênio formadas entre substrato (B) e inibidor (C) e os resíduos de aminoácido. Imagens geradas utilizando os programas PyMOL e Maestro.

5.3. Amplificação do cDNA da EPSP-sintase

Os oligonucleotídeos sintetizados foram utilizados na PCR para a padronização da melhor temperatura de amplificação do cDNA da EPSP-sintase. As temperaturas testadas variaram de 54°C a 59°C. A temperatura escolhida foi a de 55°C, pois apresentaram menor arraste, maior amplificação e menos amplificações inespecíficas (Figura 13).

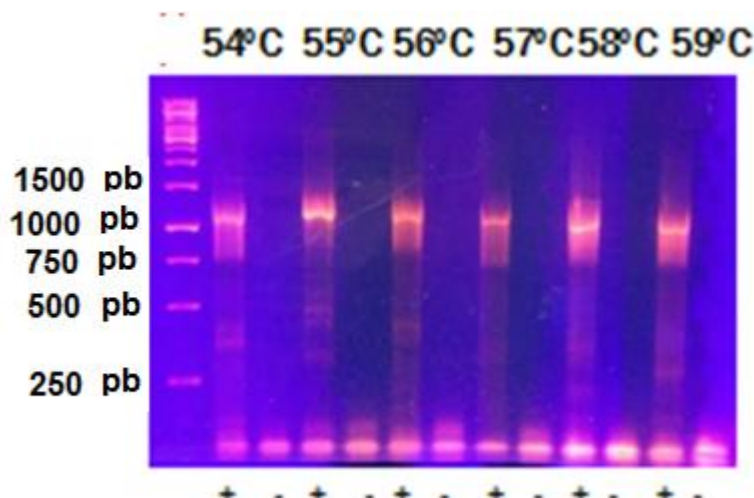


Figura 13. Padronização da PCR utilizando diferentes temperaturas e os seus respectivos controles negativos. Os controles negativos incluem todos reagentes exceto cDNA.

Para a transformação, células bacterianas *E. coli* linhagem (DE3) foram submetidas ao choque térmico para a inserção do plasmídeo recombinante. As bactérias foram cultivadas em placas de petri em meio contendo ampicilina, pois as bactérias que cresceriam nesse meio seriam aquelas que receberam o plasmídeo contendo o inserto; as células que não receberam esses plasmídeos não seriam capazes de crescer, pois não possuem resistência à ampicilina.

Ainda, para confirmar se realmente houve a transformação da célula e se o plasmídeo possui o gene da EPSP-sintase, foi realizada a PCR de colônia, além de uma nova digestão com *Bam*HI, com objetivo de liberar o inserto do vetor. Na Figura 14, linha 3, é possível perceber que, após a digestão do plasmídeo, foi liberado um fragmento de 1287 pb corresponde ao tamanho da EPSP-sintase, confirmando

assim, a clonagem e a transformação bacteriana. Além disso, o vetor clonado foi submetido a sequenciamento para confirmar a presença da EPSP-sintase.

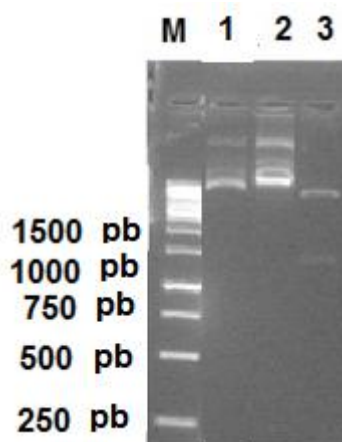


Figura 14. Gel de agarose 1% para confirmação da transformação. M: Marcador, 1: pGEX-4T3 intacto sem o inserto de clonagem. 2: pGEX-4T3 com inserto da EPSP-sintase. 3: pGEX-4T3 com inserto e digerido com *Bam*HI. A presença do inserto liberado no tamanho esperado de 1287 pb confirma a clonagem do inserto e a transformação bacteriana.

5.4. Expressão heteróloga e purificação da EPSP-sintase de *Pb18*

O pGEX-4T3 possui uma sequência de nucleotídeo conhecida como *enhancer* que tem o objetivo de aumentar a expressão da proteína recombinante. Esse *enhancer* é formado pelo óperon lac, o qual é regulado pela lactose e possui como mimetizador o isopropiltiogalactosídeo (IPTG) que não será degradado pela bactéria, se ligando ao óperon lac aumentando a expressão do inserto clonado, consequentemente, aumentando produção da proteína de interesse (HARPER & SPEICHE, 2013).

A cauda de GST inserida no gene possui um tamanho de 26 kDa e a proteína EPSP-sintase possui um tamanho de 45 kDa. Assim, a proteína fusionada deverá ter um tamanho esperado de 71 kDa. Como pode ser observado na figura 7, a proteína EPSP-sintase foi expressa em quantidade satisfatória após incubação com 1 mM de IPTG à 37 °C por 1 h.

EPSP-sintases recombinantes de outros micro-organismos também já foram obtidas em condições similares. Para *Janibacter* sp. foi utilizado o vetor pGEX-6p-1, a linhagem *E. coli* BL21, e incubação com 0,5 mM de IPTG à 18 °C, por 8 h (SINGH

& PANDA, 2005). A EPSP-sintase da alga *Dunaliella salina* foi clonada em vetor pGEX-4T-1 e utilizada a linhagem *E. coli* BL21, apresentou indução satisfatória à 37°C por 4 h, com 0,1 mM de IPTG (SINGH *et al.*, 2015).

As células foram submetidas à extração de proteínas utilizando lisozima e choques mecânicos. Após análise em gel SDS-PAGE, verificou-se que a EPSP-sintase de *Pb18* estava localizada no *pellet*. A solubilização foi realizada conforme descrito por YANG *et al.* (2011). A EPSP-sintase foi solubilizada com ureia 8 M e em seguida, foi realizada a dialise durante 12 h (Figura 15).

O nível elevado de expressão geralmente ocasiona a formação de corpos de inclusão em proteínas recombinantes. Alguns fatores como temperatura, promotor forte e alta concentração de indutor podem resultar no aumento do nível de expressão (WINGFIEL *et al.*, 2012). Os corpos de inclusão se encontram na sua forma insolúvel, entretanto, para a maioria das proteínas recombinantes, é necessário que elas estejam em sua forma solúvel. Para solucionar esse problema e tornar a proteína solúvel novamente, alguns passos podem ser realizados, como é o caso de diminuição da temperatura de indução e o uso de baixa concentração de sal (SINGH *et al.*, 2015). Neste trabalho, foi realizada a indução à 22 °C, entretanto, nesta condição ainda houve corpos de inclusão. Para solubilização, as concentrações de baixo sal, 1 M, 2 M e 3 M, também foram testadas (dados não apresentados). Mesmo nessas condições, não houve solubilização adequada da proteína, pois grande parte ainda estava contida na fração insolúvel. Apenas utilizando a concentração de 8 M de ureia foi possível solubilizar a EPSP-sintase.

Com o objetivo de melhorar a purificação da EPSP-sintase, foi então realizada a cromatografia por afinidade utilizando a resina glutationa-sefarose (GS4B). 200 µL de EPSP-sintase dialisada foi incubado com tampão Hepes (50 mM de Hepes e 75 mM de NaCl) e a resina GS4B por 3 h em gelo. A resina possui afinidade pela GST que está acoplada à EPSP-sintase recombinante. A cauda de GST possui um sítio de clivagem para a trombina, fazendo com que a proteína recombinante seja liberada da resina enquanto a cauda de GST permanece ligada à resina. Este procedimento não foi executado neste trabalho. Ao invés de clivar a EPSP-sintase com a trombina, foi apenas utilizado o tampão de eluição (10 mM de glutaciona

reducida e 50 mM de tris-HCl pH 8) que retira a proteína da resina, mas também deixa a cauda GST ainda ligada à proteína. Com o intuito de concentrar a EPSP-sintase, após purificação, a mesma foi liofilizada e ressuspensa em tampão Hepes pH 7 (Figura 16).

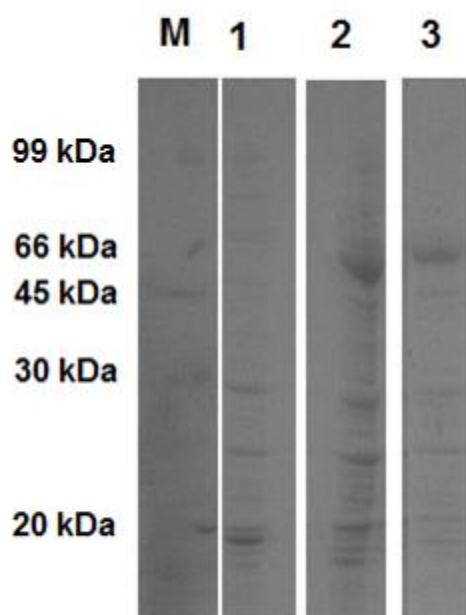


Figura 15. Gel SDS-PAGE apresentando a indução da EPSP-sintase de *Pb18*. A indução foi realizada com 1 mM de IPTG por 1 h a 37 °C. M: Marcador; 1: Tempo zero, quando alcançada a D.O. de 0,4; 2: Indução por 1 h; 3: Proteína após a diálise.

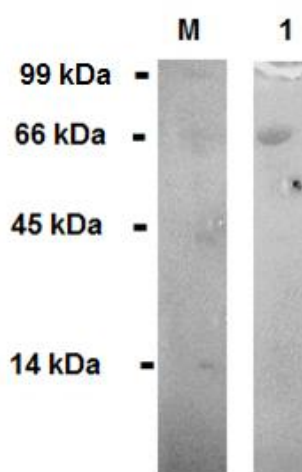


Figura 16. Gel SDS-PAGE apresentando a eluição da EPSP-sintase de *Pb18* da resina de sefarose 4B. M: Marcador. 1: Sobrenadante contendo a EPSP-sintase purificada.

5.5. *Western blot* para identificação da EPSP-sintase

A EPSP-sintase recombinante foi separada em gel SDS-PAGE e transferida para uma membrana de nitrocelulose (Figura 17). A EPSP-sintase foi reconhecida pelos anticorpos produzidos pelos camundongos tanto no extrato bruto proteico bacteriano (Figura 9, linha 1), como também na fração purificada (Figura 9, linha 2). Para garantir que o reconhecimento pelos anticorpos seria apenas da proteína EPSP-sintase, foi realizado *Western blot* com o extrato proteico contendo apenas a GST induzida. Os anticorpos não reagiram com a GST, garantindo que os anticorpos produzidos a partir da proteína recombinante só eram capazes de reconhecer a EPSP-sintase e não a GST.

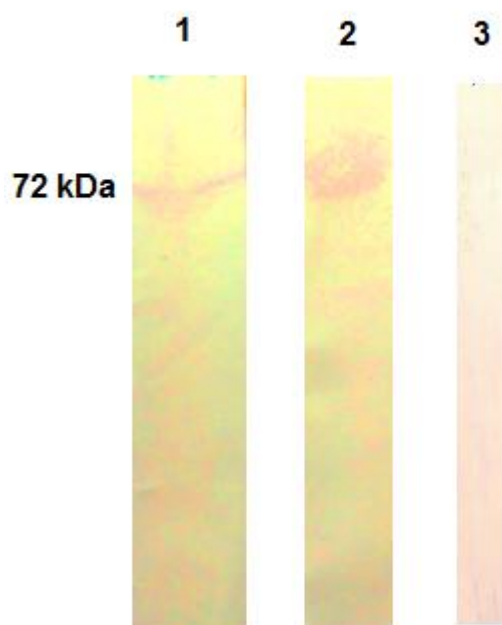


Figura 17. *Western blot* com a EPSP-sintase recombinante. Linha 1: Extrato proteico após 1 h de indução. Linha 2: EPSP-sintase recombinante após a purificação com resina de sefarose 4B. Linha 3: Extrato proteico contendo apenas a GST induzida.

5.6. Interações entre EPSP-sintase e proteínas de *Pb18*

A fusão da EPSP-sintase recombinante à GSP permite que ela seja imobilizada em coluna por afinidade. Assim, a coluna de glutatona-sefarose foi

utilizada para a realização do *pull down* com extrato de proteínas de células leveduriformes de *Pb18*. A figura 18 apresenta em gel SDS-PAGE o resultado de proteínas de *Pb18* que não interagiram com GST e EPSP-sintase (Linha 1). As proteínas que interagiram com GST podem ser visualizadas na linha 2. As proteínas que interagiram com EPSP-sintase estão localizadas na linha 3. As proteínas que interagiram tanto com a EPSP-sintase quanto com GST foram descartadas, pois foram consideradas falsos positivos.

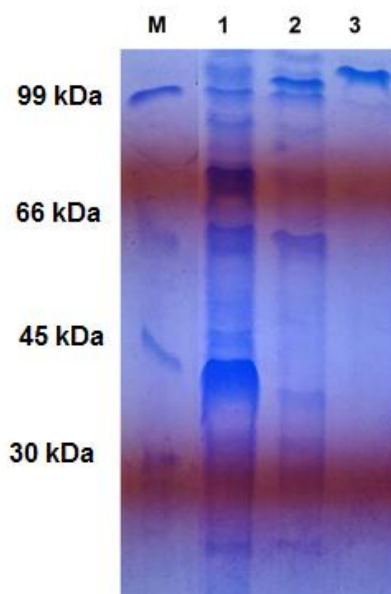


Figura 18. Gel SDS-PAGE contendo proteínas de *Pb18* que interagiram com EPSP-sintase por *pull down*. M: Marcador, Linha 1: Sobrenadante contendo proteínas de *Pb18* que não se ligaram à GST e à EPSP-sintase. Linha 2: Proteínas de *Pb18* que se ligaram à GST. Linha 3: Proteínas de *Pb18* que se ligaram à EPSP-sintase.

Vale ressaltar que o ensaio de *pull down* pode identificar interações do tipo direta, onde as proteínas se ligaram sozinhas às proteínas alvos, ou do tipo indireta, onde uma proteína se liga à proteína alvo, porém através de outras proteínas formando assim os complexos proteicos. As proteínas que se ligaram à EPSP-sintase recombinante serão discutidas de acordo com a sua respectiva classificação biológica obtidas na plataforma Pedant (Tabela 2); essas proteínas foram identificadas com o E.C. no texto abaixo. As demais proteínas sem E.C. foram utilizadas apenas para discutir as interações registradas.

As proteínas obtidas no ensaio de *pull down* foram identificadas por espectrometria de massas. Um total de 242 proteínas foi encontrado interagindo com EPSP-sintase. Dessas, 86 foram excluídas visto que apareceram somente em

uma das triplicatas. Das 156 restantes, 116 foram identificadas tanto no *pull down* com EPSP-sintase quanto com GST. Assim, apenas 40 proteínas foram consideradas interagir com EPSP-sintase. Essas proteínas foram anotadas e classificadas de acordo com o MIPS (Figura 19). Foram encontradas proteínas relacionadas ao metabolismo de aminoácidos (4), metabolismo de nucleotídeo (2) metabolismo de compostos de carbono e carboidratos (6), metabolismo de lipídios e ácidos graxos (7), ciclo celular (5), proteínas ribossomais (7), dobramento e estabilização de proteínas (5), degradação de peptídeos (4) e proteínas de ligação ao GTP (2).

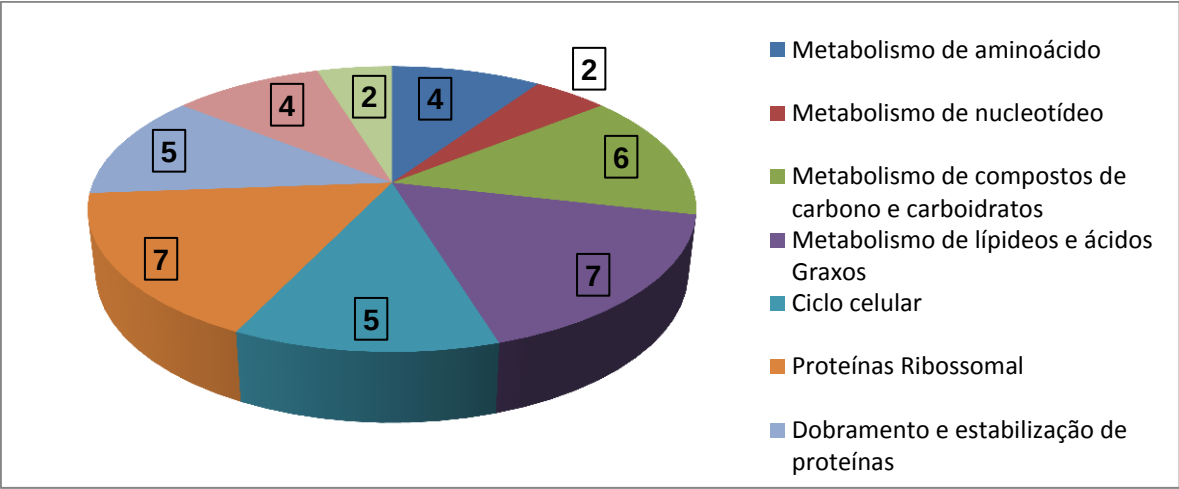


Figura 19. Gráfico com a quantidade de proteínas que formaram complexo com a EPSP-sintase de acordo com a classificação funcional (MIPS).

Tabela 2. Classificação funcional das proteínas que interagiram com EPSP-sintase no ensaio de *pull down*.

NÚMERO DE ACESSO	PROTEÍNA
1. Metabolismo	
1.1 Metabolismo de aminoácido	
PADG_08376	Aspartato semi-aldeído desidrogenase
PADG_00210	Glicina desidrogenase

PADG_02914
PADG_06429

Aminometiltransferase
Ácido cetol-reductoisomerase

1.2 Metabolismo de nucleotídeo

PADG_02246
PADG_08342

Adenosina quinase
Proteína YPTM2 de ligação a GTP

1.5 Metabolismo de compostos de carbono e carboidratos

PADG_00052
PADG_04761
PADG_04702
PADG_00668
PADG_04148
PADG_06546
PADG_07699

Subunidade de flavoproteína de
succinato desidrogenase
Glicosidase I
Malato sintase
Frutose-bisfosfato aldolase
Alfa-manosidase
Aminopeptidase sensível a
puromicina
S-formilglutamina hidrolase

1.6 Metabolismo de lipídeos e ácidos graxos

PADG_05310
PADG_01687
PADG_00607
PADG_03598
PADG_04603
PADG_00546
PADG_07699

Leucotrieno A-4 hidrolase
3-cetoacil-CoA tiolase
Cadeia alfa da riboflavina sintase
3-metil-2-oxobutanoato de
hidroximetiltransferase
Spermidina sintase
Proteína carreadora 3-oxoacil-acil-
redutase
S-formilglutamina hidrolase

10. Ciclo celular e processamento de DNA

10.3. Ciclo celular

PADG_04056
PADG_00615

Proteína epsilon14-3-3
proteasoma subunidade alpha tipo-6

PADG_05907	histona H2B tipo 1-A
PADG_00873	histona H3
PADG_07249	Proteína de ligação à actina

12. Síntese de proteínas

12.1. Proteínas Ribossomal

PADG_00333	40S proteína ribossomal S16
PADG_08244	Proteína ribossomal ácida 60S P1
PADG_04183	Proteína ribossomal 60S L33-B
PADG_04449	Proteína ribossomal L23e
PADG_00995	Ubiquitina
PADG_07891	Ubiquitina
PADG_01605	Ubiquitina

14. Destino de proteínas (dobramento, modificação e destino)

14.1 Dobramento e estabilização de proteínas

PADG_07715	Proteína de choque térmico Hsp90
PADG_06992	Co-chaperone mitocondrial GrpE
PADG_06488	Peptidil-prolil cis-trans isomerase D
PADG_02833	Fator de ribosilação ADP

14.13. Degradação de proteínas e peptídeos

PADG_07422	Proteinase tipo subtilase psp3
PADG_03221	Sacarolisina
PADG_08087	Componente proteasoma PRE3
PADG_07460	Aminopectidase vacuolar

Classificação funcional segundo o banco de dados do programa FunCat2, utilizando o Pedant(http://pedant.helmholtzmuemchen.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method=analysis&Db=p3_r48325_Par_brasi_Pb18);

5.6.1. Metabolismo de aminoácido

A enzima aspartato semi-aldeído desidrogenase (EC: 1.2.1.11) atua na biossíntese de aspartato, este por sua vez tem grande importância no organismo pois produzirá aminoácidos essenciais como lisina, treonina, metionina e isoleucina. Esta enzima atua no primeiro passo da via, onde catalisa uma reação NADPH dependente convertendo 4-fosfo-L-aspartato em L-aspartato semi-aldeído que é precursor dos aminoácidos essenciais (DAHALL & VIOLA, 2015).

A glicina desidrogenase (EC: 1.4.4.2) está envolvida no processo de degradação do aminoácido glicina, realizando a descarboxilação da glicina e liberando CO₂. A glicina desidrogenase depende de mais três proteínas para formar um complexo catalítico. Essas proteínas são: a proteína P que realiza a descarboxilação da glicina e transfere o grupo aminometileno para a proteína H, a aminotransferase (EC: 2.1.2.10), também conhecida como proteína T, que realiza a transferência do grupo metileno para o tetraidrofolato (THF) liberando NH₃ e formando THF-CH₂; a proteína L, que realiza a reoxidação da proteína H convertendo o NAD⁺ em NADH. Todos esses passos resultam na produção de NH₃, CH₂-TFH, que pode ser usado em diferentes vias biossintéticas como a da lisina, e NADH, que será usado na produção de energia na mitocôndria. O NH₃ pode ser utilizado no ciclo da ureia. Vale ressaltar que o corismato é precursor do THF produzido na via do folato (PIPER *et al.*, 2000; HASSE *et al.*, 2013).

Ácido cetol-reductoisomerase (EC: 1.1.1.86) é participante da via de biossíntese tanto da valina quanto da isoleucina. Ela utiliza o substrato 2-acetolactato que é produzido a partir do piruvato; essa reação pode ser reversível convertendo 2-acetalactato em piruvato (TYAGI *et al.*, 2005).

A interação dessas enzimas com a EPSP-sintase pode estar relacionada à disponibilidade do composto piruvato, que origina o PEP; esses compostos estão envolvidos na produção de todos aminoácidos, sendo então chaves para o

metabolismo de aminoácidos. Visto que muitas reações do metabolismo de aminoácidos são reversíveis, esses compostos podem ser utilizados para a produção de aminoácidos que estão sendo necessário em um dado momento (DEWICK, 2002).

5.6.2. Metabolismo de carbono e carboidratos

O metabolismo de carbono engloba a integração de vias que realizam o transporte e oxidação de fontes de carbono como a glicólise, gliconeogênese, via das pentoses, ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e via do glioxilato (PAPAGIANNI, 2012).

A glicólise é a via que transforma a glicose em piruvato através de nove passos enzimáticos. A frutose-bisfosfato aldolase (EC: 4.1.2.13) é responsável pelo quarto passo da via onde converte a frutose 1,6 fosfato em 3-gliceraldeído, mas também pode converter a frutose 1,6-fosfato diretamente em eritrose-4-fosfato formando uma ponte entre a via glicolítica e a via das pentose (STICONE *et al*, 2015). Eritrose-4-fosfato é o substrato inicial da via do chiquimato.

A malato sintase (EC: 2.3.3.9) participa do ciclo do glioxilato, convertendo malato em glioxilato, porém ela também pode converter o malato em piruvato; esse por sua vez, pode ser convertido em PEP na via glicolítica. PEP é usado tanto no primeiro passo da via do chiquimato pela enzima DHP-sintase quanto no quinto passo pela enzima EPSP-sintase. O mesmo acontece com a succinato desidrogenase (EC: 1.3.5.1), a qual participa do TCA e também da cadeia respiratória. No TCA ela oxida o succinato em fumarato, o qual é convertido em malato, e este em PEP pela malato sintase (EC:2.3.3.9) (RUTTER *et al.*, 2010).

Conforme pode ser notado, as enzimas citadas acima, envolvidas no metabolismo de carbono atuam na produção de PEP que poderá ser utilizada na via do chiquimato. Assim, a interação entre essas proteínas e a EPSP-sintase pode estar relacionada com a disponibilidade desses substratos utilizados na via do chiquimato. Vale ressaltar que a via chiquimato é alimentada basicamente pelas vias de metabolismo de carboidratos, uma situação onde o fungo *P.brasiliensis* seja

privado de carbono, resultará em uma menor atividade da via chiquimato (LIMA *et al.*, 2014).

5.6.3. Metabolismo de lipídeos e ácidos graxos

Um total de sete proteínas envolvidas no metabolismo de lipídeos e ácidos graxos foi encontrado interagindo com EPSP-sintase. A proteína carreadora 3-oxoacil-acil-redutase (EC: 1.1.1.100) está envolvida no metabolismo de ácidos graxos tanto na iniciação como no alongamento; ela executa a função catalisadora de condensação entre o acetil-CoA, derivado do TCA, com a malonil-ACP para produzir butiril-ACP, usando NADPH e NADH, na via de biossíntese de ácidos graxos (ABBADI, *et al.*, 2000). A via de degradação de ácidos graxos, a β -oxidação, consiste no complexo de quatro proteínas Acil-CoA desidrogenase, enoil-CoA hidratase, 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase e a proteína 3-cetoacil-CoA tioliase (EC: 2.3.1.16) (KURIHARA *et al.*, 1988). Estas enzimas utilizam acetil-CoA, pode ser levado para a o ciclo de Krebs pode ser convertido de em fosfonenolpiruvato, o mesmo substrato usado pela enzima EPSP-sintase. A interação entre essas enzimas e a EPSP-sintase sugere que essa interação deve regular a disponibilidade do PEP para a via do chiquimato.

5.6.4. Metabolismo de nucleotídeos e ciclo celular

A adenosina quinase (EC: 2.7.1.20) está envolvida na catalise da fosforilação da adenosina em AMP. Em fungos, essa enzima realiza o aproveitamento de purinas na síntese *de novo* a partir da degradação da metionina, as quais são convertidas em inosina 5-monofosfato, xantosina 5-monofosfato e guanina monofosfato.

A EPSP-sintase não utiliza ATP, porém a chiquimato quinase, que executa o quinto passo da via, ou seja, o passo anterior ao da EPSP-sintase, utiliza ATP em suas reações. Assim a ligação da EPSP-sintase à adenosina quinase poderá ser devido a proximidade física entre a EPSP-sintase e chiquimato quinase (HERDENDORF & MIZIORKO, 2007; CHENG *et al.*, 2005).

A proteína 14-3-3 épsilon tem como função geral em fungos, a fosforilação que diversas proteínas de metabolismo celular. Essas fosforilações são importantes, pois podem ativar ou desativar proteínas (HEUSDEN; STEENSMA, 2006). Visto que foram encontrados vários sítios de fosforilação na EPSP-sintase, esse evento poderia estar ocorrendo com a participação da 14-3-3 épsilon. A proteína 14-3-3 épsilon de *P. brasiliensis* parece estar envolvida no processo infeccioso de células hospedeiras (SILVIA *et al.*, 2015).

5.6.5. Proteínas ribossomais

Os ribossomos são as maquinarias celulares responsáveis por traduzir o código genético, utilizando as informações contidas em mRNA para produzir proteínas. Os ribossomos são formados de rRNAs que se agrupam para formar duas subunidades, uma de menor tamanho denominada de subunidade 40S e outra de maior tamanho conhecida como 60S, além disso existe uma gama de proteínas que se associam aos ribossomos para recrutar a sua montagem e auxiliar na tradução dos mRNA (WOOLFORD & BASERGA, 2013). As proteínas ribossomais encontradas neste trabalho, 40S proteína ribossomal S16, proteína ribossomal ácida 60S P1 (112 aa), proteína ribossômica 60S L33-B, proteína ribossômica L23 e ubiquitinas podem ter se ligado à EPSP-sintase durante a síntese proteica.

5.6.6. Dobramento, estabilização de proteínas e degradação de proteínas e peptídeos

Em células de eucariotos, o retículo endoplasmático é responsável pela localização de proteínas que atuarão no dobramento e estabilização das proteínas. Neste grupo, podemos incluir as chaperonas hsp70 e hsp90, calnexinas, proteínas disulfeto isomerase, algumas modificações pós traducionais também podem ocorrer no retículo endoplasmático como N-glicosilação, tais modificações podem fazer com que enzima desenvolva seu papel adequado no ambiente celular (GASSER *et al.*, 2008).

A proteína de choque térmico hsp90 pode sinalizar para a degradação de proteínas presentes em diferentes condições de estresses físicos, como por exemplo, a temperatura. Estudo com mutantes de *P. brasiliensis* para o gene hsp90, mostrou que os fungos mutantes apresentavam uma menor viabilidade se comparados com indivíduos selvagens (TAMAYO *et al.*, 2013).

A proteína PRE3 é componente do proteasoma, o qual degrada proteínas utilizando ATP e ubiquitinina. PRE3 participa da degradação de proteínas apresentando erro de enovelamento ou danos (ARENDT; HOCHSTRASSER, 1997).

A proteína chaperona mitocondrial GrpE está localizada no citoplasma celular de *Saccharomyces cerevisiae* e realiza a estabilização de proteínas encaminhando-as para a mitocôndria. Experimentos com *S. cerevisiae* mutante para GrpE mostraram um atraso no transporte, maturação e retardo no processo de degradação proteica (LALORAYA *et al.*, 1995).

A peptidil-prolil cis-trans isomerase D faz parte de uma família de proteínas que realiza a catálise de ligação entre as posições cis e trans de resíduos de glicina, atuando em regiões hidrofóbicas da proteína (PEMBERTON & KAY, 2005). Experimentos com mutantes de *E. Coli* para essa enzima mostraram que ela é importante para seu crescimento. Entretanto, o mesmo não foi observado para *Bacillus subtilis* em indivíduos normais e para indivíduos mutantes sobre privação de aminoácidos se mostrou ser essencial para a viabilidade dos indivíduos. (GOTHEL *et al.*, 1998) e para *S. cerevisiae*, não apresentou significância para viabilidade de mutantes da peptidil-prolil cis-trans isomerase (PEMBERTON, 2006).

A ligação entre EPSP-sintase e peptidil-prolil cis-trans isomerase D se deve possivelmente ao seu papel na manutenção dos resíduos de glicina da EPSP-sintase. A interação entre peptidil-prolil cis-trans isomerase D e serina protease de *P. brasiliensis* tem sido descrita utilizando o sistema de duplo híbrido em condição de privação de nitrogênio (PARENTE *et al.*, 2010).

A proteinase tipo subtilase psp3 não possui função definida em *P. brasiliensis*, porém ensaios realizados com o objetivo de identificar e quantificar proteínas alteradas durante o processo infeccioso mostraram que ela é altamente expressa nessa condição (CASTILHO *et al.* 2014).

A aminopeptidase vacuolar de *P. brasiliensis* foi altamente expressa no mutante para a citocromo c peroxidase após infecção em camundongo (PARENTE-ROCHA *et al.*, 2015). A aminopeptidase vacuolar é uma proteína PEP dependente, assim como a EPSP-sintase. Dessa forma, a interação entre essas proteínas poderia ser devido à utilização do substrato comum a elas, o PEP. Em adição, ambas poderiam desempenhar um importante papel no processo de infecção.

A interação entre essas proteínas e a EPSP-sintase poderia estar associada à manutenção da EPSP-sintase, seja atuando na sua estabilização, dobramento e degradação da mesma e adaptação celular.

5.7. Visão geral das interações proteicas da EPSP-sintase e corismato sintase

SANTANA (2017) realizou o *pull down* utilizando a enzima CS, a qual executa o último passo da via do chiquimato, utilizando extrato de células leveduriformes de *Pb18*. As 96 proteínas encontradas interagindo com CS, estão relacionadas com diversos processos metabólicos. Das proteínas encontradas, um total de 8 foram comuns com as encontradas aqui neste trabalho. São elas, a glicina desidrogenase, aspartato semi-aldeído desidrogenase, 3-cetoacil-CoA tiolase, succinato desidrogenase, co-chaperona mitocondrial GRPE, peptidil-prolil cis-trans isomerase D, subunidade 60S e 40S ribossomal. Um total de 32 proteínas foram encontradas interagindo somente com EPSP-sintase e 88 proteínas interagiram somente com CS. Entretanto, embora não fossem as mesmas proteínas, a maioria participa das mesmas vias. Esse fato é relevante, visto que a CS não faz parte da proteína pentafuncional Arom, como a EPSP-sintase, entretanto atuam na mesma via.

As proteínas pertencentes ao metabolismo de aminoácidos e metabolismo de carbono e carboidratos se ligaram à EPSP-sintase e CS. Essas proteínas estão relacionadas com a produção e disponibilidade de PEP, o qual é substrato utilizado tanto no início da via do chiquimato quanto no sexto passo catalisado pela EPSP-sintase.

A presença dessas proteínas que interagiram tanto com a EPSP-sintase quanto com a CS, além de outras proteínas exclusivas de cada uma, que também

são das mesmas vias metabólicas, mostra que elas desempenham um papel importante, podendo estar ligadas à disponibilidade de substratos compartilhados entre elas. A figura 12 mostra a representação esquemática dos processos metabólicos contendo proteínas que interagiram com EPSP-sintase e CS.

6. Considerações finais

De acordo com os resultados obtidos, foi observado que o sistema de expressão pGEX4T3-DE3 produziu eficientemente a proteína recombinante EPSP-sintase proveniente de *Pb18*. A Expressão pode ser confirmada através de *Western blot* utilizando anticorpos contra a proteína. Uma vez que a proteína foi expressa fusionada à GST, foi possível a sua purificação utilizando coluna de afinidade glutational-sefarose permitindo a realização do ensaio de *pull down*.

Um total de 40 proteínas interagiram com EPSP-sintase, as quais participam de diversos processos metabólicos, inclusive da via do chiquimato. As interações identificadas deverão fornecer informações sobre novas funções dessas proteínas, e ainda, poderão ser utilizadas na busca de futuros antifúngicos inibidores dessas interações.

7. Perspectivas

A obtenção da EPSP-sintase recombinante, bem como sua estrutura 3D, deverão ser utilizadas na identificação de inibidores visando a obtenção de novos antifúngicos na validação através da medição de sua atividade biológica. Em adição, deverão ser obtidas as estruturas 3D das proteínas identificadas interagindo com EPSP-sintase visando o desenho de peptídeos que poderão interferir nessa interação e na viabilidade do fungo.

Referências

ABBADI, A.; BRUMMEL, M.; SPENER, F. Knockout of the regulatory site of 3-ketoacyl-ACP synthase III enhances short-and medium-chain acyl-ACP synthesis. **The Plant Journal**, v. 24, n. 1, p. 1-9, 2000.

ABU-FARHA, M. et al. The tale of two domains proteomics and genomics analysis of SMYD2, a new histone methyltransferase. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 7, n. 3, p. 560-572, 2008.

AMBRÓSIO, A. V. A., CAMELO, C. C. S., BARBOSA, C. V., TOMAZATTI, F. G., BRAZÕES, F. A. D. S., VELOSO, J. M., SIQUEIRA, V. S. Paracoccidioidomycosis (Lutz-Splendore--Almeida disease): treatment, duration of treatment, recurrence, paradoxical reaction, prognosis, prophylaxis. **Rev Med Minas Gerais**, v. 24, n. 1, p. 71-77, 2014.

APWEILER, R., BAIROCH, A., WU, C. H., BARKER, W. C., BOECKMANN, B., FERRO, S., MARTIN, M. J. UniProt: the universal protein knowledgebase. **Nucleic acids research**, v. 32, n. suppl 1, p. D115-D119, 2004.

ARAÚJO, M.S.; SOUZA, S.C.O. Análise epidemiológica de pacientes acometidos com paracoccidioidomicose em região endêmica do estado de Minas Gerais. **Rev Pos-Grad**, n. 7, p. 22-6, 2002.

ARAÚJO, M.S.; SOUSA, C.O.M.S.; CORREIA, D. Avaliação do exame citopatológico como método para diagnosticar a paracoccidioidomicose crônica oral. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n.3, p. 427-430, 2003.

ARENDT, C.S.; HOCHSTRASSER, M. Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 94, n. 14, p. 7156-7161, 1997. *Aromatic Compounds*, **The Plant Cell**, Vol. 7, p. 907-919, 1995.

BANKS, J. L. et al. Integrated Modeling Program, Applied Chemical Theory (IMPACT). **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1752–1780, 2005.

BARABÁSI A-L, GULBAHCE N, LOSCALZO J. Network medicine: a network-based approach to human disease. **Nat Rev Genet**, n. 12, p. 56–68, 2011.

BELLISSIMO-RODRIGUES, F.; VITALI, L.H.; MARTINEZ, R. Serological diagnosis of paracoccidioidomycosis in HIV-coinfected patients. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 7, p. 904-907, nov. 2010.

BELTRAO, P. et al. Evolution of phosphoregulation: comparison of phosphorylation patterns across yeast species. **PLoS Biol**, v. 7, n. 6, p. e1000134, 2009.

BENKERT, P.; KUNZLI, M.; SCHWEDE, T. QMEAN server for protein model quality estimation. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. Web Server, p. W510–W514, 2009.

BERG, J. M. T., JOHN, L., STRYER, L., BERG, J. M., TYMOCZKO, J. L., & STRYER, L. **Biochemistry**. 2002.

BERGGÅRD, T., LINSE, S., JAMES, P. Methods for the detection and analysis of protein–protein interactions. **Proteomics**, v. 7, n.16, p. 2833-2842, 2007.

BERMAN, H. M., WESTBROOK, J., FENG, Z., GILLILAND, G., BHAT, T. N., WEISSIG, H., BOURNE, P. E. The Protein Data Bank. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 2000.

BERTONI, T. A. TAKAO, E.K.H., DIAS, J.R.C., SVIDZINSKI, I.E. Paracoccidioidomicose e tuberculose: diagnóstico diferencial . **J Bras Patol Med Lab** v. 46, n. 1, p. 17-21, 2010.

BIASINI, M.; BIENERT, S.; WATERHOUSE, A.; ARNOLD, K.; STUDER, G.; SCHMIDT, T.; KIEFER, F.; CASSARINO, T. G.; BERTONI, M.; BORDOLI, L.; SCHWEDE, T. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. W1, p. W252–W258, 2014.

BOYCE, K. J.; ANDRIANOPOULOS, A. Fungal dimorphism: The switch from hyphae to yeast is a specialized morphogenetic adaptation allowing colonization of a hostFEMS. **Microbiology Reviews**, 2015.

BORDOLI, L.; KIEFER, F.; ARNOLD, K.; BENKERT, P.; BATTEY, J.; SCHWEDE, T. Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. **Nature Protocols**, v. 4, n. 1, p. 1–13, 2009.

BORGES-WALMSLEY, M.I., DALIANG C., SHU X., WALMSLEY, A.R. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **TRENDS in Microbiology**. V.10, n.2, 2002.

BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, V. 72, p.248–254, 1976.

CAMARGO ZP, UNTERKIRCHER C, CAMPOY SP, TRAVASSOS LR. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. **J Clin. Microbiol.** V.26, p. 2147–51, 1988.

CAMARGO, Z.P. Serology of paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**. v..165, p. 289–302, 2008.

CASTILHO, D. G., CHAVES, A. F., XANDER, P., ZELANIS, A., KITANO, E. S., SERRANO, S. M., BATISTA, W. L. Exploring potential virulence regulators in *Paracoccidioides brasiliensis* isolates of varying virulence through quantitative proteomics. **Journal of proteome research**, v. 13, n. 10, p. 4259-4271, 2014.

CHEN, V. B.; ARENDALL, W. B.; HEADD, J. J.; KEEDY, D. A.; IMMORMINO, R. M.; KAPRAL, G. J.; MURRAY, L. W.; RICHARDSON, J. S.; RICHARDSON, D. C. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 66, n. 1, p. 12–21, 2010.

CHENG, W.C., CHANG, Y, N., WANG, W.C. Structural Basis for Shikimate-Binding Specificity of *Helicobacter pylori* Shikimate Kinase. **J Bacteriol.** n. 187, v. 23, p.8156–8163, 2005.

CHIARELLA, A. P., ARRUDA, C., PINA, A., COSTA, T. A., FERREIRA, R. C., CALICH, V. L. G. The relative importance of CD4 and CD8 T cells in immunity to pulmonary paracoccidioidomycosis. **Microbes Infect.** n.9, v.1078 –1088, 2007.

CHOPRA, G.; KALISMAN, N.; LEVITT, M. Consistent refinement of submitted models at CASP using a knowledge-based potential. **Proteins**, v. 78, n. 12, p. 2668–2678, 2010.

CHOPRA, G.; SUMMA, C. M.; LEVITT, M. Solvent dramatically affects protein structure refinement. Proceedings of the National. **Academy of Sciences**, v. 105, n. 51, p. 20239–20244, 2008.

CIPAK, L., SPIREK, M., NOVATCHKOVA, M., CHEN, Z., RUMPF, C., LUGMAYR, W., GREGAN, J. An improved strategy for tandem affinity purification-tagging of *Schizosaccharomyces pombe* genes. **Proteomics**, n.9, v. 20, 4825-4828, 2009.

DAHAL, G., VIOLA, R. E. Structure of a fungal form of aspartate semialdehyde dehydrogenase from *Cryptococcus neoformans*. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications**, v. 71, n. 11, p. 1365-1371, 2015.

DE ROOS AJ, BLAIR A, RUSIECKI J, HOPPIN JA, SVEC M, DOSEMECI M. Cancer incidence among glyphosate-exposed pesticide applicators in the Agricultural Health Study cohort. **Environ Health Perspect.** n.113, p.49–54, 2005.

DELEO A.B, SPRINSON D.B. 3-Deoxy-d-arabino-heptulosonic acid 7-phosphate synthase mutants of *Salmonella typhimurium*. **J Bacteriol.** n.124, p.1312–1320, 1975.

DEWICK, P. M. The shikimate pathway: aromatic amino acids and phenylpropanoids. Medicinal Natural Products: **A Biosynthetic Approach**, 3rd Edition, p. 137-186, 2009.

DEWICK, Paul M. Secondary metabolism: the building blocks and construction mechanisms. Medicinal Natural Products: **A Biosynthetic Approach**, Second Edition, p. 7-34, 2001.

DILL GM, CAJACOB CA, PADGETTE SR. Glyphosate-resistant crops: adoption, use and future considerations. **Pest Manag Sci** . n. 64, p. 326–331, 2008.

FAVA-NETTO, C. Estudos quantitativos sobre a fixação de complemento na blastomicose sul-americana, com antígeno polissacarídico. **Arq. Cir. Clin. Exp.** n.18, 197-254, 1955.

FRANCO M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **J Med Vet Mycol.** n.25, p. 5-18, 1986.

FUCHS, M. A., GEIGER, D. R., REYNOLDS, T. L., & BOURQUE, J. E. Mechanisms of glyphosate toxicity in velvetleaf (*Abutilon theophrasti medikus*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 74, n. 1, p. 27-39, 2002.

FUCILE G, GARCIA C, CARLSSON J, SUNNERHAGEN M, CHRISTENDAT D. Structural and biochemical investigation of two *Arabidopsis* shikimate kinases: The heat-inducible isoform is thermostable. *Protein Sci.* n. 20, p.1125–36, 2011.

GAN, J., WU, Y., PRABAKARAN, P., GU, Y., LI, Y., ANDRYKOVITCH, M., LIU, H., GONG, Y., YAN, H., JI, X. Structural and biochemical analyses of shikimate dehydrogenase AroE from *Aquifex aeolicus*: implications for the catalytic mechanism. *Biochemistry*, v. 46, p. 9513–9522, 2007.

GARG, B., VAID, N., & TUTEJA, N. NARENDRA. In-silico analysis and expression profiling implicate diverse role of EPSPS family genes in regulating developmental and metabolic processes. *BMC research notes*, v. 7, n. 1, p. 58, 2014.

GASSER, B., SALOHEIMO, M., RINAS, U., DRAGOSITS, M., RODRÍGUEZ-CARMONA, E., BAUMANN, K., PORRO, D. Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: a host comparative overview. *Microbial cell factories*, v. 7, n. 1, p. 11, 2008.

GIENTKA I., DUSZKIEWICZ-REINHARD W., Shikimate pathway in yeast cells: enzymes, functioning, regulation - review. *Pol. J. Food Nutr. Sci*, n. 59, p. 113-118, 2009.

GOLDMAN, G. H.; DOS REIS MARQUES, E.; DUARTE RIBEIRO, D. C.; DE SOUZA BERNARDES, L. Â.; QUIAPIN, A. C.; VITORELLI, P. M.; SAVOLDI, M.; SEMIGHINI, C. P.; DE OLIVEIRA, R. C.; NUNES, L. R.; TRAVASSOS, L. R.; PUCCIA, R.; BATISTA, W. L.; FERREIRA, L. E.; MOREIRA, J. C.; BOGOSSIAN, A. P.; TEKAIA, F.; NOBREGA, M. P.; NOBREGA, F. G.; GOLDMAN, M. H. S. Expressed sequence tag analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: Identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence and pathogenicity genes. *Eukaryotic Cell*, v. 2, n. 1, p. 34–48, 2003.

GÖTHEL, S. F., SCHOLZ, C., SCHMID, F. X., & MARAHIEL, M. A. Cyclophilin and Trigger Factor from *Bacillus subtilis* Catalyze in Vitro Protein Folding and Are Necessary for Viability under Starvation Conditions. *Biochemistry*, v. 37, n. 38, p. 13392-13399, 1998.

.

GROBAN, E. S., NARAYANAN, A., JACOBSON, M. P. Conformational changes in protein loops and helices induced by post-translational phosphorylation. **PLoS Comput Biol.** v. 2, n. 4, p.32, 2006.

GÜNEL-ÖZCAN A, BROWN KA, ALLEN AG, MASKELL DJ. Salmonella typhimurium aroB mutants are attenuated in BALB/c mice. **Microbial Pathogenesis.** n. 23, v. 5, p. 311–316 , 1997.

HAN, C., WANG, L., YU, K., CHEN, L., HU, L., CHEN, K., JIANG, H., AND SHEN, X.. Biochemical characterization and inhibitor discovery of shikimate dehydrogenase from Helicobacter pylori. **FEBS J.** n. 273, 4682-4692, 2006.

HARPER, S., SPEICHER, D., W. Purification of proteins fused to glutathione S-transferase. Protein Chromatography: **Methods and Protocols**, p. 259-280, 2011.

HARRIS, J., KLEANTHOUS, C., COGGINS, J. R., HAWKINS, A. R. & ABELL, C. Different mechanistic and stereochemical courses for the reactions catalysed by type I and type I1 dehydroquinases. **Journal of the Chemical Society Chemical Communications.** n.13, p.108:1081, 1993.

HASSE, D., ANDERSSON, E., CARLSSON, G., MASLOBOY, A., HAGEMANN, M., BAUWE, H., & ANDERSSON, I. Structure of the homodimeric glycine decarboxylase P-protein from Synechocystis sp. PCC 6803 suggests a mechanism for redox regulation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 49, p. 35333-35345, 2013.

HAWKINS, A. R. . The complex arum locus of Aspergillus nidulans : evidence for multiple gene fusions and convergent evolution. **Current Genetics.** n.11, p. 491-498, 1987.

HAWKINS, A. R., LAMB, H. K., SMITH, M., KEYTE, J. W. & ROBERTS, C. F. . Molecular organization of the quinic acid utilization (gut) gene cluster in Aspergillus nidulans. **Molecular and General Genetics.** n. 214,p. 224-23, 1988.

HELMSTAEDT K., STRITTMATTER A., LIPSCOMB W.N., BRAUS G.H.Evolution of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase-encoding genes in the yeast Saccharomyces cerevisiae.**Proc. Natl. Acad. Sci.** n. 102, p. 9784–9789, 2005.

HENSTRAND, J.M., AMRHEIN, N., SCHMID, J. Cloning and characterization of a heterologously expressed bifunctional chorismate synthase flavin reductase from *Neurospora crassa*. **J. Biol. Chem.** n. 270, p 20447-20452, 1995a.

HENSTRAND, J.M., SCHMID, J., AMRHEIN, N. Only the mature form of the plastidic chorismate synthase is enzymatically active. **Plant. Physiol.** n. 108, p.1127-1132, 1995b.

HERDENDORF, T.J. MIZIORKO, H. M. Functional evaluation of conserved basic residues in human phosphomevalonate kinase. **Biochemistry**, v. 46, n. 42, p. 11780-11788, 2007.

HERRMANN, K. M. The shikimate pathway: early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. **The Plant Cell**, v. 7, n. 7, p. 907, 1995.

HERRMANN, K. M., WEAVER, Lisa M. The shikimate pathway. **Annual review of plant biology**, v. 50, n. 1, p. 473-503, 1999

HEUSDEN, P.G. HEUSDEN, V., STEENSMA, H.Y. Yeast 14-3-3 proteins. **Yeast**, v. 23, n. 3, p. 159-171, 2006.

HORSBURGH, M. J.; FOSTER, T. J.; BARTH, P. T. AND COGGINS, J. R. Chorismate synthase from *Staphylococcus aureus*. **Microbiology**, v. 142, p. 2943-2950, 1996.

HUYNH, Q., K. Evidence for a reactive gamma-carboxyl group (Glu-418) at the herbicide glyphosate binding site of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 24, p. 11631-11635, 1988.

JOHNSON, M. E., & HUMMER, G. Interface-resolved network of protein-protein interactions. **PLoS Comput Biol**, v. 9, n. 5, p. e1003065, 2013.

JONES, J.D., HENSTRAND, J.M., HANDA, A.K., HERRMANN, K.M., WELLER, S.C. Impaired wound induction of DAHP synthase and altered stem development in transgenic potato plants expressing a DAHP synthase antisense construct. **Plant Physiol.** n. 108, 1995.

KIMMEL, G.L., KIMMEL C.A., WILLIAMS, A.L., DESESSO, J.M. Evaluation of developmental toxicity studies of glyphosate with attention to cardiovascular development. **Crit Rev Toxicol**. n.43, v. 2, p. 79–95, 2013.

KOZAKOV, D., HALL, D. R., CHUANG, G. Y., CENCIC, R., BRENKE, R., GROVE, L. E., VAJDA, S. Structural conservation of druggable hot spots in protein–protein interfaces. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n. 108, v. 33, p. 13528-13533, 2011.

KUNZE, M., BERGER, J. The similarity between N-terminal targeting signals for protein import into different organelles and its evolutionary relevance. **Frontiers in physiology**, n. 6, 2015.

KURIHARA, T. UEDA, M. TANAKA, A. Occurrence and possible roles of acetoacetyl-CoA thiolase and 3-ketoacyl-CoA thiolase in peroxisomes of an n-alkane-grown yeast, *Candida tropicalis*. **FEBS letters**, v. 229, n. 1, p. 215-218, 1988.

LALORAYA, S., DEKKER, P. J., VOOS, W., CRAIG, E. A., & PFANNER, N. Mitochondrial GrpE modulates the function of matrix Hsp70 in translocation and maturation of preproteins. **Molecular and cellular biology**, v. 15, n. 12, p. 7098-7105, 1995.

LEE H.H. Overexpression, crystallization, and preliminary X-ray crystallographic analysis of shikimate dehydrogenase from *Thermotoga maritima*. **Acta. Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.** n . 67, p. 824–826, 2011.

LIGHT, S.H., MINASOV, G., SHUVALOVA, L., DUBAN, M.E., CAFFREY, M., ANDERSON, W.F., LAVIE, A. Insights into the Mechanism of Type I Dehydroquinase Dehydratases from Structures of Reaction Intermediates. **J. Biol. Chem.** n. 286, v. 9, p. 3531, 2011.

MACHEROUX, P., SCHÖNBRUNN, E. SVERGUN, D., VOLKOV, V.V., KOCH, M.H.J., BORNEMANN, S., ROGER N. F. THORNELEY, R.N.F.T. Evidence for a major structural change in *Escherichia coli* chorismate synthase induced by flavin and substrate binding. **Biochem. J.** n. 335, p. 319–32, 1998.

MAGALHÃES EM, RIBEIRO C DE F, DÂMASO CS, COELHO LF, SILVA RR, FERREIRA FB. Prevalence of paracoccidioidomycosis infection by intradermal

reaction in rural areas in Alfenas, Minas Gerais, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. n. 56, v.5, p. 281, 2014.

MARQUES S.A., CORTEZ, D.B., LASTÓRIA J.C., CAMARGO, R.M.P., MARQUES, M.E.A. Paracoccidioidomicose: frequência, morfologia e patogênese de lesões tegumentares. **An Bras. Dermatol.** n. 82 v. 5, p. 411-7, 2007.

MARQUES, S.A. Paracoccidioidomicose: atualizacao epidemiologica, clínica, diagnostica e terapeutica. **An Bras Dermatol.** n. 88, v 5 p. 700, 2013.

MORRIS, KEVIN V.; MATTICK, JOHN S. The rise of regulatory RNA. **Nature Reviews Genetics**, n 15,v 6, p. 423-437, 2014.

MATUTE, D. R.; MCEWEN, J. G.; PUCCIA, R.; MONTES, B. A.; SAN-BLAS, G.; BAGAGLI, E.; RAUSCHER, J. T.; RESTREPO, A.; MORAIS, F.; NIÑO-VEGA, G.; TAYLOR, J. W. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, n. 1, p. 65–73, 2006.

MUÑOZ, J. F.; FARRER, R. A.; DESJARDINS, C. A.; GALLO, J. E.; SYKES, S.; SAKTHIKUMAR, S.; MISAS, E.; WHISTON, E. A.; BAGAGLI, E.; SOARES, C. M. A.; TEIXEIRA, M. de M.; TAYLOR, J. W.; CLAY, O. K.; MCEWEN, J. G.; CUOMO, C. A.; CUOMO, A. Genome Diversity, Recombination, and Virulence across the Major Lineages of *Paracoccidioides*. **mSphere**, v. 1, n. 5, p. e00213-16, 2016.

PAPAGIANNI, M. Recent advances in engineering the central carbon metabolism of industrially important bacteria. **Microbial cell factories**, v. 11, n. 1, p. 50, 2012.

PARENTE, J. A., SALEM-IZACC, S. M., SANTANA, J. M., PEREIRA, M., BORGES, C. L., BAILÃO, A. M., & SOARES, C. M. A secreted serine protease of *Paracoccidioides brasiliensis* and its interactions with fungal proteins. **BMC microbiology**, v. 10, n. 1, p. 292, 2010.

PARENTE-ROCHA, J. A., PARENTE, A. F. A., BAEZA, L. C., BONFIM, S. M. R. C., HERNANDEZ, O., MCEWEN, J.G., DE ALMEIDA SOARES, C. M. Macrophage interaction with *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells modulates fungal metabolism and generates a response to oxidative stress. **PloS one**, v. 10, n. 9, p. e0137619, 2015.

PEMBERTON, T. J. Identification and comparative analysis of sixteen fungal peptidyl-prolyl cis/trans isomerase repertoires. **BMC genomics**, v. 7, n. 1, p. 244, 2006.

PEMBERTON, TREVOR J.; KAY, JOHN E. Identification and comparative analysis of the peptidyl-prolyl cis/trans isomerase repertoires of *H. sapiens*, *D. melanogaster*, *C. elegans*, *S. cerevisiae* and *Sz. pombe*. **Comparative and functional genomics**, v. 6, n. 5-6, p. 277-300, 2005.

PENG R-H, TIAN Y-S, XIONG A-S, ZHAO W, FU X-Y. A Novel 5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase from *Rahnella aquatilis* with Significantly Reduced Glyphosate Sensitivity. *PLoS ONE* 7(8), 2012.
PHIZICKY, E. M., S. Fields. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. **Microbiol.** n 59, p. 94, 1995.

PIPER, M. D., HONG, S. P., BALL, G. E., & DAWES, I. W. Regulation of the Balance of One-carbon Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 40, p. 30987-30995, 2000.

PITTARD, J., WALLACE, B.J. Distribution and function of genes concerned with aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. **J.Bacteriol.** n. 91, p. 1494–1508, 1966.

RAO, V. S., SRINIVAS, K., SUJINI, G. N., & KUMAR, G. N. Protein-protein interaction detection: methods and analysis. **International journal of proteomics**, v. 2014, 2014.

RICHARDS TA, DACKS JB, CAMPBELL SA, BLANCHARD JL, FOSTER PG, Evolutionary origins of the eukaryotic shikimate pathway: gene fusions, horizontal gene transfer, and endosymbiotic replacements. **Eukaryot. Cell.** n. 5, p. 1517, 2006.

RODRIGUES, J. P. G. L. M.; LEVITT, M.; CHOPRA, G. KoBaMIN: a knowledge-based minimization web server for protein structure refinement. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. W1, p. W323–W328, 2012.

RODRÍGUEZ-NEGRET, E., BEJARANO, E. R., CASTILLO, A. G. Using the Yeast Two-Hybrid System to Identify Protein–Protein Interactions. **Plant Proteomics: Methods and Protocols**. p. 241-258, 2014.

ROSADO, L.A., VASCONCELOS, I.B., PALMA, M.S., FRAPPIER, V., NAJMANOVICH, R.J. The Mode of Action of Recombinant Mycobacterium

tuberculosis Shikimate Kinase: Kinetics and Thermodynamics Analyses. **PLoS ONE**. N. 8, v. 5, 2013.

RUTTER, J. WINGE, DENNIS, R.; SCHIFFMAN, J.D. Succinate dehydrogenase–assembly, regulation and role in human disease. **Mitochondrion**, v. 10, n. 4, p. 393-401, 2010.

SANTANA, A. L. C. **Clonagem, expressão heteróloga, modelagem e interações intermoleculares da proteína corismato sintase de Paracoccidioides brasiliensis 2017, 100f.** Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas - ICB, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2017

SANTOS, W.A., SILVA, B.M., PASSOS ,E.D., ZANDONA, E., FALQUETO, A. Associação entre tabagismo e paracoccidioidomicose: um estudo de caso controle no Estado do Espírito Santo. **Cad. Saúde Pública**. n.19, v. 1, p. 245–53, 2003.

SCHONBRUNN E, ESCHENBURG S, SHUTTLEWORTH WA, SCHLOSS JV, AMRHEIN N, EVANS JNS, KABSCH W. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. **Proc Natl Acad Sci USA**, n. 98, p. 1376–138, 2001.

SHELLEY, J. C.; CHOLLETI, A.; FRYE, L. L.; GREENWOOD, J. R.; TIMLIN, M. R.; UCHIMAYA, M. Epik: a software program for pK(a) prediction and protonation state generation for drug-like molecules. **Journal of computer-aided molecular design**, n. 12, v. 21, p. 681–691, 2007.

SHIKANAI-YASUDA MA, TELLES FILHO FQ, MENDES RP, COLOMBO AL, MORETTI ML E GRUPO DE CONSULTORES DO CONSENSO EM PARACOCCIDIIDOMICOSE. Consenso em paracoccidioidomicose. **Rev.Soc.Bras.Med.Trop**. n. 39, v. 3, p. 297-310, 2006.

SILVA, J. D. F. D., VICENTIM, J., OLIVEIRA, H. C. D., MARCOS, C. M., ASSATO, P. A., ANDREOTTI, P. F., ... & MENDES-GIANNINI, M. J. S. Influence of the Paracoccidioides brasiliensis 14-3-3 and gp43 proteins on the induction of apoptosis in A549 epithelial cells. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. 4 v. 110, p. 476-484, 2015.

SINGH, A., UPADHYAY, V., UPADHYAY, A. K., SINGH, S. M., PANDA, A. K. Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. **Microbial cell factories**, v. 14, n. 1, p. 41, 2015.

SINGH, S., M. PANDA, A., K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 99, n. 4, p. 303-310, 2005.

STEINRUCKEN, H.C., AMRHEIN, N. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase. **Biochem. Biophys. Res Commun.** n. 94 p. 1207–1212, 1980.

STINCONE, A., PRIGIONE, A., CRAMER, T., WAMELINK, M., CAMPBELL, K., CHEUNG, E. KELLER, M. A. The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. **Biological Reviews**, v. 90, n. 3, p. 927-963, 2015.

SUTANDY, F. X., QIAN, J., CHEN, C. S., & ZHU, H. Overview of protein microarrays. **Current protocols in protein science**, V. 27-1, 2013.

TAMAYO, D., MUÑOZ, J. F., TORRES, I., ALMEIDA, A. J., RESTREPO, A., MCEWEN, J. G., & HERNÁNDEZ, O. Involvement of the 90kDa heat shock protein during adaptation of *Paracoccidioides brasiliensis* to different environmental conditions. **Fungal genetics and biology**, v. 51, p. 34-41, 2013.

TEIXEIRA, M. M.; THEODORO, R. C.; DE CARVALHO, M. J. A.; FERNANDES, L.; PAES, H. C.; HAHN, R. C.; MENDOZA, L.; BAGAGLI, E.; SAN-BLAS, G.; FELIPE, M. S. S. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 52, n. 2, p. 273–283, 2009.

TIAN, Y. S., XU, J., XIONG, A. S., ZHAO, W., FU, X. Y., PENG, R. H., YAO, Q. H. Improvement of glyphosate resistance through concurrent mutations in three amino acids of the *Ochrobactrum* 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 23, p. 8409-8414, 2011.

TYAGI, R., LEE, Y. T., GUDDAT, L. W., & DUGGLEBY, R. G. TYAGI, RAJIV Probing the mechanism of the bifunctional enzyme ketol-acid reductoisomerase by site-directed mutagenesis of the active site. **Febs Journal**, v. 272, n. 2, p. 593-602, 2005.

TZIN V, GALILI G. **The biosynthetic pathways for shikimate and aromatic amino acids in Arabidopsis thaliana.** The Arabidopsis book-American Society of Plant Biologists v. 8, 2010.

VAN-HEUSDEN, G. P. H., Y DE STEENSMA, H. Yeast 14-3-3 proteins. **Yeast**, n. 3 v. 23, p. 159-171, 2006.

WHITE, P. J., MILLAR, G., COGGINS, R. The overexpression, purification and complete amino acid sequence of chorismate synthase from Escherichia coli K12 and its comparison with the enzyme from Neurospora crassa. **Biochem. J.** n. 251, v. 31, p. 3-322, 1988.

WINGFIELD, P. T., PALMER, I., LIANG, SM. Folding and purification of insoluble (inclusion body) proteins from Escherichia coli. **Current protocols in protein science**, n. 30, p. 65, 2001.

WOOLFORD, J. L.; BASERGA, S. J. Ribosome biogenesis in the yeast Saccharomyces cerevisiae. **Genetics**. n. 3, v. 195, p. 643-681, 2013

YANG, Z., ZHANG, L., ZHANG, Y., ZHANG, T., FENG, Y., LU, X., WANG, X.. Highly efficient production of soluble proteins from insoluble inclusion bodies by a two-step-denaturing and refolding method. **PloS one**, n. 6, v. 7, p. e22981, 2011.

YU, T.W., MULLER, R., MULLER, M., ZHANG, X., DRAEGER, G., KIM, C.G., LEISTNER, E., FLOSS, H.G. Mutational analysis and reconstituted expression of the biosynthetic genes involved in the formation of 3-amino-5-hydroxybenzoic acid, the starter unit of rifamycin biosynthesis in Amycolatopsis mediterranei S699. **J. Biol. Chem.** p. 276, 2001.