

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

Maria Regilda de Araújo Fernandes

Caracterização Molecular e Funcional da Urease de *Paracoccidioides brasiliensis*

Orientadora:

Dr^a Maristela Pereira

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Medicina Tropical, área de concentração: Microbiologia.

Goiânia – GO, 2009

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

Maria Regilda de Araújo Fernandes

Caracterização Molecular e Funcional da Urease de *Paracoccidioides brasiliensis*

Orientadora:

Profª Drª Maristela Pereira

Goiânia – GO, 2009

Este trabalho foi realizado com o auxílio financeiro do Conselho Nacional Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq): 481600/2007-8 e Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

Apoio: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES).

BANCA EXAMINADORA

TITULARES

Prof^a Dr^a Maristela Pereira (orientadora)

Prof^a Dr^a Célia Maria de Almeida Soares - Instituto de Ciências Biológicas - UFG

Prof^a Dr^a Maria José Soares Mendes Giannini - Universidade Estadual Paulista -
UNESP

SUPLENTES

Prof^a Dr^a Maria do Rosário Rodrigues Silva - Instituto de Patologia Tropical e Saúde
Pública - UFG

Prof. Dr. Cirano José Ulhôa - Instituto de Ciências Biológicas - UFG

Prof^a Dr^a Sílvia Maria Salem-Izacc - Instituto de Ciências Biológicas - UFG

Aos meus pais Braz Fernandes Neto e Maria de Araújo Fernandes, que apesar da distância sempre me incentivaram a estudar e sempre compreenderam minha ausência física.

Aos meus amados irmãos: Rejane, José, Francisco e Fernandes. Deus foi muito generoso comigo, dando-me tantos irmãos, certamente se eu fosse filha única não seria tão feliz como sou com tantos irmãos!!!

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar o que sempre peço, principalmente paciência e perseverança;

À Prof^a Dr^a Maristela Pereira por ser minha orientadora, uma orientadora acessível, sempre disponível para discutir experimentos e resultados. Pelos ensinamentos profissionais e por tanta dedicação à pesquisa.

À Prof^a Dr^a Célia Maria de Almeida Soares, uma referência em competência profissional. Sempre empenhada na busca de recursos financeiros para manter o Laboratório de Biologia Molecular (LBM) com estrutura técnica e científica.

À Mônica Santiago, pela ajuda e incentivo nos primeiros meses no LBM.

Às amigas de grupo, algumas das quais foram adotadas e que me adotaram, tornando-se irmãs de coração, em especial Patrícia Zambuzzi, Raquel e Marta. À Renata, Amanda e Patrícia Kott pela agradável convivência de tantos dias na faculdade. Aos bem-aventurados “hominhos” do grupo Rogério e Neto.

À Nadya Castro, minha conterrânea e amiga. Referência em determinação, profissionalismo e ética. À madame Cristina e Daciene, pela agradabilíssima convivência.

À Juliana Parente, ao Luiz Augusto e ao Wesley, sempre dispostos em tirar dúvidas, explicar, e pelas sugestões nos experimentos.

À Natalie, Kelly, Sarah (“-80!”), Sabrina (“bonitinha”), Patrícia Lima, Dayane, Mariana, Ívian, Mirelle, Elisa Flávia, Ana Flávia e Ellen. Ao Rodrigo, nosso cantor sertanejo; Ademar, Clayton, Ronney e Alexandre.

À Julhiany e à professora Zezé pela atenção nos experimentos realizados na UNESP, Araraquara – SP.

Aos funcionários do IPTSP, em especial Zezinho e Kariny, sempre atenciosos.

Aos meus eternos professores da graduação Lázaro Dutra, Patrícia Bonilha, Aline Aires, Adriano Azevedo, Erminiana e Ernane Bastos. Professores que sempre incentivaram seus alunos para que melhorem, cresçam no dia-a-dia.

A todos, meus sinceros agradecimentos!

Maria Regilda de Araújo Fernandes.

NÃO DESISTA

***Mesmo que pareça estar difícil.
Mesmo que ninguém te dê uma chance.
Mesmo que pareça que a meta está tão fora de alcance.***

Não desista, Não desista.

***Mesmo quando tudo der errado.
Que tudo do teu lado entristeça.
Que o mundo venha desabando sobre tua cabeça.***

Não desista, Não desista.

***Ninguém tem o direito de perder a esperança.
É só pensar em Deus e tudo vai melhorar.
Se Deus é nosso amigo, quem é que vai nos atrapalhar.***

***Enquanto houver a fé em Cristo a gente alcança qualquer objetivo que a gente
sonhar.***

Na hora no perigo é Jesus que sempre vai nos guiar.

***Se estiver perdido no caminho, mesmo que ninguém te dê uma pista.
Tudo o que você precisa, é só Jesus, não desista.***

Não desista, Não desista.

Joel Marques

SUMÁRIO

Abreviaturas.....	ix
Resumo.....	x
Abstract.....	xi
1. Introdução.....	12
1.1- <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e a Paracoccidioidomicose.....	12
1.2- Epidemiologia e transmissão.....	13
1.3- Fatores de virulência.....	14
1.4- Transcriptomas de <i>P. brasiliensis</i>	15
1.5- Adesão	16
1.6- Urease.....	19
1.6.1- Interações da uréase com proteínas acessórias	22
2. Justificativa.....	24
3. Objetivos.....	25
4. Materiais e Métodos.....	26
5. Resultados.....	38
6. Discussão.....	51
7. Conclusões.....	54
8. Perspectivas.....	55
9. Referências Bibliográficas.....	56

ABREVIATURAS

AD	Domínio de ativação
ATV	Solução de tripsina-EDTA-versene (Adolfo Lutz)
BCIP	5-bromo-4cloro-3-indolil fosfato
BD	Domínio de ligação
BSA	Soro albumino bovino
CBP	Proteína cálcio-ligante
cDNA	DNA complementar
CN	Célula normal
DO	Densidade ótica
LB	Meio Luria Bertani
L	Fase leveduriforme de <i>P. brasiliensis</i>
M	Fase miceliana de <i>P. brasiliensis</i>
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
kDa	Quilodalton
M	Molaridade
MEC	Matriz extracelular
MEP1	Metaloproteinase
NBT	Azul de nitrotetrazólio
<i>Pb</i>	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PBS	Tampão salina fosfato
<i>Pbure</i>	Gene codificante para proteína urease de <i>P. brasiliensis</i>
<i>PbURE</i>	Proteína urease de <i>P. brasiliensis</i>
<i>PbUREr</i>	Proteína recombinante Urease de <i>P. brasiliensis</i>
PBS-T	Tampão salina fosfato com 0,1% de Tween-20
PCM	Paracoccidioidomicose
pI	Ponto isoelétrico
RGD	Motivo composto pelos aminoácidos: Arginina, Glicina e Ácido Aspártico (Arg-Gly-Asp)
QDO	Meio mínimo SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp (sem adenina, histidina, leucina e triptofano)
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SOWgp	Glicoproteína da parede celular
TEMED	Tetra metil etileno diamino
TDO	Meio mínimo SD/-His/-Leu/-Trp (sem histidina, leucina e triptofano)
X-gal	5-bromo-4cloro-3indolil-b-D-galactosídeo
YPDA	Meio de cultura com Levedura/Peptona/Adenina/Glicose

RESUMO

O fungo patogênico humano *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da Paracoccidioidomicose (PCM). A principal via de contaminação é a inalação de micélios ou conídios do fungo que se convertem em leveduras no hospedeiro. Dentre os fatores de virulência descritos para fungos dimórficos está a urease, a qual hidrolisa uréia produzindo amônia e carbamato. *Pbure* possui 3.012 pb, correspondendo a uma proteína predita de 837 aminoácidos, massa molecular predita de 90 kDa e *pI* 6.0. *PbURE* possui assinatura de uma enzima dependente de níquel para sua atividade. A relação filogenética entre *PbURE* e ureases de outros fungos foi avaliada. O cDNA que codifica *PbURE* foi inserido no vetor de expressão pET-32a e a proteína recombinante de 103 kDa foi expressa. Anticorpo policlonal foi produzido contra *PbUREr* e utilizados nos ensaios de *Western blot*, *Far-Western blot* e ELISA. Os resultados mostram que *PbUREr* interfere na interação entre *P. brasiliensis* e células epiteliais pulmonares A549. *PbUREr* foi capaz de se ligar às proteínas fibronectina e colágeno tipo IV, componentes da matriz extracelular (MEC). A interação entre *PbURE* e a proteína calnexina foi identificada através da técnica de duplo-híbrido.

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*. Urease. Relações filogenéticas. Expressão heteróloga. Interações intermoleculares.

ABSTRACT

The pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* is the etiologic agent of Paracoccidioidomycosis (PCM). The main route of contamination is the inhalation of fungal propagules that convert to yeast in the host tissues. The urease is among the factors of virulence described for dimorphic fungus. It hydrolyzes the urea producing molecules of ammonia and carbamate. *Pbure* has 3,012 bp, corresponding to a predicted protein of 837 amino acids, predicted molecular mass of 90 kDa and *pI* 6.0. *PbURE* has signature to nickel-dependent enzyme for its activity. The phylogenetic relationship between *PbURE* and urease from other fungi was evaluated. The cDNA that encodes *PbURE* was inserted into the expression vector pET-32a and recombinant protein of 103 kDa was expressed. Polyclonal antibody were produced against *PbURER* and used on *Western blot*, *Far-Western blot* and ELISA. The results showed that *PbURER* interferes on interaction between *P. brasiliensis* and pulmonary epithelial cells A549. *PbURER* was able to bind to proteins fibronectin and type IV collagen, components of the extracellular matrix (ECM). The interaction between *PbURE* and calnexin protein was identified by the technique of two-hybrid.

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Paracoccidioides brasiliensis* e a Paracoccidioidomicose

O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* foi classificado por estudos moleculares como pertencente ao reino Fungi, filo Ascomycota, ordem Onygenales e família Onygenaceae. Esse fungo foi descrito pela primeira vez em 1908 por Adolfo Lutz. Em 1912, Afonso Splendore sugeriu o nome *Zymonema brasilienses*, e em 1930, para distingui-lo de *Coccidioides immitis*, Floriano de Almeida propôs o nome de *Paracoccidioides brasiliensis* (Leclerc et al. 1994; Bialek et al. 2000).

P. brasiliensis é um fungo dimórfico, termo-dependente, apresentando a fase miceliana saprobiótica. O aspecto das culturas nessa fase é esbranquiçado e microscopicamente observa-se a presença de filamentos finos, hialinos e septados. A fase de levedura constitui a forma parasitária do fungo, apresenta-se com células arredondadas, de parede dupla e brotamentos múltiplos característicos, formando a denominada “roda-de-leme” (Lacaz 1994).

A principal via de contaminação é a inalação pelo homem dos micélios ou conídios de *P. brasiliensis* existentes no meio ambiente, em seguida os conídios podem se converter em leveduras, sendo fagocitadas por macrófagos (Brummer et al. 1989). Os macrófagos podem servir como ambiente para multiplicação intracelular do fungo, possibilitando a disseminação local dos pulmões para outros órgãos. A patologia se estabelece somente após a transição para a fase leveduriforme. Esse processo ocorre

devido à variação da temperatura de 20°C, fase miceliana, para 37°C, fase leveduriforme (Kanetsuna et al. 1972). Dados clínicos e experimentais indicam a resposta imune celular como principal mecanismo de defesa do hospedeiro contra a infecção causada pelo *P. brasiliensis* (Moscardi-Bacchi & Franco 1985).

A PCM pode acometer a pele, os linfonodos, e vários órgãos internos, como os pulmões e o sistema nervoso central. As manifestações clínicas mais comuns são: emagrecimento, febre, palidez, adenomegalia, lesões na pele, tosse, dispnéia, dentre outros. Esse quadro varia com a forma clínica aguda ou crônica em que o paciente se encontra. Essa micose sistêmica possui distribuição geográfica limitada à América Latina, onde ocorre desde o México até a Argentina. Nos casos relatados fora da área endêmica, constatou-se que o paciente visitara um país latino-americano ou nele residira (Paniago et al. 2003).

1.2 Epidemiologia e transmissão

Uma vez que a PCM não é doença de notificação compulsória, os cálculos de prevalência, incidência e morbidade da micose, no Brasil, baseiam-se em relatos de inquéritos epidemiológicos e de séries de casos. Acredita-se que sua incidência em zonas endêmicas varie de 3 a 4 novos casos/milhão até 1 a 3 novos casos por 100 mil habitantes ao ano. Informações registradas no Ministério da Saúde atestam que 3.181 casos de óbito por PCM foram registrados no Brasil entre 1980 a 1995, resultando em taxa de mortalidade por PCM de 1,45 casos por milhão de habitantes. Nesse estudo, os autores apontaram a PCM como oitava causa de mortalidade por doença infecciosa predominantemente crônica entre as doenças infecciosas e parasitárias, inclusive maior

que a mortalidade por leishmanioses, e a mais alta taxa entre as micoses sistêmicas (Coutinho et al. 2002).

1.3 Fatores de virulência em fungos

A virulência de um determinado patógeno resulta da expressão de múltiplos genes em diferentes estágios da infecção, como aguda, subaguda e crônica, sendo então associada ao estabelecimento da patologia. As fases de adesão e sobrevivência do parasita no interior do hospedeiro parecem ser essenciais para o estabelecimento da patogênese (Rappleye & Goldman 2006).

Em *Histoplasma capsulatum*, a proteína cálcio-ligante (CBP) é necessária para aquisição de íons cálcio durante o parasitismo intracelular das leveduras (Patel et al. 1998), sendo importante na proliferação e diferenciação celular fúngica (Yin et al. 2005). Em *Aspergillus fumigatus*, a enzima α -1,3-glucana sintase modula o polissacarídeo α -1,3-glucana da parede celular possibilitando o crescimento do fungo nos pulmões de camundongos infectados (Maubon et al. 2006).

O fungo *C. immitis* produz a glicoproteína da parede celular (SOWgp) que é expressa na fase parasitária de fungos patogênicos humanos. Estudos *in vitro* com SOWgp de *C. immitis* demonstraram que essa proteína foi capaz de se ligar a algumas proteínas da membrana celular, sugerindo que esse antígeno de superfície celular possa atuar como uma adesina. A deleção do gene SOWgp resultou na diminuição da adesão do fungo às proteínas da matriz extracelular e na redução da virulência dos mutantes (Hung et al. 2002).

A metaloproteinase (Mep1), secretada durante a fase reprodutiva do ciclo parasítico, é responsável pela degradação do antígeno fúngico SOWgp, impedindo o

reconhecimento dos endósporos pelas células fagocíticas do hospedeiro (Hung et al. 2005).

1.4 Transcriptomas de *P. brasiliensis*

Projetos sobre os transcriptomas de *P. brasiliensis* têm sido desenvolvidos no sentido de identificar genes expressos por esse fungo utilizando diferentes abordagens.

Felipe et al. (2003; 2005) sequenciaram 25.511 clones derivados de bibliotecas de cDNAs das fases micélio e levedura resultando em 6.022 grupos, representando cerca de 80% do genoma total do fungo. Análises computacionais revelaram que desses grupos formados, 4.198 (69,4%) mostraram homologia com sequências depositadas no GenBank, 4.130 (68,3%) apresentaram homologia com sequências de fungos e 30,2% foram encontrados apenas em *P. brasiliensis*. Após classificação, concluiu-se que 29% desses genes estão envolvidos no metabolismo celular, 12% na transcrição, 10% na síntese de proteínas, 9% na produção de energia, 4% no controle da organização celular. Cerca de 4% do número total de genes anotados estão envolvidos nos mecanismos de transdução de sinal e comunicação celular, vias que têm sido relacionadas com a diferenciação celular de fungos patogênicos dimórficos. Em geral, micélio apresenta metabolismo aeróbio, uma vez que durante a fase saprofítica, genes que codificam enzimas que participam da fosforilação oxidativa estão altamente expressos, em contrapartida a fase leveduriforme apresenta metabolismo anaeróbio.

Com o objetivo de estudar genes possivelmente envolvidos na adaptação e sobrevivência de *P. brasiliensis* no hospedeiro durante a infecção Bailão et al. (2006) identificaram genes induzidos durante o processo infectivo e em condições que mimetizavam a via hematológica de disseminação fúngica, dentre eles genes

relacionados à aquisição de íons, à síntese de melanina e genes envolvidos com a síntese ou remodelamento da parede celular.

Leveduras de *P. brasiliensis* tratadas com plasma humano apresentaram um aumento significativo na expressão de transcritos associados com a degradação de lipídeos, síntese de proteínas, o remodelamento da parede e defesa celular (Bailão et al. 2007).

As análises comparativas dos perfis de genes super regulados durante a incubação com plasma e com sangue demonstraram que aproximadamente 16,6% dos transcritos super regulados encontrados no fungo, quando na presença de plasma humano, não estavam presentes no sangue, sugerindo a influência das células sanguíneas no perfil transcricional (Bailão et al. 2007).

Análises do transcriptoma de *P. brasiliensis* durante transição de micélio para levedura identificaram genes potencialmente associados ao processo dimórfico, dentre eles genes envolvidos na via de assimilação do enxofre como a sulfito redutase, isocitrato liase, malato desidrogenase e o gene codificador para a urease, sugerindo a importância dessa enzima para a adaptação do fungo nas novas condições ambientais (Bastos et al. 2007).

Costa et al. (2007) analisaram o perfil transcricional de *P. brasiliensis* durante o processo infectivo, a partir de leveduras recuperadas de animais infectados, e identificaram alterações na expressão gênica do fungo durante a infecção, como a super expressão de enzimas envolvidas no metabolismo de lipídeos, enzimas envolvidas no metabolismo de aminoácidos como a glutamina sintetase, dentre outras.

1.5 Adesão

A aderência de microrganismos patogênicos aos tecidos do hospedeiro é considerada indispensável para o início da colonização e futura disseminação. A adesão implica que o patógeno reconheça carboidratos ou proteínas ligantes presentes na superfície da célula do hospedeiro ou proteínas constituintes da membrana basal (Patti et al. 1994). Em bactérias, as adesinas estão envolvidas nos passos iniciais da colonização mediando sua interação com bactérias e a superfície da célula hospedeira. As receptinas, proteínas dos microrganismos que possuem capacidade de ligação às proteínas de mamíferos, parecem não induzir um efeito secundário ao hospedeiro, como ocorre em *Helicobacter pylori* onde a inter-relação dos fatores de virulência urease, o gene A associado à citotoxina A vacuolar (VacA) e a proteína de ativação neutrofílica (NAP) são importantes determinantes na colonização e patogenicidade de *H. pylori* no estômago (Dubreuil et al. 2002).

Três são os tipos de componentes do hospedeiro que os microrganismos podem interagir: produtos secretados pelas células, superfície celular do hospedeiro, e proteínas da matriz extracelular (MEC), tais como laminina, fibronectina, colágeno tipo I e colágeno tipo IV (Mendes-Giannini et al. 2006; 2008).

A laminina é uma glicoproteína de aproximadamente 900 kDa encontrada na membrana basal de vários órgãos, principalmente nos pulmões (Beck, 1990), enquanto que a fibronectina é uma glicoproteína dimérica de 440 kDa, presente na forma solúvel no plasma sanguíneo e outros fluidos e na forma fibrilar na MEC (Mohri 1996). Essa proteína atua como molécula de adesão em tecidos de mamíferos, um processo que envolve a ligação de receptores específicos da superfície celular com domínios presentes na molécula de fibronectina.

O colágeno, por ser o principal constituinte da MEC, representa um importante alvo para adesão de muitas espécies de microrganismos. O colágeno tipo IV é

encontrado principalmente na membrana basal e o colágeno tipo I é abundante na matriz intersticial (Gil et al. 1996). Essas proteínas da MEC, normalmente não são expostas na superfície do epitélio e endotélio, entretanto, traumas que alterem o tecido do hospedeiro podem ocasionar a exposição de membranas basais e tornar acessíveis seus componentes (Finlay 1990; Kottom et al. 2003).

Moléculas capazes de interagir com componentes da MEC têm sido descritas em fungos de relevância médica, como *P. brasiliensis* (Mendes-Giannini et al. 2008), *Candida albicans* (Sheppard et al. 2004), *H. capsulatum* (McMahon et al. 1995), *Sporothrix schenckii* (Figueiredo et al. 2004) e *C. immitis* (Hung et al. 2002). A maioria dessas moléculas microbianas são glicoproteínas conhecidas como adesinas, apresentando características similares a integrinas ou lectinas (Lima et al. 2001; Huang et al. 2003). As integrinas das células hospedeiras reconhecem proteínas da MEC que contêm a sequência de aminoácidos do tripeptídeo arginina, glicina e ácido aspártico (RGD) (Ruoslahti 1996; Pae et al. 2008).

P. brasiliensis é capaz de aderir, atravessar e invadir barreiras impostas pelos tecidos do hospedeiro (Mendes-Giannini et al. 2000). Estudo de caracterização dos componentes da MEC envolvendo a interação de *P. brasiliensis* com o hospedeiro demonstrou que a laminina é uma das principais moléculas que promovem a adesão desse fungo, permitindo a sua patogenicidade (Mendes-Giannini et al. 2008), e favorecendo assim, a invasão tecidual e disseminação do fungo (Vicentini et al. 1994; Andreotti et al. 2005). Dessa forma, a ligação do fungo à laminina poderia ocorrer durante a infecção em decorrência da exposição, ocasionada pela injúria tecidual, da membrana basal rica em laminina. Estudos indicam que *P. brasiliensis* interage também com a fibronectina e o colágeno humano durante o processo de adesão à célula hospedeira (Mendes-Giannini et al. 2006, 2008).

Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Barbosa et al. 2006) e triose fosfato isomerase de *P. brasiliensis* (Pereira et al. 2007) demonstraram ter capacidade de ligação à laminina, à fibronectina e ao colágeno tipo I. A proteína de parede celular Dfg5p, deficiente para o crescimento filamentosos, apresentou capacidade de se ligar à laminina, à fibronectina, ao colágeno tipo I e ao colágeno tipo IV, além de apresentar o motivo RGD em sua sequência predita (Castro et al. 2008).

1.6 Urease

A urease (urea amidohydrolase, EC 3.5.1.5) do feijão, *Canavalia ensiformis*, foi a primeira enzima a ser cristalizada, por James Batcheller Sumner, em 1926 (Simoni et al. 2000). Essa proteína pertence à superfamília das hidrolases, as quais necessitam de metais para exercer sua atividade catalítica (Jabri et al. 1995). A hidrólise do seu substrato uréia produz amônia e carbamato ocasionando o aumento do pH (Mobley et al. 1995). O carbamato reage com a água produzindo amônia e ácido carbônico (Figura 1).

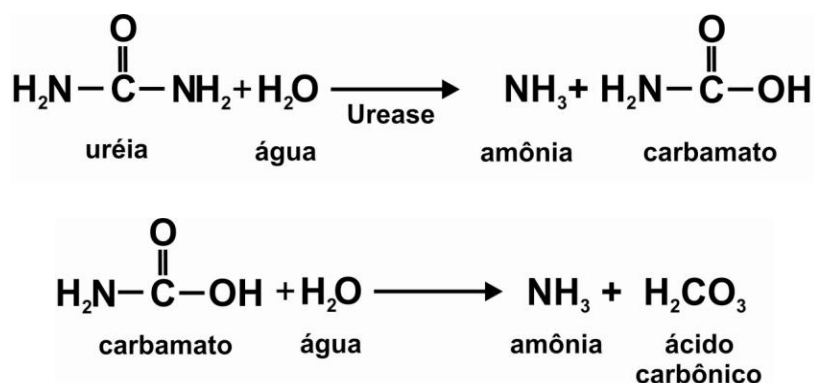


Figura 1 - Produção de amônia pela ação da urease sobre a uréia.

Estudos desenvolvidos por Carlini & Polacoo (2008) sugerem que a urease seja uma proteína multifuncional com múltiplos domínios funcionais. Além de sua atividade ureolítica, acredita-se que a urease seja capaz de produzir efeitos tóxicos em insetos; em algumas plantas a urease tem ação protetora contra fitopatógenos; em contrapartida a urease da bactéria *H. pylori* pode estimular a secreção e a agregação plaquetária (Carlini & Polacoo 2008; Follmer 2008).

Sequências gênicas da urease de diferentes organismos compartilham similaridades significativas (Mobley et al. 1991; Holm & Sander 1997). A urease apresenta quatro domínios, sendo três domínios estruturais e um catalítico, o qual se liga a um íon metal. Em *H. pylori* os domínios gama e beta são fusionados compondo a subunidade alfa; enquanto em *C. ensiformis* as subunidades alfa, beta e gama são fusionadas compondo uma única subunidade (Jabri et al. 1995).

Em bactérias como a *H. pylori*, a urease proporciona o aumento do pH do microambiente, demonstrando ter importante papel em patogêneses gástricas (Mobley et al. 1991; Mobley 1996). As moléculas de amônia produzidas a partir da hidrólise da uréia são usadas para tamponar o pH ácido, com isso a proteína citotoxina vacuolar induz alterações nas junções celulares, promovendo a formação de vacúolos e a difusão da uréia através do epitélio, favorecendo a infecção por *H. pylori* pela otimização da atividade da urease (Dubreuil et al. 2002). Para *Proteus mirabilis*, a alcalinização do meio resulta no desenvolvimento de infecções do trato urinário e pielonefrites agudas (Mobley et al. 1995).

A atividade da urease foi identificada em alguns fungos como *C. neoformans* (Cox et al. 2000), *C. immitis* (Mirbod & Schaller 2002), *Coccidioides posadasii* (Mirbod-Donovan et al. 2006). Estudos realizados em *Coccidioides spp.* demonstraram que a urease produzida durante o período de conversão da fase saprofítica para a fase

parasítica é, em parte, responsável pela produção da amônia intracelular liberada no meio extracelular tornando-o alcalino (Cole 1997).

Cox et al. (2000) demonstraram que a urease pode ser importante para *C. neoformans* sobreviver em hospedeiros humanos, devido a sobrevivência de camundongos infectados com mutante urease negativo. A virulência do selvagem e do mutante reconstituído foi significativamente maior quando comparado com o mutante urease negativa, demonstrando que a urease de *C. neoformans* atua como fator de virulência.

Utilizando modelos murinos Olszewski et al. (2004) estudaram o papel da urease de *Cryptococcus* no sistema nervoso central. A inoculação direta do fungo tipo selvagem *C. neoformans* no cérebro de camundongos, quando comparada ao isolado com deleção para o gene da urease e do mutante reconstituído, não demonstraram diferenças significativas na colonização do sistema nervoso central. Entretanto, quando o fungo foi inoculado via endovenosa, o padrão de disseminação para os diferentes órgãos e para o cérebro foi de uma menor disseminação cerebral para o gene da urease, sugerindo que a urease facilite a invasão do fungo em órgãos vitais por via hematogênica.

Em *C. neoformans* a urease é transportada em vesículas e encontra-se ativa (Rodrigues et al. 2008), assim como em *C. posadasii*. Neste, a urease é transportada dentro de vesículas e vacúolos do citosol para o ambiente externo dos tecidos pulmonares causando patologia respiratória. A atividade da urease aumenta a concentração de amônia, contribuindo para a alcalização dos locais de infecção. A mutação do gene *ure* levou à perda da atividade da urease, acarretando a redução acentuada na patogenicidade desse fungo nos pulmões de camundongos de BALB/c. Aproximadamente 55% dos animais sobreviveram quando comparados a camundongos

infectados com *C. posadasii* selvagem. Os sobreviventes não apresentaram a infecção entre 25 e 50 dias após a inoculação (Mirbod-Donovan et al. 2006).

Em diversos organismos a produção da uréia ocorre via degradação das purinas, sendo metabolizada pela ação da urease (Vogels & Drift 1976). Em *Bacillus subtilis* os níveis de urease aumentaram 20 a 25 vezes em células crescidas em meio de cultura contendo baixas fontes de nitrogênio. No fungo *P. brasiliensis*, a condição limitante de nitrogênio foi responsável pelo acúmulo de amônia ocasionado pela ação da urease (Rocha et al. 2009). Em *Aspergillus nidulans* sua síntese pode ser reprimida na presença de NH_3 ou compostos ricos em nitrogênio (Mobley et al. 1995).

Em *Bacillus pasteurii* e *Morganella morganii* a urease é sintetizada constitutivamente, enquanto em *Klebsiella*, condições limitantes de nitrogênio ativam a síntese dessa enzima. Para alguns isolados de *Escherichia coli* a urease é sintetizada em resposta às condições ambientais; nas bactérias *P. mirabilis* e *Providencia* essa enzima é induzida na presença do substrato uréia; em *Streptococcus salivarius* o pH é responsável pela regulação da enzima (Mobley et al. 1995).

1.6.1 Interações da urease com proteínas acessórias

Segundo Heimer and Mobley (2001) a apourease de *P. mirabilis* é composta de três subunidades estruturais, UreA, UreB, e UreC, montadas com um homotrímero de heterotrímeros individuais $(\text{UreABC})_3$. Para ativar o sítio catalítico, a apourease adquire íons Ni^{2+} através das proteínas acessórias, UreD, UreE, UreF, e UreG. Utilizando o sistema duplo-híbrido, UreD foi encontrada interagindo *in vivo* com a proteína co-acessória UreF. Além disso, interações homomultiméricas de UreD e UreF foram detectadas *in vivo*. Esses dados sugerem que *in vivo*, UreD de *P. mirabilis* possa

ser importante para recrutar UreF para a apourease, e que a associação homomultimérica seja crucial entre essas proteínas acessórias.

Em *H. pylori*, a interação entre UreF–UreH e UreE–UreG com a subunidade catalítica da urease permitiram a inserção do metal Ni^{2+} no interior da apoenzima. Essa apoenzima está associada à interação de UreI com a membrana celular. Esse fato pode permitir o acesso imediato da uréia do meio para a enzima intrabacteriana, permitindo a produção local de NH_3 sem alcalinização citoplasmática geral. Os dados sugerem que a interação do complexo de proteínas acessórias com a subunidade catalítica e o canal para uréia seja característica da urease de *H. pylori* (Volland et al. 2003).

A bactéria *Bacillus pasteurii* possui a proteína acessória UreG, uma chaperona envolvida na montagem do sítio ativo da urease. *BpUreG* catalisa a hidrólise de GTP, confirmando o papel dessa classe de proteínas no consumo de energia e na incorporação do metal níquel no sítio ativo da urease (Zambelli et al. 2005).

Mulrooney et al. (2005) descreveram em *Klebsiella aerogenes* a proteína UreE, uma metalochaperona que transporta íons níquel para a ativação da urease. A presença de UreE ajuda a ativação da urease em células cujo meio tenha baixa disponibilidade de níquel. Utilizando o sistema duplo-híbrido, Kim et al. (2006) demonstraram que a urease de *K. aerogenes* possui quatro proteínas acessórias - UreD, UreE, UreF e UreG – as quais são requeridas para formar o sítio ativo da apoproteína urease (UreABC). Acredita-se que a região C-terminal da UreF seja responsável pelo reconhecimento e ligação do complexo UreD-UreABC, enquanto a região N-terminal de UreF, seja responsável pela interação com outros componentes da urease para sua ativação.

2. JUSTIFICATIVA

A urease desempenha um importante papel durante a colonização de fungos e bactérias nos tecidos do hospedeiro, sendo apontada como fator de virulência. Em adição, a urease de *P. brasiliensis* possui o motivo RGD, o qual pode ser reconhecido pelas integrinas da célula hospedeira, modulando assim a ligação do fungo às proteínas da matriz extracelular do hospedeiro.

3. OBJETIVOS

- Identificar, isolar e caracterizar o cDNA codificante para *PbURE*;
- Avaliar as relações filogenéticas entre *PbURE* e ureases de outros fungos;
- Obter a proteína recombinante *PbURE* (*PbUREr*);
- Verificar se *PbUREr* atua como adesina em culturas celulares;
- Avaliar a capacidade de *PbUREr* purificada de se ligar a componentes da MEC;
- Avaliar a influência de *PbUREr* purificada e do anticorpo anti-*PbUREr* nos processos de adesão e invasão de *P. brasiliensis* às culturas celulares;
- Investigar, pela técnica de duplo-híbrido, possíveis interações proteína-proteína realizadas pela *PbUREr*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

- 4.1 O microrganismo *P. brasiliensis* - O isolado *Pb* 01 (ATCC, MYA - 826) foi crescido em meio ágar Sabouraud dextrose à temperatura de 37°C (fase leveduriforme).
- 4.2 Análise filogenética de *PbURE* e outros fungos – A relação filogenética entre *PbURE* e ureases de outros fungos foi avaliada utilizando-se sequências de proteínas obtidas no GenBank. A árvore filogenética foi construída através do alinhamento das sequências utilizando o programa Clustal X (Thompson et al. 1997). A comparação entre as sequências foi observada com o auxílio do programa Tree View (Page 1996).
- 4.3 Sequenciamento do clone de *PbURE* – A sequência parcial de *PbURE*, disponível no banco do transcriptoma de *P. brasiliensis* (<https://dna.biomol.unb.br/Pb>) foi utilizada como ponto de partida para construção de oligonucleotídeos (Sense 5' – CAAGAGCTTATCCGGGATGG – 3'; Anti-sense meio 5' – CATCCCCAATCTTCATGTAAC – 3'; Anti-sense 5' – TCCCGTACGAATCAATGATGC – 3') a fim de obter a sequência completa desse cDNA. As reações de sequenciamento de DNA foram realizadas no aparelho MEGABACE™ (Amersham Pharmacia Biotech, Amersham Place, UK), segundo o método descrito por Sanger et al. (1977), utilizando-se o sistema “DYEnamic ET, Dye Terminator Cycle Sequencing” (GE

Healthcare). As reações de sequenciamento foram preparadas utilizando-se DYEnamic ET terminator Reagent Premix, 5 μ M de oligonucleotídeos, 200-500 ng de DNA, água Milli-Q para volume final de 10 μ L. O DNA molde foi desnaturado a 94°C por 2 min, seguido de 35 ciclos, sendo a desnaturação a 94°C por 10 s, o anelamento a 45°C por 15 s e a extensão a 60°C por 1 min.

4.4 Ligação do fragmento obtido por Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) no vetor pCR2.1 e análise dos clones – O fragmento obtido por amplificação do banco de cDNA de *P. brasiliensis*, via PCR, foi eluído e ligado ao vetor pCR2.1 (Promega Co., Madison, USA) segundo os métodos descritos no protocolo do fabricante. O plasmídeo recombinante foi transformado em bactérias competentes *E. coli* DH5 α . Após o crescimento, as colônias foram coletadas das placas e submetidas à extração e purificação do DNA plasmidial com sistema comercial Flex Prep (GE Healthcare). Em seguida, o cDNA de *PbURE* foi clonado no vetor de expressão pET32a (Novagen). O plasmídio recombinante foi utilizado para transformar *E. coli* BL21 C43. Os cDNAs plasmidiais obtidos foram amplificados por PCR e os produtos foram analisados em gel de agarose a 0,8% após visualização em transluminador.

4.5 Transformação de células *E. coli* BL21 - Células de *E. coli* BL21 competentes e o sistema de ligação foram mantidos por 30 min no gelo, e posteriormente, submetidos ao choque térmico a 42°C por 1 min e 15s. Após incubação a 37°C por 1 h, sob agitação de 150 g, o material foi semeado em placa de Petri contendo meio LB sólido com ampicilina (100 μ g/mL) e glicose 2M, em seguida, a placas semeadas foram incubadas a 37°C por 18 h.

- 4.6 Expressão de *PbURer* – Após selecionar os clones positivos, esses foram incubados a 37°C, no meio de cultura LB líquido contendo ampicilina 100 µg/mL e glicose 2M, por 18h sob agitação vigorosa, a 200 g. Após atingir a densidade ótica ideal de 0.6, no comprimento de onda 600 nm, foi adicionado IPTG (concentração final de 1mM) à cultura celular. O perfil protéico dos clones transformantes foi avaliado em gel de poliacrilamida 9% (SDS-PAGE).
- 4.7 Solubilização da proteína de fusão e purificação da proteína recombinante – Após a indução, a proteína de fusão *PbURer*-pET32a foi solubilizada utilizando-se a técnica de sonicação com alta intensidade, cerca de 20 pulsos de 1 min com intervalos, entre os pulsos, de 1 min. A proteína de fusão foi purificada utilizando a resina Ni-NTA. O protocolo utilizado seguiu as recomendações do fabricante (Invitrogen).
- 4.8 Produção de anticorpo policlonal - A proteína recombinante super-expressa em *E. coli* BL21 foi utilizada para produzir anticorpo policlonal anti-*PbURer* em coelhos. O soro pré-imune foi obtido antes da primeira imunização. A reatividade do soro coletado dos coelhos contra a *PbURer* foi testada através de *Western blot*.
- 4.9 Transferência de proteínas para membrana de nitrocelulose e *Western blot* - As proteínas foram transferidas do gel de poliacrilamida 9% (SDS-PAGE), para a membrana de nitrocelulose Hybond-C (Amersham Biosciences) segundo Sambrook et al. (1989). O sistema foi colocado na cuba para transferência, com corrente constante de 25 V, por 18 h, a 4°C. Após esse período, o sistema foi desmontado a membrana de nitrocelulose corada com a solução vermelha *Ponceau S* para avaliar a

eficiência da transferência. Em seguida, a membrana foi descorada e incubada com tampão de bloqueio [50 mM PBS, 0.1% (v/v) Tween-20, 5% (w/v) leite desnatado] por 18 h, a 4°C. Após três lavagens de 10 min com tampão de lavagem [50 mM PBS, 0.1% (v/v) Tween-20] a membrana foi incubada por 2 h à temperatura ambiente com anticorpo policlonal de coelho anti-*PbUREr* (diluído 1:2.000 em PBS). Após sucessivas lavagens com tampão de lavagem a membrana foi incubada por 1 h à temperatura ambiente com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho (Sigma Aldrich, Co., St. Louis, MO) acoplado à fosfatase alcalina, diluído 1:1000 em tampão de bloqueio. A membrana foi lavada três vezes com tampão de lavagem durante 10 min e uma vez com PBS 1X. Em seguida, a membrana foi incubada com tampão fosfatase alcalina por 15 min e incubada com BCIP/NBT. A reação foi interrompida pela adição da solução de parada.

4.10 Cultura celular – Foram utilizadas células epiteliais de pulmão humano (pneumócitos A549), cultivadas em garrafas de vidro, no meio HAM-F12 suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB), e mantidas a 36,5°C. Após 3 dias, as garrafas de células foram submetidas à tripsinização. Para isso, a monocamada celular formada foi lavada com solução ATV (1 mL de solução de tripsina 0,2% ; EDTA 0,02%) (Adolfo Lutz). Após lavagem, essa solução foi desprezada e acrescentado mais 1 mL de ATV. Em seguida, as células foram homogeneizadas com volumes variados do meio correspondente acrescido de 10% de SFB. Nessa etapa, a tripsina foi neutralizada pelo SFB presente no meio de cultura. O volume total da suspensão celular obtida foi transferido para outras garrafas, de modo a se obter uma concentração celular de 10^6 células/mL.

4.11 Infecção de células A549 com *P. brasiliensis* – Os ensaios de infecção foram realizados em placas de seis orifícios. A suspensão de *P. brasiliensis* foi marcada com solução 1mM de CFSE (*Carboxyfluoroscein Succinimidyl Est*) por 30 minutos a 37°C. Após a formação da monocamada celular nas placas, por aproximadamente 24h, o sobrenadante da cultura foi desprezado e as células foram lavadas 3 vezes com 1mL cada de PBS 0.05M, pH7.2 estéril. Em seguida, cada poço (exceto controle de células normais) foi inoculado com 300µl da suspensão padronizada de *P.brasiliensis* em PBS acrescida de 300µl de meio de cultivo (meio HAM-F12 desprovido de SFB). Posteriormente, as células infectadas foram incubadas a 36,5°C por 2 e 5 h. Para todos os testes foram feitos controles de células normais, ou seja, células A₅₄₉ que não foram tratadas com o fungo. Seguido o período de infecção, as células foram lavadas três vezes com PBS, pH 7,2, a fim de eliminar células fúngicas não aderidas às culturas celulares. As células infectadas foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 2 h à temperatura ambiente ou 18 h à 8°C.

4.12 Teste de inibição do processo de adesão e invasão – Após 24 h, tempo para formação do tapete celular, o sobrenadante da cultura foi desprezado e as células foram lavadas três vezes com 1 mL de PBS estéril, pH 7,2. Em seguida, cada poço foi incubado com 150 µL (total de 25 µg/mL) *PbURer* acrescido de 150 µL de meio HAM-F12. O material foi incubado por 1 h à 37°C, e lavado três vezes com PBS pH 7,2. Após esse período, as células foram infectadas com suspensão padronizada e marcada de *P. brasiliensis*. As células infectadas foram removidas com tripsina, fixadas com paraformaldeído a 4% por 2 h à temperatura ambiente ou 18 h à 8°C. A avaliação da influência de *PbURer* sobre a inibição da adesão e da invasão, após 2 h e 5 h de incubação, foi realizada por Citometria de Fluxo (FACSCanto™). No

controle, cada poço foi inoculado com 150 µL de PBS estéril acrescido de 150 µL de meio HAM-F12.

4.13 Teste de inibição do processo de adesão e invasão com anticorpos anti-*PbURer*

– O inóculo de *P. brasiliensis* foi preparado como descrito anteriormente. Um total de 300 µL da suspensão foi transferido para um microtubo estéril, e centrifugada a 1.500 g por 5 min. O sobrenadante foi desprezado e 300 µL de anticorpos anti-*PbURer* foram adicionados ao *pellet*. Em seguida, procedeu-se o teste de infecção. O controle foi realizado utilizando-se o fungo não tratado com anticorpo anti-*PbURer*.

4.14 Avaliação estatística - A análise estatística foi realizada utilizando o teste

ANOVA, pelo método de Tukey–Kramer, usando o software Instat Graph Pad. Valores $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4.15 *Far-Western blot* – A proteína *PbURer* imobilizada na membrana de

nitrocelulose foi incubada com tampão de bloqueio (leite desnatado 5% e BSA 3%) por 4 horas à temperatura ambiente, e lavadas com tampão PBS-T. Em seguida, tiras da membrana foram incubadas com proteínas da MEC laminina (30 µg/mL), fibronectina (30 µg/mL), colágeno tipo I (20 µg/mL) e colágeno tipo IV (20 µg/mL). A incubação foi feita com PBS-T acrescido de BSA 1%, durante 90 min, à temperatura ambiente. Após esse tempo, as membranas foram lavadas com tampão PBS-T, por 10 min cada lavagem, e incubados por 18 h, à temperatura ambiente, com anticorpos anti-laminina, anti-fibronectina, anti-colágeno tipo I e anti-colágeno tipo IV, diluídos na proporção 1:100, em PBS-T-BSA. As membranas foram lavadas três vezes com tampão PBS-T, por 10 min cada lavagem e incubadas durante 2 h

com conjugado anti-IgG, marcado com peroxidase, diluído em PBS-T-BSA, 1:1000. Após três lavagens com PBS-T, a reação foi revelada na presença de diaminobenzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio diluídos em PBS.

4.16 Ensaio de competição com peptídeos sintéticos RGD (arginina, glicina e ácido aspártico) – Placas de 96 *wells* foram preenchidas com células até sua confluência. Em seguida, a placa foi lavada três vezes com tampão PBS. As células foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 30 min à temperatura ambiente. Logo após, a placa foi lavada três vezes com PBS-T 0,05% e bloqueada com PBS-SFB 10% durante 1 h, à temperatura ambiente, e então lavada três vezes com tampão PBS. Em seguida, a reação foi incubada na presença e na ausência do peptídeo sintético RGD (20 µg/mL), por 1 hora, 37°C. Após esse período, essas reações contendo ou não o peptídeo sintético RGD (20 µg/mL) foram incubados na presença de *PbURer* (5 µg/mL), para verificar a influência deste motivo na interação de *PbURer*-células. Posteriormente, a placa foi lavada três vezes com tampão PBS e incubada com anticorpo anti-*PbURer*, diluído 1:500 em solução de bloqueio por 1 h à 37°C. Após esse tempo, a placa foi lavada três vezes com tampão PBS. As reações contidas na placa foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase, diluído em solução de bloqueio 1:3000, por 1 h à temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi lavada novamente por três vezes com tampão PBS. Em seguida, procedeu-se com a reação com solução reveladora. Após 10 min, a reação foi interrompida com 50 µL/poço com a solução HCl 3N. A leitura foi realizada a 490 nm. Os resultados foram analisados otimizando o software OriginPro 7.5.

4.17 Plasmídeos utilizados no sistema duplo-híbrido e PCR : pGEM-T Easy (Promega®); pGADT7-Rec (Clontech®) e pGBKT7 (Clontech®). Os sistemas de reação consistiram de 50 ng/μL de cDNA, 0,3 μL da Taq DNA polimerase (Invitrogen), 2,5 mM da mistura de dNTPs, tampão de reação 10X, 50mM MgCl₂, 2 μL de oligonucleotídeo sense (5' – CCCGGGCCGGAAGATGCAGCTAATTC – 3') e 2 μL de oligonucleotídeo anti-sense (5' – GTCGACCAATCATCCATCAATAGACAAAA – 3'), água Milli-Q para um volume final de 25 μL. A sequência de interesse foi amplificada utilizando-se uma desnaturação inicial de 94°C por 3 min, 25 ciclos de 94°C por 1 min e 30 s para desnaturação, 52°C por 1 min e 30 s para o anelamento e 72°C por 2 min e 30 s para extensão, 72°C por 7 min para extensão final.

4.18 Ligação dos fragmentos de DNA - Para a ligação dos fragmentos de DNA no vetor de clonagem pGEM-T Easy preparou-se uma solução com 100 ng do vetor, 300 ng do inserto *Pbure*, tampão 10X da ligase (Promega) e 3U/μL da T4 DNA ligase (Promega). Esse sistema foi mantido a 4°C por 16 h, e em seguida foi realizada a transformação em células *E. coli* DH5α.

4.19 Transformação de *Pbure* -pGEM-T em bactérias competentes *E. coli* DH5α - Um total de 4 μL da reação de ligação *Pbure* -pGEM-T foi adicionado às bactérias competentes. A mistura e o sistema de ligação foram mantidos por 30 min no gelo, posteriormente, submetidos ao choque térmico a 42°C por 1 min e 15 s, e novamente mantida no gelo por 1 min. Em seguida, adicionou-se de 300 μL de meio LB líquido, sendo a cultura levada à agitação de 150 g, a 37°C, por 1 h. A cultura bacteriana foi plaqueada em LB-ágar adicionado de ampicilina (100 μg/mL) e X-Gal para

transformações com o vetor pGEM-T Easy. As placas foram deixadas na estufa a 37°C, por 18 h.

4.20 Confirmação das colônias positivas para pGEM-T Easy via PCR e digestão do plasmídeo recombinante *Pbure*/pGEM-T Easy - Os sistemas de reação consistiram de 50 ng/μL de cDNA, Taq DNA polimerase (Invitrogen), 2,5 mM da mistura de dNTPs, tampão de reação 10X, 50mM MgCl₂, oligonucleotídeo sense e anti-sense, e água deionizada para um volume final de 25 μL. As condições de amplificação da sequência de interesse foram 94°C por 3 min para desnaturação inicial, 35 ciclos a 94°C por 1 min e 30 s para desnaturação, 52°C por 1 min e 30 s para anelamento, 72°C 2 min e 30 s para extensão, e 72°C por 10 min para extensão final. O sistema de digestão consistiu de 70 ng/μL do plasmídeo recombinante, tampão 10X da enzima (Buffer O⁺) e 10 U/μL da enzima *SalI* para um volume final de 60 μL. A reação foi incubada à 37°C por 5 h. Em seguida realizou-se a purificação dos fragmentos de interesse em gel de agarose com *DNA and Gel Band Purification Kit* (GE), de acordo com as recomendações do fabricante. Posteriormente, esse produto foi digerido com a enzima com *SmaI* (Amersham). O sistema de digestão consistiu de 60 ng/μL de plasmídeo recombinante, tampão 10X da enzima (Buffer T) e 10 U/μL de *SmaI* para um volume final de 60 μL. A reação foi incubada a 30°C por 5 h. Em seguida foi realizada a purificação de DNA direto na coluna GFX.

4.21 Digestão do vetor pGBKT7 e ligação de *Pbure* a pGBKT7 - Esse plasmídeo foi submetido às mesmas condições de digestão descritas no item 4.21. As purificações dos DNAs digeridos foram realizadas direto na coluna GFX. Para a ligação do inserto digerido em pGBKT7 preparou-se o sistema composto de 15ng/μL do vetor

20ng/ μ L do inserto. Essa solução foi aquecida a 45°C por 5 min e resfriada em gelo por 5 min. Posteriormente foram adicionados tampão 10X da ligase (Invitrogen) e 1 U/ μ L da T4 DNA ligase (Invitrogen). Essa solução foi mantida a 4°C, por 16 h. Realizou-se nova transformação por choque térmico e as células foram plaqueadas em placas de Petri contendo meio LB-ágar e 50 μ g/mL de kanamicina.

4.22 Extração de DNA Plasmidial - Os plasmídeos recombinantes foram obtidos utilizando o Kit FlexiPrep (Amersham Biosciences), no qual colônias transformadas foram inoculadas em 5 mL de LB líquido contendo o antibiótico kanamicina (50 μ g/mL) para transformações com pGBKT7/*Pbure* e mantidas sob agitação de 150 g durante 16 h. Os plasmídeos foram analisados em gel de agarose para verificação da presença do inserto.

4.23 Manutenção e cultivo de *S. cerevisiae* - Cepas transformadas de *S. cerevisiae* Y187 (Matchmaker™ Library Construction & Screening – Clontech Laboratories, Inc.) foram repicadas em placas de Petri com meio de cultura YPDA sólido. As placas foram mantidas a 30°C, por 48 h ou até que as colônias atingissem aproximadamente 2 mm de diâmetro. Uma colônia foi retirada e inoculada no meio YPDA líquido, sob agitação de 150 g, durante 16 h. Aliquotas dessa cultura celular foram inoculadas no meio YPDA líquido sob agitação 150 g, até que atingisse DO_{600nm} de 0,15 à 0,3. A cultura foi centrifugada a 1.000 g durante 5 min, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi ressuscitado com 100 mL de YPDA 2X, incubado a 30°C, por 3-5 h, até que atingisse DO_{600nm} de 0,4 à 0,5. A cultura foi centrifugada à 1.000 g durante 5 min, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi

ressuspendido com 100 mL de água ultra pura estéril. Um total de 50 µg de SS carrier DNA (solução a 10 mg/µL incubada a 95°C por 10 min e resfriada em banho de gelo antes do uso), e 2-5 µg do pGBKT7/*Pbure* foram adicionados, e a reação foi incubada a 45°C por 30 min.

4.24 Biblioteca de cDNA de *P. brasiliensis* (biblioteca construída por Clayton Luiz Borges e Juliana Alves Parente) – Células da fase leveduriforme de *P. brasiliensis* foram crescidas, e após extração dos RNAs os cDNAs foram sintetizados e clonados no vetor de expressão pGADT7-Rec, o qual contém o gene LEU2, permitindo a seleção em meio mínimo sem leucina, em fase de leitura com domínio de ativação transcricional de GAL4. O material foi transformado na cepa AH109, mutada para o gene LEU2.

4.25 Rastreamento de interações intermoleculares de *Pbure* e identificação dos transcritos rastreados - O estudo das prováveis interações de *Pbure* com outras proteínas foi realizado empregando a técnica de duplo-híbrido em *S. cerevisiae*, cepas AH109 e Y187. O cDNA de *Pbure* foi clonado no vetor de expressão pGBKT7, o qual possui o gene TRP1 (responsável pela seleção em meio mínimo sem triptofano) em fase de leitura com o domínio de ligação ao DNA de GAL4 (fator transcricional de levedura). O produto clonado foi transformado na cepa Y187 mutada para triptofano de *S. cerevisiae*. As cepas transformadas Y187 e AH109 foram inoculadas no mesmo sistema a fim de promover a diploidia (*mating*), ativando assim os genes ADE2 e HIS3, responsáveis pela seleção no meio mínimo sem adenina e histidina. O produto do cruzamento foi plaqueado no meio seletivo (sem triptofano, leucina, adenina e histidina) para rastreamento das interações

realizadas. Para a identificação dos genes que realizam interação com *PbUre*, o produto de PCR do DNA plasmidial extraído de *S. cerevisiae* diplóides, foi sequenciado no MEGABACE™ utilizando oligonucleotídeos específicos para o vetor pGADT7-Rec. Posteriormente, os dados foram analisados com o auxílio de ferramentas de bioinformática, o qual inclui homologia com bancos de dados públicos dentre eles, GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e com os bancos referentes aos transcriptomas de *P. brasiliensis* (<http://www.lbm.icb.ufg.br/pipeline>).

5. RESULTADOS

5.1 – Obtenção e sequenciamento do cDNA completo codificante para *PbURE*

A partir de análises realizadas no banco de dados do transcriptoma de *P. brasiliensis* após infecção em camundongo (<https://dna.biomol.unb.br/Pb/>) foi possível concluir que a sequência de *Pbure* estava incompleta. Visando obter o cDNA completo de *Pbure*, sua sequência parcial foi amplificada, via PCR. O fragmento obtido foi aplicado, eluído do gel de agarose 0,8%, clonado no vetor pCR2.1 (Promega), e submetido ao sequenciamento automático no aparelho MEGABACE™ (GE Healthcare) (Figura 2).

URE1-S^{Sal}I-32a	
1	M Q L I P R E I D K L T I S Q L G F L A Q R R L A R G V R L N H A E A T A L I A
1	ATG TGGTAAATCGAGA GAGAT AGACA AGCTC ACCATC TCCCA ACTGG GCTTT CTTCCT CAACG ACGTC TGGCT CGTGG AGTCAG ATTGA ACCAT GCGGA GSCAA CCGCAT TAATA GCG
URE-TH-S	
41	S N I Q E L I R D G N H T V A D L M A L G K T M L G R R H V L P S V T S T L H E
121	TC AAACA TAAAGAGCTATCCGSSATGGAAC CATACTG GTTGC GCACC TGATG GCCCTA GGCAA GACCA TGCTG GGAGC CGGCA TGTTC TGCCA TCTGT GACCT CCACCTC TCCAT GAA
URE-S-int-1	
81	L F V E G T F P S G T Y L V T V H E P I S S E D G D L E K A L Y G S F L P V P S
241	CT GTTGC TCGAG GGGACT TTCCC CTCTG GCACT TATCT AGTAAC CGTCC ATGAG CCCAT CAGTTC CGAGG ACGGT GATCT GGAAA AGGCAC TGTAT GGTAG CTTCG TGCCA GTACCT TCA
121	N D I F P D P D P E D Y H P L K M P G A V I P V K Q A K I V L N A G R K R L S L
361	AA TGACA TCTTC CCAGAT CCTGA CCCGG AAGAC TATCA CCCGT GAAAA TGCTT GCGGC GGTAT TCCC TTAAG CAGGC CAAGA TTGAT TTAAT GCGGG ACGGA AGAGA TTGAGC CTT
161	K V T S R G D R P I Q V G S H Y H F I E V N P Q L D F D R I K A Y G Y R L D I P
481	AA AGTGA CTAGC AGGGGG GATAG ACCAA TTCAG GTTGG TTCCCA TTACC ATTTC ATCGA GGTCAA TCCCC AGCTG GATTT TGACC GTATCA AGGCA TATGG CTACC GCCTC GATAT CCT
201	A G T S I R F E P G D S K T V T L V E I A G E K I I H G N L A G R K R L S L
601	GC CGGAA CTTC TATCT TTTGA ACCGG GAGAC TCCAA AACGGT TACCC TCGTT GAGAT AGCCGG GGAAA AGATA ATTCA TGGGG GCAATT TCCTT GCAA CGGGA AGSTA GACCTC GGT
241	R A D E I I E R L Q R A G F A H T P Q P A G D M T R I E P F S M N R E A Y E H M
721	CG AGCGG ACGAG ATTATC GAACG GCTCC AGCGG GCTGG GTTCGC GCATA CTCCC CAGCC TGCTGG GGATA TGACA CGTAT CGAGC CGTTTT CTATG AATAG AGAAG CGTAC GAGCAT ATG
281	F G P T T G D L V R L G S M D L W V K V E K D M T S Y G G K K T L R
841	TT TGCCG CGACT ACTGGA GATCT TGTCA GGTGG GGCTC AATGGA CTGTG GGGT AAGST TGAGAA GGACA TGACC TCGTA TGGAG ATGAT GTAGT TTTGG CGGAG GTAAA ACCCTA CGA
321	E G M G Q A S G R G A D D V L D T V I T S A L I I D W S G I Y V A D I G I K G G
961	GA AGGCA TGGGC CAAGCT TCAGG GAGGG GTGGC GATGA TGTGCT TGATA CCGTT ATTAC GAGCG ACTTA TTATC GATTG GAGTG GAGTTT ACGTG GATAG ATAG GTATT AAGGGG GGT
361	D I V A I G K A G N P D I M D G V H P K M V V G A C T D V I S G E G K I V T A G
1081	GA TATTG TGGCC ATTGGG AAGGC GGGAA ACCCG GATAT TATGGA TGGTG TCCAT CCGAA GATGGT CGTTG GAGCT TGCAC CGATG TCATT CTGGT GAAGG GAAAA TAGTG ACTGCC GGT
401	G I D T H V H F I C P Q Q V N E S L A S G I T T M F G G G T G P S T G T N A T T
1201	GG CATAG TACT CATGTC CATT TATT TTGCA CAGCA GGTAA TGAAT CTCTG GATC TGACCT TACCA CTATG TTTGG AGGCG GCACAG GCGCC GATAG CCGAA CAAAC CCGAG ACG
441	C T P A P N Q I K Q M I Q A C D H F P M N F G I T G K G N D S G P K G L R E Q C
1321	TG TACG CTGCG CCAAAC CAAAT AAAGC AGATG ATTCA GGCCTG TGACC ACTTC CGAT GAATTT TGGAA TCAC TGGCAA AGGGA ACGATA GTGGA CCTAA AGGCC TACCG GAACAA TGT
481	R A G A A G L K L H E D W G C T P A A I D T C L D V C D E Y D V Q C L I H T D T
1441	CG TGCCG GAGCC GCAGGC CTCAAATTACATGAAGATTGGGGATCTACTC CTGCA GCAATC GATAC GTGCC TGAC GTATG CGACGA ATACG ACGTC CAATG TCTTA TCCACA CCGAG ACT
URE1-AT-meio	
521	L N E S G F V E Q T T K A F K N R T I H T Y H T E G A G G G H A P D I I S V V E
1561	CT CAACG AATCC GGCTTT GTCGA ACAA CTACC AAAGC ATTCAA GAACC GCACA ATCCA CACCTA CCACA CAGAA GGGGG GGGGG GAGGAC ATGCT CCCGA TATCA TCTCC GTCTGC GAA
561	H P N V L P S S T N P T R P F T M N T L D E H L D M L M V C H H L S K N I R E D
1681	CA CCCC ACGTC CTACCA AGCAG CACCA ACCCC ACGGG CCAAT CACCA TGAAT GCCCT TGATGA GCATC GTGAC ATGCT CATGT CATGG TCGAG AATCC CTCTC CAAAA ACATA CCGAG GAC
601	V A F A E S R I R A E T I A A E D V L H D L G A I S M M S S D S Q A M G R C G E
1801	GT CGGCT TCGCC GAAAGC CGCAT TCGCG CCGAG ACTAT CGCGGC GGAAG ACGTA CTCCA TGACCT CGGCG CCATC AGCAT GATGT CTTGG ATTCC CAGGC CATGG GCGCT TGTGGA GAA
641	V I L R T W N T A D K N K M Q R G P L K E D E G T G A D N F R V K R Y V S K Y T
1921	GT TATTC TCCGC ACGTGG AACAC AGCGG ATAAG AATAA AATGCA ACGGG GGCCG CTGAA GGAGGA TGAAG GTACC GGCGC AGATA ATTCCA GGGCT AAGAG GTATG TTAGC AAATAT ACG
681	I N P A I A Q G M S H V I G S V E V G K V A D L V L W T F A N F G T K P S M V L
2041	AT CAATC CAGCA ATTGCG CAGGG GATGA GTCAT GTTAT TGGGAG TGTGG AGGTT GGGAA GTGGC GGATC TTGTC TTGTG GACTT TTGCGA ATTTT GGGAC GAAGC CAAGT ATGGTG TTG
721	K S G M I A A A M V G D P N A S I P T I E P V V M R Y M F G A R V P Q T S I M F
2161	AA GTCTG GATGATTGCC GCGGC GATGG TGGGT GATCC AAACGC ATCGA TTCCA ACCAT CGAGCC CGTTG TGATG AGATA TATGT TCGGGG CACGC GTGCC CCAAA CATCC ATCATG TTC
761	V S Q A S K S L G I I D S Y G I K K R V E A V R N C R D I G K K D M K Y N D V M
2281	GT CTCCC AAGCA TCCAAG AGTTT GGCATCA TTGAT TCGTA CCGGATCA AGAAA CGGGT GAGGC GGTGC GTAAT TGTG AGATAT CGGCA AGAAG GATAT GAAAT ATAACG ACGTC ATG
URE1-ATS-int1	
801	P K M K V D S E R Y T V E A N G M L C E A E P A S R L H L T Q Q Y F V Y
2401	CC AAAGA TGAAG GTTGAT TCGGA GCGTT ATACT GTCGA AGCAAA CGGGA TGCTG TGTGA GCGGA GCGCG CTTC TCGATT ACACC TGACGC AGCAG TA
URE-TH-AS	

Figura 2 – Sequência do cDNA codante de *Pbure*. Os nucleotídeos estão indicados abaixo e os aminoácidos acima. Os números à esquerda indicam suas respectivas posições. Na caixa amarela estão marcados os oligonucleotídeos utilizados no para obter a sequência completa do cDNA de *Pbure*; na caixa verde, oligonucleotídeos empregados no sistema duplo-híbrido. As setas representam os oligonucleotídeos utilizados na expressão heteróloga no vetor pET-32a.

5.2 – Análise comparativa da sequência deduzida de aminoácidos de *PbURE* de *P. brasiliensis*.

A sequência deduzida de *PbURE* possui 836 resíduos de aminoácidos correspondendo a uma proteína predita de 90 kDa e *pI* de 6.0. Esses resultados foram obtidos através do programa ScanProsite (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>). *PbURE* possui a assinatura presente em enzimas dependentes de níquel (TAGGIDtHVFHfcP) e entre os aminoácidos 398 e 411, o sítio ativo (MVCHHLsknIreDVAFA) entre os aminoácidos 589 e 605 (Figura 3).

5.3 Análise filogenética entre *PbURE* e ureases de outros fungos

Para a análise filogenética entre *PbURE* e ureases de outros fungos, as sequências completas foram pesquisadas nos bancos de dados Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/search.shtml>) e NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As sequências de aminoácidos completas de dezoito fungos, entre eles, o *P. brasiliensis*, foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL X (Thompson et al. 1997) e comparadas através do programa Tree View (Page 1996). A partir desse alinhamento, foi gerada a árvore filogenética empregando o método neighbour-joining (Thompson et al. 1997) para avaliar as distâncias entre essas sequências. O *bootstrap* obtido utilizando 100 replicatas representa a confiabilidade dos ramos.

A árvore foi enraizada com *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, *Ustilago maydis*, *Agaricus bisporus* e *Laccaria bicolor*, pertencentes ao filo Basidiomycota. As sequências das ureases dos filos Ascomycota se agruparam em clados bem definidos. A

PbURE agrupou-se juntamente com outros fungos da ordem Onygenales (*Ajellomyces capsulatus*, *C. posadasii* e *C. immitis*). Sequências da ordem Sordariales (*Neurospora crassa*, *Gibberella zeae* e *Podospora anserina*) e Eurotiales (*Penicillium chrysogenum* Wisconsin, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus clavatus*, *Neosartorya fischeri*, *Penicillium marneffei* e *Aspergillus nidulans*) formaram dois grupos separadamente com *bootstrap* 100 (Figura 4).

5.4 – Expressão heteróloga e purificação de *PbURER*

A expressão heteróloga de *PbURE* foi realizada a fim de obter a proteína recombinante de *PbURER*. Para produzir a *PbURER* em *E. coli*, o cDNA correspondente foi clonado no vetor de expressão pET-32a (Invitrogen). O plasmídeo resultante, pET-32a-URE, foi utilizado para transformar células de *E. coli* BL21. O perfil protéico das células lisadas por sonicação foi avaliado em géis de poliacrilamida 9% (SDS-PAGE).

PbURER foi purificada por afinidade em coluna de níquel. Sabendo-se que *PbURER* possui uma massa molecular de 90 kDa e considerando-se que o vetor de expressão pET-32a possui nucleotídeos que codificam para treze resíduos de histidina, a proteína recombinante fusionada, possui 103 kDa (Figura 5).

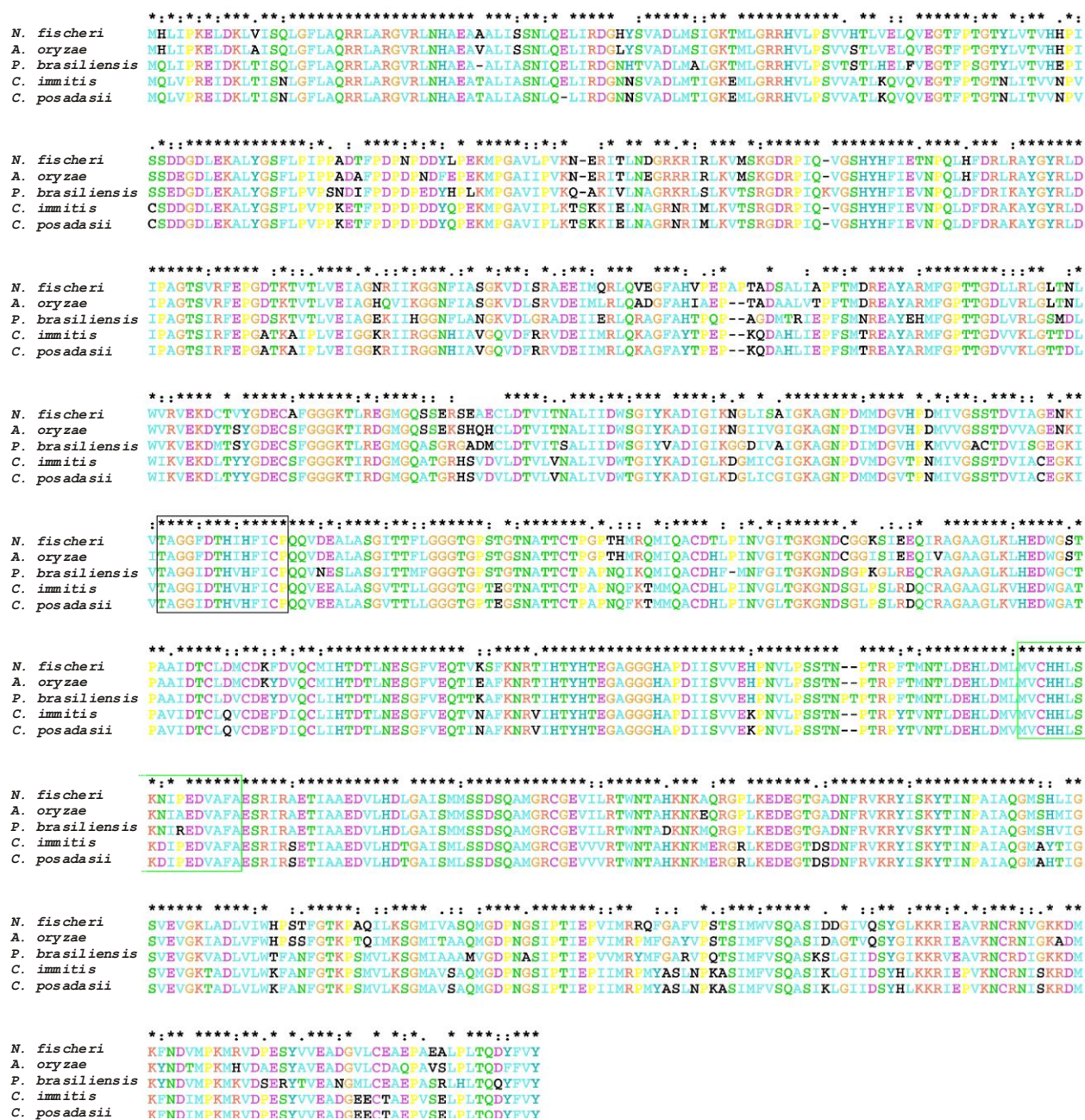


Figura 3 - Alinhamento entre *PbURE* e ureases de fungos. Os asteriscos (*) indicam resíduos de aminoácidos conservados. Os símbolos (: e .) denotam ordem decrescente de similaridade entre cada par de aminoácidos correspondentes. As barras (-) indicam regiões onde um espaço foi introduzido para otimizar a homologia entre as sequências. A assinatura característica da urease dependente de níquel está representada no retângulo preto. Os resíduos que participam do sítio ativo estão indicados no retângulo verde. Microrganismos utilizados e seus respectivos números de acesso: *N. fischeri* (gi|119496869), *A. oryzae* (gi|169771067), *P. brasiliensis* (1178965), *C. immitis* (gi|119189775) e *C. posadasii* (gi|60280325).

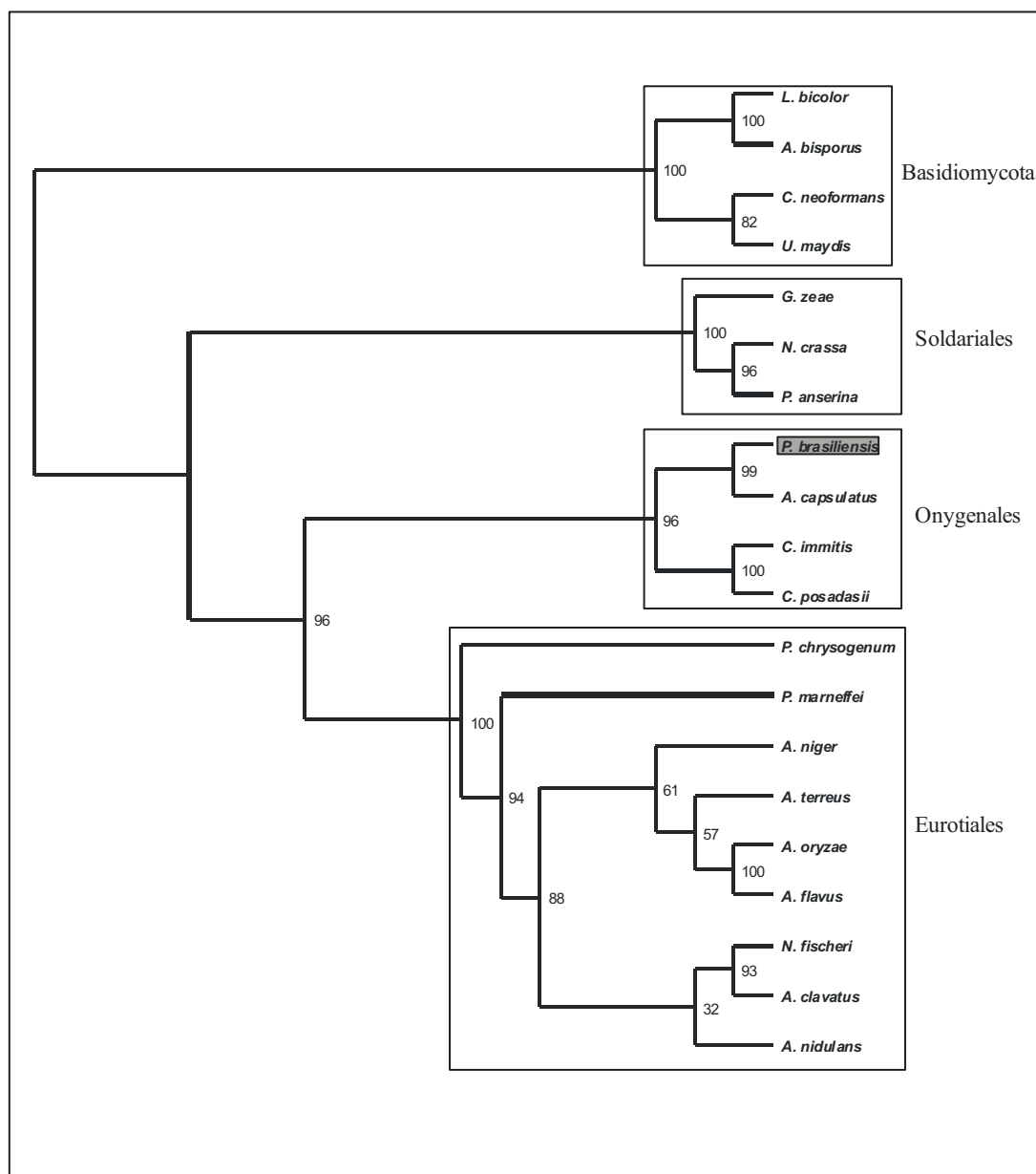


Figura 4 - Árvore filogenética ilustrando a relação entre *PbURE* e ureases de outros microrganismos. As sequências foram alinhadas e submetidas à análise filogenética utilizando o método neighbour-joining. Os valores de *bootstrap* obtidos para 100 replicações indicam a confiabilidade do ramo. As espécies utilizadas, com seu código de acesso, foram: *C. neoformans* var. *grubii* (gi|58270418), *U. maydis* (gi|71023925), *L. bicolor* (gi|17009873), *A. bisporus* (Q1ENF8), *N. crassa* (gi|85116050), *G. zeae* (gi|46107714), *P. anserina* (B2AYG6), *P. brasiliensis* (1178965), *A. capsulatus* (gi|154281373), *C. immitis* (gi|119189775), *C. posadasii* (gi|60280325), *P. chrysogenum* Wisconsin (gi|211585864), *P. marneffei* (gi|212540166), *A. niger* (A2Q896), *A. terreus* (gi|115390843), *A. oryzae* (gi|169771067), *A. flavus* (gi|220699327), *N. fischeri* (gi|119496869), *A. clavatus* (gi|121702879) e *A. nidulans* (gi|67516299).

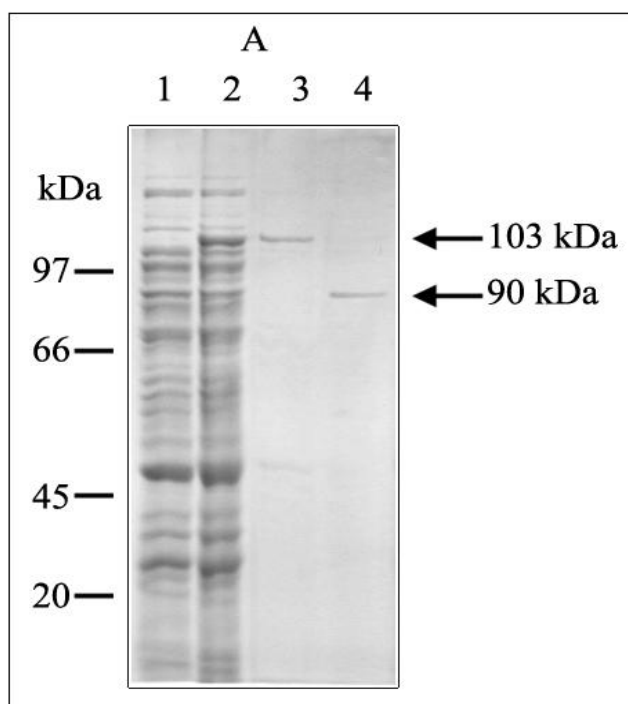


Figura 5 - Expressão heteróloga e purificação de *PbURer*. Análise em gel de poliacrilamida SDS-PAGE de *PbURer*. Células de *E. coli* BL21(DE3) foram transformadas com o plasmídeo pET-32a-URE, crescidas à 37°C a uma A_{600} de 0.6 e coletadas antes (linha 1), e após de 2 h de incubação com 1 mM IPTG (linha 2). As células foram lisadas por sonicação e *PbURer* foi isolada por afinidade em coluna de níquel (linha 3). *PbURE* sem a cauda de histidina (linha 4). O marcador com a massa molecular está indicado à esquerda.

5.5 – Identificação da urease de *P. brasiliensis* por *Western blot*

A reatividade do soro de coelho policlonal anti- *PbURer* foi avaliada frente a *PbURer* e ao extrato protéico da fase leveduriforme de *P. brasiliensis*. A validação do anticorpo anti-*PbURer* foi realizada com o soro de coelho pré-imune (Figura 6).

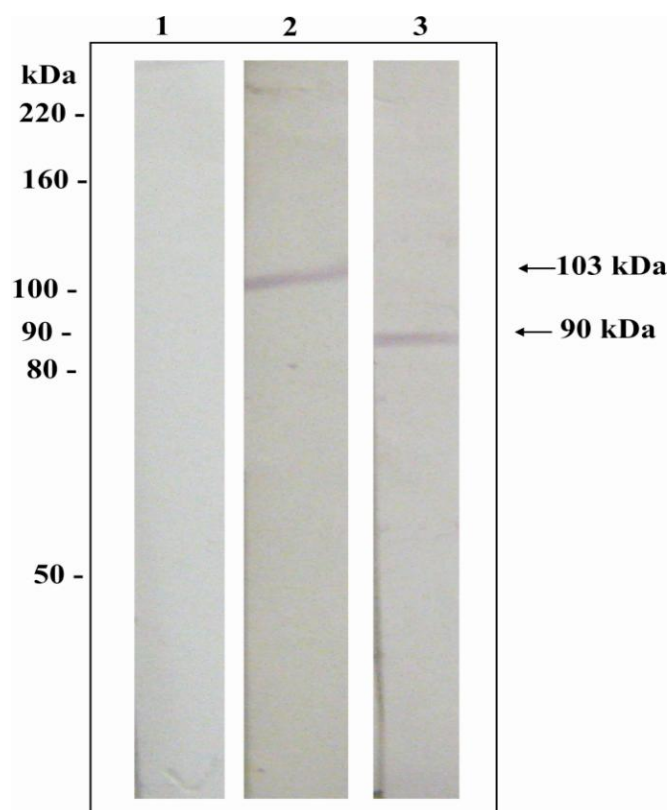


Figura 6 – *Western blot* com anticorpo policlonal anti-*PbURer*. Membrana de nitrocelulose contendo *PbURer* foi transferida do gel SDS-PAGE 9% e incubada com anti-*PbURer* (1:2000). Linha 1 - soro de coelho pré-imune, linha 2 - *PbURer* reconhecida pelo anticorpo anti-*PbURer*, linha 3 - extrato protéico da fase leveduriforme de *P. brasiliensis*, incubado com anticorpo anti-*PbURer* (1:2000). Os marcadores de massa molecular estão evidenciados à esquerda.

5.6 – Ensaio de infecção às células A549 com *P. brasiliensis*

Células A549 tratadas por 2 h com leveduras de *P. brasiliensis* e células tratadas com a proteína *PbURer* demonstraram índice de adesão semelhantes, não havendo diferença significativa entre eles. Células A549 tratadas com anticorpo policlonal anti-*PbURer* apresentaram índice de inibição de infecção significativo, aproximadamente 50%. Após 5 h, o processo de infecção celular foi ligeiramente aumentado quando as células foram tratadas com a proteína *PbURer*. Em contrapartida, em células A549 tratadas com anticorpos policlonais anti-*PbURer* o índice de infecção foi

significativamente menor quando comparado à infecção total. A interação do fungo e as células A549, quando tratadas com *PbURer*, foi confirmada através da microscopia de fluorescência, com aumento de 1000X (Figura 7).

Figura 7A

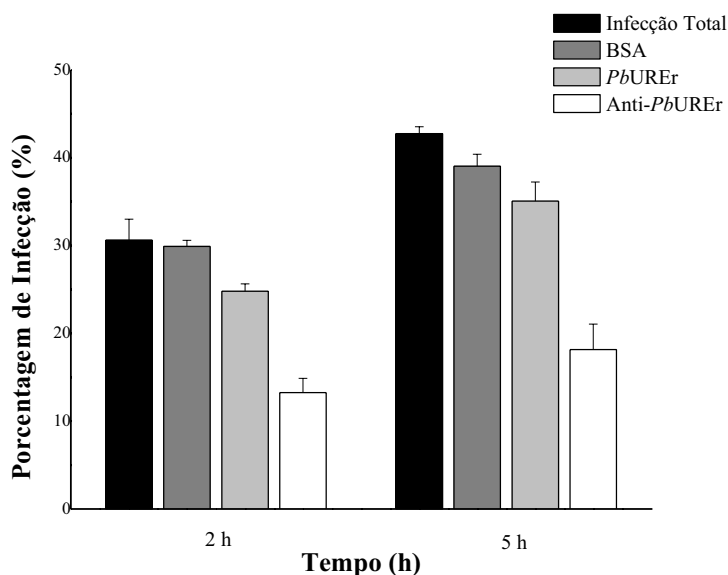


Figura 7B

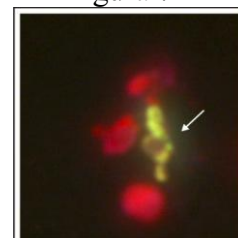


Figura 7C

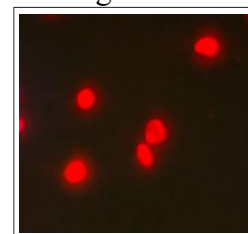


Figura 7 - Índice de infecção (2 h e 5 h) de *P. brasiliensis* quando em contato com células A549 (Figura 7A)*. A influência de *PbURer* e dos anticorpos anti- *PbURer* foram avaliados na interação do fungo com as células A549. BSA - controle negativo para *PbURer*. Microscopia de fluorescência mostrando a interação do fungo com células A549 quando estas foram tratadas com *PbURer* (Figura 7B) e depois infectadas com *P. brasiliensis*. Em vermelho, núcleos das células A549 corados com azul de Evans; verde, *P. brasiliensis* marcado com CFSE. A seta indica o fungo nesta interação. Controle negativo (Figura 7C).

*O gráfico representa a porcentagem total de infecção com valores significantes de $p < 0,05$.

5.7 – Avaliação da capacidade de ligação de *PbURer* a componentes da MEC através do *Far-Western blot*.

A capacidade de ligação de *PbURer* aos componentes da MEC laminina, fibronectina, colágeno I e colágeno tipo IV foi avaliada via *Far-Western blot*. A proteína *PbURer* demonstrou ser capaz de se ligar à fibronectina e colágeno tipo IV (Figura 8, linhas 3 e 5, respectivamente). A ligação de *PbURer* à fibronectina e ao colágeno tipo IV também foi validada pela técnica ELISA (dados não mostrados). Os resultados corroboram aqueles obtidos por *Far-Western blot*.

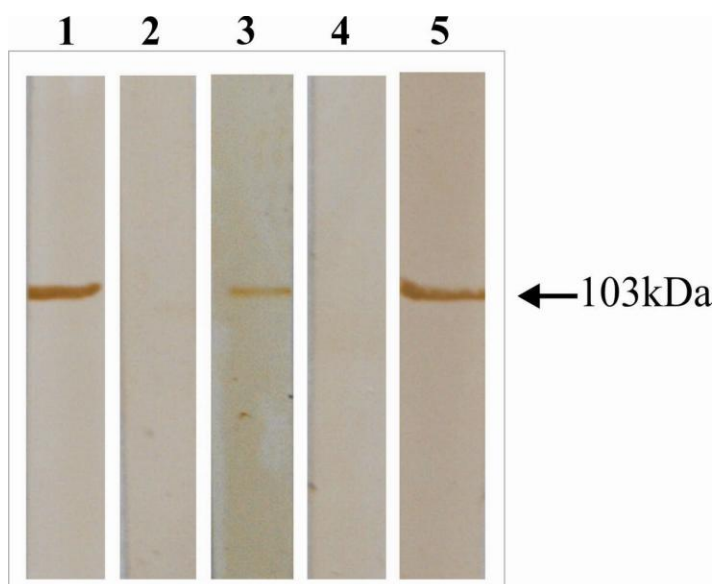


Figura 8 - Ensaio de interação da proteína *PbURer* com proteínas da MEC através de *Far-Western blot*. Controle positivo anti- *cell free* (1), laminina (2), fibronectina (3), colágeno tipo I (4) e colágeno tipo IV (5).

5.8 – Ensaio de inibição por RGD

A importância do motivo RGD na interação entre a *PbURer* e células foi comprovada pela habilidade do peptídeo sintético RGD em inibir ou não a interação da proteína *PbURer* com pneumócitos A549, através do ensaio de ELISA competitivo (Figura 9).

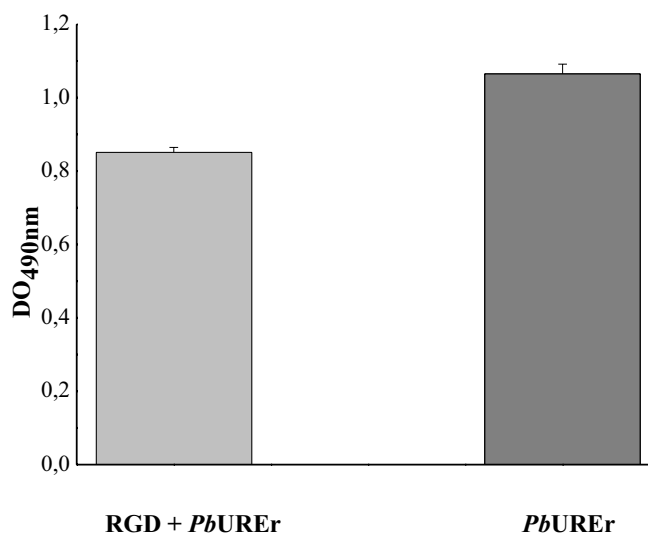


Figura 9 – Ensaio de competição com peptídeo sintético RGD através de ELISA. Pneumócitos A549 foram incubados com peptídeo sintético RGD (20 µg/mL) e na presença de *PbURer* (5 µg/mL). Anticorpos anti-*PbURer* foram utilizados como controle. ELISA (DO_{490nm}). O ensaio mostrou que o peptídeo sintético RGD competiu e inibiu a interação da *PbURer*, quando comparada com a interação apenas de *PbURer*.

5.9 – Rastreamento das interações entre proteínas através do ensaio X-α-Gal

O produto do cruzamento entre as cepas transformadas Y187 e AH109 foi plaqueado em meio mínimo sem adenina e histidina, e mantidos a 30°C, durante 3 dias. Colônias que apresentaram tamanho maior que 3 mm e coloração rosa entre o terceiro e oitavo dias foram repicadas em placa contendo o meio mínimo SD/-His/-Leu/-Trp (meio mínimo TDO) e meio mínimo SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp (meio mínimo QDO), a fim de eliminar colônias falso positivas. Para rastrear as interações entre urease e proteínas produzidas pela biblioteca de *P. brasiliensis*, as colônias positivas do meio SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp foram transferidas para placas com o meio mínimo SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X-α-Gal. A presença de X-α-Gal no meio mínimo permite a ativação do

gene repórter MEL1, responsável pela produção da enzima α -galactosidase que hidrolisa o X- α -Gal, produzindo colônias azuis (Figura 10).

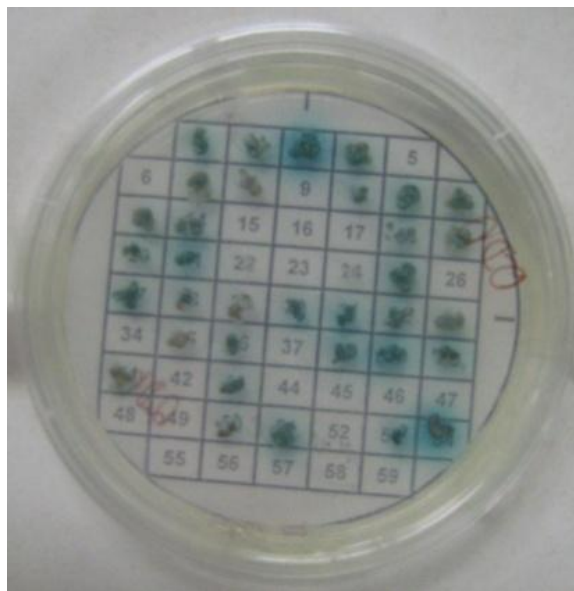


Figura 10 – Rastreamento das interações entre *PbURE* e com outras proteínas através do sistema duplo-híbrido em *S. cerevisiae*. Colônias produzidas a partir do cruzamento entre as cepas Y187 e AH109 de *S. cerevisiae* e plaqueadas em meio mínimo SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -Gal.

5.10 – Confirmação dos clones positivos obtidos do cruzamento entre as cepas Y187 e AH109 de *S. cerevisiae*

Para confirmar a presença do gene *Pbure* nos clones considerados foram realizadas PCRs dos clones selecionados usando 20 mM dos oligonucleotídeos AD-LD 5' e AD-LD 3'. Posteriormente os clones foram sequenciados.

Na tabela I está descrita a proteína identificada, através do sistema duplo-híbrido, que possivelmente interage com *Pbure*, calnexina.

Tabela I – Identificação da proteína que interage com *PbURE*

Gene	Organismo	e-value	Redundância
calnexina	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	6e-28	2

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho, a sequência parcial codificante para URE de *P. brasiliensis* (*Pbure*) foi obtida através do banco de transcriptoma de *P. brasiliensis*, durante o processo infectivo em camundongo (Costa et al. 2007). O cDNA de *Pbure* possui 3.012 nucleotídeos, sendo as regiões 5'e 3' não traduzidas constituídas de 261 e 243 nucleotídeos, respectivamente; a região traduzida é composta por 2.511 nucleotídeos, produzindo uma proteína de 837 aminoácidos, semelhante às ureases de outros fungos patogênicos como *C. immitis* e *C. posadassi* (Cole 1997).

Na sequência deduzida de aminoácidos de *PbURE* foi encontrado a assinatura TAGGIDtHVFhicP, característica de enzimas dependentes de níquel; e a sequência MVCHHLsknIreDVaFA, característica do sítio ativo da urease (Jabri et al. 1995). Essas sequências estão posicionadas em regiões similares nas ureases de fungos da ordem Onygenales (*A. capsulatus*, *C. immitis* e *C. posadasii*).

O alinhamento entre *PbURE* e ureases provenientes de outros fungos originou a formação de grupos que puderam ser visualizados na árvore filogenética. Os Sordariales (*N. crassa*, *G. zeae* e *P. anserina*), os Eurotiales (*P. chrysogenum* Wisconsin, *A. niger*, *A. terreus*, *A. oryzae*, *A. flavus*, *A. clavatus*, *N. fischeri*, *P. marneffei* e *A. nidulans*) e Onygenales (*A. capsulatus*, *C. posadasii* e *C. immitis*) formaram clados separados com altos valores de *bootstrap*, 100%, 100% e 96%, respectivamente, indicando a confiabilidade na formação dos grupos. Esses resultados indicam o agrupamento das

ureases dos fungos baseada na classificação filogenética, demonstrando que a urease evoluiu similarmente dentro das respectivas ordens.

A expressão heteróloga de *PbURer* no sistema bacteriano, utilizando o vetor de expressão pET-32a, produziu uma proteína de 103 kDa, essa proteína foi utilizada na produção de anticorpos policlonais em coelhos. Através de *Western-blot* foi possível detectar que a urease de *P. brasiliensis* é expressa na fase leveduriforme, presente no hospedeiro.

Embora *P. brasiliensis* não seja um microrganismo intracelular obrigatório Mendes-Gianinin et al. (2000) relatam que o fungo pode aderir e invadir células epiteliais. A urease de *H. pylori* apresenta uma importante participação na virulência bacteriana. Sua aderência ao epitélio gástrico, em conjunto com a produção de lipase e algumas toxinas induzem a destruição da superfície epitelial, expondo tecidos sub-epiteliais e a MEC (Doig et al. 1992; Terres et al. 1998). A urease da bactéria *Staphylococcus saprophyticus* favorece o surgimento de lesões epiteliais, expondo a fibronectina na área danificada, e influenciando na adesão da bactéria às células do hospedeiro (Meyer, Wengler-Becker & Gatermann 1996).

A capacidade da *PbURer* influenciar na interação do fungo com pneumócitos A549 foi avaliada. *PbURE* parece influenciar na adesão, pois a presença de *PbURer* e do anticorpo anti- *PbURer* impediram esse processo. O mesmo ocorre em 5 h de contato entre *P. brasiliensis* e pneumócitos A549, indicando a participação de *PbURer* no evento de invasão do fungo.

A urease de *H. pylori* não é descrita como adesina; sua presença no hospedeiro induz danos celulares que levam à exposição de componentes da MEC, aos quais se ligam proteínas adesinas da bactéria (Dubreuil et al. 2002). Estudos têm demonstrado que os fungos empregam a interação mediada por RGD para aderir aos tecidos do

hospedeiro (Hostetter, 2000; Bae *et al.* 2007). Na sequência predita de *PbURE* foi identificada a presença do tripeptídeo RGD. Desta forma, a habilidade de *PbURE* se ligar às proteínas da MEC foi avaliada. A *PbURer* foi capaz de se ligar à fibronectina e ao colágeno tipo IV, sugerindo sua atuação no processo de adesão de *P. brasiliensis* à MEC.

O experimento de interação entre *PbURE* e proteínas de *P. brasiliensis* mostrou que *PbURE* provavelmente interage com calnexina. Essa proteína reconhece glicoproteínas monoglicosiladas no retículo endoplasmático, sendo um componente essencial do complexo que mantém o enovelamento das glicoproteínas nascentes secretadas (Feitosa et al. 2007). Dessa forma, a calnexina poderia interagir com *PbURE*, mantendo seu enovelamento. Experimentos visando validar essa interação estão em processo.

7. CONCLUSÕES

- A sequência codante de *PbURE* é composta por 2,5 kb. A sequência deduzida de *PbURE* possui 837 resíduos de aminoácidos correspondendo a uma proteína de 90 kDa e *pI* de 6.0;
- *PbURE* contém a assinatura presente em enzimas dependentes de níquel (TAGGIDtHVVHfP) e o sítio ativo (MVCHHLsknIreDVaFA);
- A análise filogenética com *PbURE* e ureases de outros fungos mostrou um agrupamento baseado na classificação filogenética;
- A expressão heteróloga da proteína recombinante *PbURER* foi avaliada por análise em SDS-PAGE, evidenciando uma proteína 90 kDa;
- A partir da proteína *PbURER* foi possível a obtenção de anticorpos policlonais que reconheceram *PbURER* e *PbURE* nativa na fase leveduriforme;
- Através de experimentos *Far-Western blot* e Elisa foi mostrado que *PbURER* foi capaz de se ligar às proteínas fibronectina e colágeno IV da MEC;
- A interação entre *P. brasiliensis* e células A549 foi avaliada. Células A549 tratadas com a proteína *PbURER* demonstraram índices de infecção menores do que os índices da infecção total. Células A549 tratadas com anticorpo policlonal anti-*PbURER* apresentaram índice de inibição da infecção significativo;
- O motivo RGD de *PbURER* é importante na interação com proteínas da MEC.
- Através do sistema duplo-híbrido foi identificada a proteína calnexina, que possivelmente interage com *PbURE*.

8. PERSPECTIVAS

- Identificar a localização da urease em *P. brasiliensis*;
- Confirmar as interações rastreadas com *PbURE* através da co-imunoprecipitação;
- Identificar outras proteínas que possivelmente interagem com *PbURE*.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andreotti PF, Monteiro da Silva JL, Bailão AM, Soares CM, Benard G, Soares CP, Mendes-Giannini MJ 2005. Isolation and partial characterization of a 30 kDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect* 7:875-81.

Arraes FB, Benoliel B, Burtet RT, Costa PL, Galdino AS, Lima LH, Marinho-Silva C, Oliveira-Pereira L, Pfrimer P, Procópio-Silva L, Reis VC, Felipe MS 2005. General metabolism of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Genetics and Molecular Research*. 4: 290-308.

Bae CY, Kim S, Choi WB, Lee YH 2007. Involvement of extracellular matrix and integrin-like proteins on conidial adhesion and appressorium differentiation in *Magnaporthe oryzae*. *J Microbiol Biotechnol* 17:1198-203.

Bailão AM, Schrank A, Borges CL, Dutra V, Molinari-Madlum EEWI, Felipe MSS, Mendes-Giannini MJS, Martins WS, Pereira M, Soares CMA 2006. Differential gene expression by *Paracoccidioides brasiliensis* in host interaction conditions: Representational difference analysis identifies candidate genes associated with fungal pathogenesis. *Microbes Infect* 8: 2686-2697.

Bailão AM, Shrank A, Dutra V, Felipe MSS, Fiúza RB, Borges CL, Pereira M, Soares CMA 2007. The transcriptional profile of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells is influenced by human plasma. *FEMS Immunol Med Microbiol* 51:43–57.

Barbosa MS, Bão SN, Andreotti PF, de Faria FP, Felipe MS, Feitosa LS, Mendes-Giannini MJS, Soares CMA 2006. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. *Infect Immun* 74:382-9.

Bastos KP, Bailão AM, Borges CL, Faria FP, Felipe MSS, Silva MG, Martins WS, Fiúza RB, Pereira M, Soares CMA 2007. The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. *BMC Microbiol* 7:29.

Beck K, Hunter II, Engel J 1990. Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. *FASEB J* 4:148-60.

Bialek R, Ibricevic A, Fothergill A, Begerow D 2000. Small subunit ribosomal DNA sequence shows *Paracoccidioides brasiliensis* closely related to *Blastomyces dermatitidis*. *J Clin Microbiol* 38: 3190-3193.

Bidart T 2004. Rol de voriconazol y caspofungina en terapia antifúngica. *Rev Chil Infect.* 20, 21: S13-S19.

Brummer E, Hanson LH, Restrepo A, Stevens DA 1989. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication of by activated macrophages. *Infect Immun.* 57:2289-2294.

Castro NS, Barbosa MS, Maia ZA, Bão SN, Felipe MSS, Santana JM, Mendes-Giannini MJS, Pereira M, Soares CMA 2008. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* *PbDfg5p*, a cell-wall protein implicated in filamentous growth. *Yeast* 2:141-54.

Carlini CR, Polacco JC 2008. Toxic Properties of Urease. *Crop Sci.* 48:1665–1672.

Cole GT 1997. Ammonia production by *Coccidioides immitis* and its possible significance to the host–fungus interplay. In: Vanden Bossche, H., Stevens, D.A., Odds, F.C. (Eds.), Host–Fungus Interplay: Proceedings of the Fifth Symposium on Topics in Mycology. National Foundation for Infectious Diseases, Bethesda, MD, pp. 247–263.

Costa M, Borges CL, Bailão AM, Meirelles G V, Mendonça Y A, Dantas S F I M, Faria F P, Felipe MSS, Molinari-Madlum EEWI, Mendes-Giannini MJS, Fiuza R B, Martins WS, Pereira M, Soares CMA 2007. Transcriptome profiling of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast-phase cells recovered from infected mice brings new insights into fungal response upon host interaction. *Microbiology* 153: 4194–4207.

Coutinho ZF, Silva D, Lazera M, Petri V, Oliveira RM, Sabroza PC, Wanke B 2002. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saúde Pública* 18: 1441-1454.

Cox G M, Harrisont S, McDade HC, Taborda C P, Heinrich G, Casadevall A, Perfect JR 2003. Superoxide Dismutase Influences the Virulence of *Cryptococcus neoformans* by Affecting Growth within Macrophages. *Infect Immun.* 173–180.

Cox GM, Mukherjee J, Cole GT, Casadevall A, Perfect JR 2000. *Urease as a Virulence Factor in Experimental Cryptococcosis.* *Infect Immun.* 443–448.

Del Sal G, Manfioletti G, Schneider C 1989. The CTAB – DNA precipitation method: a common miniscale preparation of template DNA from phagemids, phages or plasmids suitable for sequencing. *Biotechniques* 7:514-519.

Dubreuil JD, Giudice GD, Rappuoli R 2002. *Helicobacter pylori* Interactions with Host Serum and Extracellular Matrix Proteins: Potencial Role in the Infectious Process. *Microbiology Mol Biol* 66: 617-629.

Feitosa L S, Soares CMA, Santos MRMS, Bailão AM, Xander P, Mortara RA, Lopes JD 2007. Cloning, characterization and expression of a calnexin homologue from the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast* 24: 79–87.

Felipe MS, Andrade RV, Arraes FB, Nicola AM, Maranhão AQ, Torres FA, Silva-Pereira I, Pocas-Fonseca MJ, Campos EG, Moraes LM, Andrade PA, Tavares AH, Silva SS, Kyaw CM, Souza DP, Pereira M, Jesuino RS, Andrade EV, Parente JA, Oliveira GS, Barbosa MS, Martins NF, Fachin AL, Cardoso RS, Passos GA, Almeida NF, Walter ME, Soares CM, Carvalho MJ, Brigido MM, PbGenome Network 2005.

Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *J Biol Chem* 280: 24706-24714.

Felipe MS, Andrade RV, Petrofeza SS, Maranhao AQ, Torres FA, Albuquerque P, Arraes FB, Arruda M, Azevedo MO, Baptista AJ, Bataus LA, Borges CL, Campos EG, Cruz MR, Daher BS, Dantas A, Ferreira MA, Ghil GV, Jesuino RS, Kyaw CM, Leitao L, Martins CR, Moraes LM, Neves EO, Nicola AM, Alves ES, Parente JA, Pereira M, Pocas-Fonseca MJ, Resende R, Ribeiro BM, Saldanha RR, Santos SC, Silva-Pereira I, Silva MA, Silveira E, Simoes IC, Soares RB, Souza DP, De-Souza MT, Andrade EV, Xavier MA, Veiga HP, Venancio EJ, Carvalho MJ, Oliveira AG, Inoue MK, Almeida NF, Walter ME, Soares CM, Brigido MM 2003. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. *Yeast* 20: 263-271.

Figueiredo CC, De Lima OC, de Carvalho L, Lopes Bezerra LM, Morandi V 2004. The *in vitro* interaction Involvement of fungal cell wall components in adhesion of *Sporothrix schenckii* to human fibronectin. *Infect Immun* 69:6874-80.

Finlay BB 1990. Cell adhesion and invasion mechanisms in microbial pathogenesis. *Curr Opin Cell Bio* 2:815-20.

Follmer C 2008. Insights into the role and structure of plant ureases. *Phytochem.* 69:18–28.

Garrett RM & Rajagopalan KV 1996. Site-directed Mutagenesis of Recombinant Sulfite Oxidase Identification Of Cysteine 207 As A Ligand Of Molybdenum. *J Biol Chem.* 7387–7391.

Gil ML, Peñalver MC, Lopez-Ribot JL, O'Connor JE, Martinez JP 1996. Binding of extracellular matrix proteins to *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect Immun* 64:5239-47.

Heimer SR, Mobley HLT 2001. Interaction of *Proteus mirabilis* Urease Apoenzyme and Accessory Proteins Identified with Yeast Two-Hybrid Technology. *J Bacteriol.*

Holm L, Sander C 1997. *An evolutionary treasure: unification of a broad set of aminohydrolases related of urease.* *Proteins.* 28: 72-82.

Hostetter MK 1999. Integrin-like proteins in *Candida spp.* and other microorganisms. *Fungal Genet Bio* 28:135-45.

Hostetter MK 2000. RGD-mediated adhesion in fungal pathogens of humans, plants and insects. *Curr Opin Microbiol* 3:344-8.

Huang G, Zhang M, Erdman SE 2003. Posttranslational modifications required for cell surface localization and function of the fungal adhesin Aga1p. *Eukaryot Cell.* 2:1099-114.

Hung C Y, Seshan K R, Yu J J, Schaller R, Xue J, Basrur V, Gardner M J, Cole G T 2005. A metalloproteinase of *Coccidioides posadasii* contributes to evasion of host detection. *Infect Immun* 73:6689-703.

Hung CY, YU JJ, Seshan KR, Reichard U, Cole GT 2002. A parasitic phase-specific adhesin of *Coccidioides immitis* contributes to the virulence of this respiratory Fungal pathogen. *Infect Immun* 70:3443-56.

Jabri E, Carr MB, Hausinger RP, Karplus PA 1995. The crystal structure of urease from *Klebsiella aerogenes*. *Science*. 268:996-7.

Johannesson H, Townsend JP, Hung CY, Cole GT, Taylor JW 2005. Concerted evolution in the repeats of an immunomodulating cell surface protein, SOWgp, of the human pathogenic fungi *Coccidioides immitis* and *C. posadasii*. *Genetics* 171:109-17.

Johnson CH, Prigge JT, Warren AD, Mcewen JE 2003. Characterization of an alternative oxidase activity of *Histoplasma capsulatum*. *Yeast* 20:381-8.

Kanetsuna F, Carbonell LM, Azuma I, Yamamura Y 1972. Biochemical Studies on the Thermal Dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* 110: 208-218.

Kim JK, Mulrooney SB, Hausinger RP 2006. The UreEF Fusion Protein Provides a Soluble and Functional Form of the UreF Urease Accessory Protein. *J Bacteriol* 188: 8413–8420.

Kottom TJ, Köhler JR, Thomas CF Jr, Fink GR, Limper AH 2003. Lung epithelial cells and extracellular matrix components induce expression of *Pneumocystis carinii* STE20, a gene complementing the mating and pseudohyphal growth defects of STE20 mutant yeast. *Infect. Immun.* 71:6463-71.

Lacaz CS 1994. Historical evolution of the knowledge on paracoccidioidomycosis and its etiologic agent, *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Franco M.; Lacaz C.S.; Restrepo-Moreno A, Del-Negro G. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton, Florida, EUA, p. 1-11.

Lima OC, Figueiredo CC, Previato JO, Mendonca-Previato L, Morandi V, Lopes Bezerra LM 2001. Involvement of fungal cell wall components in adhesion of *Sporothrix schenckii* to human fibronectin. *Infect. Immun.* 69:6874-80.

Mc Mahon JP, Wheat J, Sobel ME, Pasula R, Downing JF, Martin WJ 1995. Murine Laminin binds to *Histoplasma capsulatum*. A possible mechanism of dissemination. *J. Clin. Inv.* 96:1010-7.

Maubon D, Park S, Tanguy M, Huerre M, Schmitt C, Prevost MC, Perlin DS, Latge JP, Beauvais A 2006. AGS3, an alpha(1-3)glucan synthase gene family member of *Aspergillus fumigatus*, modulates mycelium growth in the lung of experimentally infected mice. *Fungal Genet Biol.* 43:366-75.

Mendes-Giannini MJS, Andreotti PF, Vincenzi LR, da Silva JL, Lenzi HL, Benard G, Zancopé-Oliveira R, Guedes HLM, Soares CP 2006. Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect* 8:1550-9.

Mendes-Giannini MJS, Monteiro da Silva JL, da Silva JF, Donofrio FC, Miranda ET, Andreotti PF, Soares CP 2008. Interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* with host cells: recent advances. *Mycopathologia* 165:237-48.

Mendes-Giannini MJS, Taylor ML, Bouchara JB, Burger E, Calich VL, Escalante ED, Hanna SA, Lenzi HL, Machado MP, Miyaji M, Monteiro da Silva JL, Mota EM, Restrepo A, Restrepo S, Tronchin G, Vincenzi LR, Xidieh CF, Zenteno E 2000. Pathogenesis II: fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. *Med Mycol* 38:113-23.

Meyer HGW, Wengler-Becker U, Gatermann SG 1996. The Hemagglutinin of *Staphylococcus saprophyticus* Is a Major Adhesin for Uroepithelial Cells. *Infect. Immun.* 64: 3893–3896.

Mirbod F, Schaller RA 2002. Purification and characterization of urease isolated from the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Med. Mycol.* 40:35–44.

Mobley HLT, Island MD, Hausinger RP 1995. Molecular Biology of Microbial Ureases. *Microbiological Reviews.* 451–480.

Mobley HL 1996. The role of *Helicobacter pylori* urease in the pathogenesis of gastritis and peptic ulceration. *Aliment Pharmacol Ther* 1:57-64

Mobley HL, Hu LT, Foxa LPA 1991. *Helicobacter pylori* urease: properties and role in pathogenesis. *Scand J Gastroenterol Suppl* 187:39-46.

Mohri H 1996. Fibronectin and integrins interactions. *J Investig Med* 44:429-41.

Mulrooney SB, Ward SK, Hausinger RP 2005. Purification and Properties of the *Klebsiella aerogenes* UreE Metal-Binding Domain, a Functional Metallochaperone of Urease. *J. Biol. Chem* 280:4684–4695.

Olszewski MA, Noverr MC, Chen GH, Toews GB, Cox GM, Perfect JR, Huffnagle GB 2004. Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. *Am. J. Pathol.* 164:1761–1771.

Page RDM 1996. *TREEVIEW. An application to display phylogenetic trees on personal computers applications in the Biosciences* 12:357-358.

Paniago AMM, Aguiar JIA, Aguiar ES, Cunha RV, Pereira GROL, Londero AT, Wanke B 2003. Paracoccidioidomicose: estudo clínico e epidemiológico de 422 casos observados no Estado de Mato Grosso do Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36:455-459.

Patel JB, Batanghari JW, Goldman WE 1998. Probing the yeast phase-specific expression of the CBP1 gene in *Histoplasma capsulatum*. *J Bacteriol.* 180:1786-92.

Pae SH, Dokic D, Dettman RW 2008. Communication between integrin receptors facilitates epicardial cell adhesion and matrix organization. *Dev Dyn* **237**:962-78.

Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Höök M 1994. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol* 48:585-617.

Pereira LA, Bão SN, Barbosa MS, da Silva JL, Felipe MS, Santana JM, Mendes-Giannini MJS, Soares CMA 2007. Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function. *FEMS Yeast Res* **7**:1381-8.

Ramos-e-Silva M, Saraiva LES 2008. Paracoccidioidomycosis. *Dermatol Clin* **26** :257–269.

Rappleye CA, Goldman WE 2006. Defining Virulence Genes in the Dimorphic Fungi. *Annu Rev Microbiol.* **60**:281-303.

Rocha AA, Malavazi I, Goldman GH, Puccia R 2009. Transcription regulation of the PbGP43 gene by nitrogen in the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genetics and Biology* **46**:85–93.

Rodrigues ML, Nakayasu ES, Oliveira DL, Nimrichter L, Nosanchuk JD, Almeida IC, Casadevall A 2008. Extracellular Vesicles Produced by *Cryptococcus neoformans* Contain Protein Components Associated with Virulence. *Eukaryot. Cell* **6**:48–59.

Rooney PJ, Klein BS 2004. Sequence Elements Necessary for Transcriptional Activation of BAD1 in the Yeast Phase of *Blastomyces dermatitidis*. *Eukaryot. Cell.* 785–794.

Ruoslahti E 1996. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:697-715.

Shikanai-Yasuda MA, Filho FQT, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML e Grupo de Consultores do Consenso em Paracoccidioidomicose 2006. Consenso em paracoccidioidomicose. *Rev Soc Bras Med Trop.* 39:297-310.

Simoni RD, Hill RL, Vaughan M 2002. Urease, the First Crystalline Enzyme and the Proof That Enzymes Are Proteins: the Work of James B. Sumner. *J Biol Chem* 277:23.

Tavares AH, Silva SS, Bernardes VV, Maranhão AQ, Kyaw CM, Pocas-Fonseca M, Silva-Pereira I 2005. Virulence insights from the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome. *Genet Mol Res.* 4:372-89.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG 1997. *The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools.* *Nucleic Acids Res.* 24:4876-4882.

Vicentini AP, Gesztes JL, Franco MF, de Souza W, de Moraes JZ, Travassos LR, Lopes JD 1994. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface

glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infect Immun.* 62:1465-9.

Vogels GD, Drift C van D 1976. Degradation of Purines and Pyrimidines by Microorganisms. *Bacteriol Rev.* 40(2): 403–468.

Voland P, Weeks DL, Marcus EA, Prinz C, Sachs G, Scott D 2003. Interactions among the seven *Helicobacter pylori* proteins encoded by the urease gene cluster. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 284: G96-G106

Yin X, Warner DR, Roberts EA, Pisano MM, Greene RM 2005. Novel interaction between nuclear co-activator CBP and the CDK5 activator binding protein - C53. *Int J Mol Med.* 16:251-6.

Zambelli B, Stola M, Musiani F, de Vriendt K, Samyn B, Devreese B, van Beeumen J, Turano P, Dikiy A, Bryant DA, Ciurli S 2005. UreG, a Chaperone in the Urease Assembly Process, Is an Intrinsically Unstructured GTPase That Specifically Binds Zn^{2+} . *J. Biol. Chem.* 280: 4684-46.