



**UFG**

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

**MARIELLE GARCIA SILVA**

---

**ANÁLISE PROTEÔMICA DE MEMBRANAS DE  
*Paracoccidioides* sp. DURANTE PRIVAÇÃO DE ZINCO**

---

**Orientadora:** Dra. Célia Maria de Almeida Soares

**Goiânia  
2014**

**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: Marielle Garcia Silva

Título do trabalho: Análise proteômica de membranas de *Paracoccidioides* sp. durante privação de zinco.


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

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

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)<sup>2</sup>

Ciente e de acordo:

  
Assinatura do(a) orientador(a)<sup>2</sup>

Data: 02 / 08 / 2017

<sup>1</sup> 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

<sup>2</sup>A assinatura deve ser escaneada.



**UFG**

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

**MARIELLE GARCIA SILVA**

---

**ANÁLISE PROTEÔMICA DE MEMBRANAS DE  
*Paracoccidioides* sp. DURANTE PRIVAÇÃO DE ZINCO**

---

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás como requisito para obtenção do Título de Mestre em Medicina Tropical e Saúde Pública.

**Orientador:** Prof. Dra. Célia Maria de Almeida Soares

**Goiânia  
2014**

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

Garcia, Marielle

Análise proteômica de membranas de *Paracoccidioides* sp. durante privação de zinco [manuscrito] / Marielle Garcia, Juliana Santana, Luciana Casaletti. - 2014.

CIX, 109 f.

Orientador: Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares; co orientadora Dra. Mirelle Garcia Silva.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2014.

Bibliografia.

Inclui abreviaturas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Proteoma. 2. Proteínas de membrana. 3. Privação de zinco. I. Santana, Juliana. II. Casaletti, Luciana. III. de Almeida Soares, Célia Maria, orient. IV. Garcia Silva, Mirelle, co-orient. V. Título.

CDU 577.1



**ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MARIELLE GARCIA SILVA** - Aos quatro dias do mês de agosto do ano de 2014 (04/08/2014), às 14:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. CÉLIA MARIA DE ALMEIDA SOARES, LUCIANA CASALETTI e PATRÍCIA DE SOUSA LIMA, para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: **“ANÁLISE PROTEÔMICA DE MEMBRANAS DE *Paracoccidioides sp.* DURANTE PRIVAÇÃO DE ZINCO”**, em nível de MESTRADO, área de concentração em MICROBIOLOGIA, de autoria de MARIELLE GARCIA SILVA, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela Orientadora, Profa. Dra. CÉLIA MARIA DE ALMEIDA SOARES, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da dissertação que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a Candidata, tendo-se adotado o sistema de diálogo seqüencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1081/2012 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando a candidata **Aprovada** ou **Reprovada**:

**Banca Examinadora**

Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares

Dra. Luciana Casaletti

Dra. Patrícia de Sousa Lima

**Aprovada / Reprovada**

APROVADA

APROVADA

APROVADA

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata Habilitada, (**Habilitada ou não Habilitada**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de MESTRE EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, na área de concentração em MICROBIOLOGIA, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 15 h 50 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, JOSÉ CLEMENTINO DE OLIVEIRA NETO, secretário do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.

A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Dissertação:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Profa. Dra. Célia Maria de Almeida Soares (ICB/UFG)

Dra. Luciana Casaletti (ICB/UFG)

Dra. Patrícia de Sousa Lima (ICB/UFG)

Secretário da Pós-Graduação:

**Assinatura**

Célia Maria de Almeida Soares  
Luciana Casaletti  
Patrícia de Sousa Lima

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

**BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Aluno (a):** Marielle Garcia Silva

---

**Orientador (a):** Prof<sup>ª</sup>. Dra. Célia Maria de Almeida Soares

---

**MEMBROS**

Dr. Célia Maria de Almeida Soares  
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás

Dra. Luciana Casaletti  
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás

Dra. Patrícia de Sousa Lima  
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás

**DATA: 04/08/2014**

*Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida...*

*... meus pais José e Lucélia, que sempre fizeram de tudo  
para me oferecer boa educação e sempre me  
apoiaram nas decisões tomadas.*

*... à minha irmã Mirelle, que sempre me ajudou nas  
tarefas e decisões. Obrigada pelo apoio!  
Se não fossem vocês, hoje não estaria  
onde estou! Obrigada por tudo!*

*Amo vocês!*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade da vida e por me abençoar a cada dia.

À minha orientadora Célia Maria de Almeida Soares, por me receber no seu grupo de trabalho. Agradeço pela orientação e pela confiança em mim depositada. Pelo esforço em oferecer aos seus alunos condições para realização de trabalho de qualidade. Admiro sua competência e profissionalismo na coordenação do laboratório.

Ao meu cunhado Alexandre, que nunca negou ajuda durante a realização dos experimentos. Obrigada pelo apoio, pelas sugestões e pela amizade.

Aos professores do Laboratório de Biologia Molecular, da Universidade Federal de Goiás, Maristela Pereira, Alexandre Bailão, Clayton Borges Juliana Parente e Sílvia Salém-Izzac, pelo auxílio oferecido.

Aos membros da banca de qualificação, Patrícia Lima, Lilian Baeza e Clayton Borges pelas sugestões e contribuições.

À Juliana Santana, pelo companheirismo durante a realização dos experimentos e das discussões. Obrigada pela amizade profissional e pessoal.

À Luciana, pela amizade, pelos conselhos e momentos de diversão. Obrigada pela ajuda durante a realização dos experimentos e por toda contribuição durante esses anos. Muito obrigada Lu.

À Patrícia Lima, Elisa Flávia, Lucas Nojosa e Mariana Tomazett, pelos momentos de descontração, que ajudam a aliviar o cansaço durante o trabalho, e pela disponibilidade em sempre me ajudar. Obrigada a todos vocês!

À Edilânia, Amanda, Danielle, Alessandro, Karla, Gabriel, Leandro Prado, André, Vanessa, Luiz Paulo, Igor, Fabiana, Leandro, Paula Francienete, Laura, Diandra, Laurine, Wesley, Lívia, Joyce, Kleber. Agradeço pelo convívio e contribuições.

À todos os membros da minha família pelo apoio e palavras de incentivo. Obrigada pelas orações!



## SUMÁRIO

	Pág.
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	xi
<b>RESUMO</b>	xii
<b>ABSTRACT</b>	xiii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1. Paracoccidioides spp. e Paracoccidioidomicose – Aspectos gerais .....	14
1.2. Membranas celulares .....	19
1.3. Importância dos íons metálicos em processos celulares .....	26
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	33
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	34
3.1 Geral .....	34
3.2 Específicos .....	34
<b>4. MANUSCRITO</b> .....	35
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	99
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	102
<b>7. PERSPECTIVAS</b> .....	103
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	104

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Dissertação</b>	Pág.
Figura 1: Morfologia de <i>Paracoccidioides</i> spp.	13
Figura 2: Distribuição geográfica da paracoccidioidomicose.	15
Figura 3: Aspectos clínicos da PCM.	16
Figura 4: Estrutura da membrana celular.	17
Figura 5: Associação das proteínas à membrana celular.	19
Figura 6: Proteínas de membrana ligadas a lipídeos.	21
Figura 7: Estrutura geral de uma âncora GPI ligando uma proteína à membrana plasmática.	23
Figura 8: Modelo do transporte de zinco.	27
Figura 9: Alinhamento de sequências de aminoácidos de <i>S. cerevisiae</i> , <i>Paracoccidioides</i> spp. e espécies de <i>Cryptococcus</i> .	28
<b>Manuscrito</b>	
Figura 1: Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) do extrato de membrana de <i>Paracoccidioides</i> sp.	45
Figura 2: Porcentagem de proteínas de membrana identificadas.	46
Figura 3: Proteínas de membrana reguladas.	46
Figure 4: Classificação funcional das proteínas de membrana.	47
Tabela 1: Proteínas de membrana identificadas em <i>Paracoccidioides</i> sp. na presença ou na ausência de zinco.	48
Tabela 2: Proteínas de membrana de <i>Paracoccidioides</i> sp. reprimidas em privação de zinco e suas funções biológicas.	56
Tabela 3: Proteínas de membrana de <i>Paracoccidioides</i> sp. induzidas em privação de zinco e suas funções biológicas.	63
Figura suplementar – 1 Tipo de detecção dos peptídeos para amostras do controle e de privação de zinco.	65
Figura suplementar – 2 Faixa de detecção dinâmica dos experimentos.	66
Figura suplementar – 3 Localização subcelular das proteínas identificadas	67
Tabela suplementar – 1 Proteínas reguladas em células de levedura de <i>Paracoccidioides</i> sp. sob privação de zinco e as suas funções biológicas previstas.	68

## LISTA DE ABREVIATURAS

PCM:	Paracoccidiodomicose
MET:	Microscopia eletrônica de transmissão
S1:	Espécie 1
PS2:	Espécie filogenética 2
PS3:	Espécie filogenética 3
PS4:	Espécie filogenética 4
DTT:	Ditiotreitol
TPEN:	<i>N,N,N,N</i> - tetrakis (2-pyridyl-methyl) ethylenediamine - Quelante específico de zinco
PIM:	Proteínas integrais de membrana
GPI:	Glicosilfosfatidilinositol
MPTs:	Modificações pós-traducionais
PATs:	Palmitoil-transferases
FTase:	Farnesiltransferase
Zrt1:	Transportador de zinco de alta afinidade
Zrt2:	Transportador de zinco de baixa afinidade
Irt1:	Transportador de ferro
CDF:	Facilitador de difusão de cátions
GM-CSF:	Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos
PA:	Ácido fosfatídico
LPA:	Ácido lisofosfatídico
1-AGPAT:	1-acil-sn-glicerol-3-phosphate aciltransferase beta
PS:	Fosfatidilserina
PI:	Fosfatidilinositol
PE:	Fosfatidiletanolamina
PC:	Fosfatidilcolina
Sac1:	Fosfatase fosfoinositídica
Dpm1:	Dolicol fosfato manose sintase
Mkc1:	Proteína quinase ativada por mitógeno
MMcM:	Meio mínimo Mc Veigh Morton
AF:	<i>Ammonium formate</i>
PLGS:	<i>ProteinLynx Global Server</i>
UPLC-MS <sup>E</sup> :	Cromatografia de ultraperformance acoplada à espectrometria de massas

## RESUMO

*Paracoccidioides* spp. são fungos patogênicos, causadores da paracoccidioidomicose, uma importante micose sistêmica nos países latino-americanos. O sucesso da infecção depende da capacidade do patógeno obter micronutrientes essenciais (metais) a partir do hospedeiro. Este processo de captação de nutrientes ocorre através de transportadores associados às membranas. As membranas são constituídas por uma bicamada lipídica com proteínas associadas e estão envolvidas em diferentes processos durante o estabelecimento da infecção, como transporte de nutrientes e regulação homeostática da célula. Como o zinco é um metal que desempenha um papel importante na regulação da interação patógeno-hospedeiro e distúrbios na homeostase deste micronutriente estão implicados na patogênese de doenças infecciosas, o objetivo deste estudo foi identificar as proteínas de membranas expressas em condições de privação de zinco. A técnica NanoUPLC-MS<sup>E</sup> foi empregada para identificar proteínas de membranas de células de levedura (*Pb01*) cultivadas em meio quimicamente definido na presença e ausência de zinco. Microscopia eletrônica de transmissão foi realizada para confirmar o enriquecimento da amostra com membranas. Posteriormente, as amostras foram digeridas e analisadas por NanoUPLC-MS<sup>E</sup>. Análises *in silico* foram realizadas para determinação da localização de 460 proteínas obtidas do extrato proteico de *Pb01* cultivado em meio com zinco (controle) e TPEN (tratado). Do total de proteínas identificadas, 141 proteínas foram classificadas como pertencentes a membranas e destas, 120 proteínas foram reprimidas e 21 foram induzidas durante privação de zinco. Dentre as 141 proteínas de membranas, 81 apresentaram domínio transmembrana e 9 foram classificadas como sendo de membrana, em decorrência de modificação pós-traducional. Um total de 15 proteínas de membrana apresentou peptídeo sinal. Análises da função das proteínas de membranas permitiu a descrição de que o metabolismo de fosfolipídeos e a integridade celular foram afetados pela privação de zinco.

Palavras chave: Proteoma, proteínas de membranas, privação de zinco

## ABSTRACT

*Paracoccidioides* spp. are pathogenic fungi that causes paracoccidioidomycosis, an important systemic mycosis in Latin American countries. The success of infection depends on the pathogen ability to obtain essential micronutrients (metals) from the host. This process of nutrient uptake occurs through membrane associated transporters. The membranes are constituted of a lipid bilayer with associated proteins and are involved in different processes during the establishment of infection, such as transport of nutrients and homeostatic regulation. As zinc is a metal that plays an important role in the regulation of host-pathogen interaction and changes in this micronutrient homeostasis are implicated in the pathogenesis of infectious diseases, the aim of this study was to identify the membrane proteins expressed under conditions of zinc deprivation. NanoUPLC-MS<sup>E</sup> technique was employed in order to identify membrane proteins of yeast cells (*Pb01*) grown in chemically defined media in the presence and absence of zinc. Transmission electron microscopy was performed to confirm the sample enrichment with membranes. Subsequently, the samples were digested and analyzed by NanoUPLC-MS<sup>E</sup>. *In silico* analysis was performed to determine the location of 460 proteins identified in extracts of *Pb01* grown in + Zn (control) and TPEN (treated) medium. Among the identified proteins, 141 were classified as belonging to membranes and of those, 120 proteins were repressed and 21 were induced during zinc deprivation. Among the 141 membrane proteins, 81 showed transmembrane domains and 9 were classified as membranes proteins with post-transcriptional modification. A total of 15 membrane proteins showed signal peptide. Analysis of the function of membrane proteins, allowed the description that phospholipid metabolism and cell integrity maintenance pathways were affected by zinc deprivation.

Keywords: Proteome, membranes proteins, zinc deprivation

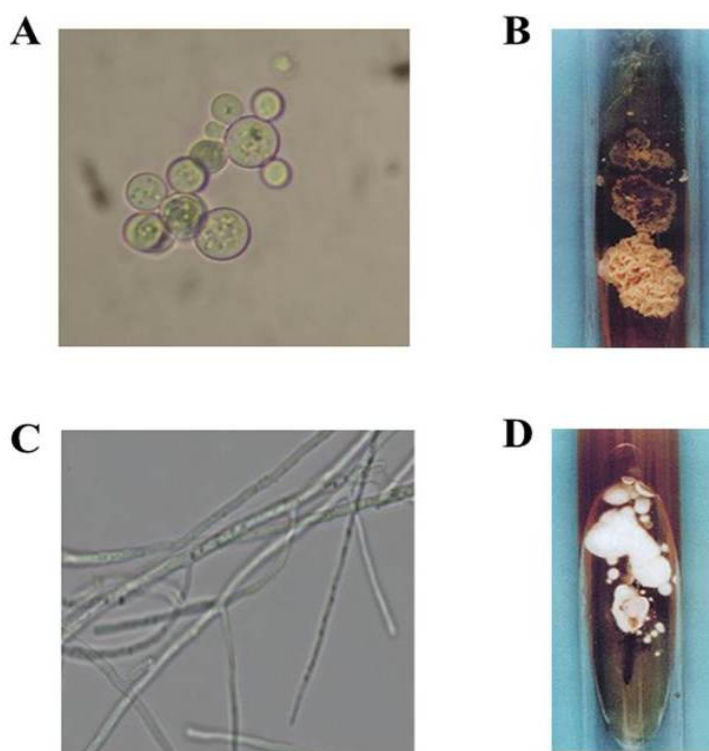
# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 *Paracoccidioides* spp. e Paracoccidioidomicose – Aspectos gerais

*Paracoccidioides* spp. são fungos patogênicos, causadores da paracoccidioidomicose (PCM), uma importante micose sistêmica nos países Latino-Americanos. O fungo pertence ao filo Ascomycota, ordem Onygenales e família Ajellomycetaceae (Onygenaceae). Análises filogenéticas de isolados de *Paracoccidioides* spp. resultaram na diferenciação do gênero em duas espécies: *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*. De acordo com dados do sequenciamento nucleotídico de 8 loci de 65 isolados, o complexo *P. brasiliensis* é constituído por três linhagens filogenéticas: S1 (com 38 isolados), PS2 (com seis isolados, sendo 5 de origem brasileira e 1 de origem venezuelana) e PS3 (com 21 isolados colombianos). Recentemente foi identificada uma nova linhagem filogenética, PS4, que inclui 5 isolados clínicos da Venezuela (SALGADO-SALAZAR et al., 2010; BOCCA et al., 2013). O complexo *P. lutzii* representa os isolados semelhantes ao Pb01 (isolado 1 de *Paracoccidioides lutzii*), que apresentaram diferenças morfológicas e genômicas em relação aos outros isolados classificados como *P. brasiliensis* (MATUTE et al., 2006; CARRERO et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2014). Os membros do complexo *P. brasiliensis* estão distribuídos entre Brasil, Argentina, Uruguai, Paraguai, Peru e Colômbia. Já os membros do complexo *P. lutzii* foram encontrados na região Centro-Oeste do Brasil, Rondônia e Equador (MATUTE et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2014).

Alguns organismos são capazes de ocupar mais de um nicho ecológico durante seu ciclo de vida, como é o caso dos fungos patogênicos termodimórficos. Durante a fase de micélio (saprófita) o fungo está sob a influência de diferentes condições, como mudança frequente de temperatura e umidade e em competição com outros microorganismos. Já durante a fase de levedura, estes patógenos se adaptam a um habitat diferente, tais como os órgãos internos do corpo (influência da temperatura, hormônios e do sistema imunológico) (BAGAGLI et al., 2008). *Paracoccidioides* spp. são encontrados na forma miceliana no meio ambiente (solo) ou em condições *in vitro* nas temperaturas de 22°C-28°C, enquanto nos tecidos do hospedeiro ou quando cultivado entre 35°C-37°C, é encontrado como levedura (BAGAGLI et al., 2006). Em relação à

morfologia, micélio e levedura de ambas as espécies do gênero *Paracoccidioides* são similares. Ambas as formas são multinucleadas, enquanto os conídios produzidos pelo micélio possuem só um núcleo (CANO et al., 1998; MCEWEN et al., 1987b). Microscopicamente, na fase de levedura as colônias de *Paracoccidioides* spp. são caracterizadas por múltiplos brotamentos originados de uma célula-mãe, a qual é central e circundada por células periféricas menores, apresentando uma estrutura semelhante a uma roda de leme de navio (Figura 1A). A forma miceliana é caracterizada por hifas septadas com a presença de conídios terminais ou intercalares (Figura 1C) (RESTREPO-MORENO, 2003; QUEIROZ-TELLES, 1994). Macroscopicamente, as colônias de levedura são rugosas e amareladas (Figura 1B); já as colônias de micélio são pequenas, irregulares e com aspecto algodonofo (Figura 1D) (BRUMMER et al., 1993).



**Figura 1: Morfologia de *Paracoccidioides* spp. :** Características microscópicas: **A-** Levedura, **C-** Micélio. Aspecto de colônias crescidas à 37°C (**B** – Levedura) e 25°C (**D** – Micélio). Aumento: A e B – 40 vezes. Fonte: Laboratório de Biologia Molecular, Universidade Federal de Goiás; Sturme et al. (2011); Lacaz et al., (1999).

*Paracoccidioides* spp. já foram isolados de tatus (*Dasypus novemcinctus* e *Cabassous centralis*) e detectados em animais domésticos, como cachorro (BAGAGLI et al., 1998; RICCI et al., 2004; CORREDOR et al., 1999). Por poderem ser acometidos

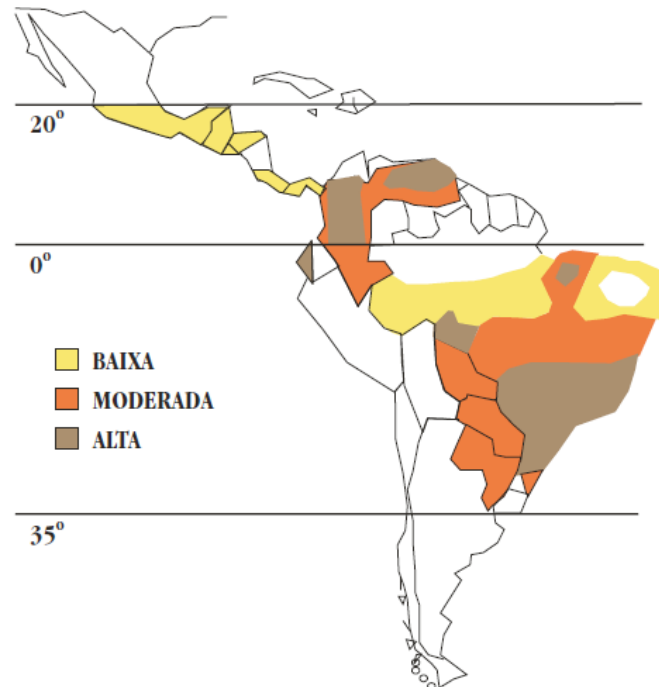
pela doença, estes organismos devem ser considerados hospedeiros acidentais e não reservas naturais do fungo (CONTI DIAZ, 2007). No solo, em amostras recolhidas ao redor e dentro da toca dos tatus, o fungo foi detectado através de métodos moleculares (THEODORO et al., 2005). Os tatus podem infectar-se várias vezes, pois ficam em contato constante com o solo e possuem uma resposta imunológica celular fraca (RICHINI-PEREIRA et al., 2009). Infecção por *P. brasiliensis* também já foi reportada em porcos domésticos, mas o fungo não foi isolado dos animais (BELITARDO et al., 2014). A identificação de *Paracoccidioides* spp. em 20% dos tatus examinados da região de Tucuruí (Pará) sugere que o animal possa exercer algum papel no ciclo natural do fungo (NAIFF et al., 1986).

A paracoccidioidomicose afeta principalmente trabalhadores rurais do sexo masculino que estão em contato direto com o solo. A doença é restrita às Américas Central e do Sul, com maior prevalência no Brasil, Colômbia, Venezuela e Argentina (Figura 2). No Brasil, entre 1980 e 1995, a PCM foi considerada a oitava causa de morte por doença infecciosa e entre as micoses sistêmicas apresenta taxa de mortalidade média anual de 1,45/milhão de habitantes. As regiões Sudeste (São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro) e Sul (Paraná e Rio Grande do Sul) apresentaram maior índice de mortalidade. Acredita-se que a incidência anual em áreas endêmicas varie de 3 a 4 novos casos/milhão (PRADO et al., 2009; COUTINHO et al., 2002; BRUMMER et al., 1993; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

A principal via de infecção por *Paracoccidioides* spp. é a inalação (ALMEIDA, 2005). Os conídios e/ou propágulos produzidos pela forma miceliana, após serem inalados e atingirem os alvéolos pulmonares, transitam para levedura, a forma parasitária (MCEWEN et al., 1987a). Após a transição, o fungo pode disseminar-se pelas vias linfáticas e/ou hematogênicas, para outros locais do organismo hospedeiro, podendo ser fatal para o paciente (CAMARGO e FRANCO, 2000; VALERA et al., 2008). A PCM é predominante no sexo masculino, com razão de 10 a 12 homens para 1 mulher, em adultos (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). Esta diferença é explicada pela presença de hormônios esteróides, que inibem a transição de micélio ou conídio para levedura (LOOSE et al., 1983). Análise da transição dimórfica de isolados de *Paracoccidioides* spp. na presença de  $17\beta$ -estradiol demonstraram que o número de células que transitaram para a forma parasitária foi menor que na ausência do hormônio (RESTREPO et al., 1984). Em estudo realizado com camundongos foi demonstrado o bloqueio da transição dimórfica em fêmeas (ARISTIZABAL et al., 1998). Além disso,



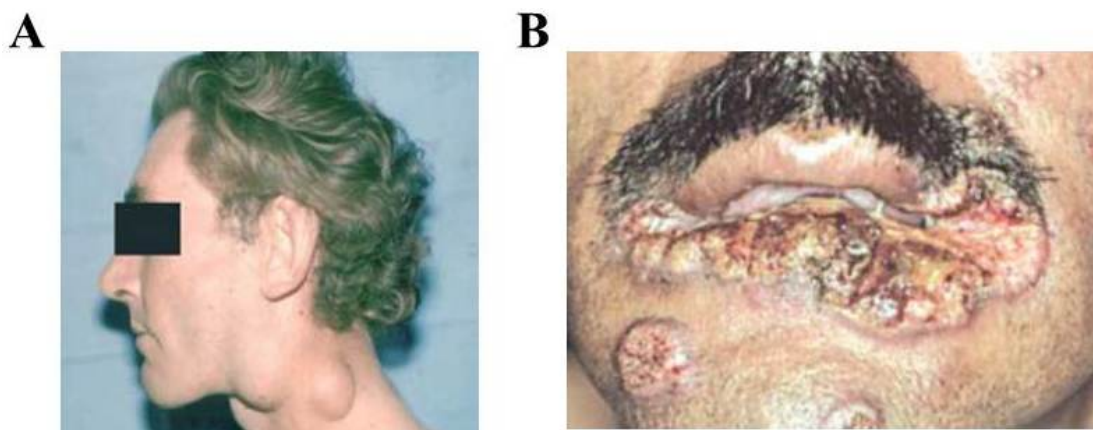
análises transcricionais indicaram que as ações inibitórias de  $17\beta$ -estradiol são decorrentes da ação de genes sinalizadores que regulam o dimorfismo (SHANKAR et al., 2011).



**Figura 2: Distribuição geográfica da paracoccidioidomicose.** Fonte: Shikanai-Yasuda et al. 2006.

A classificação clínica da PCM, definida no Colóquio Internacional de Paracoccidioidomicose em 1986, inclui: PCM infecção e PCM doença (forma aguda/subaguda e forma crônica). Na PCM infecção o paciente não apresenta sinais ou sintomas da doença mas possui reatividade positiva à paracoccidioidina (antígeno) (FRANCO et al., 1987). A forma aguda (tipo juvenil) possui evolução mais rápida e severa, representa apenas 3 a 5% de todos os casos e é caracterizada pelo envolvimento do sistema fagocítico mononuclear (linfonodos, fígado, baço e medula óssea) (Figura 3A). Predomina em crianças e adolescentes e sua distribuição é semelhante em crianças do gênero feminino e masculino. O quadro clínico é caracterizado por hipertrofia do sistema retículo-endotelial, disfunção da medula óssea, linfadenomegalia, manifestações digestivas, hepatoesplenomegalia, envolvimento ósteo-articular e lesões cutâneas (LONDERO e MELO, 1983; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). Dependendo do grau de disseminação, a forma aguda pode ser subdividida em grave ou moderada. A forma

grave acomete principalmente órgãos linfáticos, fígado, baço e medula óssea. Já a forma moderada acomete somente um sistema ou uma cadeia linfática (FRANCO et al., 1987).



**Figura 3: Aspectos clínicos da PCM.** A – Forma aguda apresentando linfonodos aumentados, linfadenomegalia. B - Acometimento peri-oral e mentoniano na forma crônica. Fonte: Shikanai-Yasusa et al., 2006.

A PCM crônica apresenta evolução mais lenta, podendo levar anos até ser diagnosticada. Ocorre em mais de 90% dos casos e acomete adultos entre 30 e 60 anos, predominantemente do sexo masculino. O quadro clínico é caracterizado por manifestações pulmonares, presentes em 90% dos pacientes. Quando a infecção acomete somente um órgão é chamada de apresentação unifocal e quando está presente em mais de um órgão (pulmão, mucosa e pele) é chamada de multifocal. Os pulmões são os órgãos mais afetados, seguidos pela pele e membranas mucosas, oral e nasal principalmente (Figura 3B) (FRANCO et al., 1987; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). Os cinco principais aspectos patológicos descritos por Tuder e colaboradores (1985) em pacientes com PCM crônica foram: reação pneumônica, formação granulomatosa precoce, granulomas maduros, padrão misto (granuloma precoce e maduro na mesma área pulmonar) e fibrose pulmonar.

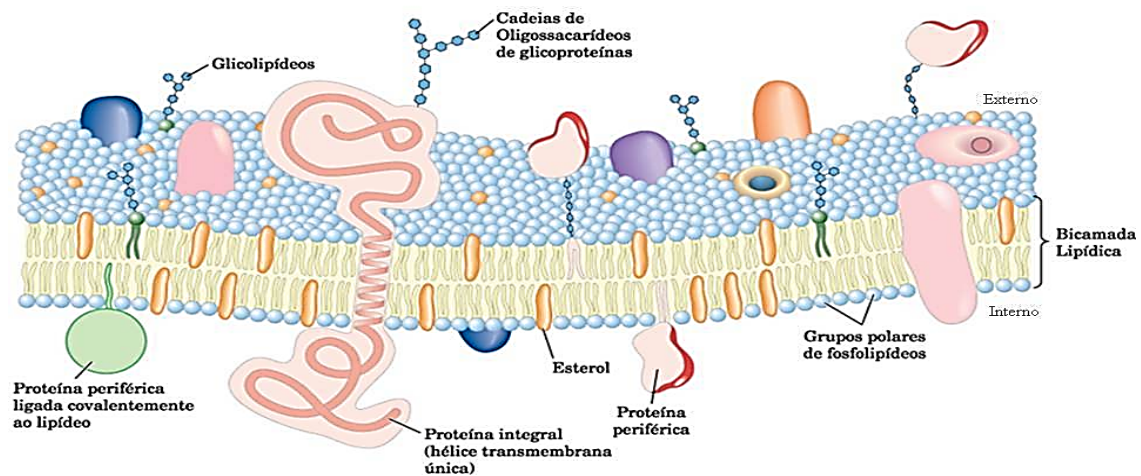
A cura espontânea não ocorre na PCM, por isso é necessária a realização do tratamento que inclui o uso de drogas antifúngicas, suporte nutricional, tratamento de eventual sequelas e prevenção de doenças oportunistas (SILVA e SARAIVA, 2008). As drogas antifúngicas utilizadas para o tratamento da PCM são: anfotericina B, sulfamídicos (sulfadiazina, associação sulfametoxazol/trimetoprim, sulfadoxina) e azólicos (cetoconazol, fluconazol, itraconazol). A avaliação da resposta do hospedeiro ao tratamento é realizada através de provas sorológicas específicas, que também são importantes para auxiliar no diagnóstico. De forma geral o tratamento é de longa

duração, mas não existe um consenso quanto à melhor droga a ser utilizada e quanto a duração do tratamento (BOCCA et al., 2013; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

## 1.2 Membranas celulares

A membrana plasmática desempenha importante papel nas células, funcionando como barreira física, regulando a troca de informações, íons e metabólitos entre a célula e o meio ambiente (EPHRITIKHINE et al., 2004). Além disso, as membranas são responsáveis pela compartimentalização intracelular de organelas, como núcleo, mitocôndria, retículo endoplasmático, aparelho de Golgi, lisossomos e vesículas secretoras (TAN et al., 2008).

As membranas são formadas por proteínas e lipídeos, que são responsáveis por quase toda a massa das membranas biológicas, e carboidratos, presentes como parte de glicoproteínas e glicolipídeos (Figura 4) (NELSON e COX, 2011).



**Figura 4: Estrutura da membrana celular.** Formada por proteínas e lipídeos e carboidratos. As proteínas integrais flutuam entre os lipídeos, mantidas por interações hidrofóbicas com as cadeias laterais de seus aminoácidos apolares. As porções de carboidratos ligadas a algumas proteínas e lipídeos da membrana plasmática são expostas na superfície extracelular da membrana. Fonte: Nelson e Cox, 2001.

Os principais lipídeos constituintes da membrana plasmática são os fosfolipídeos, que formam uma bicamada lipídica, na qual regiões apolares das moléculas lipídicas são

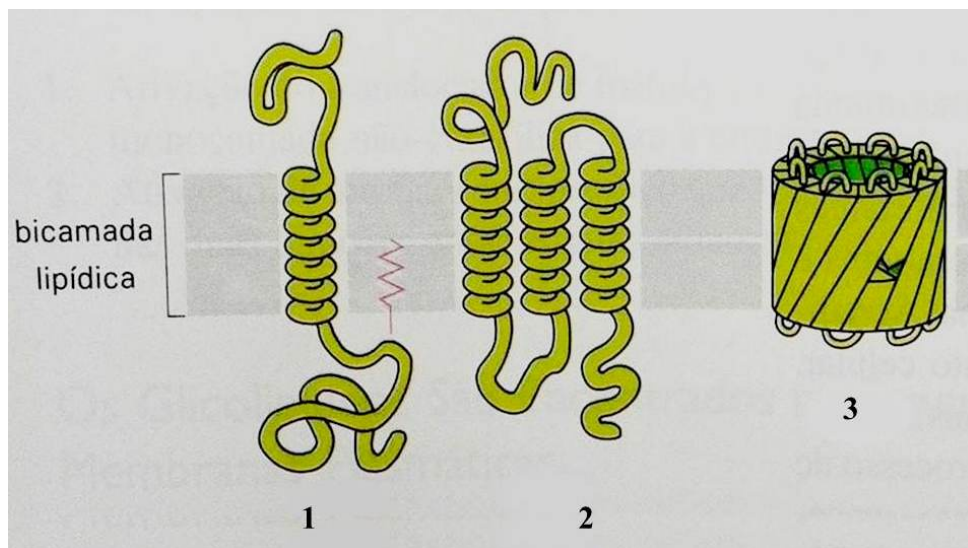
orientadas para o centro da bicamada e seus grupos polares são orientados para fora. As membranas são impermeáveis à maioria de solutos polares ou carregados e permeáveis a compostos apolares (ALBERTS et al., 2004; NELSON e COX, 2011).

As glicoproteínas são formadas por um ou mais oligossacarídeos de complexidades variadas covalentemente ligados a uma proteína. São encontradas na superfície externa da membrana plasmática, na matriz extracelular e no sangue. Desempenham papel fundamental em processos biológicos, incluindo adesão celular, dobramento de proteínas e transdução de sinal (NELSON e COX, 2011; VARKI, 1993). Já os glicolipídeos são esfingolipídeos de membrana, que são compostos por uma molécula de aminoálcool, uma molécula de ácido graxo de cadeia longa e um grupo polar que está unido por uma ligação glicosídica ou fosfodiéster. Estes esfingolipídeos são divididos em três subclasses de acordo com o grupo da cabeça: esfingomielinas, glicolipídeos neutros e gangliosídeos. As esfingomielinas contêm fosfocolina ou fosfoetanolamina como grupo polar da cabeça. Já os glicolipídeos neutros e gangliosídeos contêm oligossacarídeos simples e oligossacarídeos complexos ligados à ceramida, respectivamente (NELSON e COX, 2011).

A estrutura da membrana biológica, como modelo de mosaico fluido, foi inicialmente proposta por Singer e Nicolson (1972). De acordo com o modelo de mosaico fluido, a membrana biológica é formada por uma bicamada lipídica com proteínas embebidas. No entanto, no interior da bicamada existem regiões específicas em função, estrutura e composição denominadas plataformas lipídicas as quais englobam o colesterol e os esfingolipídeos. Estas plataformas muitas vezes são resistentes ao tratamento com detergentes e são insolúveis na presença de Triton (MALINSKY et al., 2013). Em células de *Saccharomyces cerevisiae* e animais, a associação de proteínas com estas plataformas lipídicas surgiu como importante regulador da transdução de sinal, da reorganização do citoesqueleto e da infecção por patógenos (MONGRAND et al., 2004).

A estrutura e função da bicamada lipídica são influenciadas pela constituição proteica. Diante da grande variedade de funções desempenhadas pelas proteínas de membrana (transporte, adesão celular, receptores de sinais, captação de nutrientes) existem muitas proteínas diferentes que permitem o bom funcionamento da célula e sua interação com o ambiente. Em eucariotos, estima-se que aproximadamente 30% genoma codifica proteínas de membrana (TAN et al., 2008).

De acordo com o tipo de associação, as proteínas de membrana podem ser classificadas em três categorias: as proteínas integrais de membrana (PIM), as periféricas e as proteínas ancoradas a membrana por glicosilfosfatidilinositol (GPI) (YADETA et al., 2013). As PIMs são anfipáticas (possuem regiões hidrofóbicas e regiões hidrofílicas), compostas de um ou mais domínios transmembrana e estão firmemente associadas à membrana pela interação hidrofóbica entre seus domínios hidrofóbicos e os lipídeos de membrana (Figura 5) (NELSON e COX, 2011; ALBERTS et al., 2004). Para ocorrer a inserção da proteína integral na membrana plasmática é necessária a presença de um peptídeo sinal na porção N-terminal da proteína para secreção e direcionamento à membrana através do retículo endoplasmático e aparato de Golgi (YADETA et al., 2013).



**Figura 5: Associação das proteínas à membrana celular.** Acredita-se que a maioria das proteínas transmembrana atravessam a bicamada como (1) uma  $\alpha$  hélice única, (2) como múltiplas  $\alpha$  hélices ou (3) como uma folha  $\beta$  pregueada (um barril  $\beta$ ). Algumas destas proteínas de “passagem única” ou de “múltiplas passagens” através da membrana têm uma cadeia de ácidos graxos covalentemente ligada, inserida na monocamada lipídica citosólica (1). Fonte: Alberts et al. 2004.

As ligações peptídicas na bicamada lipídica tendem a formar pontes de hidrogênio entre elas, pois são polares e há ausência de água. Assim, com o objetivo de formar pontes de hidrogênio, as PIMs podem formar dois tipos de estruturas, as  $\alpha$  hélices e conformação  $\beta$  (ALBERTS et al., 2004). Na conformação  $\beta$  as cadeias polipeptídicas atravessam a membrana várias vezes e são organizadas em cilindros fechados. A

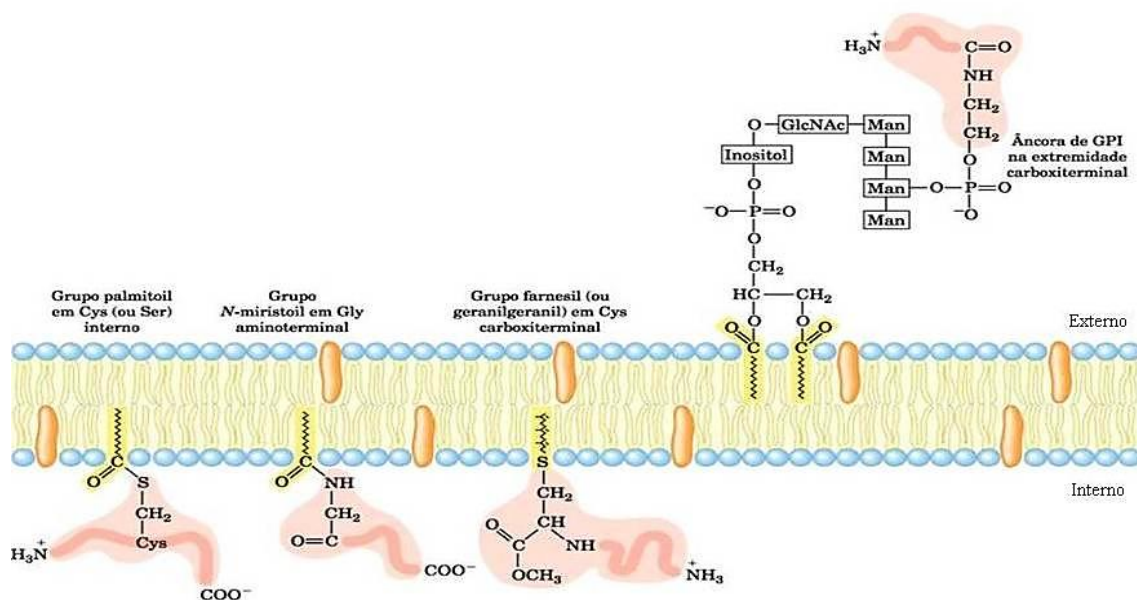
conformação  $\beta$  é encontrada na membrana externa de bactérias gram-negativas, mitocôndrias e cloroplastos, onde permite o efluxo/influxo passivo de pequenas moléculas (TORRES et al., 2003; SPEERS e WU, 2007). Proteínas contendo  $\alpha$  hélice são encontradas em todos os tipos de membrana, com exceção da membrana externa de bactérias gram-negativas e são constituídas por um ou mais domínios hidrofóbicos (OTT e LINGAPPA, 2002; TORRES et al., 2003).

As PIMs são classificadas em três tipos de acordo com as propriedades do domínio transmembrana. As proteínas do tipo I apresentam apenas um domínio transmembrana cuja porção N-terminal é orientada para o espaço extracelular. As proteínas do tipo II apresentam um domínio transmembrana e a porção N-terminal da proteína é voltada para o meio intracelular, enquanto as proteínas do tipo III constituem as proteínas multipasso, formadas por múltiplos domínios transmembrana cujas porções N- e C-terminais são orientadas para o espaço luminal ou extracelular (OTT e LINGAPPA, 2002; ALBERTS et al., 1994).

As PIMs possuem várias funções e são as únicas proteínas que podem atuar nos dois lados da bicamada ou transportar moléculas através dela. Estão envolvidas na comunicação intra- e extracelular, no reconhecimento da resposta imune, no controle da adesão celular, no controle dos processos metabólicos, no tráfego de vesículas, no transporte de íons, na propagação da cascata de sinalização e são alvos para muitos fármacos no tratamento de infecções (GILMORE e WASHBURN, 2010; TAN et al., 2008; OTT e LINGAPPA, 2002).

Outra categoria das proteínas de membrana são as proteínas periféricas (Figura 6). Estas proteínas não atravessam a membrana, mas são associadas à ela através de interações com os lipídios ou interações não-covalentes proteína-proteína (MARMAGNE et al., 2007; TAN et al., 2008). As proteínas periféricas estão localizadas na parte citosólica da membrana e estão envolvidas nos processos de sinalização da membrana plasmática com o interior da célula (YADETA et al., 2013). As interações com os lipídios ocorrem através de modificações pós-traducionais (MPTs), que podem ocorrer no citoplasma ou na face citoplasmática da membrana e no lúmen da via secretora. As modificações que ocorrem no citoplasma são a miristoilação, palmitoilação e a prenilação. Outra modificação pós-traducional que ocorre no lúmen da via secretora é a fixação de âncoras glicosilfosfatidilinositol (GPI) (NADOLSKI e LINDER, 2007).

Na miristoilação a enzima N-miristoil transferase catalisa a transferência do miristato (ácido graxo saturado de 14 carbonos) de miristoil-CoA para substrato peptídico ou proteico adequado. O miristato é especificamente ligado ao resíduo de glicina N-terminal via ligação amida. Proteínas destinadas à miristoilação apresentam uma sequência N-terminal formada pelos aminoácidos metionina e glicina. Muitas proteínas miristoiladas são encontradas na membrana (membrana plasmática ou membranas intracelulares) e vários estudos comprovaram que a miristoilação é necessária para a ligação de proteínas à membrana (RESH, 1999). Já a palmitoilação, é catalisada pela classe das palmitoil-transferases (PATs) ligadas à membrana. Ocorre através da adição reversível do palmitato, um ácido graxo saturado de 16 carbonos, por meio de uma ligação tioéster ao resíduo de cisteína da proteína. Como a palmitoilação é reversível, uma outra classe de enzima atua sobre a regulação do estado de palmitoilação, as aciltioesterases, responsáveis pela remoção do palmitato das proteínas. A palmitoilação também ocorre nas PIMs e nas proteínas que se associam à membrana por interações. Assim, por ser uma ligação reversível e por atuar em proteínas que já estão presentes na membrana, a palmitoilação pode ser caracterizada como um sinal secundário para a associação das proteínas à membrana (GREAVES e CHAMBERLAIN, 2007; NADOLSKI e LINDER, 2007).



**Figura 6: Proteínas de membrana ligadas a lipídeos.** Lipídeos ligados covalentemente ancoram proteínas de membrana à bicamada lipídica. Um grupo palmitoil é mostrado ligado via ligação tioéster a um resíduo de Cys. Um grupo N-miristoil geralmente é ligado a uma Gly aminoterminal; os grupos farnesil e geranylgeranil ligados a resíduos de Cys carboxitermais

são isoprenoides de 15 a 20 carbonos, respectivamente. Todos estes conjuntos de lipídeos-proteínas são encontrados apenas na face interna da membrana. Âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI) são derivadas do fosfatidilinositol, no qual o inositol conduz um oligossacarídeo pequeno covalentemente ligado por meio da fosfoetanolamina, ao resíduo carboxiterminal de uma proteína. Proteínas ligadas ao GPI estão sempre na face extracelular da membrana plasmática. Fonte: Nelson e Cox, 2011.

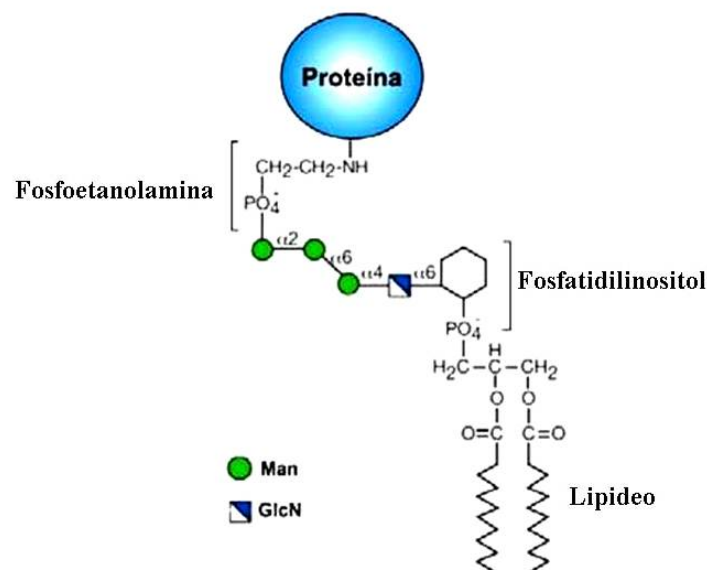
Outra modificação lipídica pós-traducional é a prenilação, envolvida em processos de direcionamento de proteínas à membrana. Na prenilação ocorre a adição de um isoprenóide, farnesil de 15 carbonos, ou geranil de 20 carbonos, ao resíduo de cisteína próximo a porção C-terminal da proteína através de uma ligação tioéster. Três enzimas catalisam a adição do isoprenóide à proteína, são elas: farnesiltransferase (FTase), geranil-transferase do tipo I e geranil-transferase do tipo II. A FTase e a geranil-transferase do tipo I transferem os grupos farnesil e geranil, respectivamente, à proteínas com motivo CaaX, sendo que (C) é uma cisteína, (aa) aminoácido alifático e (X) um aminoácido variado que determina qual enzima atuará sobre a proteína. Já a geranil-transferase do tipo II transfere o grupo geranil a proteínas com motivo CxC (cisteína, aminoácido variado, cisteína) ou CC (cisteína/cisteína) (MOORES et al., 1991; ZHANG e CASEY, 1996).

A modificação pós-traducional que ocorre no lúmen da via secretora é a fixação de âncoras glicosilfosfatidilinositol (GPI). Caracterizando a terceira categoria de proteínas de membrana estas âncoras associam proteínas à superfície externa da membrana plasmática (ENGLUND, 1993; NADOLSKI e LINDER, 2007). A associação ocorre através da ligação da âncora GPI em um motivo existente na região C-terminal da proteína (FERGUSON et al., 1988). A âncora GPI é composta por um grupo inositol e glicosamina, três grupos manose e um grupo fosfoetanolamina, que é o ponto onde ocorre a ligação da âncora com a região C-terminal da proteína (PITTET e CONZELMANN, 2007) (Figura 7). As proteínas que se associarão à membrana pela âncora GPI contêm um peptídeo sinal na porção N-terminal, que direciona a proteína ao retículo endoplasmático e um segundo sinal para a ligação à âncora GPI na porção C-terminal da proteína (CARAS et al., 1987).

Estudo realizado com o objetivo de avaliar o perfil transcricional de *Paracoccidioides* sp. (Pb01) durante as etapas iniciais da transição de micélio para levedura, por meio de análises das sequências expressas (do inglês Expressed Sequence



Tags, EST), revelaram aumento da expressão de genes envolvidos no remodelamento e biossíntese da parede celular e membrana plasmática. Trinta e quatro genes, relacionados à parede celular e membrana, apresentaram expressão aumentada em resposta à mudança na temperatura. Genes que codificam a enzima ácido graxo desaturase (desA) e as enzimas da via de biossíntese do ergosterol foram induzidos. A presença destas duas classes de enzimas evidencia que durante a transição de micélio para levedura o remodelamento da membrana é ativado (BASTOS et al., 2007). Além disso, proteínas da família beta-1,3-glucanosiltransferase, que são associadas à membrana plasmática através da âncora de GPI, foram caracterizadas em *Paracoccidioides*. Estudo em *S. cerevisiae* demonstrou que a diminuição da atividade da proteína da família beta-1,3-glucanosiltransferase promove alterações na parede celular. Estas alterações leva à diminuição no crescimento, alteração na morfologia celular, sensibilidade ao fluorocromo que se liga a quitina e aumento da permeabilidade da parede celular (LIMA et al., 2012; POPOLO e VAI, 1999; CASTRO et al., 2009; RAM et al., 1998).



**Figura 7: Estrutura geral de uma âncora GPI ligando uma proteína à membrana plasmática:** A proteína é ancorada à fosfoetanolamina através de sua extremidade C-terminal. Man, manose; GlcN, glicosamina. Adaptação: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=glyco2&part=ch21>

### **1.3 Importância dos íons metálicos em processos celulares**

Os íons metálicos são elementos vitais que participam de numerosos processos metabólicos em todos os tipos celulares, sendo ligados diretamente ao metabolismo do DNA e ao processamento pós-transcricional da maioria das proteínas. Assim, alterações nas concentrações celulares dos íons metálicos podem causar danos aos elementos metabólicos vitais, que podem conduzir à morte celular (NELSON, 1999).

Ferro, cobre e zinco são os três metais cuja oferta suficiente é essencial para proliferação do organismo. Sob a forma heme e ferro-enxofre, o ferro é um cofator essencial de várias enzimas, transportadores de oxigênio e de sistemas de transferência de elétrons envolvidos em funções celulares vitais que vão desde a respiração até a replicação do DNA (SCHAIBLE e KAUFMANN, 2004). É requerido para biossíntese de aminoácidos, proteínas, esteróis e ácidos graxos e para o metabolismo de xenobióticos (SHAKOURY-ELIZEH et al., 2010). O cobre é um íon metálico redutor essencial para os organismos aeróbios, que também atua como cofator catalítico e estrutural para as enzimas envolvidas na geração de energia, aquisição de ferro, transporte de oxigênio e o metabolismo celular (KIM et al., 2008a).

Assim como o ferro e o cobre, o zinco é um metal de extrema importância para o desenvolvimento do organismo. O zinco forma o centro catalítico em numerosas enzimas, desempenha papéis importantes na funcionalidade e na definição da forma de uma grande variedade de proteínas (apesar de não ser um metal redutor ativo), previne a formação de radicais livres, participa dos processos de divisão e diferenciação celulares e garante o funcionamento correto de vários tecidos, órgãos e sistemas (MOCHEGANI e MUZZIOLI, 2000; VAN HO et al., 2002).

Apesar da grande importância para o desenvolvimento do organismo, ferro, cobre e zinco podem ser tóxicos se os seus níveis e distribuição não forem regulados (PENA et al., 1999; RUTHERFORD e BIRD, 2004; EIDE, 2003; FINNEY e O'HALLORAN, 2003). O excesso de zinco pode provocar a ligação do metal a sítios impróprios em proteínas ou cofatores, tornando-se tóxico para célula (EIDE, 2003). Por outro lado, se os níveis destes metais estiverem abaixo do necessário, podem ocorrer consequências graves como anemia e alterações no sistema imune, em humanos (MACDIARMID et al., 2000). Assim, os organismos expressam uma variedade de mecanismos de captação para absorvê-los. Dentre os mecanismos que já foram

identificados e estudados destaca-se o controle da transcrição de genes envolvidos na aquisição, distribuição e armazenamento de metais (RUTHERFORD e BIRD, 2004).

A capacidade de invasores microbianos obterem micronutrientes (metais) a partir do hospedeiro é um componente importante de virulência. Para impedir o crescimento microbiano o hospedeiro limita as concentrações destes metais, processo conhecido como imunidade nutritiva (WEINBERG, 2009; APPELBERG, 2006). Estudo realizado com *Staphylococcus aureus* identificou uma proteína do hospedeiro, calprotectina, que inibiu o crescimento de *S. aureus* dentro do abscesso através da quelatação de nutrientes  $Mn^{+2}$  e  $Zn^{+2}$  resultando na reprogramação do transcrito da bactéria. Este resultado define que a quelatação de metal é uma estratégia imune para controlar a infecção, uma vez que em abscessos sem calprotectina ocorreu proliferação microbiana (CORBIN et al., 2008).

A homeostase de zinco é mantida em *S. cerevisiae* através da atividade regulada de proteínas transportadoras presentes na membrana plasmática e na membrana de compartimentos intracelulares. Esta regulação é mediada em ambos os níveis, transcricional e pós-traducional e ocorre em resposta a alterações dos níveis de zinco intracelulares (EIDE, 2003). Em *S. cerevisiae* a captação de zinco é mediada por dois sistemas (Figura 8). O sistema de captação de alta afinidade, o qual é ativo em condições limitadas de zinco (ZHAO e EIDE, 1996b), e o sistema de captação de baixa afinidade, que é ativo na presença de concentrações suficientes de zinco (ZHAO e EIDE, 1996a). A expressão e a atividade do transportador de zinco de alta afinidade, Zrt1, e do transportador de zinco de baixa afinidade, Zrt2, são regulados por dois fatores de transcrição, Zap1 e o Mtf1, e em nível pós-traducional (ZHAO e EIDE, 1997; GITAN et al., 1998).

Estes transportadores de zinco de alta e baixa afinidade são codificados pelos genes ZRT1 e ZRT2 e pertencem à família ZIP. O nome desta família refere-se aos primeiros membros que foram caracterizados funcionalmente, os transportadores de zinco Zrt1 e Zrt2 (zinc-regulated transporter) em *S. cerevisiae* e o transportador de ferro Irt1 (iron-regulated transporter) em *Arabidopsis thaliana* (EIDE, 2004). Os transportadores desta família, que estão associados com o transporte de zinco, transportam o metal do meio extracelular para o citoplasma ou intracelular através das membranas celulares (GAITHER e EIDE, 2001); a maioria destas proteínas transportadoras tem oito domínios transmembrana-DTM (EIDE, 2004). Outro gene que pertence à família ZIP foi identificado por Macdiarmid e colaboradores (2000), o ZRT3,

que está localizado na membrana de vacúolos que acumulam zinco, os chamados “zincosomos”. Este gene codifica uma proteína que transporta zinco do interior do vacúolo para o citoplasma (SIMM et al., 2007).

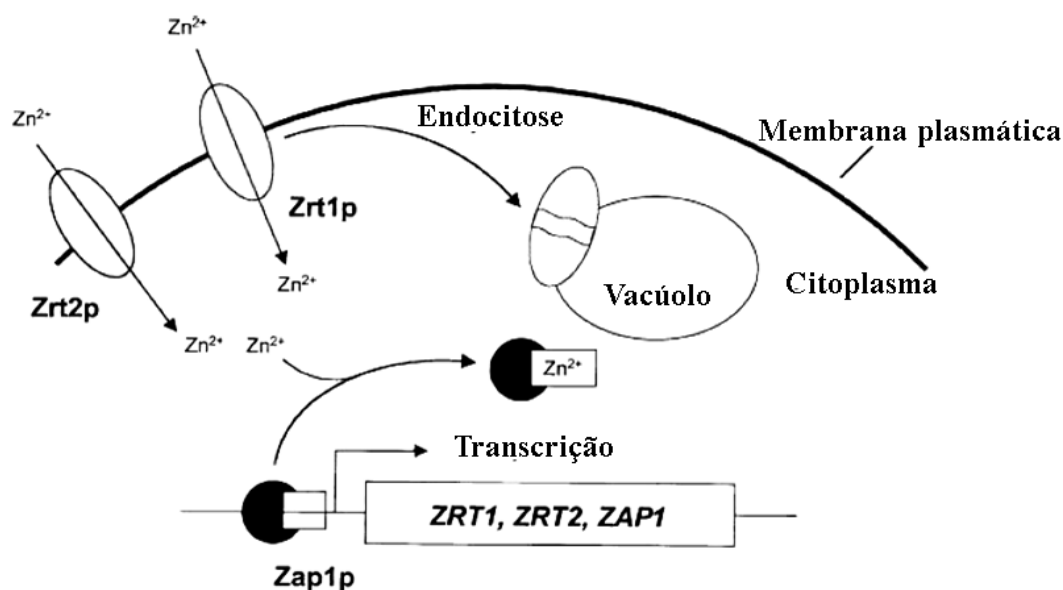
Outra família de transportadores de zinco é a CDF (*Cation Diffusion facilitator/Facilitador de difusão de cátions*) que é dividida em diferentes sub-grupos de acordo com a similaridade de sequências das proteínas. Os transportadores pertencentes a esta família transportam o zinco do meio intracelular para o meio extracelular (direção oposta à das proteínas da família ZIP) ou do meio intracelular para dentro de organelas (vacúolo) (GAITHER e EIDE, 2001).

O controle da expressão gênica em resposta à deficiência de zinco é feito por dois fatores de transcrição, o fator de transcrição responsivo ao zinco Zap1 e o Mtf1. O ZAP1 codifica um ativador transcricional que, em *S. cerevisiae*, induz a expressão de ZRT1 e ZRT2 (RUTHERFORD e BIRD, 2004). O Mtf1, em humanos, desempenha um papel central na proteção das células contra a toxicidade de zinco (RUTHERFORD e BIRD, 2004). Em *Candida albicans*, Kim e colaboradores (2008b) identificaram um fator de transcrição responsivo ao zinco, Csr1 (*Candida Supressor of ROK1*), que é codificado por um gene homólogo ao gene ZAP1 em *S. cerevisiae*. Em *Aspergillus fumigatus*, Moreno e colaboradores em 2007 evidenciaram o papel do gene ZAFA (*zinc-responsive transcriptional activator*), homólogo à ZAP1 de *S. cerevisiae*. Este gene codifica um fator de transcrição para proteínas responsivas ao zinco na regulação da homeostase de zinco e na virulência (MORENO et al., 2007).

A regulação do transportador Zrt1 em nível pós-traducional ocorre quando a célula, sob baixas concentrações de zinco, é exposta a níveis elevados de zinco extracelular. Esta exposição provoca a internalização da proteína Zrt1 através de endocitose e sua subsequente degradação no vacúolo. Assim, a regulação pós-traducional limita a absorção de zinco impedindo a acumulação potencialmente prejudicial do metal (GITAN et al., 1998).

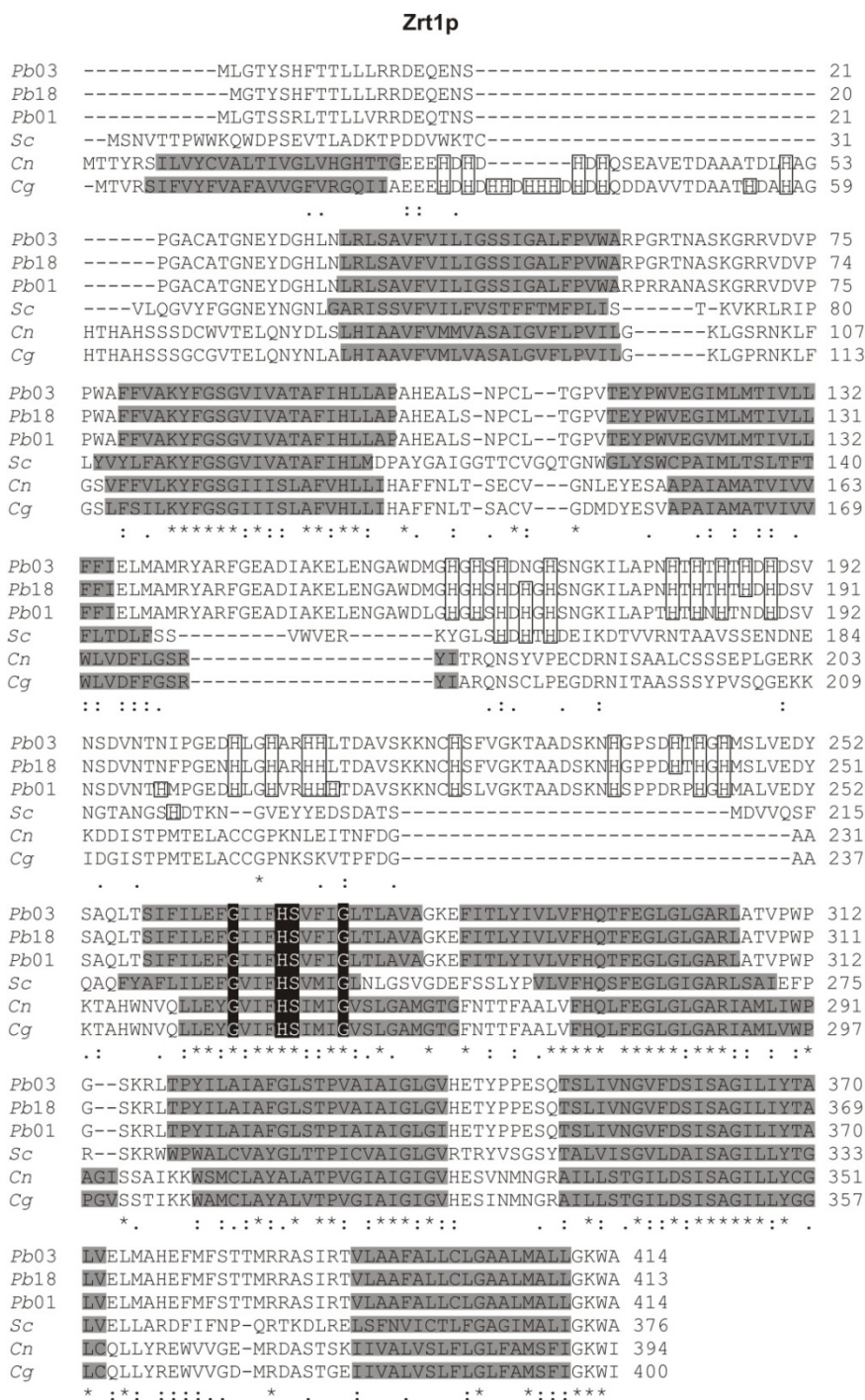
Estudos prévios têm demonstrado que o vacúolo é um importante local de estoque de zinco e que a concentração de zinco nesta organela é controlado pelo fator de transcrição Zap1. O transporte de zinco do meio intracelular para dentro do vacúolo ocorre através de transportadores, Zrc1 e Cot1, localizados na membrana vacuolar, que pertencem à família CDF (WHITE e GADD, 1987; MACDIARMID et al., 2000; SIMM et al., 2007). O armazenamento de zinco no vacúolo provavelmente é um importante

fator durante o processo de infecção, já que uma resposta do hospedeiro é diminuir a disponibilidade de zinco para o patógeno (LULLOFF et al., 2004).



**Figura 8 – Modelo do transporte de zinco (Zn).** Zrt1p (alta afinidade) e Zrt2p (baixa afinidade) transportam Zn<sup>+2</sup> para dentro da célula. Os genes que codificam Zrt1p e Zrt2p são regulados transcricionalmente pela atividade de Zap1p, que ativa a transcrição sob condições de limitação de zinco. Em nível pós-traducional, Zrt1p sofre endocitose e é degradado dentro dos vacúolos. Modificado: Van Ho et al. (2002).

Análise do genoma de *Paracoccidioides* spp. revelou ortólogos aos transportadores de zinco que foram previamente descritos em fungos e que são localizados na membrana plasmática, vacuolar e do retículo endoplasmático. Genes que codificam para transportadores da família ZIP, com homologia para Zrt1 (Figura 9) ou Zrt2 de *S. cerevisiae*, estão no banco de dados do genoma de *Paracoccidioides* spp.. Um total de cinco genes, que codificam transportadores de zinco, foram identificados de acordo com análise genômica. O isolado *Pb01* apresenta 5 transportadores de zinco, codificado pelos genes ZRT1, ZRT2, ZRT3, ZRC1 e COT1, sendo os três últimos de membrana vacuolar. Já os isolados *Pb03* e *Pb18* possuem quatro genes (COT1, ZRT1, ZRT2 E ZRT3). Um ortólogo para o fator de transcrição Zap1p de *S. cerevisiae* também está presente nos três isolados de *Paracoccidioides* spp. (SILVA et al., 2011).



**Figura 9 - Alinhamento de seqüências de aminoácidos de *S. cerevisiae*, *Paracoccidioides* spp. e espécies de *Cryptococcus*. Os domínios transmembrana previstos estão apresentados em caixas cinza. As caixas pretas no interior do segmento transmembrana contém resíduos conservados de histidina-serina e glicina. As histidinas encontradas na região amino-terminal de Zrt1p de espécies de *Cryptococcus* e no laço entre domínios transmembrana III e IV em *Paracoccidioides* spp. e *S. cerevisiae* são encaixotadas. Os asteriscos indicam identidade de aminoácidos e pontos representam substituições conservadas. Adaptado: Silva et al., 2011.**

Bailão e colaboradores (2006) desenvolveram um estudo com o objetivo de identificar genes envolvidos na adaptação e sobrevivência de *Paracoccidioides* spp. no hospedeiro durante a infecção. Transcritos homólogos à Zrt1 foram induzidos durante o processo infectivo e em condições que mimetizam a via hematogênica de disseminação fúngica. Estes transcritos foram observados em estudos realizados por Bailão e colaboradores (2007) ao analisarem células do fungo incubadas com plasma humano durante 10 e 60 minutos.

Análise proteômica de leveduras de *Paracoccidioides* spp. submetidas à privação de zinco permitiu a identificação de 100 proteínas que foram diferencialmente reguladas, sendo que, 46 foram induzidas e 54 foram reprimidas. Proteínas relacionadas à virulência, resgate celular e resposta ao estresse foram induzidas. Outro processo induzido pela privação de zinco foi a gliconeogênese, enquanto o ciclo do metilcitrato foi reprimido (PARENTE et al., 2013).

Estudos tem mostrado que o zinco é um micronutriente essencial para proliferação de fungos patogênicos. Foi demonstrado que a privação de zinco é um mecanismo de defesa do hospedeiro utilizado pelos macrófagos durante a infecção por *Histoplasma capsulatum*. Winters e colaboradores (2010) observaram que durante a infecção há redução dos níveis de  $Zn^{+2}$  e  $Fe^{+2/+3}$  em macrófagos (Mφ) ativados com GM-CSF (fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos) em comparação com Mφ não ativados. A quelação de  $Zn^{+2}$  no meio e no interior de Mφ não ativados reduziu o crescimento do *H. capsulatum*. Diante destes resultados os autores concluíram que o zinco é requerido para o crescimento de *H. capsulatum* no meio e pode influenciar o crescimento intracelular. Posteriormente foi demonstrado que GM-CSF regula a expressão de exportadores de Zn (Slc30a4 e Slc30a7), que transportam o zinco dos fagossomos para dentro do aparato de Golgi. O aparato de Golgi atua como um local de armazenamento de Zn livre ou como um “depósito de Zn” restringindo o acesso ao Zn por patógenos intracelulares, reservando-o para a função fagocitária. Além disso, foi demonstrado que macrófagos ativados com GM-CSF sequestram o zinco livre induzindo a sua ligação a metalotioneínas. Conseqüentemente, a replicação e o processo de infecção fúngica por *H. capsulatum* foi interrompido pela privação de Zn. Estas estratégias de sequestro de zinco livre em macrófagos ativados aumentou o estresse oxidativo, que também inibiu o crescimento de *H. capsulatum* (VIGNESH et al., 2013; PALMITER e HUANG, 2004; MCCORMICK et al., 2010).

Diante da importância do metal, do fato de transcritos serem expressos durante o processo infectivo e em condições que mimetizam a via hematogênica de disseminação fúngica, juntamente com a diferença de expressão das proteínas durante a privação de zinco tem-se como perspectiva ampliar os estudos da homeostase deste metal em *Paracoccidioides* spp. principalmente sob ênfase das proteínas das membranas celulares. Para tal estudo a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (NanoUPLC) acoplada ao espectrômetro de massas foi utilizada. Esta técnica permite a análise de amostras complexas de forma eficiente e com alta sensibilidade (LIMA et al., 2014; BAILAO et al., 2014).



## 2. JUSTIFICATIVA

Proteínas de membranas celulares são importantes no crescimento e desenvolvimento celulares e durante o processo de interação patógeno-hospedeiro, participam de inúmeros processos como transporte de nutrientes e íons, adesão celular, resposta ao estresse, produção de energia, captação de estímulos ambientais e captação de nutrientes. Dentre estes nutrientes destacam-se os íons metálicos que são importantes para o metabolismo e desenvolvimento dos organismos. Assim, quando estes micronutrientes estão em concentrações limitadas no meio, os organismos empregam mecanismos para captá-lo, o que é considerado um fator de virulência.

Estudos prévios realizados no Laboratório de Biologia Molecular, revelaram que *Paracoccidioides* spp. possui transportadores de zinco de alta e baixa afinidades, os quais são expressos em condições que mimetizam o processo infeccioso. Além disso, foi observado que a deficiência de zinco induz proteínas citoplasmáticas relacionadas com a resposta ao estresse oxidativo. Diante destes resultados, o estudo das proteínas de membranas do fungo expressas em condições de privação de zinco, um ambiente que mimetiza o encontrado no hospedeiro, se torna importante para compreensão dos mecanismos utilizados pelo patógeno para a obtenção deste nutriente essencial.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

O objetivo geral é identificar as proteínas de membranas de *Paracoccidioides* sp. diferencialmente expressas sob condição de privação de zinco.

#### **3.2 Específicos**

→Obter fração enriquecida de membranas e realizar de microscopia eletrônica de transmissão (MET);

→Obter o extrato proteico da fração enriquecida de membranas de *Paracoccidioides* sp. na presença (controle) e ausência (tratado) de zinco;

→Digerir, identificar e classificar funcionalmente as proteínas da fração enriquecida de membranas diferencialmente expressas em condições de privação de zinco;

→Realizar análises *in silico* das proteínas identificadas à fim de identificar a localização subcelular, a presença de domínio transmembrana, a associação com membrana, a presença de peptídeo sinal e classificação funcional;

→Sugerir mecanismos utilizados por *Paracoccidioides* sp. na homeostase de zinco relacionados à fração de membranas do fungo.

## 4. MANUSCRITO

### Proteomic analysis of *Paracoccidioides* sp. membranes during zinc deprivation

SILVA, M.G.<sup>1</sup>; de CURCIO, J.S.<sup>1</sup>; BAILÃO, M.G.S.<sup>1</sup>; CASALETTI L.<sup>1</sup>; BÁO, S. N.<sup>2</sup>; BAILÃO, A.M.<sup>1</sup>; BORGES C.L.<sup>1</sup>, SOARES, C.M.A<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil. <sup>2</sup>Laboratório de Microscopia, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil. e-mail: [cmsoares@gmail.com](mailto:cmsoares@gmail.com)

#### Abstract

*Paracoccidioides* spp. are a pathogenic fungi that causes paracoccidioidomycosis, an important systemic mycosis in Latin American countries. The plasma membrane constituted of a lipid bilayer with associated proteins is involved in different processes during the establishment of infection, such as transport of nutrients and homeostatic regulation. As zinc is a metal that plays an important role in the regulation of host-pathogen interaction and changes in this micronutrient homeostasis are implicated in the pathogenesis of infectious diseases, the aim of this study was to identify the membrane proteins of *Pb01* expressed under condition zinc deprivation. NanoUPLC-MS<sup>E</sup> technique was employed in order to identify membrane proteins of yeast cells grown in chemically defined media in the presence (0.03 mM de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) and absence (0.05 mM de TPEN) of zinc. After obtaining protein extracts, transmission electron microscopy was performed to confirm the enrichment with membranes of *Paracoccidioides* sp. Subsequently, the samples were digested and analyzed by NanoUPLC-MSE. *In silico* analysis allowed the determination of the location of 460 proteins identified in the protein extracts of *Pb01* grown in + Zn (control) and TPEN (treated) medium. Of the total identified proteins, 141 were classified as belonging to membranes plasmatic, mitochondrial, peroxisome, the endoplasmatic reticulum and the golgi complex. Of these 120 proteins were repressed and 21 were induced during zinc deprivation. Among the 141 membrane proteins, 81 proteins showed transmembrane domain and 9 were classified as membrane by post-transcriptional modification. A total of 15 membrane proteins showed signal peptide. With these results we observed that phospholipid metabolism and cell integrity were affected by zinc deprivation.

## Introduction

Zinc is a metal of importance to the development of organisms. It serves as a structural or catalytic cofactor for many proteins and participates in the processes of cell division and differentiation (MOCCHIGIANI and MUZZIOLI, 2000). If levels and distribution of this metal are not controlled, the excess can be toxic to the cell (FINNEY and O'HALLORAN, 2003). The zinc homeostasis is maintained at both the transcriptional and post-translational levels and occurs in response to changes in the zinc intracellular levels (EIDE, 2003).

The uptake of zinc in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by two systems. The high-affinity uptake system, that is active in zinc limited conditions (ZHAO and EIDE, 1996b), and the low-affinity uptake system that is active in the presence of sufficient concentrations of zinc (ZHAO and EIDE, 1996a). The expression and activity of the high-affinity zinc transporter (Zrt1) and low-affinity zinc transporter (Zrt2) are regulated by the transcription factor Zap1 and at the posttranslational level (ZHAO and EIDE, 1997; GITAN et al., 1998). In conditions of zinc limitation Zap1 induces the expression of Zrt1 and Zrt2 (RUTHERFORD and BIRD, 2004). The regulation at the posttranslational level occurs when the cell under low zinc concentration is exposed to high extracellular levels of zinc. This exposure causes the internalization of Zrt1 protein via endocytosis and subsequent degradation in the vacuole (GITAN et al., 1998).

The plasma membrane plays an important role in cells, acting as a physical barrier, regulating the exchange of information, ions and metabolites between the cell and the environment (EPHRITIKHINE et al., 2004). Moreover, the membranes are responsible for the intracellular compartmentalization of organelles (TAN et al., 2008). The structure and function of the lipid bilayer are influenced by the protein composition. The membrane proteins perform a variety of functions such as transport, cell adhesion, signal receptors and nutrient uptake. Zinc transporters (Zrt1 and Zrt2) are located in the plasma membrane depending on the concentration of zinc in the medium (TAN et al., 2008; GITAN et al., 1998).

*Paracoccidioides* is pathogenic thermodimorphic fungus that causes paracoccidioidomycosis, an important systemic mycosis in Latin American countries. In host tissue or *in vitro* at 36°C this organism grows as yeast and in the environment or when grown at temperatures below 28 ° C grows in the mycelial form (BAGAGLI et al., 2006). The main route of infection by *Paracoccidioides* spp. is inhalation. Conidia

and/or propagules produced by the mycelial form, after being inhaled, reach the pulmonary alveoli and transit to pathogenic yeast form (MCEWEN et al., 1987).

Due to relevance of micronutrients to fungal homeostasis and pathogenesis, our group has conducted studies with several metals in *Paracoccidioides* spp. *In silico* analysis demonstrated that *Paracoccidioides* spp. has genes that encode zinc transporters of the ZIP family with homology to *S. cerevisiae* Zrt1 and Zrt2 (SILVA et al., 2011). It was demonstrated that these *Paracoccidioides* sp. homologous genes are induced under zinc deprivation (PARENTE et al., 2013). In addition, it was observed that zinc deficiency induces cytoplasmic proteins related to oxidative stress response, such as thioredoxin, glutathione reductase and thioredoxin reductase (PARENTE et al., 2013). In the present work we performed proteomic analysis of *Paracoccidioides* sp. membranes during zinc deprivation by using NanoUPLC-MS<sup>E</sup> strategy. We identified 460 proteins differentially regulated, of which 156 were up regulated and 304 were down regulated under zinc deficiency. A total of 141 membrane proteins were identified in our analysis. We observed that phospholipid metabolism and cellular integrity were affected by zinc deprivation.

## **Materials and methods**

### **Fungal isolate and culture conditions**

The experiments were performed with *Pb01* (ATCC MYA-826) of *Paracoccidioides lutzii*. The yeast phase was grown *in vitro* for five days in Fava Netto's solid medium (FAVA-NETTO, 1955) at 36°C. Fava Netto's solid medium components are the following: 1% (w/v) peptone, 0.5% (w/v) yeast extract, 0.3% (w/v) proteose peptone, 0.5% (w/v) beef extract, 0.5% (w/v) NaCl, 4% (w/v) glucose, 1.2% (w/v) agar, pH 7.2.

### **Obtainment of the cells in the yeast phase**

After five days of growth in the medium above, the yeast cells were inoculated in Fava Netto' liquid medium for 72 h at 36°C, 150 rpm. Posteriorly, the yeast cells were centrifuged at 1,200 g for 10 min at 4°C and washed in sterile phosphate buffered saline 1 x (PBS 1X - 0.14 mM NaCl, 2.7 mM KCL, 1.8 mM KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.2). The supernatant was discarded and the cells were then resuspended in PBS 1X. The cells were inoculated in McVeigh/Morton' liquid medium, (MMcM - 4% (w/v) glucose, 0.15% (w/v) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% (w/v) MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.015% (w/v) CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0.2% (w/v) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.2% (w/v) L-Asparagine, 0.02% (w/v) L-Cystine, 1% (v/v) vitamin supplement, 0.1% (v/v) trace elements supplement, pH 7.0) (RESTREPO and JIMENEZ, 1980) for 24 h at 36°C under agitation of 150 rpm. Posteriorly, the cells were centrifuged at 1,200 g for 10 min at 4°C and washed in PBS 1X. The supernatant was discarded and the cells were then resuspended in PBS 1X. The cells were counted in a Neubauer' chamber, and 2 x 10<sup>6</sup> cells/mL were inoculated in MMcM medium with ZnSO<sub>4</sub> and in MMcM medium supplemented with the zinc chelator, as described below (PARENTE et al., 2013).

### **Cultivation of the fungus in conditions of zinc deprivation**

The yeast cells (2 x 10<sup>6</sup> cells/mL) were grown in MMcM medium in the presence (control - 30 μM ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) and absence of zinc. The depleted medium was prepared without addition of ZnSO<sub>4</sub> and supplemented with the zinc chelator N,N,N,N-tetrakis (2-pyridyl-methyl) ethylenediamine (TPEN; Sigma Aldrich, Co., St. Louis, MO) at a concentration of 0.05 mM. The cultures were incubated with gentle shaking at 36°C for 24 h. The time of cell exposure to zinc starvation was determined by cell viability analysis (PARENTE et al., 2013).

### **Extraction of membrane proteins**

The protocol described by Vidakovics and colleagues (2007) was used with some modifications. The yeast cells cultured in MMcM medium (with ZnSO<sub>4</sub> and zinc chelator) were centrifuged at 1,200 x g for 10 min at 4°C, frozen in liquid nitrogen, and disrupted by maceration using a mortar and pestle until a fine powder was obtained (DA FONSECA et al., 2001). After this step, the sample was transferred to a conical tube and resuspended in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5. Glass beads were added to the conical tube, and after agitation for 20 min at 4°C, the sample was subjected to centrifugation at 8,000 g for 10 min at 4°C. The supernatant was diluted in 10 mL of 0.1 M sodium carbonate (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) pH 11, and slowly stirred on ice, for 1 h. The carbonate-treated sample was submitted to ultracentrifugation in a Beckman Coulter Optima L-

90K centrifuge at 115,000 g for 1 h, at 4°C. The supernatant was discarded and the pellet containing the membrane fraction was resuspended in 8 mL of 50 mM Tris/HCL pH 7.5 using a glass homogenizer (grinder) in ice to solubilize the membranes fraction. The sample was submitted the other step of ultracentrifugation at 115,000 g for 1 h at 4°C. Part of the formed pellet was removed for performing transmission electron microscopy (TEM) and the remainder was resuspended in 50 mM ammonium bicarbonate pH 8.0 and stored at – 80°C.

### **Transmission Electron Microscopy (TEM)**

The transmission electron microscopy was performed to confirm the quality of the obtained sample. For the realization of the TEM of the membrane fraction the procedures employed were based on the methodology described by Barbosa and colleagues (2006) with some modifications. The sample of the membrane fraction was fixed in 2% (w/v) paraformaldehyde, 2% (v/v) glutaraldehyde, in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2, for 2 h at room temperature. After washing in 0.1 M sodium cacodylate buffer pH 7.2, the sample was post fixed in 1.6% (w/v) (1:1) solution of osmium tetroxide and potassium ferrocyanide for 1 h. Another washing in 0.1 M sodium cacodylate buffer pH 7.2 and in distilled water, was performed and the sample was maintained for 12 h in the solution of 0.5 % (v/v) aqueous uranyl acetate at 4°C. The sample was washed in distilled water, and dehydrated in an ascending series of acetone (v/v) (30, 50, 70, 90, and 100 %). The inclusion of the material occurred in a mixture of (3:1) acetone/ Spurr resin (*Electron Microscopy Sciences, Co*) for 6 h, (2:1) acetone/Spurr resin overnight, (1:1) acetone/Spurr resin for 6 h, (2:1) Spurr resin/acetone overnight and finally in pure resin for 6 h. The sample was imbeded in Spurr resin for 3 days in a incubator at 60°C. The ultrathin sections were contrasted with 3% aqueous uranyl acetate and 10% lead citrate and the sample of the membranes fraction was analyzed in the Transmission Electron Microscope (TEM) type JEM 1011 (*Electron Microscopy Sciences, Co.*).

## **Quantification of protein extract and preparation of protein samples for NanoUPLC-MS<sup>E</sup>**

After obtaining the samples, the quantification of the protein extract was performed using the Bradford reagent (Sigma-Aldrich) (BRADFORD, 1976). The samples were analyzed using nanoscale liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. Aliquot of the sample (100  $\mu$ g) was prepared for NanoUPLC-MS<sup>E</sup> as previously described (MURAD et al., 2011b; LIMA et al., 2014; BAILAO et al., 2014). Briefly, 50 mM ammonium bicarbonate pH 8.5 was added and was followed by addition of 75  $\mu$ L of RapiGEST (0.2% v/v) (Waters Corp, Milford, MA). After, the solution was vortexed and incubated in dry bath for 15 min at 80°C. After incubation, the samples were centrifuged and the proteins reduced by adding of 2.5  $\mu$ L of a 100 mM DTT solution followed by incubation for 30 min at 60°C. The alkylation of proteins was performed by addition 2.5  $\mu$ L of 300 mM iodoacetamide and incubation in a dark room for 30 min. A 40  $\mu$ L aliquot of trypsin (Promega, Madison, WI, USA) prepared with 50 mM ammonium bicarbonate, to 50 ng/ $\mu$ L, was added. The sample was vortexed slightly and digested at 37°C for 16 h. Following the digestion, the hydrolysis of RapiGEST was performed by addition of 10  $\mu$ L of 5% (v/v) trifluoroacetic acid, followed by incubation at 37°C for 90 min. The sample was centrifuged at 20,000 x g at 6°C for 30 min, and the supernatant was transferred to microfuge tubes and dried in a *speed vacuum*. Peptide was solubilized in 30  $\mu$ L of ultrapure water and submitted to purification and concentration using a pipette tip with a bed of chromatographic media (ZipTips® C18 Pipette Tips, Milipore, Bedford, MA, USA) and dried in a *speed vacuum*. The peptide was resuspended with a solution of one pmol/ $\mu$ L MassPREP Digestion Standard [rabbit phosphorilase B (PHB)] (Waters Corp) to prepare the final concentration of 200 fmol/ $\mu$ L of the PHB. The buffer solution of 20 mM ammonium formate (AF) was used to increase the pH. After solubilization, the peptide was transferred to a Waters Total Recovery vial (Waters Corp).

## **NanoUPLC-MS<sup>E</sup> analysis and data processing**

The digested peptides were separated by NanoUPLC-MS<sup>E</sup> through nanoACQUITY<sup>TM</sup> system (Waters-Micromass, Manchester, UK) coupled to a Synapt HDMS<sup>TM</sup> mass spectrometer (Waters-Micromass, Manchester, UK). The



nanoACQUITY™ system is equipped with a Trap Symmetry C18, 5µm pre-column, 180 µm x 20mm (Part No 186006527, Waters), XBridge C18, 5µm separation column, 300µm x 50mm (Part No 186003682, Waters), and analytical column 1.7 µm, 100 µm x 100 mm (Part No 186005779, Waters). The columns were utilized in the separation of the peptides. Acetonitrile, formic acid and water were used to promote a gradient of acetonitrile with different concentrations in order to elute the peptides retained on the column according to the hydrophobicity. According to acetonitrile gradient (10, 14, 16, 20, 65 %), the sample was fractionated five times in a reverse phase column. The lock mass calibrant standard glufibrinopeptide B (GFP-B) was used as reference spray of the NanoLockSpray source. All analyses were performed with nanoelectrospray ionization in the positive ion mode nanoESI(+) with a NanoLockSpray source (MURAD et al., 2011b).

The MS data obtained from NanoUPLC-MS<sup>E</sup> were processed and searched using the ProteinLynx (PLGs) version 2.4 (Waters Corporation, Manchester, UK) as previously described by Murad and colleagues (2011a). Protein identifications and quantitative data packaging were performed using dedicated algorithms and a search against the *Paracoccidioides* database ([http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides\\_brasiliensis/MultiHome.html](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html)). The ion detection, clustering, and log-scale parametric normalizations were performed in PLGS with an Expression<sup>E</sup> license installed (Waters, Manchester, UK). Protein and peptides tables generated by PLGS were merged and the dynamic range of the experiments, peptides detection type, and mass accuracy were determined for each condition (MURAD and RECH, 2012). Software programs *FBAT* (LAIRD et al., 2000), *MassPivot* (kindly provided by Dr. Andre M. Murad), *Spotfire*® (© TIBCO Software Inc.) and *Microsoft Office Excel* (Microsoft©) were used. To identify differentially expressed proteins, the quantification data were normalized to the protein that showed the lowest coefficient of variation between the six replicates.

### ***In silico* Analysis**

The data obtained by NanoUPLC-MS<sup>E</sup> were subjected to *in silico* analysis in databases to identify the subcellular localization, the presence of the transmembrane domain, the association with membrane, the presence of signal peptide and functional classification.

In determination of the subcellular localization of proteins, the programs Wolf PSORT ([http://www.genscript.com/psort/wolf\\_psort.html](http://www.genscript.com/psort/wolf_psort.html)) and Pedant with the GO database (<http://pedant.gsf.de/>). The search for transmembrane domain was performed with the program TMHMM version 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). The search for signal peptide was done with the program SignalP version 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). The program used to predict GPI anchor was the big-PI Fungal Predictor ([http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi\\_server.html](http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi_server.html)). In the search for myristoylated proteins it were used the programs Myristoylator (<http://web.expasy.org/myristoylator/>) and TerminiNator (<http://www.isv.cnrs-gif.fr/terminator3/index.html>). For the prediction of palmitoylated proteins, the TerminiNator program was used and to predict prenylated proteins, the PrePS-Prenylation Prediction Suite (<http://mendel.imp.ac.at/sat/PrePS/index.html>) software was used. For functional classification the database Funcat2 ([http://pedant.gsf.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method=analysis&Db=p3\\_r48325\\_Par\\_bras\\_i\\_Pb01](http://pedant.gsf.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method=analysis&Db=p3_r48325_Par_bras_i_Pb01)) was employed.

## RESULTS

### Transmission Electron Microscopy (TEM)

The transmission electron microscopy (TEM) was performed to confirm that the obtained sample was enriched with cell membranes of *Paracoccidioides* sp.. The sample was subjected to the fixation step, washing, resin inclusion, ultrathin sections and photographed in a transmission electron microscope. The result obtained by microscopy confirm that the sample was enriched with cell membranes (Figure 1).

### Proteomics analysis

The resulting NanoUPLC-MS<sup>E</sup> protein and peptide data generated by PLGS process are shown in supplementary figures 1 and 2. The experiments resulted in 2,938 and 2,237 identified peptides which 55 and 59% were obtained from peptide match type data in the first pass to control and zinc deprivation conditions, respectively, and 16% were obtained in the second pass in both conditions (Supplementary figure 1). A total of 14% of the peptides were identified by a missed trypsin cleavage in both conditions,

whereas an in-source fragmentation rate of 4 and 1% was obtained to control and zinc deprivation conditions, respectively (Supplementary figure 1). The results obtained from dynamic range detection are presented in supplementary figure 2. This graphic represents the concentration of protein identified in its detection range. The proteins identified showed a range of similar concentration.

A total of six hundred and eleven proteins were identified, from which four hundred and sixty (Table S1) were regulated in *Pb01* yeast cells under zinc deprivation. A 1.5 fold change was used as a threshold to determine the up and down regulated proteins.

### **Subcellular localization of identified proteins by NanoUPLC-MS<sup>E</sup> in the membranes fraction of *Paracoccidioides* sp.**

The prediction of the subcellular localization of identified proteins was determined by *in silico* analysis. These analysis was performed in the database in order to identify proteins that showed some association with membranes. The Wolf PSORT software (predicts only proteins of plasma membrane) and the TMHMM, TermiNator, Myristoylator, PrePS-Prenylation Prediction Suite and Gene Ontology (GO) programs were used for identify proteins belonging the cell membranes of *Paracoccidioides* sp.. According to the analysis *in silico* the main subcellular localization of the identified proteins in the membrane fraction was in the cell membranes (30,65%) followed by localization in mitochondrial region (25,22%) and cytoplasmatic region (23,7%) (Supplementary figure 3).

### **Membrane proteins of *Paracoccidioides* sp. identified by *in silico* analysis**

From the total of the regulated proteins, one hundred and forty-one (31%) (Table 1) were classified as cell membrane proteins. Eighty-one proteins presented transmembrane domain and nine proteins were classified belonging to the cell membrane according to the association with membrane by myristoylation (one protein), palmitoylation and prenylation (eight proteins). The others fifty-one proteins not present transmembrane domain or post translational modification but showed that the subcellular localization according to Wolf PSORT and cellular component in gene ontology (GO) were in regions of cell membranes (Figure 2). Between the proteins that

presented transmembrane domain, seventy proteins were down regulated and eleven proteins were up regulated. According to the subcellular localization, forty-one proteins were down regulated and ten proteins were up regulated. All myristoylated and prenylated proteins were down regulated (Figure 3).

### **Membrane proteins of *Paracoccidioides* sp. down regulated in zinc deprivation**

One hundred and twenty proteins (Table 2) of cell membranes were down regulated in zinc deprivation. Eighty-six of these proteins were only identified in the control condition. Besides the in silico analysis performed to identify proteins that showed some association with the membrane, the search for proteins secreted by classical and non-classical pathways was also performed. Among the one hundred and twenty proteins of cell membranes, thirteen were predicted to be secreted by classical pathways, due to the presence of signal peptide and transmembrane domain.

The functional classification of down regulated membrane proteins, revealed that 26,67% and 18,33% of proteins were involved in transport events and metabolism, respectively (Figure 4).

### **Membrane proteins of *Paracoccidioides* sp. up regulated in zinc deprivation**

A total of twenty-one proteins (Table 3) of cell membranes, were up regulated in zinc deprivation. Nineteen of these proteins were only identified in the zinc deprivation condition. Between the twenty-one proteins of cell membranes, it were identified two proteins that were predicted to be secreted by classical pathways and also presented transmembrane domain. A total of 47,62% of these proteins of cell membranes up regulated were involved in transport events and 14,29 % were involved in protein synthesis (Figure 4).

## **DISCUSSION**

Zinc as other metals, is an essential nutrient and serves as a structural or catalytic cofactor for many proteins. In conditions of zinc deprivation the cellular response is regulated mainly at the transcriptional level (ZHAO and EIDE, 1997). In *S. cerevisiae*, studies have revealed both homeostatic and adaptive responses to zinc

deficiency. The homeostatic response is characterized by the control of zinc uptake, vacuolar zinc storage and conservation of intracellular zinc pools. This response is considered a first-line of defense against the stress generated by zinc deprivation. The adaptive response, also known as second-line defense, allows cells to adapt and survive to conditions of zinc deficiency. In yeast, this response is induced under severe zinc limitation conditions and occurs when cells are no longer able to access zinc for ideal growth. The strategies employed by yeast cells as second-line defense under zinc deficiency include mechanisms of resistance to oxidative stress, changes in lipid synthesis pathways, remodeling of sulfate assimilation and cell wall (WU et al., 2008; WU et al., 2007).

Our group has demonstrated previously that *Paracoccidioides* sp. experiences oxidative stress when subjected to zinc deficiency, as in *S. cerevisiae*. In addition, zinc absence induces gluconeogenesis and downregulates the methylcitrate cycle. In order to complement these findings obtained after analysis of cytoplasmic proteins, in the present work we analyzed the membrane proteome of *Paracoccidioides* sp. yeast cells, under zinc deprivation conditions. We identified four hundred and sixty proteins that were regulated in *Pb01* yeast cells exposed to the zinc chelator TPEN. Of these, one hundred and forty-one proteins were classified as cell membrane proteins according to the *in silico* analysis described in MM. We identified proteins related to the glycerophospholipid metabolism and cellular integrity.

The enzyme 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase beta (1-AGPAT) that belongs to glycerophospholipid metabolism was down regulated under zinc deprivation. These enzymes catalyze the formation of phosphatidic acid (PA) from lysophosphatidic acid (LPA) by incorporating an acyl moiety at *sn*-2 position. The PA produced by 1-AGPAT activity is a substrate of the pathway for the production of phospholipids as phosphatidylserine (PS), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidylcholine (PC) that are found in yeast (CARMAN and HAN, 2007) and also in *Paracoccidioides* membranes (LONGO et al., 2013). Our data is in agreement with a previous study which demonstrated that in *S. cerevisiae* the activities of the enzymes involved in PS, PE and PC pathways were decreased under zinc deficiency (IWANYSHYN et al., 2004). As PA is the upstream substrate in the synthesis of all these phospholipids, we can suggest that the decreased production of PA leads to the reduction in PS, PE and PC levels and, maybe, to defects in plasma membrane structure.

The phosphoinositide phosphatase (Sac1) is a transmembrane protein found in the endoplasmic reticulum (ER) and Golgi complex (KONRAD et al., 2002; WHITTERS et al., 1993). This enzyme has a specific role in secretion and acts as an antagonist of the phosphatidylinositol 4-kinase Pikp in Golgi trafficking (SCHORR et al., 2001). The rapid change of the localization of Sac1 between the ER and the Golgi occurs in response to growth conditions. The localization of Sac1 at the ER occurs only during times of exponential growth and is mediated by interaction with dolichol-phosphate mannanose synthase (Dpm1) through direct contact between the transmembrane domains (FAULHAMMER et al., 2005). The Sac1 and Dpm1 proteins are required for dolichol oligosaccharide biosynthesis and in this study these proteins were down regulated suggesting that carbohydrate metabolism was affected by zinc deprivation, as described by Wu and colleague (2008).

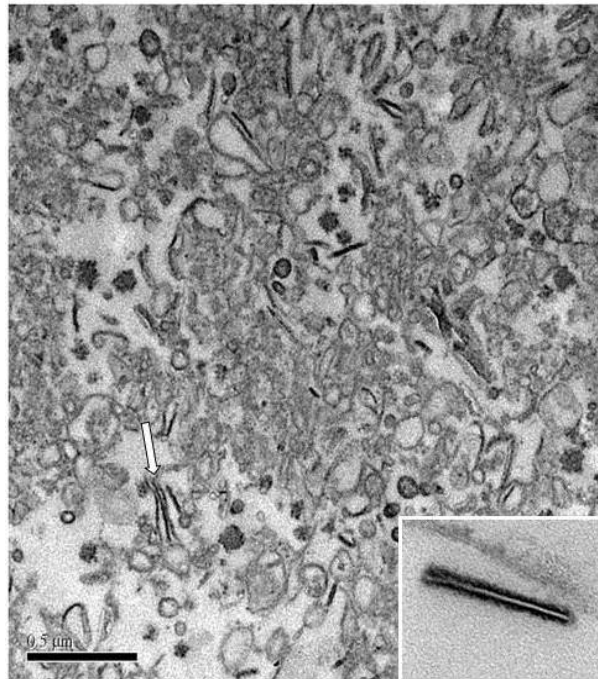
Studies have shown que Sac1 is related to the integrity of the cell wall due to defects in chitin synthase trafficking and chitin biosynthesis observed in *sac1* mutant. This phenotype was more severe for the *sac1* and *slt2* double mutant. Slt2 is a non-membrane MAP kinase involved in cell wall rearrangement in response to cell wall stress (HEINISCH et al., 1999). Therefore, these proteins have a synergistic role in regulating cell wall construction (TAHIROVIC et al., 2003). A Slt2 homologous was found in our membrane proteome, the mitogen-activated protein kinase Mkc1. Interestingly, Mkc1 was up regulated under zinc deficiency while Sac1 was down regulated. As Sac1 is involved in cell wall integrity, we suggest that zinc absence triggers cell wall defects, as described in *S. cerevisiae* (WU et al., 2008). To counteract the cell wall stress, Mkc1 was induced. In agreement with the effect of zinc starvation on cell wall, we found that the chitin synthase B, a membrane protein, was also downregulated in the absence of zinc.

To our knowledge, this is the first report that describes the response of *Paracoccidioides* spp. to micronutrient starvation at the membranes proteome level. The new findings showed here, associated with the responses to zinc deficiency at cytoplasmic level, will add important information to the growing knowledge of how *Paracoccidioides* spp. behaves in conditions of metal starvation. As nutritional immunity is a strategy of host to avoid infection, the mechanisms employed by the fungus to survive and adapt to this condition are paramount for pathogenicity.

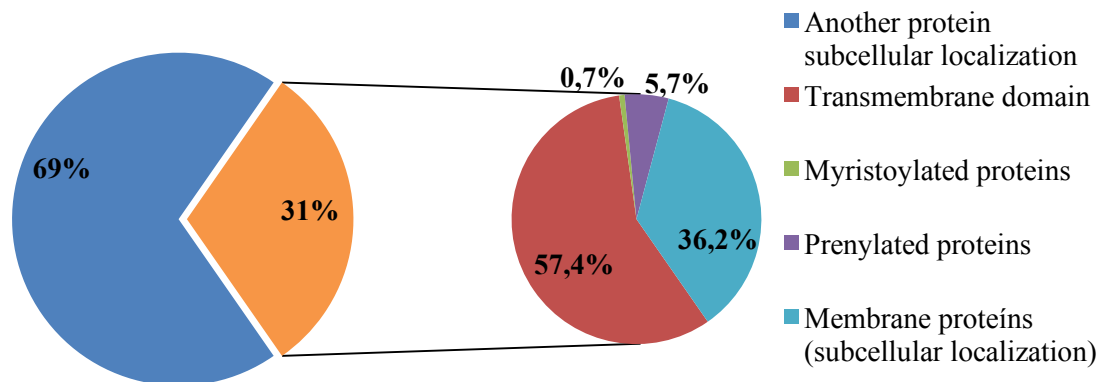
## CONCLUSION

Nutritional immunity is one of the strategies used by the host to prevent the growth of pathogenic microorganisms. Thus, *Paracoccidioides* sp, facing a condition of stress (nutrient deprivation) uses mechanisms to adapt and survive. The development of these mechanisms are essential for its pathogenicity. With the results obtained in the present study, we can conclude that zinc deprivation *Paracoccidioides* sp. promotes changes in the cell integrity and metabolism of phospholipids and these changes can affect the cellular development.

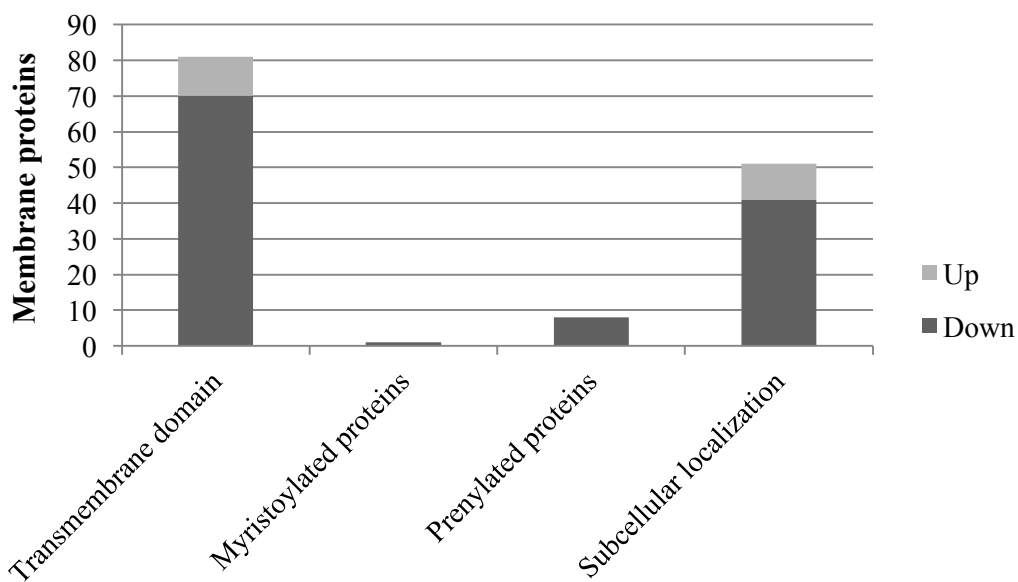
## Figures and Table



**Figure 1: Transmission Electron Microscopy of membrane extract of *Paracoccidioides* spp..** The large figure show the presence of membrane fragments of the fungus, as indicated in the white arrow. In detail, a fragment showing the lipid bilayer of the membrane (300 thousand fold). Magnitude bar (0.5  $\mu\text{m}$  = 50 thousand fold).

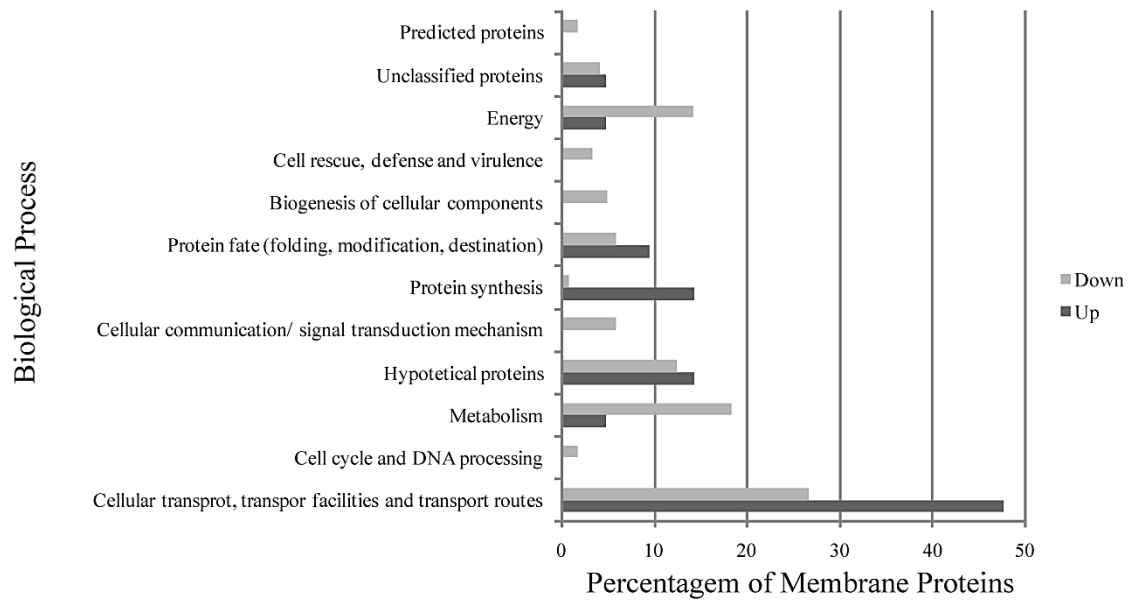


**Figure 2: Percentage of identified membrane proteins.** A total of 141 (31%) proteins were classified as cell membrane proteins. Of these 81 (57,4%) proteins presented transmembrane domains, 8 (5,7%) proteins were prenylated, 1 (0,7%) protein was myristoylated and 51 (36,2%) proteins were classified according to the subcellular localization.



**Figure 3: Regulated membrane proteins.** Transmembrane Domain – 70 proteins down and 11 up regulated; Myristoylated proteins – 1 down regulated protein; Prenylated proteins – 8 down regulated proteins; Subcellular localization – 41 proteins down and 10 up regulated.





**Figure 4: Functional classification of the membrane proteins.** The database FunCat2 was used to perform this classification. Most down regulated proteins are involved in transport and metabolism and the up regulated proteins are involved in transport and protein synthesis.

Table 1: Membrane proteins identified in *Paracoccidioides* sp. in the presence or absence of zinc.

Accession number <sup>a</sup>	Annotation <sup>b</sup>	TMH <sup>c</sup>	PTMs <sup>d</sup>	SignalP Score ≥ 0,45 <sup>e</sup>	Score <sup>f</sup>
<b>TRANSMEMBRANE DOMAIN</b>					
PAAG_00481	Membrane biogenesis protein Yop1 (171 aa)	3	#	-	2066,63
PAAG_01037	Oligosaccharyltransferase alpha subunit (505 aa)	1	#	0,784	331,3
PAAG_01750	Signal sequence binding protein (1497 aa)	2	#	0,745	229,94
PAAG_02679	Vacuolar ATP synthase 98 kDa subunit (841 aa)	7	#	-	212,59
PAAG_03162	Phosphoinositide phosphatase (Sac1) (707 aa)	2	#	-	183,88
PAAG_03418	Mitochondrial precursor proteins import receptor (1572 aa)	1	#	-	194,08
PAAG_04328	Endosomal cargo receptor (Erp3) (213 aa)	2	#	0,912	1751,27
PAAG_05584	Peroxisomal adenine nucleotide transporter 1 (343 aa)	2	#	-	243,45
PAAG_05828	Cation-transporting ATPase (1317 aa)	3	#	-	255,75
PAAG_05864	Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein (393 aa)	1	#	-	234,69
PAAG_06994	Endoplasmic reticulum vesicle protein (217 aa)	2	#	0,872	177,08
PAAG_07712	Surfeit locus protein (304 aa)	7	#	-	2155,51
PAAG_08029	Peroxisomal membrane protein PMP34 (338 aa)	5	#	-	382,02
PAAG_08469	Inorganic phosphate transporter (202 aa)	1	#	-	2214,41
PAAG_08587	GPR1/FUN34/yaaH family protein (226 aa)	3	#	-	4618,7
PAAG_09064	Sideroflexin-1 (338 aa)	5	#	-	374,9
PAAG_05443	Endoplasmic reticulum 25kda transmembrane protein (214 aa)	3	#	-	560,94
PAAG_07328	Transport protein SEC61 subunit alpha (480 aa)	10	#	-	621,26

<b>PAAG_08620</b>	ADP,ATP carrier protein (310 aa)	3	#	-	10453,18
<b>PAAG_08082</b>	Plasma membrane ATPase (930 aa)	9	#	-	7230,75
<b>PAAG_01041</b>	Prohibitin-2 (311 aa)	1	#	-	4227,94
<b>PAAG_00231</b>	Cytochrome P450 61 (354 aa)	1	#	-	303,05
<b>PAAG_00827</b>	Cytochrome P450 51 (603 aa)	4	#	0,749	308,44
<b>PAAG_01390</b>	Endoplasmic reticulum protein (570 aa)	1	#	0,658	223,43
<b>PAAG_03024</b>	3-ketodihydrosphingosine reductase tsc10 (386 aa)	1	#	-	253,4
<b>PAAG_03722</b>	Acyl-CoA desaturase (467 aa)	4	#	-	738,82
<b>PAAG_03974</b>	NADPH cytochrome P450 oxidoreductase (379 aa)	1	#	-	310,79
<b>PAAG_04719</b>	Oligosaccharyl transferase subunit (739 aa)	13	#	-	379,35
<b>PAAG_05077</b>	Class I alpha-mannosidase 1 <sup>a</sup> (869 aa)	1	#	-	360,41
<b>PAAG_05644</b>	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 12-A (340 aa)	1	#	-	208,66
<b>PAAG_05910</b>	Dolichyl-phosphate-mannose-protein mannosyltransferase (917 aa)	8	#	-	657,3
<b>PAAG_08431</b>	Dolichyl-phosphate-mannose-protein mannosyltransferase (746 aa)	9	#	-	289,29
<b>PAAG_09072</b>	Mitochondrial 51uclease (336 aa)	1	#	-	3854,97
<b>PAAG_06668</b>	Mitochondrial metallochaperone Sco1 (317 aa)	1	#	-	253,54
<b>PAAG_04025</b>	Osmosensor protein (278 aa)	2	#	-	510,94
<b>PAAG_06815</b>	Tricalbin-3 (1516 aa)	2	#	-	165,67
<b>PAAG_02462</b>	Alpha-1,2 mannosyltransferase KTR1 (505 aa)	1	#	-	300,78
<b>PAAG_05468</b>	Translocation protein sec63 (693 aa)	3	#	-	324,18

<b>PAAG_06464</b>	Disulfide-isomerase (728 aa)	1	#	0,851	252,29
<b>PAAG_07238</b>	Alpha-1,2 mannosyltransferase KTR1 (397 aa)	1	#	0,732	671,57
<b>PAAG_04110</b>	Dolichyl-di-phosphooligosaccharide-protein glycotransferase (471 aa)	1	#	0,949	977,57
<b>PAAG_00622</b>	Mitochondria fission 1 protein (154 aa)	1	#	-	1001,94
<b>PAAG_02917</b>	GTP-binding protein Sey1 (873 aa)	2	#	-	176,93
<b>PAAG_03391</b>	Chitin synthase B (928 aa)	6	#	-	282,35
<b>PAAG_03489</b>	Cell lysis protein cw11 (358 aa)	4	#	-	1188,55
<b>PAAG_07503</b>	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase beta (304 aa)	2	#	-	425,34
<b>PAAG_01262</b>	Hsp70-like protein (629 aa)	1	#	0,864	3655,29
<b>PAAG_08209</b>	Peroxin-11 (239 aa)	1	#	-	3889,83
<b>PAAG_00125</b>	Conserved hypothetical protein (480 aa)	3	#	-	206,51
<b>PAAG_00184</b>	Conserved hypothetical protein (299 aa)	4	#	-	304,39
<b>PAAG_00187</b>	Conserved hypothetical protein (241 aa)	3	#	-	808,12
<b>PAAG_01890</b>	Conserved hypothetical protein (190 aa)	2	#	-	251,17
<b>PAAG_04529</b>	Conserved hypothetical protein (117 aa)	1	#	-	1843,87
<b>PAAG_04540</b>	Conserved hypothetical protein (180 aa)	1	#	-	247,42
<b>PAAG_04911</b>	Conserved hypothetical protein (300 aa)	4	#	-	422,48
<b>PAAG_05272</b>	Conserved hypothetical protein (435 aa)	1	#	-	446,27
<b>PAAG_05875</b>	Hypothetical protein (115 aa)	1	#	-	434,68
<b>PAAG_06568</b>	Conserved hypothetical protein (415 aa)	1	#	-	345,74

<b>PAAG_08987</b>	Conserved hypothetical protein (317 aa)	1	#	-	170,75
<b>PAAG_05911</b>	Conserved hypothetical protein (147 aa)	1	#	-	8129,16
<b>PAAG_07960</b>	Conserved hypothetical protein (152 aa)	4	#	-	1003,46
<b>PAAG_08051</b>	Hypothetical protein (279 aa)	2	#	0,594	217,91
<b>PAAG_02265</b>	Mitochondrial F1F0 ATP synthase subunit (102 aa)	1	#	-	8032,77
<b>PAAG_03160</b>	Formation of crista junctions protein 1(686 aa)	1	#	-	346,12
<b>PAAG_05091</b>	NADH-ubiquinone oxidoreductase 213 kDa subunit (200 aa)	3	#	-	357,62
<b>PAAG_08517</b>	Propionate-CoA ligase (711 aa)	1	#	-	271,08
<b>PAAG_06654</b>	Signal sequence receptor alpha chain (275 aa)	1	#	0,769	390,4
<b>PAAG_07846</b>	CBS and PB1 domain-containing protein (672 aa)	1	#	-	496,37
<b>PAAG_04157</b>	DUF1620 domain-containing protein (954 aa)	1	#	0,863	382,34
<b>PAAG_12011</b>	Mitochondria cytochrome c oxidase subunit 2 (254 aa)	2	#	-	2138,11
<b>PAAG_06701</b>	PCI domain-containing protein (750 aa)	1	#	0,790	352,24
<b>PAAG_08352</b>	NADH-ubiquinone oxidoreductase (120 aa)	1	#	-	375,07
<b>PAAG_01425</b>	Eukaryotic translation initiation factor 3 (478 aa)	2	#	-	281,8
<b>PAAG_05425</b>	Golgi membrane protein (Coy1) (766 aa)	1	#	-	118,61
<b>PAAG_07589</b>	SNARE domain-containing protein (271 aa)	1	#	-	124,41
<b>PAAG_00404</b>	Mitochondrial sodium/hydrogen exchanger (710 aa)	9	#	-	123,07
<b>PAAG_00739</b>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B (211 aa)	1	#	0,641	212,21
<b>PAAG_06946</b>	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit tim14	1	#	-	330,93

<b>PAAG_03316</b>	Conserved hypothetical protein (422 aa)	1	#	-	225,85
<b>PAAG_07599</b>	Conserved hypothetical protein (312 aa)	1	#	-	158,75
<b>PAAG_01417</b>	ER membrane DUF1077 domain-containing protein (105 aa)	2	#	-	311,13
<b>MYRISTOYLATION</b>					
<b>PAAG_03988</b>	ADP-ribosylation factor (187 aa)	*	C 14	-	243,52
<b>PRENYLATION</b>					
<b>PAAG_01602</b>	Ras-like GTP-binding protein (312 aa)	*	C 20	-	1037,04
<b>PAAG_07175</b>	GTP-binding protein YPT52 (294 aa)	*	C 20	-	1651,53
<b>PAAG_08093</b>	GTP-binding protein ypt3 (221 aa)	*	C 20	-	692,85
<b>PAAG_01500</b>	GTP-binding protein SAS1 (207 aa)	*	C 20	-	1546,88
<b>PAAG_02458</b>	GTP-binding protein ypt7 (206 aa)	*	C 20	-	1281,11
<b>PAAG_07634</b>	Small GTPase RhoA (192 aa)	*	C 15/C 20	-	6087,45
<b>PAAG_02230</b>	Cell division control protein (193 aa)	*	C 15/C 20	-	638,27
<b>PAAG_00797</b>	Mitochondrial protein import protein MAS5 (411 aa)	*	C 15	-	982
<b>SUBCELLULAR LOCALIZATION</b>					
<b>PAAG_02796</b>	Mitochondrial 2-oxodicarboxylate carrier 1 (315 aa)	*	#	-	217,42
<b>PAAG_02824</b>	Mitochondrial inner membrane translocase subunit TIM44 (534 aa)	*	#	-	198,45
<b>PAAG_03644</b>	Mitochondrial import receptor subunit tom-40 (356 aa)	*	#	-	651,53
<b>PAAG_05350</b>	Mitochondrial phosphate carrier protein (422 aa)	*	#	-	3006,85
<b>PAAG_08010</b>	Mitochondrial carrier protein (311 aa)	*	#	-	1443,87
<b>PAAG_08086</b>	Mitochondrial DNA replication protein YHM2 (317 aa)	*	#	-	514,67

<b>PAAG_07564</b>	Outer mitochondrial membrane protein porin (285 aa)	*	#	-	9018,79
<b>PAAG_00639</b>	Phosphate carrier protein (385 aa)	*	#	-	1566,86
<b>PAAG_05107</b>	AAA ATPase (921 aa)	*	#	-	351,17
<b>PAAG_07669</b>	Mannan polymerase II complex ANP1 subunit (461 aa)	*	#	-	580,61
<b>PAAG_00230</b>	Cytochrome P450 61 (167 aa)	*	#	-	652,31
<b>PAAG_01833</b>	2-succinylbenzoate-CoA ligase (583 aa)	*	#	-	456,85
<b>PAAG_02604</b>	L-tyrosine decarboxylase (578 aa)	*	#	-	169,59
<b>PAAG_04238</b>	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit (655 aa)	*	#	-	179,7
<b>PAAG_04564</b>	Betaine aldehyde dehydrogenase (635 aa)	*	#	-	193,12
<b>PAAG_01575</b>	Sterol 24-C-methyltransferase (378 aa)	*	#	-	1375,67
<b>PAAG_01874</b>	Dolichol-phosphate mannosyltransferase (280 aa)	*	#	-	1456,63
<b>PAAG_00850</b>	Glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase (489 aa)	*	#	-	3602,18
<b>PAAG_06289</b>	Tryptophan synthase (725 aa)	*	#	-	390,84
<b>PAAG_06961</b>	Aldehyde dehydrogenase (496 aa)	*	#	-	744,17
<b>PAAG_07640</b>	Casein kinase I (284 aa)	*	#	-	196,41
<b>PAAG_07235</b>	SNARE domain-containing protein (252 aa)	*	#	-	430,59
<b>PAAG_04458</b>	Prohibitin-1 (281 aa)	*	#	-	2586,79
<b>PAAG_03292</b>	Cytochrome c peroxidase (375 aa)	*	#	-	6884,11
<b>PAAG_05415</b>	TIM22 inner membrane protein import complex anchor subunit Tim18 (199 aa)	*	#	-	201,95
<b>PAAG_00151</b>	NADH-cytochrome b5 reductase (310 aa)*	*	#	-	465,02

<b>PAAG_00948</b>	NADH dehydrogenase iron-sulfur protein (229 aa)	*	#	-	195,5
<b>PAAG_01044</b>	NADH-ubiquinone oxidoreductase 24 kDa subunit (260 aa)	*	#	-	368,56
<b>PAAG_02656</b>	NADH-ubiquinone oxidoreductase 51 kDa subunit (516 aa)	*	#	-	617,71
<b>PAAG_05735</b>	NADH-ubiquinone oxidoreductase 49 kDa subunit (480 aa)	*	#	-	2857,94
<b>PAAG_05876</b>	Cytochrome c oxidase subunit VIa (143 aa)	*	#	-	2405,87
<b>PAAG_06796</b>	Cytochrome c oxidase polypeptide IV (198 aa)	*	#	-	1101,38
<b>PAAG_08088</b>	Cytochrome b-c1 complex subunit 2 (464 aa)	*	#	-	2793,7
<b>PAAG_08057</b>	Cytochrome c oxidase polypeptide V (200 aa)	*	#	-	969,86
<b>PAAG_04570</b>	ATP synthase D chain, mitochondrial (175 aa)	*	#	-	6113,62
<b>PAAG_05031</b>	NADH-ubiquinone oxidoreductase 40 kDa subunit (294 aa)	*	#	-	1979,87
<b>PAAG_07672</b>	Cytochrome b-c1 complex subunit 7 (123 aa)	*	#	-	13389,36
<b>PAAG_02653</b>	Acetyl-coenzyme A synthetase (670 aa)	*	#	-	1504,51
<b>PAAG_06541</b>	Erythrocyte band 7 integral membrane protein (361 aa)	*	#	-	867,73
<b>PAAG_01439</b>	Predicted protein (375 aa)	*	#	-	205,68
<b>PAAG_03337</b>	Predicted protein (327 aa)	*	#	-	202,04
<b>PAAG_03780</b>	ATP-dependent RNA helicase DBP5 (505 aa)	*	#	-	131,49
<b>PAAG_01345</b>	Importin-8 (1032 aa)	*	#	-	133,85
<b>PAAG_03042</b>	Vacuolar ATP synthase subunit c (394 aa)	*	#	-	195,78
<b>PAAG_05036</b>	Transport protein SEC24 (939 aa)	*	#	-	141,36
<b>PAAG_05589</b>	Transport protein SEC23 (773 aa)	*	#	-	211,4



<b>PAAG_07874</b>	Hepatocellular carcinoma down-regulated mitochondrial carrier protein (302 aa)*	*	#	-	152,37
<b>PAAG_08834</b>	Tricarboxylate transport protein (297 aa)	*	#	-	135,81
<b>PAAG_06344</b>	Rab GDP-dissociation inhibitor (469 aa)	*	#	-	532,2
<b>PAAG_08164</b>	Homogentisate 1,2-dioxygenase (455 aa)	*	#	-	187,81
<b>PAAG_06136</b>	Conserved hypothetical protein (414 aa)	*	#	-	159,87

<sup>a</sup>Accession number– Accession number of the protein in the database of *Paracoccidioides* spp.

([http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides\\_brasiliensis/MultiHome.html](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html))

<sup>b</sup>Protein annotation from *Paracoccidioides* genome database or by homology in NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

<sup>c</sup>Represents the amount of transmembrane domains identified in proteins using the program TMHMM version 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

<sup>d</sup>Presence of posttranslational modification. For myristoylated protein (C14) programs Terminator (<http://www.isv.cnrs-gif.fr/terminator3/test.php>) and Myristoylator (<http://web.expasy.org/myristoylator/>) were used. Terminator program was used to identify palmitoylated proteins. Research by prenylated proteins was done by the program PresPs-Prenylation Prediction Suite (<http://mendel.imp.ac.at/sat/PrePS/index.html>) and to predict GPI anchor the program big-Pi fungi predictor ([http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi\\_server.html](http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi_server.html)) was used. C15 and C20 indicates the presence of a recognition site for the addition of a farnesyl or geranyl group (FTase and geranyltransferase type I, Rab geranylgeranyl transferase).

<sup>e</sup>Presence of signal peptide was analyzed by program SignalP version 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). The values indicate the score of the proteins with the signal peptide, this value must be equal to or greater than 0.45.

<sup>f</sup>Indicates the score of the protein

\*: Proteins that no presented transmembrane domain

#: Proteins that no presented posttranslational modification

-: Proteins that no presented signal peptide

C: Proteins only identified in the control condition

T: Proteins only identified in the zinc deprivation condition

The functional classification was performed used the database of FunCat2

([http://pedant.gsf.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method=analysis&Db=p3\\_r48325\\_Par\\_braasi\\_Pb01](http://pedant.gsf.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method=analysis&Db=p3_r48325_Par_braasi_Pb01)).

The database Gene Ontology (GO) and WolfPSORT was employed to evaluate the possible localization of proteins in cell membranes of *Paracoccidioides* sp.. Some proteins did not show any form of classical association with the lipid bilayer, but showed that the localization subcellular were in regions of cell membranes, with score  $\geq 50$ .

Table 2: Membrane proteins of *Paracoccidioides* sp. down regulated in zinc deprivation and their biological functions provided – FunCat2

Access Number <sup>a</sup>	Annotation <sup>b</sup>	TMH <sup>c</sup>	PTMs <sup>d</sup>	SignalP Score ≥ 0,45 <sup>e</sup>	Score <sup>f</sup>	Fold change (log2) <sup>g</sup>
<b>CELLULAR TRANSPORT, TRANSPORT FACILITIES AND TRANSPORT ROUTES</b>						
PAAG_00481	Membrane biogenesis protein Yop1 (171 aa)	3	#	-	2066,63	C
PAAG_01037	Oligosaccharyltransferase alpha subunit (505 aa)	1	#	0,784	331,3	C
PAAG_01750	Signal sequence binding protein (1497 aa)	2	#	0,745	229,94	C
PAAG_02679	Vacuolar ATP synthase 98 kDa subunit (841 aa)	7	#	-	212,59	C
PAAG_02796	Mitochondrial 2-oxodicarboxylate carrier 1 (315 aa)	*	#	-	217,42	C
PAAG_02824	Mitochondrial inner membrane translocase subunit TIM44 (534 aa)	*	#	-	198,45	C
PAAG_03162	Phosphoinositide phosphatase (Sac1) (707 aa)	2	#	-	183,88	C
PAAG_03418	Mitochondrial precursor proteins import receptor (1572 aa)	1	#	-	194,08	C
PAAG_03644	Mitochondrial import receptor subunit tom-40 (356 aa)	*	#	-	651,53	C
PAAG_03988	ADP-ribosylation factor (187 aa)	*	C 14	-	243,52	C
PAAG_04328	Endosomal cargo receptor (Erp3) (213 aa)	2	#	0,912	1751,27	C
PAAG_05350	Mitochondrial phosphate carrier protein (422 aa)	*	#	-	3006,85	C
PAAG_05584	Peroxisomal adenine nucleotide transporter 1 (343 aa)	2	#	--	243,45	C
PAAG_05828	Cation-transporting ATPase (1317 aa)	3	#	-	255,75	C
PAAG_05864	Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein (393 aa)	1	#	-	234,69	C
PAAG_06994	Endoplasmic reticulum vesicle protein (217 aa)	2	#	0,872	177,08	C
PAAG_07712	Surfeit locus protein (304 aa)	7	#	-	2155,51	C
PAAG_08010	Mitochondrial carrier protein (311 aa)	*	#	-	1443,87	C

<b>PAAG_08029</b>	Peroxisomal membrane protein PMP34 (338 aa)	5	#	-	382,02	C
<b>PAAG_08086</b>	Mitochondrial DNA replication protein YHM2 (317 aa)	*	#	-	514,67	C
<b>PAAG_08469</b>	Inorganic phosphate transporter (202 aa)	1	#	-	2214,41	C
<b>PAAG_08587</b>	GPR1/FUN34/yaaH family protein (226 aa)	3	#	-	4618,7	C
<b>PAAG_09064</b>	Sideroflexin-1 (338 aa)	5	#	-	374,9	C
<b>PAAG_05443</b>	Endoplasmatic reticulum 25kda transmembrane protein (214 aa)	3	#	-	560,94	C
<b>PAAG_07328</b>	Transport protein SEC61 subunit alpha (480 aa)	10	#	-	621,26	-3,910
<b>PAAG_07564</b>	Outer mitochondrial membrane protein porin (285 aa)	*	#	-	9018,79	-3,910
<b>PAAG_01602</b>	Ras-like GTP-binding protein (312 aa)	*	C 20	-	1037,04	-3,506
<b>PAAG_00639</b>	Phosphate carrier protein (385 aa)	*	#	-	1566,86	-2,871
<b>PAAG_08620</b>	ADP,ATP carrier protein (310 aa)	3	#	-	10453,18	-2,207
<b>PAAG_05107</b>	AAA ATPase (921 aa)	*	#	-	351,17	-1,500
<b>PAAG_08082</b>	Plasma membrane ATPase (930 aa)	9	#	-	7230,75	-2,828
<b>PAAG_07175</b>	GTP-binding protein YPT52 (294 aa)	*	C 20	-	1651,53	-2,077
<b>CELL CYCLE AND DNA PROCESSING</b>						
<b>PAAG_07669</b>	Mannan polymerase II complex ANP1 subunit (461 aa)	*	#	-	580,61	C
<b>PAAG_01041</b>	Prohibitin-2 (311 aa)	1	#	-	4227,94	-1,428
<b>METABOLISM</b>						
<b>PAAG_00230</b>	Cytochrome P450 61 (167 aa)	*	#	-	652,31	C
<b>PAAG_00231</b>	Cytochrome P450 61 (354 aa)	1	#	-	303,05	C
<b>PAAG_00827</b>	Cytochrome P450 51 (603 aa)	4	#	0,749	308,44	C

<b>PAAG_01390</b>	Endoplasmic reticulum protein (570 aa)	1	#	0,658	223,43	C
<b>PAAG_01833</b>	2-succinylbenzoate-CoA ligase (583 aa)	*	#	-	456,85	C
<b>PAAG_07503</b>	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase beta (304 aa)	2	#	-	425,34	C
<b>PAAG_02604</b>	L-tyrosine decarboxylase (578 aa)	*	#	-	169,59	C
<b>PAAG_03024</b>	3-ketodihydrosphingosine reductase tsc10 (386 aa)	1	#	-	253,4	C
<b>PAAG_03722</b>	Acyl-CoA desaturase (467 aa)	4	#	-	738,82	C
<b>PAAG_03974</b>	NADPH cytochrome P450 oxidoreductase (379 aa)	1	#	-	310,79	C
<b>PAAG_04238</b>	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit (655 aa)	*	#	-	179,7	C
<b>PAAG_04564</b>	Betaine aldehyde dehydrogenase (635 aa)	*	#	-	193,12	C
<b>PAAG_04719</b>	Oligosaccharyl transferase subunit (739 aa)	13	#	-	379,35	C
<b>PAAG_05077</b>	Class I alpha-mannosidase 1A (869 aa)	1	#	-	360,41	C
<b>PAAG_05644</b>	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 12-A (340 aa)	1	#	-	208,66	C
<b>PAAG_05910</b>	Dolichyl-phosphate-mannose-protein mannosyltransferase (917 aa)	8	#	-	657,3	C
<b>PAAG_08431</b>	Dolichyl-phosphate-mannose-protein mannosyltransferase (746 aa)	9	#	-	289,29	C
<b>PAAG_01575</b>	Sterol 24-C-methyltransferase (378 aa)	*	#	-	1375,67	-3,044
<b>PAAG_01874</b>	Dolichol-phosphate mannosyltransferase (280 aa)	*	#	-	1456,63	-2,366
<b>PAAG_00850</b>	Glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase (489 aa)	*	#	-	3602,18	-1,991
<b>PAAG_09072</b>	Mitochondrial nuclease (336 aa)	1	#	-	3854,97	-1,616
<b>PAAG_06289</b>	Tryptophan synthase (725 aa)	*	#	-	390,84	-1,443
<b>PAAG_06961</b>	Aldehyde dehydrogenase (496 aa)	*	#	-	744,17	-0,909

<b>PROTEIN SYNTHESIS</b>							
<b>PAAG_06668</b>	Mitochondrial metallochaperone Sco1 (317 aa)	1	#	-	253,54	C	
<b>CELLULAR COMMUNICATION/SIGNAL TRANSDUCTION MECHANISM</b>							
<b>PAAG_04025</b>	Osmosensor protein (278 aa)	2	#	-	510,94	C	
<b>PAAG_06815</b>	Tricalbin-3 (1516 aa)	2	#	-	165,67	C	
<b>PAAG_07640</b>	Casein kinase I (284 aa)	*	#	-	196,41	C	
<b>PAAG_08093</b>	GTP-binding protein ypt3 (221 aa)	*	C 20	-	692,85	C	
<b>PAAG_01500</b>	GTP-binding protein SAS1 (207 aa)	*	C 20	-	1546,88	-2,813	
<b>PAAG_02458</b>	GTP-binding protein ypt7 (206 aa)	*	C 20	-	1281,11	-2,481	
<b>PAAG_07634</b>	Small GTPase RhoA (192 aa)	*	C 15/C 20	-	6087,45	-1,053	
<b>PROTEIN FATE (FOLDING, MODIFICATION, DESTINATION)</b>							
<b>PAAG_02462</b>	Alpha-1,2 mannosyltransferase KTR1 (505 aa)	1	#	-	300,78	C	
<b>PAAG_05468</b>	Translocation protein sec63 (693 aa)	3	#	-	324,18	C	
<b>PAAG_06464</b>	Disulfide-isomerase (728 aa)	1	#	0,851	252,29	C	
<b>PAAG_07235</b>	SNARE domain-containing protein (252 aa)	*	#	-	430,59	C	
<b>PAAG_07238</b>	Alpha-1,2 mannosyltransferase KTR1 (397 aa)	1	#	0,732	671,57	C	
<b>PAAG_04458</b>	Prohibitin-1 (281 aa)	*	#	-	2586,79	-3,145	
<b>PAAG_04110</b>	Dolichyl-di-phosphooligosaccharide-protein glycotransferase (471 aa)	1	#	0,949	977,57	-0,837	
<b>BIOGENESIS OF CELLULAR COMPONENTS</b>							
<b>PAAG_00622</b>	Mitochondria fission 1 protein (154 aa)	1	#	-	1001,94	C	
<b>PAAG_02917</b>	GTP-binding protein Sey1 (873 aa)	2	#	-	176,93	C	
<b>PAAG_03391</b>	Chitin synthase B (928 aa)	6	#	-	282,35	C	

<b>PAAG_03489</b>	Cell lysis protein cw11 (358 aa)	4	#	-	1188,55	C
<b>PAAG_08209</b>	Peroxin-11 (239 aa)	1	#	-	3889,83	C
<b>CELL RESCUE, DEFENSE AND VIRULENCE</b>						
<b>PAAG_02230</b>	Cell division control protein (193 aa)	*	C 15/C 20	-	638,27	C
<b>PAAG_01262</b>	Hsp70-like protein (629 aa)	1	#	0,864	3655,29	-2,640
<b>PAAG_00797</b>	Mitochondrial protein import protein MAS5 (411 aa)	*	C 15	-	982	-2,582
<b>PAAG_03292</b>	Cytochrome c peroxidase (375 aa)	*	#	-	6884,11	-0,808
<b>HYPOTHETICAL PROTEINS</b>						
<b>PAAG_00125</b>	Conserved hypothetical protein (480 aa)	3	#	-	206,51	C
<b>PAAG_00184</b>	Conserved hypothetical protein (299 aa)	4	#	-	304,39	C
<b>PAAG_00187</b>	Conserved hypothetical protein (241 aa)	3	#	-	808,12	C
<b>PAAG_01890</b>	Conserved hypothetical protein (190 aa)	2	#	-	251,17	C
<b>PAAG_04529</b>	Conserved hypothetical protein (117 aa)	1	#	-	1843,87	C
<b>PAAG_04540</b>	Conserved hypothetical protein (180 aa)	1	#	-	247,42	C
<b>PAAG_04911</b>	Conserved hypothetical protein (300 aa)	4	#	-	422,48	C
<b>PAAG_05272</b>	Conserved hypothetical protein (435 aa)	1	#	-	446,27	C
<b>PAAG_05415</b>	TIM22 inner membrane protein import complex anchor subunit Tim18 (199 aa)	*	#	-	201,95	C
<b>PAAG_05875</b>	Hypothetical protein (115 aa)	1	#	-	434,68	C
<b>PAAG_06568</b>	Conserved hypothetical protein (415 aa)	1	#	-	345,74	C
<b>PAAG_08051</b>	Hypothetical protein (279 aa)	2	#	0,594	217,91	C
<b>PAAG_08987</b>	Conserved hypothetical protein (317 aa)	1	#	-	170,75	C

<b>PAAG_05911</b>	Conserved hypothetical protein (147 aa)	1	#	-	8129,16	-1,876
<b>PAAG_07960</b>	Conserved hypothetical protein (152 aa)	4	#	-	1003,46	-1,573
<b>ENERGY</b>						
<b>PAAG_00151</b>	NADH-cytochrome b5 reductase (310 aa)	*	#	-	465,02	C
<b>PAAG_00948</b>	NADH dehydrogenase iron-sulfur protein (229 aa)	*	#	-	195,5	C
<b>PAAG_01044</b>	NADH-ubiquinone oxidoreductase 24 kDa subunit (260 aa)	*	#	-	368,56	C
<b>PAAG_02265</b>	Mitochondrial F1F0 ATP synthase subunit (102 aa)	1	#	-	8032,77	C
<b>PAAG_02656</b>	NADH-ubiquinone oxidoreductase 51 kDa subunit (516 aa)	*	#	-	617,71	C
<b>PAAG_03160</b>	Formation of crista junctions protein 1 (686 aa)	1	#	-	346,12	C
<b>PAAG_05091</b>	NADH-ubiquinone oxidoreductase 213 kDa subunit (200 aa)	3	#	-	357,62	C
<b>PAAG_05735</b>	NADH-ubiquinone oxidoreductase 49 kDa subunit (480 aa)	*	#	-	2857,94	C
<b>PAAG_05876</b>	Cytochrome c oxidase subunit VIa (143 aa)	*	#	-	2405,87	C
<b>PAAG_08517</b>	Propionate-CoA ligase (711 aa)	1	#	-	271,08	C
<b>PAAG_06796</b>	Cytochrome c oxidase polypeptide IV (198 aa)	*	#	-	1101,38	-3,160
<b>PAAG_08088</b>	Cytochrome b-c1 complex subunit 2 (464 aa)	*	#	-	2793,7	-2,481
<b>PAAG_08057</b>	Cytochrome c oxidase polypeptide V (200 aa)	*	#	-	969,86	-2,150
<b>PAAG_04570</b>	ATP synthase D chain, mitochondrial (175 aa)	*	#	-	6113,62	-1,890
<b>PAAG_05031</b>	NADH-ubiquinone oxidoreductase 40 kDa subunit (294 aa)	*	#	-	1979,87	-1,169
<b>PAAG_07672</b>	Cytochrome b-c1 complex subunit 7 (123 aa)	*	#	-	13389,36	-1,082
<b>PAAG_02653</b>	Acetyl-coenzyme A synthetase (670 aa)	*	#	-	1504,51	-1,702

UNCLASSIFIED PROTEINS						
PAAG_06654	Signal sequence receptor alpha chain (275 aa)	1	#	0,769	390,4	C
PAAG_07846	CBS and PB1 domain-containing protein (672 aa)	1	#	-	496,37	C
PAAG_04157	DUF1620 domain-containing protein (954 aa)	1	#	0,863	382,34	C
PAAG_06541	Erythrocyte band 7 integral membrane protein (361 aa)	*	#	-	867,73	-1,876
PAAG_12011	Mitochondria cytochrome c oxidase subunit 2 (254 aa)	2	#	-	2138,11	-3,260
PREDICTED PROTEINS						
PAAG_01439	Predicted protein (375 aa)	*	#	-	205,68	C
PAAG_03337	Predicted protein (327 aa)	*	#	-	202,04	C

<sup>a</sup>Accession number – Accession number of the protein in the database of *Paracoccidioides* spp.

([http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides\\_brasiliensis/MultiHome.html](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html));

<sup>b</sup>Protein annotation from *Paracoccidioides* genome database or by homology in NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>);

<sup>c</sup>Represents the amount of transmembrane domains identified in proteins using the program TMHMM version 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>);

<sup>d</sup>Presence of posttranslational modification. For myristoylated protein (C14) programs Terminator (<http://www.isv.cnrs-gif.fr/terminator3/test.php>) and Myristoylator (<http://web.expasy.org/myristoylator/>) were used. Terminator program was used to identify palmitoylated proteins. Research by prenylated proteins was done by the program PresPs-Prenylation Prediction Suite (<http://mendel.imp.ac.at/sat/PrePS/index.html>) and to predict GPI anchor the program big-Pi fungi predictor ([http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi\\_server.html](http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi_server.html)) was used. C15 and C20 indicates the presence of a recognition site for the addition of a farnesyl or geranyl group (FTase and geranyltransferase type I, Rab geranylgeranyl transferase);

<sup>e</sup>Presence of signal peptide was analyzed by program SignalP version 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). The values indicate the score of the proteins with the signal peptide, this value must be equal to or greater than 0.45;

<sup>f</sup>Indicates the score of the protein;

<sup>g</sup>Protein expression profiles in log2-fold change.

\*: Proteins that no presented transmembrane domain.

#: Proteins that no presented posttranslational modification.

-: Proteins that no presented signal peptide.

C: Proteins only identified in the control condition.

T: Proteins only identified in the zinc deprivation condition.

The functional classification was performed used the database of FunCat2

([http://pedant.gsf.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method=analysis&Db=p3\\_r48325\\_Par\\_bras\\_i\\_Pb01](http://pedant.gsf.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method=analysis&Db=p3_r48325_Par_bras_i_Pb01)).



The database Gene Ontology (GO) and WolfPSORT was employed to evaluate the possible localization of proteins in cell membranes of *Paracoccidioides* sp.. Some proteins did not show any form of classical association with the lipid bilayer, but showed that the localization subcellular were in regions of cell membranes, with score  $\geq 50$ .

Table 3: Membrane proteins of *Paracoccidioides* sp. up regulated in zinc deprivation and their provided biological functions – FunCat2

Access Number <sup>a</sup>	Annotation <sup>b</sup>	TMHs <sup>c</sup>	PTMs <sup>d</sup>	SignalP Score $\geq 0,45^e$	Score <sup>f</sup>	Fold change (log2) <sup>g</sup>
<b>PROTEIN SYNTHESIS</b>						
PAAG_03780	ATP-dependent RNA helicase DBP5 (505 aa)	*	#	-	131,49	T
PAAG_06701	PCI domain-containing protein (750 aa)	1	#	0,790	352,24	T
PAAG_01425	Eukaryotic translation initiation factor 3 (478 aa)	2	#	-	281,8	1,197
<b>CELLULAR TRANSPORT, TRANSPORT FACILITIES AND TRANSPORT ROUTES</b>						
PAAG_01345	Importin-8 (1032 aa)	*	#	-	133,85	T
PAAG_03042	Vacuolar ATP synthase subunit c (394 aa)	*	#	-	195,78	T
PAAG_05036	Transport protein SEC24 (939 aa)	*	#	-	141,36	T
PAAG_05425	Golgi membrane protein (Coy1) (766 aa)	1	#	-	118,61	T
PAAG_05589	Transport protein SEC23 (773 aa)	*	#	-	211,4	T
PAAG_07589	SNARE domain-containing protein (271 aa)	1	#	-	124,41	T
PAAG_07874	Hepatocellular carcinoma down-regulated mitochondrial carrier protein (302 aa)	*	#	-	152,37	T
PAAG_08834	Tricarboxylate transport protein (297 aa)	*	#	-	135,81	T
PAAG_00404	Mitochondrial sodium/hydrogen exchanger (710 aa)	9	#	-	123,07	T
PAAG_06344	Rab GDP-dissociation inhibitor (469 aa)	*	#	-	532,2	1,847
<b>METABOLISM</b>						
PAAG_08164	Homogentisate 1,2-dioxygenase (455 aa)	*	#	-	187,81	T
<b>ENERGY</b>						
PAAG_08352	NADH-ubiquinone oxidoreductase (120 aa)	1	#	-	375,07	T

<b>PROTEIN FATE (FOLDING, MODIFICATION, DESTINATION)</b>						
<b>PAAG_00739</b>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B (211 aa)	1	#	0,641	212,21	T
<b>PAAG_06946</b>	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit tim14	1	#	-	330,93	T
<b>HYPOTHETICAL PROTEINS</b>						
<b>PAAG_03316</b>	Conserved hypothetical protein (422 aa)	1	#	-	225,85	T
<b>PAAG_06136</b>	Conserved hypothetical protein (414 aa)	*	#	-	159,87	T
<b>PAAG_07599</b>	Conserved hypothetical protein (312 aa)	1	#	-	158,75	T
<b>UNCLASSIFIED PROTEINS</b>						
<b>PAAG_01417</b>	ER membrane DUF1077 domain-containing protein (105 aa)	2	#	-	311,13	T

<sup>a</sup>Accession number– Accession number of the protein in the database of *Paracoccidioides* spp.

([http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides\\_brasiliensis/MultiHome.html](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html));

<sup>b</sup>Protein annotation from Paracoccidioides genome database or by homology in NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>);

<sup>c</sup>Represents the amount of transmembrane domains identified in proteins using the program TMHMM version 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>);

<sup>d</sup>Presence of posttranslational modification. For myristoylated protein (C14) programs Terminator (<http://www.isv.cnrs-gif.fr/terminator3/test.php>) and Myristoylator (<http://web.expasy.org/myristoylator/>) were used. Terminator program was used to identify palmitoylated proteins. Research by prenylated proteins was done by the program PresPs-Prenylation Prediction Suite (<http://mendel.imp.ac.at/sat/PrePS/index.html>) and to predict GPI anchor the program big-Pi fungi predictor ([http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi\\_server.html](http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi_server.html)) was used. C15 and C20 indicates the presence of a recognition site for the addition of a farnesyl or geranyl group (FTase and geranyltransferase type I, Rab geranylgeranyl transferase);

<sup>e</sup>Presence of signal peptide was analyzed by program SignalP version 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). The values indicate the score of the proteins with the signal peptide, this value must be equal to or greater than 0.45;

<sup>f</sup>Indicates the score of the protein;

<sup>g</sup>Protein expression profiles in log2-fold change.

\*: Proteins that no presented transmembrane domain.

#: Proteins that no presented posttranslational modification.

-: Proteins that no presented signal peptide.

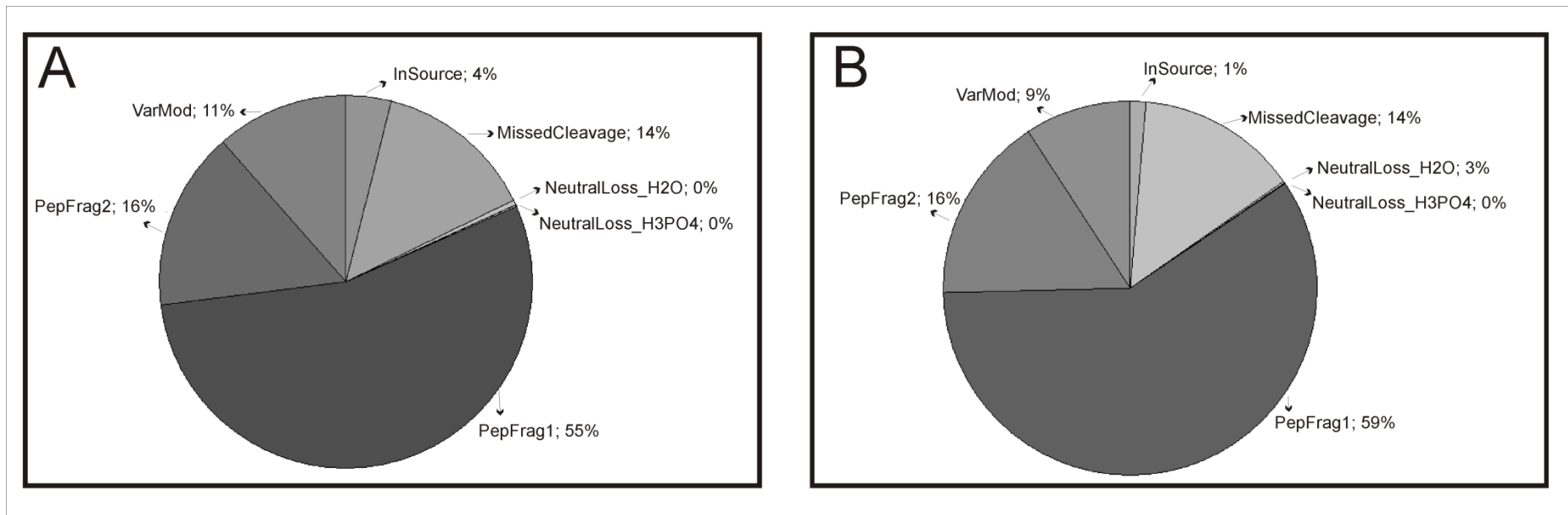
C: Proteins only identified in the control condition.

T: Proteins only identified in the zinc deprivation condition.

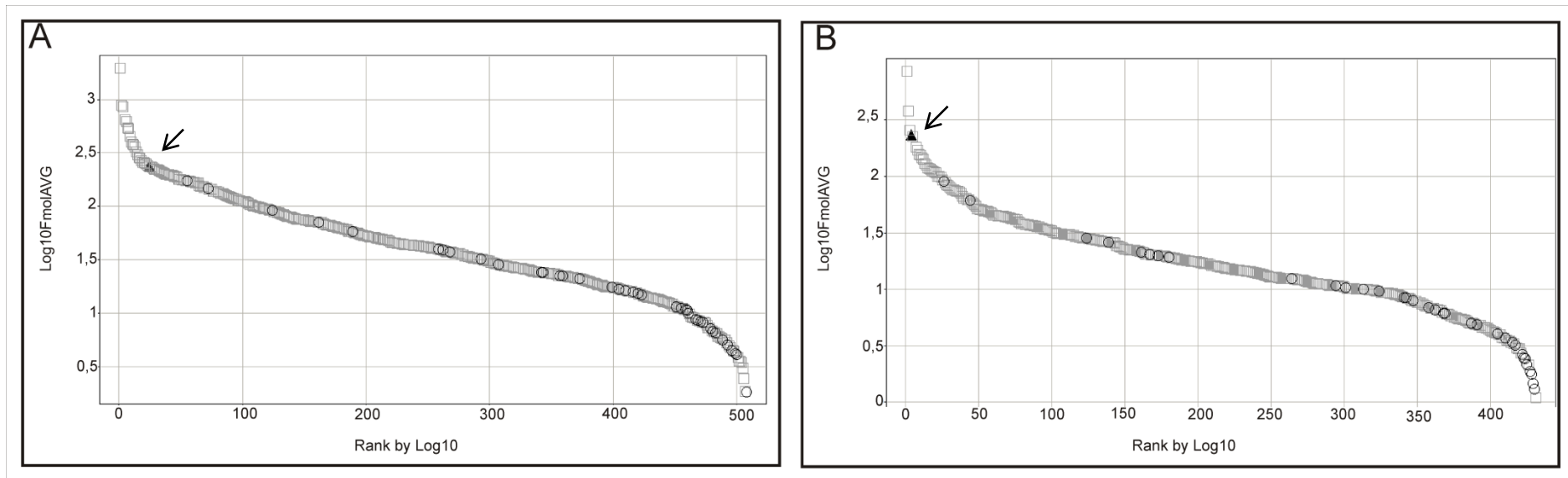
The functional classification was performed used the database of FunCat2

([http://pedant.gsf.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method=analysis&Db=p3\\_r48325\\_Par\\_bras\\_i\\_Pb01](http://pedant.gsf.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method=analysis&Db=p3_r48325_Par_bras_i_Pb01)).

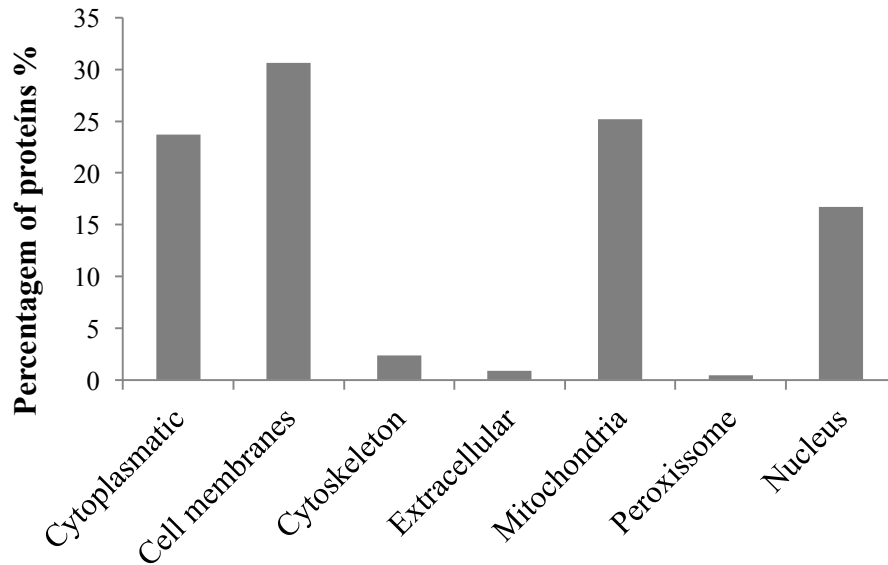
The database Gene Ontology (GO) and WolfPSORT was employed to evaluate the possible localization of proteins in cell membranes of *Paracoccidioides* sp.. Some proteins did not show any form of classical association with the lipid bilayer, but showed that the localization subcellular were in regions of cell membranes, with score  $\geq 50$ .



**Supplementary figure 1: Peptide detection type to control and zinc deprivation samples.** The graphics A and B represent peptide detection type to control and zinc deprivation samples, respectively. PepFrag1 and PepFrag2 correspond to the peptide matched when compared to database by PLGS, VarMod that corresponds to variable modifications, InSource that corresponds to fragmentation that occurred on ionization source, MissedCleavage that indicates the missed cleavage by trypsin and Neutral loss H<sub>2</sub>O and NH<sub>3</sub> that correspond to water and ammonia precursor losses.



**Supplementary figure 2: Detection dynamic range of the experiments.** For each conditions the dynamic range of proteomic experiments was performed. Graphic A represent the control and graphic B zinc deprivation. The square gray represent the regular proteins, black circle represent the reverse proteins and triangle black, indicated by the black arrow, represent the standard proteins (rabbit phosphorylase B).



**Supplementary figure 3: Subcellular localization of identified proteins.** The programs used for *in silico* analysis of the subcellular localization of proteins was Wolf PSORT and Gene Ontology (GO). The presence of transmembrane domain and post translational modification were also considered during the classification of subcellular localization of identified proteins. The main subcellular localizations of the identified proteins in the membrane fraction were in the cell membranes (30,65%) followed by localization in mitochondrial region (25,22%) and cytoplasmatic region (23,7%).

Supplementary table-1: Proteins regulated in *Paracoccidioides* sp. yeast cells under zinc deprivation and their provided biological functions – FunCat2

Access Number <sup>a</sup>	Annotation <sup>b</sup>	TMH <sup>c</sup>	PTMs <sup>d</sup>	SignalP Score ≥ 0,45 <sup>e</sup>	Score <sup>f</sup>	Fold change (log2) <sup>g</sup>
<b>CELLULAR TRANSPORT, TRANSPORT FACILITIES AND TRANSPORT ROUTES</b>						
PAAG_00481	Membrane biogenesis protein Yop1 (171 aa)	3	#	-	2066,63	C
PAAG_01037	Oligosaccharyltransferase alpha subunit (505 aa)	1	#	0,784	331,3	C
PAAG_01750	Signal sequence binding protein (1497 aa)	2	#	0,745	229,94	C
PAAG_02679	Vacuolar ATP synthase 98 kDa subunit (841 aa)	7	#	-	212,59	C
PAAG_02796	Mitochondrial 2-oxodicarboxylate carrier 1 (315 aa)	*	#	-	217,42	C
PAAG_02824	Mitochondrial inner membrane translocase subunit TIM44 (534 aa)	*	#	-	198,45	C
PAAG_03162	Phosphoinositide phosphatase (Sac1) (707 aa)	2	#	-	183,88	C
PAAG_03418	Mitochondrial precursor proteins import receptor (1572 aa)	1	#	-	194,08	C
PAAG_03644	Mitochondrial import receptor subunit tom-40 (356 aa)	*	#	-	651,53	C
PAAG_03988	ADP-ribosylation factor (187 aa)	*	C 14	-	243,52	C
PAAG_04328	Endosomal cargo receptor (Erp3) (213 aa)	2	#	0,912	1751,27	C
PAAG_05350	Mitochondrial phosphate carrier protein (422 aa)	*	#	-	3006,85	C
PAAG_05584	Peroxisomal adenine nucleotide transporter 1 (343 aa)	2	#	-	243,45	C
PAAG_05828	Cation-transporting ATPase (1317 aa)	3	#	-	255,75	C
PAAG_05848	Reduced viability upon starvation protein (418 aa)	*	#	-	485,7	C
PAAG_05864	Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein (393 aa)	1	#	-	234,69	C
PAAG_06994	Endoplasmic reticulum vesicle protein (217 aa)	2	#	0,872	177,08	C

<b>PAAG_07712</b>	Surfeit locus protein (304 aa)	7	#	-	2155,51	C
<b>PAAG_08010</b>	Mitochondrial carrier protein (311 aa)	*	#	-	1443,87	C
<b>PAAG_08029</b>	Peroxisomal membrane protein PMP34 (338 aa)	5	#	-	382,02	C
<b>PAAG_08086</b>	Mitochondrial DNA replication protein YHM2 (317 aa)	*	#	-	514,67	C
<b>PAAG_08469</b>	Inorganic phosphate transporter (202 aa)	1	#	-	2214,41	C
<b>PAAG_08587</b>	GPR1/FUN34/yaaH family protein (226 aa)	3	#	-	4618,7	C
<b>PAAG_09064</b>	Sideroflexin-1 (338 aa)	5	#	-	374,9	C
<b>PAAG_05443</b>	Endoplasmatic reticulum 25kda transmembrane protein (214 aa)	3	#	-	560,94	C
<b>PAAG_07328</b>	Transport protein SEC61 subunit alpha (480 aa)	10	#	-	621,26	-3,910
<b>PAAG_07564</b>	Outer mitochondrial membrane protein porin (285 aa)	*	#	-	9018,79	-3,910
<b>PAAG_01602</b>	Ras-like GTP-binding protein (312 aa)	*	C 20	-	1037,04	-3,506
<b>PAAG_00639</b>	Phosphate carrier protein (385 aa)	*	#	-	1566,86	-2,871
<b>PAAG_08620</b>	ADP,ATP carrier protein (310 aa)	3	#	-	10453,18	-2,207
<b>PAAG_06233</b>	Vesicular-fusion protein SEC17 (293 aa)	*	#	-	3732,83	-1,789
<b>PAAG_05107</b>	AAA ATPase (921 aa)	*	#	-	351,17	-1,500
<b>PAAG_00782</b>	Small COPII coat GTPase sar1 (190 aa)	*	#	-	1439,66	-1,241
<b>PAAG_05518</b>	Cell division cycle protein (821 aa)	*	#	-	445,04	-0,736
<b>PAAG_08082</b>	Plasma membrane ATPase (930 aa)	9	#	-	7230,75	-2,828
<b>PAAG_07175</b>	GTP-binding protein YPT52 (294 aa)	*	C 20	-	1651,53	-2,077
<b>PAAG_01345</b>	Importin-8 (1032 aa)	*	#	-	133,85	T

<b>PAAG_01947</b>	ATPase GET3 (342 aa)	*	#	-	218,13	T
<b>PAAG_02625</b>	Vesicle transport v-SNARE protein vti1 (209 aa)	*	#	-	256	T
<b>PAAG_03042</b>	Vacuolar ATP synthase subunit c (394 aa)	*	#	-	195,78	T
<b>PAAG_03820</b>	Sorting nexin-3 (143 aa)	*	#	-	168,23	T
<b>PAAG_04914</b>	Zinc finger protein gcs1 (407 aa)	*	#	-	191,11	T
<b>PAAG_05036</b>	Transport protein SEC24 (939 aa)	*	#	-	141,36	T
<b>PAAG_05425</b>	Golgi membrane protein (Coy1) (766 aa)	1	#	-	118,61	T
<b>PAAG_05589</b>	Transport protein SEC23 (773 aa)	*	#	-	211,4	T
<b>PAAG_05716</b>	Carbonic anhydrase (283 aa)	*	#	-	198,09	T
<b>PAAG_05827</b>	Glycolipid transferprotein HET-C2 (209 aa)	*	#	-	198,19	T
<b>PAAG_06249</b>	Transport protein SEC31 (1274 aa)	*	#	-	144,74	T
<b>PAAG_06255</b>	Mitochondrial co-chaperone GrpE (254 aa)	*	#	-	2023,92	T
<b>PAAG_07589</b>	SNARE domain-containing protein (271 aa)	1	#	-	124,41	T
<b>PAAG_07845</b>	Karyopherin (1035 aa)	*	#	0,661	139,85	T
<b>PAAG_07874</b>	Hepatocellular carcinoma down-regulated mitochondrial carrier protein (302 aa)*	*	#	-	152,37	T
<b>PAAG_08359</b>	Coatomer subunit alpha (1211 aa)	*	#	-	140,04	T
<b>PAAG_08834</b>	Tricarboxylate transport protein (297 aa)	*	#	-	135,81	T
<b>PAAG_00404</b>	Mitochondrial sodium/hydrogen exchanger (710 aa)	9	#	-	123,07	T
<b>PAAG_06344</b>	Rab GDP-dissociation inhibitor (469 aa)	*	#	-	532,2	1,847
<b>CELL CYCLE AND DNA PROCESSING</b>						



<b>PAAG_00294</b>	Replication factor-A protein (604 aa)	*	#	-	190,97	C
<b>PAAG_00570</b>	Tubulin gamma chain (448 aa)	*	#	-	435,26	C
<b>PAAG_04999</b>	Spindle pole body component alp14 (911 aa)	*	#	-	172,63	C
<b>PAAG_05000</b>	Nuclear migration protein nudF (75 aa)	*	#	-	692,73	C
<b>PAAG_07669</b>	Mannan polymerase II complex ANP1 subunit (461 aa)	*	#	-	580,61	C
<b>PAAG_03532</b>	Actin (376 aa)	*	#	-	14339,53	-2,683
<b>PAAG_01041</b>	Prohibitin-2 (311 aa)	1	#	-	4227,94	-1,428
<b>PAAG_08471</b>	Histone H2A.Z (139 aa)	*	#	-	2767,66	-1,356
<b>PAAG_00106</b>	Histone acetyltransferase type B catalytic subunit (547 aa)	*	#	-	152,79	T
<b>PAAG_02403</b>	Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase PRP43 (769 aa)	*	#	-	159,11	T
<b>PAAG_06574</b>	Curved DNA-binding protein 42 kDa protein (420 aa)	*	#	-	229,32	T
<b>PAAG_06891</b>	mRNA binding post-transcriptional regulator (Csx1) (401 aa)	*	#	-	962,92	T
<b>PAAG_07170</b>	Eukaryotic translation initiation factor 3 135 kDa subunit (1270 aa)	*	#	-	290,02	T
<b>PAAG_03031</b>	Tubulin beta chain (448 aa)	*	#	-	2194,01	0,635
<b>PAAG_02364</b>	Thioredoxin (117 aa)	*	#	-	8475,69	3,636
<b>METABOLISM</b>						
<b>PAAG_00230</b>	Cytochrome P450 61 (167 aa)	*	#	-	652,31	C
<b>PAAG_00231</b>	Cytochrome P450 61 (354 aa)	1	#	-	303,05	C
<b>PAAG_00827</b>	Cytochrome P450 51 (603 aa)	4	#	0,749	308,44	C
<b>PAAG_01178</b>	6-phosphogluconate dehydrogenase (492 aa)	*	#	-	752,45	C

<b>PAAG_01222</b>	Acyl-CoA dehydrogenase family protein (506 aa)	*	#	-	367,58	C
<b>PAAG_01390</b>	Endoplasmic reticulum protein (570 aa)	1	#	0,658	223,43	C
<b>PAAG_07503</b>	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase beta (304 aa)	2	#	-	425,34	C
<b>PAAG_01542</b>	Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A (512 aa)	*	#	-	210,86	C
<b>PAAG_01833</b>	2-succinylbenzoate-CoA ligase (583 aa)	*	#	-	456,85	C
<b>PAAG_01882</b>	Acetolactate synthase catalytic subunit (702 aa)	*	#	-	376,47	C
<b>PAAG_01931</b>	Phosphoacetylglucosamine mutase (549 aa)	*	#	-	1039,05	C
<b>PAAG_01974</b>	Mitochondrial methylglutaconyl-CoA hydratase (306 aa)	*	#	-	201,77	C
<b>PAAG_02604</b>	L-tyrosine decarboxylase (578 aa)*	*	#	-	169,59	C
<b>PAAG_02644</b>	Kynurenine-oxoglutarate transaminase (452 aa)	*	#	-	263,08	C
<b>PAAG_02693</b>	Saccharopine dehydrogenase (451 aa)	*	#	-	215,45	C
<b>PAAG_03024</b>	3-ketodihydrosphingosine reductase tsc10 (386 aa)	1	#	-	253,4	C
<b>PAAG_03659</b>	Protein kinase gsk3 (395 aa)	*	#	-	248,12	C
<b>PAAG_03722</b>	Acyl-CoA desaturase (467 aa)	4	#	-	738,82	C
<b>PAAG_03974</b>	NADPH cytochrome P450 oxidoreductase (379 aa)	1	#	-	310,79	C
<b>PAAG_04099</b>	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha (727 aa)	*	#	-	205,93	C
<b>PAAG_04238</b>	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit (655 aa)	*	#	-	179,7	C
<b>PAAG_04564</b>	Betaine aldehyde dehydrogenase (635 aa)	*	#	-	193,12	C
<b>PAAG_04719</b>	Oligosaccharyl transferase subunit (739 aa)	13	#	-	379,35	C
<b>PAAG_05077</b>	Class I alpha-mannosidase 1A (869 aa)	1	#	-	360,41	C

<b>PAAG_05644</b>	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 12-A (340 aa)	1	#	-	208,66	C
<b>PAAG_05910</b>	Dolichyl-phosphate-mannose-protein mannosyltransferase (917 aa)	8	#	-	657,3	C
<b>PAAG_05972</b>	N-acetyltransferase ECO1 (426 aa)	*	#	-	236,06	C
<b>PAAG_06217</b>	Acetylmithine aminotransferase (485 aa)	*	#	-	203,45	C
<b>PAAG_06825</b>	Fatty-acid amide hydrolase (607 aa)	*	#	-	212,72	C
<b>PAAG_06996</b>	G-protein complex beta subunit CpcB (317 aa)	*	#	-	587,65	C
<b>PAAG_07631</b>	Short chain dehydrogenase/reductase family protein (254 aa)	*	#	-	222,77	C
<b>PAAG_07682</b>	Ribonucleoside-diphosphate reductase large chain (879 aa)	*	#	-	272,71	C
<b>PAAG_07785</b>	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component (990 aa)	*	#	-	185,43	C
<b>PAAG_08052</b>	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase (708 aa)	*	#	-	251,97	C
<b>PAAG_08100</b>	O-acetylhomoserine (thiol)-lyase (440 aa)	*	#	-	373,09	C
<b>PAAG_08349</b>	C-1-tetrahydrofolate synthase (940 aa)	*	#	-	237,4	C
<b>PAAG_08431</b>	Dolichyl-phosphate-mannose-protein mannosyltransferase (746 aa)	9	#	-	289,29	C
<b>PAAG_08718</b>	Succinate-semialdehyde dehydrogenase (498 aa)	*	#	-	235,42	C
<b>PAAG_08880</b>	Cell division control protein (386 aa)	*	#	-	207,96	C
<b>PAAG_01575</b>	Sterol 24-C-methyltransferase (378 aa)	*	#	-	1375,67	-3,044
<b>PAAG_07729</b>	Isocitrate dehydrogenase subunit 2 (342 aa)	*	#	-	2867,17	-2,510
<b>PAAG_03978</b>	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase (345 aa)	*	#	-	394,12	-2,453
<b>PAAG_01874</b>	Dolichol-phosphate mannosyltransferase (280 aa)	*	#	-	1456,63	-2,366
<b>PAAG_02603</b>	Aspartate aminotransferase (430 aa)	*	#	-	1320,11	-2,279

<b>PAAG_05419</b>	rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarlin (319 aa)	*	#	-	662,01	-2,164
<b>PAAG_00850</b>	Glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase (489 aa)	*	#	-	3602,18	-1,991
<b>PAAG_08174</b>	Mannose-1-phosphate guanyltransferase subunit beta-A (506 aa)	*	#	-	1194,16	-1,789
<b>PAAG_00856</b>	Isocitrate dehydrogenase subunit 1 (389 aa)	*	#	-	2920,71	-1,731
<b>PAAG_09072</b>	Mitochondrial nuclease (336 aa)	1	#	-	3854,97	-1,616
<b>PAAG_06289</b>	Tryptophan synthase (725 aa)	*	#	-	390,84	-1,443
<b>PAAG_02718</b>	Mannose-1-phosphate guanyltransferase (416 aa)	*	#	-	845,97	-1,428
<b>PAAG_01002</b>	NAD-specific glutamate dehydrogenase (1104 aa)	*	#	-	691,16	-1,284
<b>PAAG_00435</b>	(R)-benzylsuccinyl-CoA dehydrogenase (445 aa)	*	#	-	1227,68	-1,068
<b>PAAG_06961</b>	Aldehyde dehydrogenase (496 aa)	*	#	-	744,17	-0,909
<b>PAAG_01525</b>	Fatty acid synthase subunit alpha reductase (1884 aa)	*	#	-	389,8	-0,793
<b>PAAG_00317</b>	Septin 4 (346 aa)	*	#	-	444,9	T
<b>PAAG_00417</b>	Succinyl-CoA ligase subunit alpha (332 aa)	*	#	-	681,58	T
<b>PAAG_01324</b>	Folic acid synthesis protein (601 aa)	*	#	-	193,22	T
<b>PAAG_01787</b>	Protein phosphatase PP2A regulatory subunit A (617 aa)	*	#	-	185,69	T
<b>PAAG_02011</b>	Phosphoglucomutase (763 aa)	*	#	-	140,67	T
<b>PAAG_02016</b>	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase (653 aa)	*	#	-	368,86	T
<b>PAAG_02336</b>	Nudix hydrolase (323 aa)	*	#	-	114,18	T
<b>PAAG_02554</b>	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase (512 aa)	*	#	-	243,08	T
<b>PAAG_02859</b>	Adenosylhomocysteinase (448 aa)	*	#	-	491,12	T

<b>PAAG_03643</b>	6-phosphofructo-2-kinase (535 aa)	*	#	-	156,97	T
<b>PAAG_03689</b>	3-ketoacyl-CoA thiolase B (420 aa)	*	#	-	140,26	T
<b>PAAG_04102</b>	Isovaleryl-CoA dehydrogenase (431 aa)	*	#	-	988,61	T
<b>PAAG_04528</b>	Acetylglutamate kinase (905 aa)	*	#	-	184,26	T
<b>PAAG_04856</b>	Acetyl-CoA hydrolase (526 aa)	*	#	-	152,67	T
<b>PAAG_04966</b>	Hydrolase (298 aa)	*	#	-	155,53	T
<b>PAAG_05005</b>	Anthranilate synthase component 1 (556 aa)	*	#	-	147,53	T
<b>PAAG_05151</b>	ATP-citrate-lyase (487 aa)	*	#	-	655,78	T
<b>PAAG_05198</b>	Chorismate mutase (330 aa)	*	#	-	286,91	T
<b>PAAG_05253</b>	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase (574 aa)	*	#	-	208,72	T
<b>PAAG_05328</b>	3-isopropylmalate dehydrogenase A (363 aa)	*	#	-	198,35	T
<b>PAAG_05355</b>	Acetamidase (543 aa)	*	#	-	174,47	T
<b>PAAG_05392</b>	Betaine aldehyde dehydrogenase (479 aa)	*	#	-	1998,5	T
<b>PAAG_05406</b>	Histidine biosynthesis trifunctional protein (871 aa)	*	#	-	217,33	T
<b>PAAG_06431</b>	Ornithine aminotransferase (461 aa)	*	#	-	1076,09	T
<b>PAAG_06458</b>	Dihydroorotate dehydrogenase (529 aa)	*	#	-	172,97	T
<b>PAAG_06596</b>	Alcohol dehydrogenase (320 aa)	*	#	-	173,77	T
<b>PAAG_06953</b>	Short chain dehydrogenase/reductase family (261 aa)	*	#	-	204,27	T
<b>PAAG_07605</b>	Acetolactate synthase small subunit (338 aa)	*	#	-	241,99	T
<b>PAAG_07626</b>	Cobalamin-independent synthase (772 aa)	*	#	-	546,81	T

<b>PAAG_07746</b>	3-ketoacyl-CoA thiolase (422 aa)	*	#	-	464,73	T
<b>PAAG_07804</b>	D-lactate dehydrogenase (525 aa)	*	#	-	265,01	T
<b>PAAG_08164</b>	Homogentisate 1,2-dioxygenase (455 aa)	*	#	-	187,81	T
<b>PAAG_08512</b>	Serine hydroxymethyltransferase (536 aa)	*	#	-	672,51	T
<b>PAAG_08731</b>	Acetyl-CoA carboxylase (2273 aa)	*	#	-	127,68	T
<b>PAAG_08910</b>	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase (609 aa)	*	#	-	218,07	T
<b>PAAG_06506</b>	Aspartate aminotransferase (464 aa)	*	#	-	166,79	0,707
<b>PAAG_08075</b>	Citrate synthase (475 aa)	*	#	-	1939,32	0,750
<b>PAAG_07786</b>	Acetyl-CoA acetyltransferase (400 aa)	*	#	-	565,13	1,111
<b>PAAG_01336</b>	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase (669 aa)	*	#	-	166,58	1,284
<b>PAAG_00468</b>	4-aminobutyrate aminotransferase (286 aa)	*	#	-	399,07	1,601
<b>PAAG_07276</b>	Glycogen synthase (711 aa)	*	#	-	292,89	1,601
<b>PAAG_01321</b>	Oxidoreductase 2-nitropropane dioxygenase family (356 aa)	*	#	-	4962,24	1,919
<b>PROTEIN SYNTHESIS</b>						
<b>PAAG_00648</b>	60S ribosomal protein L33-B (110 aa)	*	#	-	1964,82	C
<b>PAAG_01001</b>	40S ribosomal protein S29 (261 aa)	*	#	-	1992,17	C
<b>PAAG_01050</b>	Cytosolic large ribosomal subunit protein L30 (110 aa)	*	#	-	3129,24	C
<b>PAAG_01330</b>	Eukaryotic translation initiation factor 3 RNA-binding subunit (289 aa)	*	#	-	249,8	C
<b>PAAG_01834</b>	60S ribosomal protein L16 (203 aa)	*	#	-	1527,43	C
<b>PAAG_02889</b>	Ribosomal protein L35 (126 aa)	*	#	-	4498,1	C
<b>PAAG_03019</b>	60S ribosomal protein L6-B (205 aa)	*	#	-	945,94	C

<b>PAAG_03322</b>	40S ribosomal protein S20 (117 aa)	*	#	-	6248,36	C
<b>PAAG_04253</b>	Mitochondrial 54S ribosomal protein IMG1 (219 aa)	*	#	-	350,09	C
<b>PAAG_05233</b>	60S ribosomal protein L26 (135 aa)	*	#	-	1520,52	C
<b>PAAG_05805</b>	40S ribosomal protein S21 (89 aa)	*	#	-	1297,9	C
<b>PAAG_06668</b>	Mitochondrial metallochaperone Sco1 (317 aa)	1	#	-	253,54	C
<b>PAAG_07381</b>	Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1 (475 aa)	*	#	-	283,46	C
<b>PAAG_07385</b>	60S ribosomal protein L23a (154 aa)	*	#	-	5895,08	C
<b>PAAG_07707</b>	60S ribosomal protein L10a (230 aa)	*	#	-	1338,26	C
<b>PAAG_05337</b>	40S ribosomal protein S22 (131 aa)	*	#	-	12504,44	-4,588
<b>PAAG_00724</b>	Ribosomal protein 11 large subunit (176 aa)	*	#	-	9552,25	-4,400
<b>PAAG_01785</b>	40S ribosomal protein S3 (271 aa)	*	#	-	21541,52	-4,371
<b>PAAG_01433</b>	40S ribosomal protein S14 (152 aa)	*	#	-	17244	-3,679
<b>PAAG_04998</b>	60S ribosomal protein L8-B (262 aa)	*	#	-	2775,79	-3,549
<b>PAAG_05379</b>	60S ribosomal protein L17 (185 aa)	*	#	-	1113,95	-3,520
<b>PAAG_00765</b>	60S ribosomal protein L36 (104 aa)	*	#	-	2664,35	-3,477
<b>PAAG_06569</b>	60S ribosomal protein L43 (93 aa)	*	#	-	5061,11	-3,477
<b>PAAG_05017</b>	40S ribosomal protein S10-A (166 aa)	*	#	-	679,84	-3,333
<b>PAAG_00952</b>	60S ribosomal protein L20 (175 aa)	*	#	-	5734,02	-3,304
<b>PAAG_08888</b>	60S ribosomal protein L4-A (373 aa)	*	#	-	8767,51	-3,246
<b>PAAG_03513</b>	40S ribosomal protein S18 (156 aa)	*	#	-	14815,58	-3,174

<b>PAAG_06367</b>	30S ribosomal protein S17P (162 aa)	*	#	-	5888,38	-3,131
<b>PAAG_01939</b>	60S ribosomal protein L27-A (136 aa)	*	#	-	6931,86	-2,770
<b>PAAG_04425</b>	60S ribosomal protein L22 (123 aa)	*	#	-	5067,62	-2,698
<b>PAAG_00430</b>	60S ribosomal protein L2 (255 aa)	*	#	-	2846,63	-2,683
<b>PAAG_00548</b>	60S ribosomal protein L5 (300 aa)	*	#	-	2156,82	-2,669
<b>PAAG_08497</b>	60S ribosomal protein L19 (192 aa)	*	#	-	6540,1	-2,626
<b>PAAG_02634</b>	Ribosomal protein S6 (238 aa)	*	#	-	8673,91	-2,597
<b>PAAG_00205</b>	60S ribosomal protein L24(161 aa)	*	#	-	835,13	-2,525
<b>PAAG_06743</b>	Ribosomal protein L23e (141 aa)	*	#	-	2920,08	-2,525
<b>PAAG_00088</b>	60S ribosomal protein L3 (393 aa)	*	#	-	1944,76	-2,380
<b>PAAG_00594</b>	Elongation factor 2 (832 aa)	*	#	-	3597,23	-2,265
<b>PAAG_00969</b>	60S ribosomal protein L15 (204 aa)	*	#	-	2964,13	-2,222
<b>PAAG_03816</b>	40S ribosomal protein S4 (263 aa)	*	#	-	4428,17	-2,150
<b>PAAG_01435</b>	40S ribosomal protein S16 (144 aa)	*	#	-	11252,87	-2,135
<b>PAAG_07955</b>	60S ribosomal protein L18 (190 aa)	*	#	-	4195,82	-2,106
<b>PAAG_01413</b>	40S ribosomal protein S17 (143 aa)	*	#	-	7782,73	-1,775
<b>PAAG_07847</b>	40S ribosomal protein S26 (122 aa)	*	#	-	5677,8	-1,717
<b>PAAG_03828</b>	40S ribosomal protein S9 (192 aa)	*	#	-	5593,07	-1,702
<b>PAAG_06487</b>	60S ribosomal protein L7-C (249 aa)	*	#	-	3017,48	-1,702
<b>PAAG_00801</b>	60S acidic ribosomal protein P0 lyase (314 aa)	*	#	-	5246,05	-1,688



<b>PAAG_04965</b>	60S ribosomal protein L31 (124 aa)	*	#	-	4718	-1,688
<b>PAAG_00347</b>	60S ribosomal protein L9-B (193 aa)	*	#	-	857,94	-1,587
<b>PAAG_09043</b>	40S ribosomal protein S2 (261 aa)	*	#	-	6516,56	-1,298
<b>PAAG_06320</b>	60S ribosomal protein L13 (218 aa)	*	#	-	7295,81	-1,342
<b>PAAG_00264</b>	40S ribosomal protein S8-B (203 aa)	*	#	-	4093,71	-1,183
<b>PAAG_06882</b>	40S ribosomal protein S24 (135 aa)	*	#	-	2114,3	-0,838
<b>PAAG_02111</b>	40S ribosomal protein S0 (296 aa)	*	#	-	6272,65	-0,692
<b>PAAG_03827</b>	60S ribosomal protein L21-A (161 aa)	*	#	-	5832	-0,692
<b>PAAG_00150</b>	Arginyl-tRNA synthetase (585 aa)	*	#	-	290,14	T
<b>PAAG_00240</b>	Eukaryotic translation initiation factor 5A (139 aa)	*	#	-	193,53	T
<b>PAAG_00244</b>	Polyadenylate-binding protein (823 aa)	*	#	-	359,49	T
<b>PAAG_00747</b>	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit gamma (521 aa)	*	#	-	297,63	T
<b>PAAG_00815</b>	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A (1072 aa)	*	#	-	123,62	T
<b>PAAG_01141</b>	Tyrosyl-tRNA synthetase (411 aa)	*	#	-	375,36	T
<b>PAAG_01786</b>	Phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain (601 aa)	*	#	-	238,36	T
<b>PAAG_02553</b>	54S ribosomal protein YmL6 (347 aa)	*	#	-	331,5	T
<b>PAAG_03780</b>	ATP-dependent RNA helicase DBP5 (505 aa)	*	#	-	131,49	T
<b>PAAG_04916</b>	Elongation factor G (904 aa)	*	#	-	118,6	T
<b>PAAG_05015</b>	Leucyl-tRNA synthetase (1119 aa)	*	#	-	177,07	T
<b>PAAG_05806</b>	Phenylalanyl-tRNA synthetase alpha chain (521 aa)	*	#	-	169,92	T

<b>PAAG_06701</b>	PCI domain-containing protein (750 aa)	1	#	0,790	352,24	T
<b>PAAG_09083</b>	TCTP family protein (183 aa)	*	#	-	8742,68	T
<b>PAAG_00238</b>	Ubiquitin (219 aa)	*	#	-	274,05	0,678
<b>PAAG_08540</b>	40S ribosomal protein S25 (158 aa)	*	#	-	1542,68	0,721
<b>PAAG_08955</b>	40S ribosomal protein S3aE (256 aa)	*	#	-	8490,22	1,125
<b>PAAG_01425</b>	Eukaryotic translation initiation factor 3 (478 aa)	2	#	-	281,8	1,197
<b>PAAG_04690</b>	40S ribosomal protein S15 (154 aa)	*	#	-	14548,56	1,399
<b>CELLULAR COMMUNICATION/SIGNAL TRANSDUCTION MECHANISM</b>						
<b>PAAG_04025</b>	Osmosensor protein (278 aa)	2	#	-	510,94	C
<b>PAAG_04784</b>	COP9 signalosome complex subunit 1 (490 aa)	*	#	-	362,35	C
<b>PAAG_06815</b>	Tricalbin-3 (1516 aa)	2	#	-	165,67	C
<b>PAAG_07640</b>	Casein kinase I (284 aa)	*	#	-	196,41	C
<b>PAAG_08093</b>	GTP-binding protein ypt3 (221 aa)	*	C 20	-	692,85	C
<b>PAAG_08247</b>	Calmodulin (150 aa)	*	#	-	943,74	C
<b>PAAG_01500</b>	GTP-binding protein SAS1 (207 aa)	*	C 20	-	1546,88	-2,813
<b>PAAG_02458</b>	GTP-binding protein ypt7 (206 aa)	*	C 20	-	1281,11	-2,481
<b>PAAG_07734</b>	Adenylyl cyclase-associated protein (531 aa)	*	#	-	244,83	-2,265
<b>PAAG_07634</b>	Small GTPase RhoA (192 aa)	*	C 15/C 20	-	6087,45	-1,053
<b>PAAG_02817</b>	Stomatin family protein (457 aa)	*	#	-	362,08	-0,866
<b>PAAG_05737</b>	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase (352 aa)	*	#	-	125	T

PAAG_05737	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase (386 aa)	*	#	-	125	T
PAAG_05737	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase (412 aa)	*	#	-	125	T
PAAG_05737	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase (446 aa)	*	#	-	125	T
PAAG_06948	Mitogen-activated protein kinase MKC1 (432 aa)	*	#	-	827,05	T
PAAG_02820	GTP-dependent nucleic acid-binding protein engD (413 aa)	*	#	-	284,62	1,674
PAAG_00535	Mitogen-activated protein kinase HOG1 (361 aa)	*	#	-	176,87	1,688
<b>PROTEIN FATE (FOLDING, MODIFICATION, DESTINATION)</b>						
PAAG_00188	Mitochondrial intermembrane space protein Mia40(401 aa)	*	#	-	426,79	C
PAAG_00986	Disulfide isomerase Pdi1 (539 aa)	*	#	0,772	1771,33	C
PAAG_01706	26S proteasome regulatory subunit RPN10 (301 aa)	*	#	-	265,68	C
PAAG_02085	Signal sequence processing protein SEC11 (198 aa)	*	#	-	363,12	C
PAAG_02462	Alpha-1,2 mannosyltransferase KTR1 (505 aa)	1	#	-	300,78	C
PAAG_02588	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase cyp8 (442 aa)	*	#	-	213,93	C
PAAG_04882	Tetratricopeptide repeat domain-containing protein (415 aa)	*	#	-	368,2	C
PAAG_04917	Vacuolar protein sorting-associated protein vps17 (582 aa)	*	#	-	301,54	C
PAAG_05468	Translocation protein sec63 (693 aa)	3	#	-	324,18	C
PAAG_05509	Proteasome non-ATPase regulatory subunit 11 (425 aa)	*	#	-	174,96	C
PAAG_05962	Proteasome non-ATPase regulatory subunit 3 (642 aa)	*	#	-	227,53	C
PAAG_06464	Disulfide-isomerase (728 aa)	1	#	0,851	252,29	C
PAAG_07235	SNARE domain-containing protein (252 aa)	*	#	-	430,59	C

<b>PAAG_07238</b>	Alpha-1,2 mannosyltransferase KTR1 (397 aa)	1	#	0,732	671,57	C
<b>PAAG_07286</b>	Vacuolar protein sorting-associated protein (133 aa)	*	#	-	1179,07	C
<b>PAAG_08184</b>	T-complex protein 1 epsilon subunit (569 aa)	*	#	-	274,81	C
<b>PAAG_04458</b>	Prohibitin-1 (281 aa)	*	#	-	2586,79	-3,145
<b>PAAG_07165</b>	T-complex protein 1 subunit gamma (539 aa)	*	#	-	429,56	-2,222
<b>PAAG_03161</b>	GTP-binding protein ypt5 (215 aa)	*	#	-	1564,16	-2,106
<b>PAAG_03952</b>	T-complex protein 1 subunit alpha (569 aa)	*	#	-	337,36	-1,962
<b>PAAG_07851</b>	T-complex protein 1 subunit eta (564 aa)	*	#	-	476,87	-1,746
<b>PAAG_01727</b>	T-complex protein 1 subunit delta (511 aa)	*	#	-	1318,93	-1,674
<b>PAAG_04110</b>	Dolichyl-di-phosphooligosaccharide-protein glycotransferase (471 aa)	1	#	0.949	977,57	-0,837
<b>PAAG_05417</b>	Mitochondrial-processing peptidase subunit beta (480 aa)	*	#	-	2168,61	-0,649
<b>PAAG_00739</b>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B (211 aa)	1	#	0,641	212,21	T
<b>PAAG_00770</b>	Protease regulatory subunit (355 aa)	*	#	-	204,85	T
<b>PAAG_01278</b>	Karyopherin Kap123 (1102 aa)	*	#	-	244,68	T
<b>PAAG_01479</b>	26S protease regulatory subunit 8 (390 aa)	*	#	-	528,64	T
<b>PAAG_01726</b>	26S protease regulatory subunit 8 (440 aa)	*	#	-	261,56	T
<b>PAAG_01962</b>	Proteasome 26S subunit (159 aa)	*	#	-	1042,11	T
<b>PAAG_04899</b>	26S protease regulatory subunit 4 (393 aa)	*	#	-	313,57	T
<b>PAAG_05226</b>	Hsp90 binding co-chaperone (Sba1) (197 aa)	*	#	-	168,56	T
<b>PAAG_06168</b>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase cypE (164 aa)	*	#	-	1608,22	T

<b>PAAG_06741</b>	Proteasome 26S subunit (191 aa)	*	#	-	194,8	T
<b>PAAG_06946</b>	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit tim14	1	#	-	330,93	T
<b>PAAG_07394</b>	T-complex protein 1 subunit zeta (541 aa)	*	#	-	346,29	T
<b>PAAG_00730</b>	Clathrin heavy chain 1 (1650 aa)	*	#	-	216,55	1,731
<b> BIOGENESIS OF CELLULAR COMPONENTS</b>						
<b>PAAG_00622</b>	Mitochondria fission 1 protein (154 aa)	1	#	-	1001,94	C
<b>PAAG_02917</b>	GTP-binding protein Sey1 (873 aa)	2	#	-	176,93	C
<b>PAAG_03391</b>	Chitin synthase B (928 aa)	6	#	-	282,35	C
<b>PAAG_03489</b>	Cell lysis protein cw11 (358 aa)	4	#	-	1188,55	C
<b>PAAG_05312</b>	Coatomer subunit delta (566 aa)	*	#	-	394,31	C
<b>PAAG_08104</b>	Alpha-tubulin (73 aa)	*	#	-	449	C
<b>PAAG_08209</b>	Peroxin-11 (239 aa)	1	#	-	3889,83	C
<b>PAAG_06192</b>	ARP2/3 complex 20 kDa subunit (170 aa)	*	#	-	310,7	T
<b> TRANSCRIPTION</b>						
<b>PAAG_02173</b>	ATP-dependent RNA helicase mss116 (680 aa)	*	#	-	163,62	C
<b>PAAG_05498</b>	Nucleolar protein NOP58 (890 aa)	*	#	-	167,15	C
<b>PAAG_07099</b>	Histone H3.3 (137 aa)	*	#	-	749,86	C
<b>PAAG_00126</b>	HistonE H4 2 (104 aa)	*	#	-	9528,42	-2,727
<b>PAAG_04651</b>	GTP-binding nuclear protein GSP1/Ran (216 aa)	*	#	-	4111,59	-2,597
<b>PAAG_08833</b>	ATP-dependent RNA helicase DHH1 (516 aa)	*	#	-	496,42	-1,630
<b>PAAG_07283</b>	ATP-dependent RNA helicase FAL1 (409 aa)	*	#	-	449,27	-0,923

<b>PAAG_00734</b>	ATP-dependent RNA helicase DED1 (684 aa)	*	#	-	1519,36	-0,620
<b>PAAG_04511</b>	ATP-dependent RNA helicase SUB2 (468 aa)	*	#	-	1837,61	-2,496
<b>PAAG_02018</b>	Transcription initiation factor IIB (353 aa)	*	#	-	134,94	T
<b>PAAG_03277</b>	Pre-mRNA-processing factor 39 (542 aa)	*	#	-	156,26	T
<b>PAAG_04662</b>	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5 (279 aa)	*	#	-	473,08	T
<b>PAAG_04726</b>	Pirin (316 aa)	*	#	-	125,14	T
<b>PAAG_05087</b>	RNP domain-containing protein (320 aa)	*	#	-	178,49	T
<b>PAAG_01062</b>	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1 (122 aa)	*	#	-	320,61	1,962
<b>CELL RESCUE, DEFENSE AND VIRULENCE</b>						
<b>PAAG_02230</b>	Cell division control protein (193 aa)	*	C 15/C 20	-	638,27	C
<b>PAAG_05142</b>	10 kDa heat shock protein, mitochondrial (104 aa)	*	#	-	2943,71	C
<b>PAAG_01262</b>	Hsp70-like protein (629 aa)	1	#	0,864	3655,29	-2,640
<b>PAAG_00797</b>	Mitochondrial protein import protein MASS5 (411 aa)	*	C 15	-	982	-2,582
<b>PAAG_07775</b>	Heat shock protein SSB1 (558 aa)	*	#	-	1741,24	-1,226
<b>PAAG_08003</b>	Hsp70-like protein (655 aa)	*	#	-	3719,92	-1,010
<b>PAAG_03292</b>	Cytochrome c peroxidase (375 aa)	*	#	-	6884,11	-0,808
<b>PAAG_05679</b>	Heat shock protein (696 aa)	*	#	-	4757,84	-0,765
<b>PAAG_05249</b>	Aldehyde dehydrogenase (497 aa)	*	#	-	1041,64	-0,721
<b>PAAG_08664</b>	Phenylacetate 2-hydroxylase (373 aa)	*	#	-	427,39	-2,380
<b>PAAG_00660</b>	Replication factor C subunit 2 (405 aa)	*	#	-	198,98	T
<b>PAAG_06811</b>	Heat shock protein STI1 (579 aa)	*	#	-	386,58	T

<b>PAAG_07444</b>	Chaperone protein dnaK (579 aa)	*	#	-	140,36	T
<b>PAAG_02686</b>	Hsp90 co-chaperone AHA1 (330 aa)	*	#	-	349,98	1,298
<b>HYPOTHETICAL PROTEINS</b>						
<b>PAAG_00125</b>	Conserved hypothetical protein (480 aa)	3	#	-	206,51	C
<b>PAAG_00171</b>	Conserved hypothetical protein (204 aa)	*	#	-	349,48	C
<b>PAAG_00184</b>	Conserved hypothetical protein (299 aa)	4	#	-	304,39	C
<b>PAAG_00187</b>	Conserved hypothetical protein (241 aa)	3	#	-	808,12	C
<b>PAAG_00335</b>	Conserved hypothetical protein (370 aa)	*	#	-	223,46	C
<b>PAAG_01045</b>	Conserved hypothetical protein (151 aa)	*	#	-	228,82	C
<b>PAAG_01806</b>	Conserved hypothetical protein (105 aa)	*	#	-	991,89	C
<b>PAAG_01870</b>	Conserved hypothetical protein (296 aa)	*	#	-	372,04	C
<b>PAAG_01890</b>	Conserved hypothetical protein (190 aa)	2	#	-	251,17	C
<b>PAAG_02068</b>	Conserved hypothetical protein (450 aa)	*	#	-	776,87	C
<b>PAAG_02192</b>	Conserved hypothetical protein (397 aa)	*	#	-	270,83	C
<b>PAAG_03505</b>	Conserved hypothetical protein (203 aa)	*	#	0,840	350,01	C
<b>PAAG_04529</b>	Conserved hypothetical protein (117 aa)	1	#	-	1843,87	C
<b>PAAG_04540</b>	Conserved hypothetical protein (180 aa)	1	#	-	247,42	C
<b>PAAG_04911</b>	Conserved hypothetical protein (300 aa)	4	#	-	422,48	C
<b>PAAG_04991</b>	Conserved hypothetical protein (618 aa)	*	#	-	160,24	C
<b>PAAG_05224</b>	Hypothetical protein (282 aa)	*	#	-	382,88	C
<b>PAAG_05272</b>	Conserved hypothetical protein (435 aa)	1	#	-	446,27	C

<b>PAAG_05415</b>	Conserved hypothetical protein (199 aa)	*	#	-	201,95	C
<b>PAAG_05550</b>	Hypothetical protein (173 aa)	*	#	-	454,14	C
<b>PAAG_05875</b>	Hypothetical protein (115 aa)	1	#	-	434,68	C
<b>PAAG_06188</b>	Conserved hypothetical protein (455 aa)	*	#	-	162,25	C
<b>PAAG_06213</b>	Conserved hypothetical protein (929 aa)	*	#	-	206,17	C
<b>PAAG_06520</b>	Conserved hypothetical protein (1533 aa)	*	#	-	300,93	C
<b>PAAG_06523</b>	Conserved hypothetical protein (142 aa)	*	#	-	339,79	C
<b>PAAG_06568</b>	Conserved hypothetical protein (415 aa)	1	#	-	345,74	C
<b>PAAG_07254</b>	Conserved hypothetical protein (178 aa)	*	#	-	289,71	C
<b>PAAG_07989</b>	Conserved hypothetical protein (485 aa)	*	#	-	427,61	C
<b>PAAG_08051</b>	Hypothetical protein (279 aa)	2	#	0,594	217,91	C
<b>PAAG_08062</b>	Hypothetical protein (75 aa)	*	#	-	608,15	C
<b>PAAG_08279</b>	Conserved hypothetical protein (289 aa)	*	#	-	220,29	C
<b>PAAG_08296</b>	Conserved hypothetical protein (454 aa)	*	#	-	171,15	C
<b>PAAG_08987</b>	Conserved hypothetical protein (317 aa)	1	#	-	170,75	C
<b>PAAG_05911</b>	Conserved hypothetical protein (147 aa)	1	#	-	8129,16	-1,876
<b>PAAG_07960</b>	Conserved hypothetical protein (152 aa)	4	#	-	1003,46	-1,573
<b>PAAG_04161</b>	Conserved hypothetical protein (884 aa)	*	#	-	447,33	-1,385
<b>PAAG_02019</b>	Conserved hypothetical protein (127 aa)	*	#	-	463,22	T
<b>PAAG_02467</b>	Conserved hypothetical protein (234 aa)	*	#	-	203,48	T



<b>PAAG_02907</b>	Conserved hypothetical protein (241 aa)	*	#	-	332,1	T
<b>PAAG_03233</b>	Conserved hypothetical protein (308 aa)	*	#	-	180,95	T
<b>PAAG_03316</b>	Conserved hypothetical protein (422 aa)	1	#	-	225,85	T
<b>PAAG_04011</b>	Conserved hypothetical protein (184 aa)	*	#	-	164,77	T
<b>PAAG_04072</b>	Conserved hypothetical protein (678 aa)	*	#	-	205,99	T
<b>PAAG_05019</b>	Hypothetical protein (138 aa)	*	#	-	915,4	T
<b>PAAG_06136</b>	Conserved hypothetical protein (414 aa)	*	#	-	159,87	T
<b>PAAG_06955</b>	Conserved hypothetical protein (289 aa)	*	#	-	688,61	T
<b>PAAG_06976</b>	Conserved hypothetical protein (342 aa)	*	#	-	141,42	T
<b>PAAG_07599</b>	Conserved hypothetical protein (312 aa)	1	#	-	158,75	T
<b>PAAG_07957</b>	Hypothetical protein (195 aa)	*	#	-	436,64	T
<b>PAAG_08234</b>	Conserved hypothetical protein (389 aa)	*	#	-	116,98	T
<b>PAAG_03243</b>	Conserved hypothetical protein (319 aa)	*	#	-	400,5	2,020
<b>CELL TYPE DIFFERENTIATION</b>						
<b>PAAG_07159</b>	Bud site selection protein (694 aa)	*	#	-	311,51	T
<b>ENERGY</b>						
<b>PAAG_00151</b>	NADH-cytochrome b5 reductase (310 aa)	*	#	-	465,02	C
<b>PAAG_00948</b>	NADH dehydrogenase iron-sulfur protein (229 aa)	*	#	-	195,5	C
<b>PAAG_01044</b>	NADH-ubiquinone oxidoreductase 24 kDa subunit (260 aa)	*	#	-	368,56	C
<b>PAAG_02265</b>	Mitochondrial F1F0 ATP synthase subunit (102 aa)	1	#	-	8032,77	C
<b>PAAG_02266</b>	NADH-ubiquinone oxidoreductase 21 kDa subunit (226 aa)	*	#	-	875,88	C

<b>PAAG_02297</b>	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske (251 aa)	*	#	-	923,89	C
<b>PAAG_02656</b>	NADH-ubiquinone oxidoreductase 51 kDa subunit (516 aa)	*	#	-	617,71	C
<b>PAAG_03051</b>	NADH-ubiquinone oxidoreductase 20.8 kDa subunit (161 aa)	*	#	-	320,19	C
<b>PAAG_03138</b>	Alanine-glyoxylate aminotransferase (494 aa)	*	#	-	280,59	C
<b>PAAG_03160</b>	Formation of crista junctions protein 1(686 aa)	1	#	-	346,12	C
<b>PAAG_04539</b>	NADH-ubiquinone oxidoreductase 105 kDa subunit (95 aa)	*	#	-	362,72	C
<b>PAAG_04698</b>	NADH-ubiquinone oxidoreductase 178 kDa subunit(177 aa)	*	#	-	784,8	C
<b>PAAG_05091</b>	NADH-ubiquinone oxidoreductase 213 kDa subunit (200 aa)	3	#	-	357,62	C
<b>PAAG_05454</b>	Acyl-CoA dehydrogenase (440 aa)	*	#	-	737,07	C
<b>PAAG_05735</b>	NADH-ubiquinone oxidoreductase 49 kDa subunit (480 aa)	*	#	-	2857,94	C
<b>PAAG_05876</b>	Cytochrome c oxidase subunit VIa (143 aa)	*	#	-	2405,87	C
<b>PAAG_06103</b>	Succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit (192 aa)	*	#	-	511,18	C
<b>PAAG_07791</b>	NADH-ubiquinone oxidoreductase (212 aa)	*	#	-	1529,82	C
<b>PAAG_07868</b>	NADH-quinone oxidoreductase subunit I 2 (230 aa)	*	#	-	374,77	C
<b>PAAG_08517</b>	Propionate-CoA ligase (711 aa)	1	#	-	271,08	C
<b>PAAG_08916</b>	LYR family protein (133 aa)	*	#	-	1206,08	C
<b>PAAG_06796</b>	Cytochrome c oxidase polypeptide IV(198 aa)	*	#	-	1101,38	-3,160
<b>PAAG_08088</b>	Cytochrome b-c1 complex subunit 2 (464 aa)	*	#	-	2793,7	-2,481
<b>PAAG_08966</b>	NADH-ubiquinone oxidoreductase 78 kDa subunit (729 aa)	*	#	-	985,25	-2,366
<b>PAAG_08057</b>	Cytochrome c oxidase polypeptide V (200 aa)	*	#	-	969,86	-2,150

<b>PAAG_04838</b>	ATP synthase subunit 4 (245 aa)	*	#	-	8091,03	-2,034
<b>PAAG_04570</b>	ATP synthase D chain, mitochondrial (175 aa)	*	#	-	6113,62	-1,890
<b>PAAG_00771</b>	Enolase (405 aa)	*	#	-	2583,52	-1,775
<b>PAAG_06380</b>	Pyruvate kinase (535 aa)	*	#	-	829,73	-1,385
<b>PAAG_04166</b>	Transaldolase (325 aa)	*	#	-	1355,79	-1,342
<b>PAAG_05031</b>	NADH-ubiquinone oxidoreductase 40 kDa subunit (294 aa)	*	#	-	1979,87	-1,169
<b>PAAG_07672</b>	Cytochrome b-c1 complex subunit 7 (123 aa)	*	#	-	13389,36	-1,082
<b>PAAG_04820</b>	ATPase alpha subunit (466 aa)	*	#	-	8922,32	-0,923
<b>PAAG_01534</b>	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta (378 aa)	*	#	-	1193,17	-0,750
<b>PAAG_08468</b>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (339 aa)	*	#	-	20985,51	-3,708
<b>PAAG_02653</b>	Acetyl-coenzyme A synthetase (670 aa)	*	#	-	1504,51	-1,702
<b>PAAG_01725</b>	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit (597 aa)	*	#	-	393,21	-1,558
<b>PAAG_00050</b>	Pyruvate dehydrogenase protein X component (490 aa)	*	#	-	283,14	T
<b>PAAG_00173</b>	Electron transfer flavoprotein subunit alpha (350 aa)	*	#	-	684,28	T
<b>PAAG_00403</b>	Alcohol dehydrogenase (355 aa)	*	#	-	685,88	T
<b>PAAG_00726</b>	Pyruvate carboxylase (1197 aa)	*	#	-	147,03	T
<b>PAAG_01650</b>	Monothiol glutaredoxin-5 (277 aa)	*	#	-	244,35	T
<b>PAAG_02769</b>	Pyruvate dehydrogenase protein X component (496 aa)	*	#	-	388,71	T
<b>PAAG_04374</b>	Nonspecific lipid-transfer protein (399 aa)	*	#	-	754,71	T
<b>PAAG_04931</b>	Electron transfer flavoprotein subunit beta (200 aa)	*	#	-	1245,14	T

<b>PAAG_07410</b>	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase (522 aa)	*	#	-	231,99	T
<b>PAAG_08352</b>	NADH-ubiquinone oxidoreductase (120 aa)	1	#	-	375,07	T
<b>PAAG_08551</b>	ATP synthase subunit g (200 aa)	*	#	-	3438,37	0,793
<b>PAAG_04444</b>	Transketolase (686 aa)*	*	#	-	300,17	1,226
<b>UNCLASSIFIED PROTEINS</b>						
<b>PAAG_02600</b>	Peptidyl-tRNA hydrolase (254 aa)	*	#	0,665	7026,78	C
<b>PAAG_03531</b>	Phosphoribosylamine-glycine ligase (154 aa)	*	#	-	238,23	C
<b>PAAG_06654</b>	Signal sequence receptor alpha chain (275 aa)	1	#	0,769	390,4	C
<b>PAAG_07680</b>	Phosphoribulokinase/uridine kinase family protein (238 aa)	*	#	-	246,36	C
<b>PAAG_07846</b>	CBS and PB1 domain-containing protein (672 aa)	1	#	-	496,37	C
<b>PAAG_04157</b>	DUF1620 domain-containing protein (954 aa)	1	#	0,863	382,34	C
<b>PAAG_06541</b>	Erythrocyte band 7 integral membrane protein (361 aa)	*	#	-	867,73	-1,876
<b>PAAG_12011</b>	Mitochondria cytochrome c oxidase subunit 2 (254 aa)	2	#	-	2138,11	-3,260
<b>PAAG_01280</b>	Ser/Thr protein phosphatase family protein (680 aa)	*	#	-	364,72	T
<b>PAAG_01417</b>	ER membrane DUF1077 domain-containing protein (105 aa)	2	#	-	311,13	T
<b>PAAG_01900</b>	Serine/threonine-protein kinase psk1 (289 aa)	*	#	-	128,89	T
<b>PAAG_03152</b>	CobW domain-containing protein (434 aa)	*	#	-	146,14	T
<b>PAAG_03741</b>	HD domain-containing protein (143 aa)	*	#	-	1373,61	T
<b>PAAG_06995</b>	TPR repeat protein (115 aa)	*	#	-	161,42	T
<b>PAAG_01347</b>	Actin cytoskeleton protein (VIP1) (267 aa)	*	#	-	317,17	-1,183
<b>PREDICTED PROTEINS</b>						

<b>PAAG_01245</b>	Predicted protein (115 aa)	*	#	-	289,73	C
<b>PAAG_01439</b>	Predicted protein (375 aa)	*	#	-	205,68	C
<b>PAAG_02238</b>	Predicted protein (134 aa)	*	#	-	251,65	C
<b>PAAG_03337</b>	Predicted protein (327 aa)	*	#	-	202,04	C
<b>PAAG_04219</b>	Predicted protein (132 aa)	*	#	-	311,02	C
<b>PAAG_04363</b>	Predicted protein (371 aa)	*	#	-	230,13	C
<b>PAAG_06540</b>	Predicted protein (127 aa)	*	#	-	218,9	C
<b>PAAG_01478</b>	Predicted protein (113 aa)	*	#	-	151,67	T
<b>PAAG_01702</b>	Predicted protein (723 aa)	*	#	-	119,2	T
<b>PAAG_04993</b>	Predicted protein (230 aa)	*	#	-	213,59	T

<sup>a</sup>Accession number– Accession number of the protein in the database of *Paracoccidioides* spp.

([http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides\\_brasiliensis/MultiHome.html](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/paracoccidioides_brasiliensis/MultiHome.html));

<sup>b</sup>Protein annotation from Paracoccidioides genome database or by homology in NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>);

<sup>c</sup>Represents the amount of transmembrane domains identified in proteins using the program TMHMM version 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>);

<sup>d</sup>Presence of posttranslational modification. For myristoylated protein (C14) programs Terminator (<http://www.isv.cnrs-gif.fr/terminator3/test.php>) and Myristoylator (<http://web.expasy.org/myristoylator/>) were used. Terminator program was used to identify palmitoylated proteins. Research by prenylated proteins was done by the program PresPs-Prenylation Prediction Suite (<http://mendel.imp.ac.at/sat/PrePS/index.html>) and to predict GPI anchor the program big-Pi fungi predictor ([http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi\\_server.html](http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi_server.html)) was used. C15 and C20 indicates the presence of a recognition site for the addition of a farnesyl or geranyl group (FTase and geranyltransferase type I, Rab geranylgeranyl transferase);

<sup>e</sup>Presence of signal peptide was analyzed by program SignalP version 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). The values indicate the score of the proteins with the signal peptide, this value must be equal to or greater than 0.45;

<sup>f</sup>Indicates the score of the protein;

<sup>g</sup>Protein expression profiles in log2-fold change;

\*: Proteins that no presented transmembrane domain.

#: Proteins that no presented posttranslational modification.

-: Proteins that no presented signal peptide.

C: Proteins only identified in the control condition.

T: Proteins only identified in the zinc deprivation condition.

The functional classification was performed used the database of FunCat2 ([http://pedant.gsf.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method=analysis&Db=p3\\_r48325\\_Par\\_braSi\\_Pb01](http://pedant.gsf.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method=analysis&Db=p3_r48325_Par_braSi_Pb01)).

The database Gene Ontology (GO) and WolfPSORT was employed to evaluate the possible localization of proteins in cell membranes of *Paracoccidioides* sp.. Some proteins did not show any form of classical association with the lipid bilayer, but showed that the localization subcellular were in regions of cell membranes, with score  $\geq 50$ .

## REFERENCES

- BAGAGLI, E.; BOSCO, S. M.; THEODORO, R. C.; FRANCO, M. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. **Infect Genet Evol** 6(5): 344-351, 2006.
- BAILAO, E. F.; PARENTE, J. A.; PIGOSSO, L. L.; DE CASTRO, K. P.; FONSECA, F. L.; SILVA-BAILAO, M. G.; BAO, S. N.; BAILAO, A. M.; RODRIGUES, M. L.; HERNANDEZ, O.; MCEWEN, J. G.; SOARES, C. M. Hemoglobin uptake by *Paracoccidioides* spp. is receptor-mediated. **PLoS Negl Trop Dis** 8(5): e2856, 2014.
- BARBOSA, M. S.; BAO, S. N.; ANDREOTTI, P. F.; DE FARIA, F. P.; FELIPE, M. S.; DOS SANTOS FEITOSA, L.; MENDES-GIANNINI, M. J.; SOARES, C. M. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. **Infect Immun** 74(1): 382-389, 2006.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** 72: 248-254, 1976.
- CARMAN, G. M.; HAN, G. S. Regulation of phospholipid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by zinc depletion. **Biochim Biophys Acta** 1771(3): 322-330, 2007.
- DA FONSECA, C. A.; JESUINO, R. S.; FELIPE, M. S.; CUNHA, D. A.; BRITO, W. A.; SOARES, C. M. Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes Infect** 3(7): 535-542, 2001.
- EIDE, D. J. Multiple regulatory mechanisms maintain zinc homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Nutr** 133(5 Suppl 1): 1532S-1535S, 2003.
- EPHRITIKHINE, G.; FERRO, M.; ROLLAND, N. Plant membrane proteomics. **Plant Physiol Biochem** 42(12): 943-962, 2004.
- FAULHAMMER, F.; KONRAD, G.; BRANKATSCHK, B.; TAHIROVIC, S.; KNODLER, A.; MAYINGER, P. Cell growth-dependent coordination of lipid signaling and glycosylation is mediated by interactions between Sac1p and Dpm1p. **J Cell Biol** 168(2): 185-191, 2005.
- FAVA-NETTO, C. Estudos quantitativos sobre a fixação de complemento na blastomicose sul americana, com antígeno polissacarídico. **Arq Cir Clin Exp** 18: 197-254, 1955.
- FINNEY, L. A.; O'HALLORAN, T. V. Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors. **Science** 300(5621): 931-936, 2003.

GITAN, R. S.; LUO, H.; RODGERS, J.; BRODERIUS, M.; EIDE, D. Zinc-induced inactivation of the yeast ZRT1 zinc transporter occurs through endocytosis and vacuolar degradation. **J Biol Chem** 273(44): 28617-28624, 1998.

HEINISCH, J. J.; LORBERG, A.; SCHMITZ, H. P.; JACOBY, J. J. The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Microbiol** 32(4): 671-680, 1999.

IWANYSHYN, W. M.; HAN, G. S.; CARMAN, G. M. Regulation of phospholipid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by zinc. **J Biol Chem** 279(21): 21976-21983, 2004.

KONRAD, G.; SCHLECKER, T.; FAULHAMMER, F.; MAYINGER, P. Retention of the yeast Sac1p phosphatase in the endoplasmic reticulum causes distinct changes in cellular phosphoinositide levels and stimulates microsomal ATP transport. **J Biol Chem** 277(12): 10547-10554, 2002.

LAIRD, N. M.; HORVATH, S.; XU, X. Implementing a unified approach to family-based tests of association. **Genet Epidemiol** 19 Suppl 1: S36-42, 2000.

LIMA, P. S.; CASALETTI, L.; BAILAO, A. M.; DE VASCONCELOS, A. T.; FERNANDES GDA, R.; SOARES, C. M. Transcriptional and proteomic responses to carbon starvation in *Paracoccidioides*. **PLoS Negl Trop Dis** 8(5): e2855, 2014.

LONGO, L. V.; NAKAYASU, E. S.; GAZOS-LOPES, F.; VALLEJO, M. C.; MATSUO, A. L.; ALMEIDA, I. C.; PUCCIA, R. Characterization of cell wall lipids from the pathogenic phase of *Paracoccidioides brasiliensis* cultivated in the presence or absence of human plasma. **PLoS One** 8(5): e63372, 2013.

MCEWEN, J. G.; BEDOYA, V.; PATINO, M. M.; SALAZAR, M. E.; RESTREPO, A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. **J Med Vet Mycol** 25(3): 165-175, 1987.

MOCHEGANI, E.; MUZZIOLI, M. Therapeutic application of zinc in human immunodeficiency virus against opportunistic infections. **J Nutr** 130(5S Suppl): 1424S-1431S, 2000.

MURAD, A. M.; SOUZA, G.; GARCIA, J.; RECH, E. Characterisation and quantitation expression analysis of recombinant proteins in plant complex mixtures using nanoUPLC mass spectrometry. **Protocol Exchange**: 1-17, 2011a.

MURAD, A. M.; SOUZA, G. H.; GARCIA, J. S.; RECH, E. L. Detection and expression analysis of recombinant proteins in plant-derived complex mixtures using nanoUPLC-MS(E). **J Sep Sci** 34(19): 2618-2630, 2011b.

MURAD, A. M.; RECH, E. L. NanoUPLC-MS<sup>E</sup> proteomic data assessment of soybean seeds using the Uniprot database. **BMC Biotechnol** 12: 82, 2012.



PARENTE, A. F.; DE REZENDE, T. C.; DE CASTRO, K. P.; BAILAO, A. M.; PARENTE, J. A.; BORGES, C. L.; SILVA, L. P.; SOARES, C. M. A proteomic view of the response of *Paracoccidioides* yeast cells to zinc deprivation. **Fungal Biol** 117(6): 399-410, 2013.

RESTREPO, A.; JIMENEZ, B. E. Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium. **J Clin Microbiol** 12(2): 279-281, 1980.

RUTHERFORD, J. C.; BIRD, A. J. Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells. **Eukaryot Cell** 3(1): 1-13, 2004.

SCHORR, M.; THEN, A.; TAHIROVIC, S.; HUG, N.; MAYINGER, P. The phosphoinositide phosphatase Sac1p controls trafficking of the yeast Chs3p chitin synthase. **Curr Biol** 11(18): 1421-1426, 2001.

SILVA, M. G.; SCHRANK, A.; BAILAO, E. F.; BAILAO, A. M.; BORGES, C. L.; STAATS, C. C.; PARENTE, J. A.; PEREIRA, M.; SALEM-IZACC, S. M.; MENDES-GIANNINI, M. J.; OLIVEIRA, R. M.; SILVA, L. K.; NOSANCHUK, J. D.; VAINSTEIN, M. H.; DE ALMEIDA SOARES, C. M. The homeostasis of iron, copper, and zinc in *Paracoccidioides brasiliensis*, *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, and *Cryptococcus gattii*: a comparative analysis. **Front Microbiol** 2: 49, 2011.

TAHIROVIC, S.; SCHORR, M.; THEN, A.; BERGER, J.; SCHWARZ, H.; MAYINGER, P. Role for lipid signaling and the cell integrity MAP kinase cascade in yeast septum biogenesis. **Curr Genet** 43(2): 71-78, 2003.

TAN, S.; TAN, H. T.; CHUNG, M. C. Membrane proteins and membrane proteomics. **Proteomics** 8(19): 3924-3932, 2008.

VIDAKOVICS, M. L.; PABA, J.; LAMBERTI, Y.; RICART, C. A.; DE SOUSA, M. V.; RODRIGUEZ, M. E. Profiling the *Bordetella pertussis* proteome during iron starvation. **J Proteome Res** 6(7): 2518-2528, 2007.

WHITTERS, E. A.; CLEVES, A. E.; MCGEE, T. P.; SKINNER, H. B.; BANKAITIS, V. A. SAC1p is an integral membrane protein that influences the cellular requirement for phospholipid transfer protein function and inositol in yeast. **J Cell Biol** 122(1): 79-94, 1993.

WU, C. Y.; BIRD, A. J.; WINGE, D. R.; EIDE, D. J. Regulation of the yeast TSA1 peroxiredoxin by ZAP1 is an adaptive response to the oxidative stress of zinc deficiency. **J Biol Chem** 282(4): 2184-2195, 2007.

WU, C. Y.; BIRD, A. J.; CHUNG, L. M.; NEWTON, M. A.; WINGE, D. R.; EIDE, D. J. Differential control of Zap1-regulated genes in response to zinc deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. **BMC Genomics** 9: 370, 2008.

ZHAO, H.; EIDE, D. The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem** 271(38): 23203-23210, 1996a.

ZHAO, H.; EIDE, D. The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. **Proc Natl Acad Sci U S A** 93(6): 2454-2458, 1996b.

ZHAO, H.; EIDE, D. J. Zap1p, a metalloregulatory protein involved in zinc-responsive transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell Biol** 17(9): 5044-5052, 1997.

## 5. DISCUSSÃO

As proteínas de membrana são de importância para o desenvolvimento celular pois executam uma variedade de processos como adesão, sinalização, transporte celular e captação de nutrientes (GILMORE e WASHBURN, 2010). Diante disso, estudos foram desenvolvidos para caracterização destas proteínas em diferentes organismos e condições. Em *S. cerevisiae*, análise proteômica da membrana plasmática durante o estresse salino revelou mudanças significantes na abundância de várias proteínas de membrana plasmática, as quais podem afetar a morfologia da membrana plasmática e a homeostase iônica (SZOPINSKA et al., 2011). Em plantas, foi realizada análise proteômica com o objetivo de avaliar a regulação e a função de proteínas de membrana na absorção de ferro e estresse oxidativo. Os resultados obtidos indicam que as proteínas envolvidas no transporte e sinalização foram as mais abundantes (HOPFF et al., 2013).

Zinco, como outros metais, é um nutriente essencial e desempenha papéis como um co-factor estrutural ou catalítico para muitas proteínas. Em condições de privação de zinco a resposta celular é regulada, principalmente ao nível da transcrição (ZHAO e EIDE, 1997). Em *S. cerevisiae*, estudos têm revelado tanto respostas homeostáticas como respostas adaptativas à deficiência de zinco. A resposta homeostática é caracterizada pelo controle da absorção de zinco, armazenamento vacuolar de zinco e conservação de grandes quantidades de zinco intracelulares. Esta resposta é considerada uma primeira linha de defesa contra o estresse gerado pela privação de zinco. A resposta adaptativa, também conhecida como segunda linha de defesa, permite adaptação celular em condições de deficiência de zinco. Em levedura, esta resposta é induzida em condições de limitação de zinco graves e ocorre quando as células já não são capazes de captar o zinco para o crescimento ideal. As estratégias utilizadas pelas células de levedura como segunda linha de defesa sobre deficiência de zinco incluem mecanismos de resistência ao estresse oxidativo, alterações nas vias de síntese de lipídios, remodelação de assimilação de sulfato e parede celular (WU et al., 2008; WU et al., 2007).

Nosso grupo demonstrou anteriormente que quando células de *Paracoccidioides* sp. são incubadas em condições de privação de zinco proteínas relacionadas ao estresse oxidativo são induzidas, assim como em *S. cerevisiae*. Além disso, a ausência de zinco

induz gliconeogênese e reprime o ciclo do metil-citrato (PARENTE et al., 2013). Para complementar estes resultados obtidos após a análise de proteínas citoplasmáticas, no presente trabalho analisamos o proteoma de membrana de células de levedura de *Paracoccidioides* sp. em condições de privação de zinco. Foram identificados 460 proteínas que foram regulados em células de levedura de *Pb01* expostas ao quelante de zinco TPEN. Destes, 141 foram classificados como proteínas da membrana celular de acordo com a análise *in silico* realizada. Identificamos proteínas relacionadas metabolismo glicerofosfolípídios e integridade celular.

A enzima 1-AGPAT (1-acil-sn-glicerol-3-phosphate aciltransferase beta), que apresenta dois domínios transmembrana e que pertence ao metabolismo de glicerofosfolípídeos, foi reprimida em condições de privação de zinco. Esta enzima catalisa a formação do ácido fosfatídico (PA) a partir de ácido lisofosfatídico (LPA), incorporando um grupo acil na posição sn-2. O PA produzido pela atividade da 1-AGPAT é substrato para via de fosfolípidos para produção de fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilcolina (PC), que são encontradas em leveduras (CARMAN e HAN, 2007) e também nas membranas *Paracoccidioides* spp. (LONGO et al., 2013). Nossos dados estão de acordo com um estudo anterior que demonstrou que em *S. cerevisiae* as atividades das enzimas envolvidas na via de biossíntese de PS, PE e PC foram reduzidas sob a deficiência de zinco (IWANYSHYN et al., 2004). Como PA é o substrato a principal na síntese de todos estes fosfolípidos, podemos sugerir que a diminuição da produção de PA leva à redução dos níveis de PS, PE e PC e, talvez, a defeitos na estrutura da membrana plasmática.

A fosfatase fosfoinositídica (Sac1) é uma proteína que apresenta domínio transmembrana, encontrada no retículo endoplasmático (RE) e complexo de Golgi (KONRAD et al., 2002; WHITTERS et al., 1993). Esta enzima tem papel específico na secreção e age como antagonista da fosfatidilinositol 4-quinase PiKp no tráfego de Golgi (SCHORR et al., 2001). A rápida mudança de localização da Sac1 entre o RE e o Golgi ocorre em resposta a condições de crescimento. A localização da Sac1 no RE ocorre apenas durante os períodos de crescimento exponencial e é mediada pela interação com dolicol fosfato manose sintase (Dpm1) através do contato direto entre os domínios transmembrana (FAULHAMMER et al., 2005). As proteínas Sac1 e Dpm1 são necessárias para a biossíntese de oligossacarídeos e neste estudo estas proteínas

foram reguladas negativamente sugerindo que o metabolismo de carboidratos foi afetado pela privação de zinco como descrito por Wu e colaboradores (2008).

Estudos tem mostrado que Sac1 está relacionada a integridade da parede celular devido a defeitos no tráfego da quitina sintase e biossíntese de quitina observados no mutante para Sac1. Esse fenótipo foi mais severo para o duplo mutante *sac1* e *slt2*. Slf2 é uma proteína que não está ligada à membrana, envolvida na reorganização da parede celular em resposta ao estresse causado na parede (HEINISCH et al., 1999). Por conseguinte, estas proteínas têm um papel sinérgico na regulação da construção da parede celular (TAHIROVIC et al., 2003). Um homólogo à Slf2 foi encontrado no nosso proteoma de membrana, proteína quinase ativada por mitógeno, Mkc1. Curiosamente, Mkc1 foi induzida pela deficiência de zinco, enquanto Sac1 foi reprimida. Como Sac1 está envolvida na integridade da parede celular, sugere-se que a ausência de zinco provoque defeitos da parede celular, como descrito em *S. cerevisiae* (WU et al., 2008). Para amenizar o estresse na parede celular, Mkc1 foi induzida. De acordo com o efeito da privação de zinco na parede da célula, verificou-se que a quitina-sintase B, uma proteína de membrana, foi também reprimida na ausência de zinco.

Para o nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho que descreve a resposta de *Paracoccidioides* spp. a privação de micronutrientes a nível proteômico de membranas. As novas descobertas mostradas aqui, associadas com as respostas à deficiência de zinco a nível citoplasmático, irá acrescentar informações importantes para o crescente conhecimento de como *Paracoccidioides* spp. comporta-se em condições de privação de metais. Como a imunidade nutricional é uma estratégia de para evitar a infecção, os mecanismos utilizados pelo fungo para sobreviver e se adaptar a essa condição são fundamentais para patogenicidade.

## 6. CONCLUSÃO

A imunidade nutricional é uma das estratégias utilizada pelo hospedeiro para impedir o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos. Assim, o micro-organismo, diante de uma condição de estresse (privação de nutrientes no meio) utiliza mecanismos para se adaptar e sobreviver. O desenvolvimento destes mecanismos são fundamentais para sua patogenicidade. Com os resultados obtidos no presente trabalho, podemos concluir que durante a privação de zinco o *Paracoccidioides* sp. apresentou alterações na sua estrutura como na integridade celular e no metabolismo de fosfolídeos.

## 7. PERSPECTIVAS

- Imunofluorescência com calcofluor white;
- *Western blot* com anticorpos específicos para marcadores de membranas;
- Análise da expressão de genes por qRT-PCRs.

## 8. REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Molecular Biology of the Cell. In. New York: Garland Publishing, 1994. 485-488.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Biologia molecular da célula. In. Porto Alegre, 2004.
- ALMEIDA, S. M. Central nervous system paracoccidioidomycosis: an overview. **Braz J Infect Dis** 9(2): 126-133, 2005.
- APPELBERG, R. Macrophage nutritive antimicrobial mechanisms. **J Leukoc Biol** 79(6): 1117-1128, 2006.
- ARISTIZABAL, B. H.; CLEMONS, K. V.; STEVENS, D. A.; RESTREPO, A. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: *in vivo* inhibition in females. **Infect Immun** 66(11): 5587-5591, 1998.
- BAGAGLI, E.; SANO, A.; COELHO, K. I.; ALQUATI, S.; MIYAJI, M.; DE CAMARGO, Z. P.; GOMES, G. M.; FRANCO, M.; MONTENEGRO, M. R. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus noveminctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. **Am J Trop Med Hyg** 58(4): 505-512, 1998.
- BAGAGLI, E.; BOSCO, S. M.; THEODORO, R. C.; FRANCO, M. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. **Infect Genet Evol** 6(5): 344-351, 2006.
- BAGAGLI, E.; THEODORO, R. C.; BOSCO, S. M.; MCEWEN, J. G. *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. **Mycopathologia** 165(4-5): 197-207, 2008.
- BAILAO, A. M.; SCHRANK, A.; BORGES, C. L.; DUTRA, V.; WALQUIRIA INES MOLINARI-MADLUM, E. E.; SOARES FELIPE, M. S.; SOARES MENDES-GIANNINI, M. J.; MARTINS, W. S.; PEREIRA, M.; MARIA DE ALMEIDA SOARES, C. Differential gene expression by *Paracoccidioides brasiliensis* in host interaction conditions: representational difference analysis identifies candidate genes associated with fungal pathogenesis. **Microbes Infect** 8(12-13): 2686-2697, 2006.
- BAILAO, A. M.; SCHRANK, A.; BORGES, C. L.; PARENTE, J. A.; DUTRA, V.; FELIPE, M. S.; FIUZA, R. B.; PEREIRA, M.; DE ALMEIDA SOARES, C. M. The transcriptional profile of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells is influenced by human plasma. **FEMS Immunol Med Microbiol** 51(1): 43-57, 2007.
- BAILAO, E. F.; PARENTE, J. A.; PIGOSSO, L. L.; DE CASTRO, K. P.; FONSECA, F. L.; SILVA-BAILAO, M. G.; BAO, S. N.; BAILAO, A. M.; RODRIGUES, M. L.;



HERNANDEZ, O.; MCEWEN, J. G.; SOARES, C. M. Hemoglobin uptake by *Paracoccidioides* spp. is receptor-mediated. **PLoS Negl Trop Dis** 8(5): e2856, 2014.

BASTOS, K. P.; BAILAO, A. M.; BORGES, C. L.; FARIA, F. P.; FELIPE, M. S.; SILVA, M. G.; MARTINS, W. S.; FIUZA, R. B.; PEREIRA, M.; SOARES, C. M. 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, 2007.

BELITARDO, D. R.; CALEFI, A. S.; BORGES, I. K.; DE OLIVEIRA, G. G.; SBEGHEN, M. R.; ITANO, E. N.; DE CAMARGO, Z. P.; ONO, M. A. Detection of antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis* in free-range domestic pigs (*Sus scrofa*). **Mycopathologia** 177(1-2): 91-95, 2014.

BOCCA, A. L.; AMARAL, A. C.; TEIXEIRA, M. M.; SATO, P.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; SOARES FELIPE, M. S. Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. **Future Microbiol** 8(9): 1177-1191, 2013.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin Microbiol Rev** 6(2): 89-117, 1993.

CAMARGO, Z. P.; FRANCO, M. F. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Rev Iberoam Micol** 17(2): 41-48, 2000.

CANO, M. I.; CISALPINO, P. S.; GALINDO, I.; RAMIREZ, J. L.; MORTARA, R. A.; DA SILVEIRA, J. F. Electrophoretic karyotypes and genome sizing of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Clin Microbiol** 36(3): 742-747, 1998.

CARAS, I. W.; WEDDELL, G. N.; DAVITZ, M. A.; NUSSENZWEIG, V.; MARTIN, D. W., JR. Signal for attachment of a phospholipid membrane anchor in decay accelerating factor. **Science** 238(4831): 1280-1283, 1987.

CARMAN, G. M.; HAN, G. S. Regulation of phospholipid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by zinc depletion. **Biochim Biophys Acta** 1771(3): 322-330, 2007.

CARRERO, L. L.; NINO-VEGA, G.; TEIXEIRA, M. M.; CARVALHO, M. J.; SOARES, C. M.; PEREIRA, M.; JESUINO, R. S.; MCEWEN, J. G.; MENDOZA, L.; TAYLOR, J. W.; FELIPE, M. S.; SAN-BLAS, G. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. **Fungal Genet Biol** 45(5): 605-612, 2008.

CASTRO, N. S.; DE CASTRO, K. P.; ORLANDI, I.; FEITOSA L DOS, S.; ROSA E SILVA, L. K.; VAINSTEIN, M. H.; BAO, S. N.; VAI, M.; SOARES, C. M. Characterization and functional analysis of the beta-1,3-glucanosyltransferase 3 of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **FEMS Yeast Res** 9(1): 103-114, 2009.

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

CORBIN, B. D.; SEELEY, E. H.; RAAB, A.; FELDMANN, J.; MILLER, M. R.; TORRES, V. J.; ANDERSON, K. L.; DATTILO, B. M.; DUNMAN, P. M.; GERADS, R.; CAPRIOLI, R. M.; NACKEN, W.; CHAZIN, W. J.; SKAAR, E. P. Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses. **Science** 319(5865): 962-965, 2008.

CORREDOR, G. G.; CASTANO, J. H.; PERALTA, L. A.; DIEZ, S.; ARANGO, M.; MCEWEN, J.; RESTREPO, A. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. **Rev Iberoam Micol** 16(4): 216-220, 1999.

COUTINHO, Z. F.; SILVA, D.; LAZERA, M.; PETRI, V.; OLIVEIRA, R. M.; SABROZA, P. C.; WANKE, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cad Saude Publica** 18(5): 1441-1454, 2002.

EIDE, D. J. Multiple regulatory mechanisms maintain zinc homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Nutr** 133(5 Suppl 1): 1532S-1535S, 2003.

EIDE, D. J. The SLC39 family of metal ion transporters. **Pflugers Arch** 447(5): 796-800, 2004.

ENGLUND, P. T. The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. **Annu Rev Biochem** 62: 121-138, 1993.

EPHRITIKHINE, G.; FERRO, M.; ROLLAND, N. Plant membrane proteomics. **Plant Physiol Biochem** 42(12): 943-962, 2004.

FAULHAMMER, F.; KONRAD, G.; BRANKATSCHK, B.; TAHIROVIC, S.; KNODLER, A.; MAYINGER, P. Cell growth-dependent coordination of lipid signaling and glycosylation is mediated by interactions between Sac1p and Dpm1p. **J Cell Biol** 168(2): 185-191, 2005.

FERGUSON, M. A.; HOMANS, S. W.; DWEK, R. A.; RADEMACHER, T. W. Glycosyl-phosphatidylinositol moiety that anchors *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein to the membrane. **Science** 239(4841 Pt 1): 753-759, 1988.

FINNEY, L. A.; O'HALLORAN, T. V. Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors. **Science** 300(5621): 931-936, 2003.

FRANCO, M.; MONTENEGRO, M. R.; MENDES, R. P.; MARQUES, S. A.; DILLON, N. L.; MOTA, N. G. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Rev Soc Bras Med Trop** 20(2): 129-132, 1987.

GAITHER, L. A.; EIDE, D. J. Eukaryotic zinc transporters and their regulation. **Biomaterials** 14(3-4): 251-270, 2001.

GILMORE, J. M.; WASHBURN, M. P. Advances in shotgun proteomics and the analysis of membrane proteomes. **J Proteomics** 73(11): 2078-2091, 2010.

GITAN, R. S.; LUO, H.; RODGERS, J.; BRODERIUS, M.; EIDE, D. Zinc-induced inactivation of the yeast ZRT1 zinc transporter occurs through endocytosis and vacuolar degradation. **J Biol Chem** 273(44): 28617-28624, 1998.

GREAVES, J.; CHAMBERLAIN, L. H. Palmitoylation-dependent protein sorting. **J Cell Biol** 176(3): 249-254, 2007.

HEINISCH, J. J.; LORBERG, A.; SCHMITZ, H. P.; JACOBY, J. J. The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Microbiol** 32(4): 671-680, 1999.

HOPFF, D.; WIENKOOP, S.; LUTHJE, S. The plasma membrane proteome of maize roots grown under low and high iron conditions. **J Proteomics** 91: 605-618, 2013.

IWANYSHYN, W. M.; HAN, G. S.; CARMAN, G. M. Regulation of phospholipid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by zinc. **J Biol Chem** 279(21): 21976-21983, 2004.

KIM, B. E.; NEVITT, T.; THIELE, D. J. Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. **Nat Chem Biol** 4(3): 176-185, 2008a.

KIM, M. J.; KIL, M.; JUNG, J. H.; KIM, J. Roles of Zinc-responsive transcription factor Csr1 in filamentous growth of the pathogenic Yeast *Candida albicans*. **J Microbiol Biotechnol** 18(2): 242-247, 2008b.

KONRAD, G.; SCHLECKER, T.; FAULHAMMER, F.; MAYINGER, P. Retention of the yeast Sac1p phosphatase in the endoplasmic reticulum causes distinct changes in cellular phosphoinositide levels and stimulates microsomal ATP transport. **J Biol Chem** 277(12): 10547-10554, 2002.

LACAZ, C. S.; VIDAL, M. S.; HEINS-VACCARI, E. M.; DE MELO, N. T.; DEL NEGRO, G. M.; ARRIAGADA, G. L.; FREITAS RDOS, S. *Paracoccidioides brasiliensis*. A mycologic and immunochemical study of two strains. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** 41(2): 79-86, 1999.

LIMA, P. S.; BAILAO, E. F.; SILVA, M. G.; CASTRO NDA, S.; BAO, S. N.; ORLANDI, I.; VAI, M.; DE ALMEIDA SOARES, C. M. Characterization of the *Paracoccidioides* beta-1,3-glucanosyltransferase family. **FEMS Yeast Res** 12(6): 685-702, 2012.

LIMA, P. S.; CASALETTO, L.; BAILAO, A. M.; DE VASCONCELOS, A. T.; FERNANDES GDA, R.; SOARES, C. M. Transcriptional and proteomic responses to carbon starvation in *Paracoccidioides*. **PLoS Negl Trop Dis** 8(5): e2855, 2014.

LONDERO, A. T.; MELO, I. S. Paracoccidioidomycosis in childhood. A critical review. **Mycopathologia** 82(1): 49-55, 1983.

LONGO, L. V.; NAKAYASU, E. S.; GAZOS-LOPES, F.; VALLEJO, M. C.; MATSUO, A. L.; ALMEIDA, I. C.; PUCCIA, R. Characterization of cell wall lipids from the pathogenic phase of *Paracoccidioides brasiliensis* cultivated in the presence or absence of human plasma. **PLoS One** 8(5): e63372, 2013.

LOOSE, D. S.; STOVER, E. P.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A.; FELDMAN, D. Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 80(24): 7659-7663, 1983.

LULLOFF, S. J.; HAHN, B. L.; SOHNLE, P. G. Fungal susceptibility to zinc deprivation. **J Lab Clin Med** 144(4): 208-214, 2004.

MACDIARMID, C. W.; GAITHER, L. A.; EIDE, D. Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO J** 19(12): 2845-2855, 2000.

MALINSKY, J.; OPEKAROVA, M.; GROSSMANN, G.; TANNER, W. Membrane microdomains, rafts, and detergent-resistant membranes in plants and fungi. **Annu Rev Plant Biol** 64: 501-529, 2013.

MARMAGNE, A.; FERRO, M.; MEINNEL, T.; BRULEY, C.; KUHN, L.; GARIN, J.; BARBIER-BRYGOO, H.; EPHRITIKHINE, G. A high content in lipid-modified peripheral proteins and integral receptor kinases features in the *Arabidopsis* plasma membrane proteome. **Mol Cell Proteomics** 6(11): 1980-1996, 2007.

MATUTE, D. R.; MCEWEN, J. G.; PUCCIA, R.; MONTES, B. A.; SAN-BLAS, G.; BAGAGLI, E.; RAUSCHER, J. T.; RESTREPO, A.; MORAIS, F.; NINO-VEGA, G.; TAYLOR, J. W. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Mol Biol Evol** 23(1): 65-73, 2006.

MCCORMICK, N.; VELASQUEZ, V.; FINNEY, L.; VOGT, S.; KELLEHER, S. L. X-ray fluorescence microscopy reveals accumulation and secretion of discrete intracellular zinc pools in the lactating mouse mammary gland. **PLoS One** 5(6): e11078, 2010.

MCEWEN, J. G.; BEDOYA, V.; PATINO, M. M.; SALAZAR, M. E.; RESTREPO, A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. **J Med Vet Mycol** 25(3): 165-175, 1987a.

MCEWEN, J. G.; RESTREPO, B. I.; SALAZAR, M. E.; RESTREPO, A. Nuclear staining of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **J Med Vet Mycol** 25(5): 343-345, 1987b.

MOCCHIGIANI, E.; MUZZIOLI, M. Therapeutic application of zinc in human immunodeficiency virus against opportunistic infections. **J Nutr** 130(5S Suppl): 1424S-1431S, 2000.

MONGRAND, S.; MOREL, J.; LAROCHE, J.; CLAVEROL, S.; CARDE, J. P.; HARTMANN, M. A.; BONNEU, M.; SIMON-PLAS, F.; LESSIRE, R.; BESSOULE, J. J. Lipid rafts in higher plant cells: purification and characterization of Triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. **J Biol Chem** 279(35): 36277-36286, 2004.

MOORES, S. L.; SCHABER, M. D.; MOSSER, S. D.; RANDS, E.; O'HARA, M. B.; GARSKY, V. M.; MARSHALL, M. S.; POMPLIANO, D. L.; GIBBS, J. B. Sequence dependence of protein isoprenylation. **J Biol Chem** 266(22): 14603-14610, 1991.

MORENO, M. A.; IBRAHIM-GRANET, O.; VICENTEFRANQUEIRA, R.; AMICH, J.; AVE, P.; LEAL, F.; LATGE, J. P.; CALERA, J. A. The regulation of zinc homeostasis by the ZafA transcriptional activator is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. **Mol Microbiol** 64(5): 1182-1197, 2007.

NADOLSKI, M. J.; LINDER, M. E. Protein lipidation. **FEBS J** 274(20): 5202-5210, 2007.

NAIFF, R. D.; FERREIRA, L. C.; BARRETT, T. V.; NAIFF, M. F.; ARIAS, J. R. Enzootic paracoccidioidomycosis in armadillos (*Dasyus novemcinctus*) in the State of Para. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** 28(1): 19-27, 1986.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípio de bioquímica de Lehninger. In. Artmed, 2011.

NELSON, N. Metal ion transporters and homeostasis. **EMBO J** 18(16): 4361-4371, 1999.

OTT, C. M.; LINGAPPA, V. R. Integral membrane protein biosynthesis: why topology is hard to predict. **J Cell Sci** 115(Pt 10): 2003-2009, 2002.

PALMITER, R. D.; HUANG, L. Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers. **Pflugers Arch** 447(5): 744-751, 2004.

PARENTE, A. F.; DE REZENDE, T. C.; DE CASTRO, K. P.; BAILAO, A. M.; PARENTE, J. A.; BORGES, C. L.; SILVA, L. P.; SOARES, C. M. A proteomic view of the response of *Paracoccidioides* yeast cells to zinc deprivation. **Fungal Biol** 117(6): 399-410, 2013.

PENA, M. M.; LEE, J.; THIELE, D. J. A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. **J Nutr** 129(7): 1251-1260, 1999.

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

POPOLO, L.; VAI, M. The Gas1 glycoprotein, a putative wall polymer cross-linker. **Biochim Biophys Acta** 1426(2): 385-400, 1999.

PRADO, M.; SILVA, M. B.; LAURENTI, R.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 104(3): 513-521, 2009.

QUEIROZ-TELLES, F. *Paracoccidioides brasiliensis* ultrastructural findings. In: \_\_\_\_\_. **Paracoccidioidomycosis**. M. Franco, C. S. Lacaz, A. Restrepo-Moreno and G. Del Negro. London: CRC Press, 1994. 27-44.

RAM, A. F.; KAPTEYN, J. C.; MONTIJN, R. C.; CARO, L. H.; DOUWES, J. E.; BAGINSKY, W.; MAZUR, P.; VAN DEN ENDE, H.; KLIS, F. M. Loss of the plasma membrane-bound protein Gas1p in *Saccharomyces cerevisiae* results in the release of beta1,3-glucan into the medium and induces a compensation mechanism to ensure cell wall integrity. **J Bacteriol** 180(6): 1418-1424, 1998.

RESH, M. D. Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. **Biochim Biophys Acta** 1451(1): 1-16, 1999.

RESTREPO-MORENO, A. Paracoccidioidomycosis. In: \_\_\_\_\_. **Clinical Mycology**. W. E. Dismukes, P. G. Pappas and J. Sobel. New York: Oxford University Press, 2003. 328-345.

RESTREPO, A.; SALAZAR, M. E.; CANO, L. E.; STOVER, E. P.; FELDMAN, D.; STEVENS, D. A. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Infect Immun** 46(2): 346-353, 1984.

RICCI, G.; MOTA, F. T.; WAKAMATSU, A.; SERAFIM, R. C.; BORRA, R. C.; FRANCO, M. Canine paracoccidioidomycosis. **Med Mycol** 42(4): 379-383, 2004.

RICHINI-PEREIRA, V. B.; BOSCO, S. M.; THEODORO, R. C.; BARROZO, L.; PEDRINI, S. C.; ROSA, P. S.; BAGAGLI, E. Importance of xenarthrans in the eco-epidemiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **BMC Res Notes** 2: 228, 2009.

RUTHERFORD, J. C.; BIRD, A. J. Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells. **Eukaryot Cell** 3(1): 1-13, 2004.

SALGADO-SALAZAR, C.; JONES, L. R.; RESTREPO, A.; MCEWEN, J. G. The human fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* (Onygenales: Ajellomycetaceae) is a complex of two species: phylogenetic evidence from five mitochondrial markers. **Cladistics** 26(6): 613-624, 2010.

SCHAIBLE, U. E.; KAUFMANN, S. H. Iron and microbial infection. **Nat Rev Microbiol** 2(12): 946-953, 2004.

SCHORR, M.; THEN, A.; TAHIROVIC, S.; HUG, N.; MAYINGER, P. The phosphoinositide phosphatase Sac1p controls trafficking of the yeast Chs3p chitin synthase. **Curr Biol** 11(18): 1421-1426, 2001.

SHAKOURY-ELIZEH, M.; PROTCHENKO, O.; BERGER, A.; COX, J.; GABLE, K.; DUNN, T. M.; PRINZ, W. A.; BARD, M.; PHILPOTT, C. C. Metabolic response to iron deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem** 285(19): 14823-14833, 2010.

SHANKAR, J.; WU, T. D.; CLEMONS, K. V.; MONTEIRO, J. P.; MIRELS, L. F.; STEVENS, D. A. Influence of 17beta-estradiol on gene expression of *Paracoccidioides* during mycelia-to-yeast transition. **PLoS One** 6(12): e28402, 2011.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; TELLES FILHO FDE, Q.; MENDES, R. P.; COLOMBO, A. L.; MORETTI, M. L. Guidelines in paracoccidioidomycosis. **Rev Soc Bras Med Trop** 39(3): 297-310, 2006.

SILVA, M. G.; SCHRANK, A.; BILAO, E. F.; BILAO, A. M.; BORGES, C. L.; STAATS, C. C.; PARENTE, J. A.; PEREIRA, M.; SALEM-IZACC, S. M.; MENDES-GIANNINI, M. J.; OLIVEIRA, R. M.; SILVA, L. K.; NOSANCHUK, J. D.; VAINSTEIN, M. H.; DE ALMEIDA SOARES, C. M. The homeostasis of iron, copper, and zinc in *Paracoccidioides brasiliensis*, *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, and *Cryptococcus gattii*: a comparative analysis. **Front Microbiol** 2: 49, 2011.

SILVA, M. R.; SARAIVA, L. E. S. Paracoccidioidomycosis. **Dermatol Clin** 26(2): 257-269, vii, 2008.

SIMM, C.; LAHNER, B.; SALT, D.; LEFURGEY, A.; INGRAM, P.; YANDELL, B.; EIDE, D. J. *Saccharomyces cerevisiae* vacuole in zinc storage and intracellular zinc distribution. **Eukaryot Cell** 6(7): 1166-1177, 2007.

SINGER, S. J.; NICOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science** 175(4023): 720-731, 1972.

SPEERS, A. E.; WU, C. C. Proteomics of integral membrane proteins--theory and application. **Chem Rev** 107(8): 3687-3714, 2007.

STURME, M. H. J.; PUCCIA, R.; GOLDMAN, G. H.; RODRIGUES, F. Molecular biology of the dimorphic fungi *Paracoccidioides* spp. **Fungal biology reviews** 25(2): 89-97, 2011.

SZOPINSKA, A.; DEGAND, H.; HOCHSTENBACH, J. F.; NADER, J.; MORSOMME, P. Rapid response of the yeast plasma membrane proteome to salt stress. **Mol Cell Proteomics** 10(11): M111 009589, 2011.

TAHIROVIC, S.; SCHORR, M.; THEN, A.; BERGER, J.; SCHWARZ, H.; MAYINGER, P. Role for lipid signaling and the cell integrity MAP kinase cascade in yeast septum biogenesis. **Curr Genet** 43(2): 71-78, 2003.

TAN, S.; TAN, H. T.; CHUNG, M. C. Membrane proteins and membrane proteomics. **Proteomics** 8(19): 3924-3932, 2008.

TEIXEIRA, M. M.; THEODORO, R. C.; DE CARVALHO, M. J.; FERNANDES, L.; PAES, H. C.; HAHN, R. C.; MENDOZA, L.; BAGAGLI, E.; SAN-BLAS, G.; FELIPE, M. S. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Mol Phylogenet Evol** 52(2): 273-283, 2009.

TEIXEIRA, M. M.; THEODORO, R. C.; OLIVEIRA, F. F.; MACHADO, G. C.; HAHN, R. C.; BAGAGLI, E.; SAN-BLAS, G.; SOARES FELIPE, M. S. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. **Med Mycol** 52(1): 19-28, 2014.

THEODORO, R. C.; CANDEIAS, J. M.; ARAUJO, J. P., JR.; BOSCO SDE, M.; MACORIS, S. A.; PADULA, L. O.; FRANCO, M.; BAGAGLI, E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. **Med Mycol** 43(8): 725-729, 2005.

TORRES, J.; STEVENS, T. J.; SAMSO, M. Membrane proteins: the 'Wild West' of structural biology. **Trends Biochem Sci** 28(3): 137-144, 2003.

TUDER, R. M.; EL IBRAHIM, R.; GODOY, C. E.; DE BRITO, T. Pathology of the human pulmonary paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia** 92(3): 179-188, 1985.

VALERA, E. T.; MORI, B. M.; ENGEL, E. E.; COSTA, I. S.; BRANDAO, D. F.; NOGUEIRA-BARBOSA, M. H.; QUEIROZ, R. G.; SILVEIRA VDA, S.; SCRIDELI, C. A.; TONE, L. G. Fungal infection by *Paracoccidioides brasiliensis* mimicking bone tumor. **Pediatr Blood Cancer** 50(6): 1284-1286, 2008.

VAN HO, A.; WARD, D. M.; KAPLAN, J. Transition metal transport in yeast. **Annu Rev Microbiol** 56: 237-261, 2002.

VARKI, A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. **Glycobiology** 3(2): 97-130, 1993.



VIGNESH, K. S.; FIGUEROA, J. A. L.; POROLLO, A.; CARUSO, J. A.; DEEPE, G. S., JR. Granulocyte macrophage-colony stimulating factor induced Zn sequestration enhances macrophage superoxide and limits intracellular pathogen survival. **Immunity** 39(4): 697-710, 2013.

WEINBERG, E. D. Iron availability and infection. **Biochim Biophys Acta** 1790(7): 600-605, 2009.

WHITE, C.; GADD, G. M. The uptake and cellular distribution of zinc in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Gen. Microbiol**: 727-737, 1987.

WHITTERS, E. A.; CLEVES, A. E.; MCGEE, T. P.; SKINNER, H. B.; BANKAITIS, V. A. SAC1p is an integral membrane protein that influences the cellular requirement for phospholipid transfer protein function and inositol in yeast. **J Cell Biol** 122(1): 79-94, 1993.

WINTERS, M. S.; CHAN, Q.; CARUSO, J. A.; DEEPE, G. S., JR. Metallomic analysis of macrophages infected with *Histoplasma capsulatum* reveals a fundamental role for zinc in host defenses. **J Infect Dis** 202(7): 1136-1145, 2010.

WU, C. Y.; BIRD, A. J.; WINGE, D. R.; EIDE, D. J. Regulation of the yeast TSA1 peroxiredoxin by ZAP1 is an adaptive response to the oxidative stress of zinc deficiency. **J Biol Chem** 282(4): 2184-2195, 2007.

WU, C. Y.; BIRD, A. J.; CHUNG, L. M.; NEWTON, M. A.; WINGE, D. R.; EIDE, D. J. Differential control of Zap1-regulated genes in response to zinc deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. **BMC Genomics** 9: 370, 2008.

YADETA, K. A.; ELMORE, J. M.; COAKER, G. Advancements in the analysis of the *Arabidopsis* plasma membrane proteome. **Front Plant Sci** 4: 86, 2013.

ZHANG, F. L.; CASEY, P. J. Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. **Annu Rev Biochem** 65: 241-269, 1996.

ZHAO, H.; EIDE, D. The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem** 271(38): 23203-23210, 1996a.

ZHAO, H.; EIDE, D. The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. **Proc Natl Acad Sci U S A** 93(6): 2454-2458, 1996b.

ZHAO, H.; EIDE, D. J. Zap1p, a metalloregulatory protein involved in zinc-responsive transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell Biol** 17(9): 5044-5052, 1997.