



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR**

## Proteínas de superfície de *Paracoccidioides brasiliensis*

CANDIDATA: NADYA DA SILVA CASTRO

ORIENTADORA: DRA. CÉLIA MARIA DE ALMEIDA SOARES

TESE APRESENTADA AO PROGRAMA DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA  
MOLECULAR, DA FACULDADE DE  
MEDICINA, DA UNIVERSIDADE DE  
BRASÍLIA COMO REQUISITO PARCIAL À  
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM  
PATOLOGIA MOLECULAR.

**BRASÍLIA – DF**

**MAIO – 2008**

TRABALHO REALIZADO NO LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR,  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, INSTITUTO  
DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS.

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

# **BANCA EXAMINADORA**

## **TITULARES**

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

Prof. Dr. Augusto Schrank  
Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Ivan Torres Nicolau de Campos  
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

Prof. Dr. Bergmann Morais Ribeiro  
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília.

Prof. Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca  
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília.

## **SUPLENTE**

Prof. Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres  
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília.

*“- Os homens do seu planeta – disse o pequeno Príncipe – cultivam cinco mil rosas num jardim... e não encontram o que procuram...*

*- É verdade – respondi.*

*- E, no entanto, o que eles procuram poderia ser encontrado numa só rosa, ou num pouco de água...*

*- É verdade.*

*E o príncipezinho acrescentou: Mas os olhos são cegos.*

*É preciso ver com o coração”.*

*“O pequeno príncipe” de Antonie de Saint-Exupéry*

*Dedico esta tese aos meus queridos pais, Nadson e Genialda, que foram e são exemplos de dedicação e de perseverança e cujos incentivos, apoio e amor contribuíram em muito para a realização deste trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

À prof. Célia Soares, pela valiosa e dedicada orientação durante o decorrer desta tese, sobretudo nesta reta final. Com palavras talvez eu não consiga exprimir em totalidade minha gratidão, mas deixo aqui, os meus sinceros agradecimentos a você, quem admiro e respeito pelo exemplo de competência e entusiasmo.

Às profs. Maristela, Rosália, Fabrícia e Úrsula pela disposição, sugestões, por todo auxílio prestado durante a execução deste trabalho e acima de tudo pela valiosa amizade e conselhos.

Aos profs. Sônia, Marilene e Augusto por me acolherem tão bem em seus laboratórios e por contribuírem para o meu aperfeiçoamento profissional.

Aos pesquisadores Luciano Feitosa, Marina Vai e Ivan Orlandi pela prontidão e essencial colaboração científica.

Aos meus queridíssimos amigos, Kelly, Pati Zambuzzi, Regilda, Sarah, Cristina e Pati Lima, pelo carinho, apoio e pela estimada amizade. Obrigada por tornarem os dias mais agradáveis.

Ao Luiz, Wesley, Rogério Fiúza e Pati Kott pelo auxílio, “quebra-galhos”, macetes e troca de experiências e idéias. A Sabrina, Ronney, Rogério Troian e Rodrigo pela convivência prazerosa durante estes anos e pelos momentos cômicos.

Clayton, Alexandre, Juliana e Mônica Santiago pela constante ajuda e dedicação as atividades gerais do laboratório, o que contribui em muito para a realização do trabalho de todos.

À Lilian, Zilminha, Ju Camargos, Bruno, Moniquinha, Lidiane, Aline, Sheyla, Glaciane, Kleber, Milce, Bernadete, Karinne, Fernanda, Cristielly, Kesser, Tércio e a tantos outros que já não mais desfrutamos de suas agradáveis companhias no laboratório, mas que deixaram lembranças de muitos bons momentos e de grandes ensinamentos.

Também a Nathalie, Elisa e Mirelle pelo carinho, fácil sorriso e ajuda em muitos momentos. E aos mais recentes amigos Netto, Mariana, Raquel, Amanda, Ana Flávia, Dayane e Leandro pelo agradável convívio e amizade.

Não posso esquecer também dos amigos de Porto Alegre: Julia, Mel, Cris, Irina, Charley, Márcia e a outros que eu possa ter esquecido de citar os nomes, agradeço pelos ótimos momentos de convivência, receptividade e pelo apoio durante a execução dos experimentos. De modo especial, agradeço à Lívia, uma pessoa fantástica que contribuiu muito para o êxito dos meus experimentos.

À minha família pelos incentivos e apoio em todos os momentos, e por fazer a vida valer a pena.

E ao que merece a minha maior gratidão, Deus, meu alicerce, minha luz... meu rochedo nos momentos alegres e difíceis. Obrigada por estar sempre comigo e por me provar que com fé e coragem a gente chega a muitos lugares e alcança grandes sonhos!

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos!

# PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O DOUTORAMENTO

## Artigos completos publicados em periódicos

1. Castro NS, Barbosa MS, Maia ZA, Bão SN, Felipe MSS, Santana JM, Mendes-Giannini MJS, Pereira M, Soares CMA. **Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* PbDfg5p, a cell-wall protein implicated in filamentous growth.** *Yeast* **24**:141-54, 2008.
2. Santos MO, Castro NS, Pereira M, Soares CMA. **Genes involved in translation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma synoviae*.** *Genetics and Molecular Biology* **30**:230-5, 2007.
3. Oliveira JC, Castro NS, Felipe MSS, Pereira M, Soares CMA. **Comparative analysis of the cDNA encoding a ClpA homologue of *Paracoccidioides brasiliensis*.** *Mycological Research* **109**:707-16, 2005.
4. Castro NS, Maia ZA, Pereira M, Soares CMA. **Screening for glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins in *Paracoccidioides brasiliensis*.** *Genetics and Molecular Research* **4**:326-45, 2005.
5. Felipe MSS, Andrade RV, Arraes FBM, Nicola AM, Maranhão AQ, Torres FA, Silva-Pereira I, Poças-Fonseca MJ, Campos EG, Moraes LMP, Andrade PA, Tavares AHFP, Silva SS, Kyaw CM, Souza DP, PbGenome Network\*, Pereira M, Jesuíno RSA, Andrade EV, Parente JA, Oliveira GS, Barbosa MS, Martins NF, Fachin AL, Cardoso RS, Passos GAS, Almeida NF, Walter MEMT, Soares CMA, Carvalho MJA, Brigido MM. **Transcriptional profile of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells.** *The Journal of Biological Chemistry* **280**:24706-14, 2005.

\* PbGenome Network: Alda M.T. Ferreira, Alessandra Dantas, Alessandra J. Baptista, Alexandre M. Bailão, Ana L. Bonato, André C. Amaral, Bruno S. Daher, Camila M. Silva, Christiane S. Costa, Clayton L. Borges, Cléber O. Soares, Cristina M. Junta, Daniel A.S. Anjos, Edans F.O. Sandes,



Eduardo A. Donadi, Elza T. Sakamoto-Hojo, Flávio R. Araújo, Flávia C. Albuquerque, Gina C. Oliveira, João R.M. Almeida, Juliana C. Oliveira, Kláudia G. Jorge, Larissa Fernandes, Lorena S. Derengowski, Luís A.M. Bataus, Marcus A.M. Araújo, Marcus K. Inoue, Marlene T. De-Souza, Mauro F. Almeida, Nádia S. Parachin, Nadya S. Castro, Odair P. Martins, Patrícia L.N. Costa, Paula Sandrin-Garcia, Renata B.A. Soares, Stephano S. Mello, Viviane C.B. Reis.

### **Artigo submetido para publicação**

1. Castro NS, Castro KP, Orlandi I, Feitosa LS, Rosa e Silva LK, Vainstein MH, Bão SN, Vai M, Soares CMA. **The beta-1,3-glucanosyltransferase 3 of *Paracoccidioides brasiliensis* is involved in cell wall biosynthesis and morphogenesis.** *FEMS Yeast Research* (Submetido), 2008.

### **Manuscrito em preparação**

1. Castro KP, Castro NS, Feitosa LS, Rosa e Silva LK, Vainstein MH, Bão SN, Soares CMA. **The proline-rich cell-wall protein of *Paracoccidioides brasiliensis*.**

### **Trabalhos apresentados em eventos**

1. Castro NS, Castro KP, Maia ZA, Felipe MSS, Pereira M, Niño-Vega G, Soares CMA. **A family of beta-1,3-glucanosyltransferases of *Paracoccidioides brasiliensis*: Identification, comparative analysis and heterologous expression.** In: *IX International Meeting on Paracoccidioidomycosis*. Águas de Lindóia. Journal of the São Paulo Institute of Tropical Medicine. São Paulo: v.47. p.50, 2005.

2. Castro KP, Castro NS, Maia ZA, Felipe MSS, Pereira M, Soares CMA. **A Proline-rich antigen (PRA/Ag2) homologue of *Paracoccidioides brasiliensis*** In: *IX International Meeting on Paracoccidioidomycosis*. Águas de Lindóia. Journal of the São Paulo Institute of Tropical Medicine. São Paulo: v.47. p.51, 2005.

3. Maia ZA, Castro NS, Castro KP, Felipe MSS, Pereira M, Soares CMA. **Characterization and heterologous expression of a recombinant DFG5-like protein of *Paracoccidioides brasiliensis***. In: *IX International Meeting on Paracoccidioidomycosis*. Águas de Lindóia. Journal of the São Paulo Institute of Tropical Medicine. São Paulo: v.47. p.50, 2005.
4. Parente JA, Costa M, Castro NS, Felipe MSS, Pereira M, Deepe Jr GS, Soares CMA. **Characterization of a serine proteinase from *Paracoccidioides brasiliensis* accumulated during the infective process**. In: *IX International Meeting on Paracoccidioidomycosis*. Águas de Lindóia. Journal of the São Paulo Institute of Tropical Medicine. São Paulo: v.47. p.54, 2005.
5. Tacco BACA, Costa M, Parente JA, Felipe MSS, Castro NS, Pereira M, Soares CMA. **Characterization of an aspartyl proteinase of *Paracoccidioides brasiliensis***. In: *IX International Meeting on Paracoccidioidomycosis*. Águas de Lindóia. Journal of the São Paulo Institute of Tropical Medicine. São Paulo: v.47. p.51, 2005.
6. Rezende TCV, Castro NS, Moreira SFI, Santos MO, Felipe MSS, Oliveira EHD, Pereira M, Soares CMA. **Identification of new antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* by using the IVIAT technology**. In: *IX International Meeting on Paracoccidioidomycosis*. Águas de Lindóia. Journal of the São Paulo Institute of Tropical Medicine. São Paulo: v.47. p.52, 2005.
7. Chagas RF, Bailão AM, Pereira M, Felipe MSS, Castro NS, Soares CMA. **The catalase A of *Paracoccidioides brasiliensis*: proteomic identification, cDNA cloning and characterization**. In: *IX International Meeting on Paracoccidioidomycosis*. Águas de Lindóia. Journal of the São Paulo Institute of Tropical Medicine. São Paulo: v.47. p.48, 2005.
8. Castro NS, Maia ZA, Felipe MSS, Castro KP, Pereira M, Soares CMA. **The Receptor for Activated C Kinase 1 homologue of *Paracoccidioides brasiliensis*: structural and phylogenetic analysis**. In: *IX International Meeting on Paracoccidioidomycosis*. Águas de Lindóia. Journal of the São Paulo Institute of Tropical Medicine. São Paulo: v.47. p.50, 2005.

9. Tacco BACA, Cunha-Passos DA, Felipe MSS, Castro NS, Pereira M, Soares CMA. **The 14-3-3 proteins of *Paracoccidioides brasiliensis*: comparative analysis of two cDNAs encoding PB14-3-3 1 and PB14-3-3 2.** In: *IX International Meeting on Paracoccidioidomycosis*. Águas de Lindóia. Journal of the São Paulo Institute of Tropical Medicine. São Paulo: v.47. p.51, 2005.

# SUMÁRIO

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>XII</b>
<b>RESUMO</b>	<b>XVI</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XVII</b>
<b>CAPÍTULO 1: Considerações Gerais</b>	
1. <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	19
1.1. Aspectos gerais	19
1.2. Dimorfismo de <i>P. brasiliensis</i>	20
1.3. Parede celular de <i>P. brasiliensis</i>	23
2. Proteínas de membrana plasmática e parede celular em fungos	25
<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>30</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>32</b>
<b>CAPÍTULO 2: Proteínas com Âncoras de Glicosilfosfatidilinositol</b>	
1. Introdução	34
2. Artigo publicado	42
3. Discussão	62
<b>CAPÍTULO 3: Beta-1,3-Glicanosiltransferases</b>	
1. Introdução	69
2. Artigo Submetido	75
3. Discussão	104
<b>CAPÍTULO 4: Proteína Dfg5</b>	
1. Introdução	108
2. Artigo publicado	113
3. Discussão	127
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>131</b>
<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>132</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>134</b>

## ABREVIATURAS

- ASL-CWPs:** proteínas de parede celular sensíveis a álcali (*alkali-sensitive linkage-CWPs*)
- cAMP:** adenosina 3',5' monofosfato cíclico (*cyclic adenosine 3',5' monophosphate*)
- CAZy:** banco de dados de enzimas ativas para carboidratos (*Carbohydrate-Active Enzymes database*)
- CBM43:** Módulo de Ligação à Carboidratos, Família 43 (*Carbohydrate-Binding Module Family 43*)
- CRD:** epítipo determinante de reação cruzada (*cross-reacting determinant*)
- CRH:** hipersensibilidade a “Congo red” (*Congo red hypersensitive*)
- Cu-Zn SOD:** Cobre-zinco superóxido dismutase (*Cu-Zn superoxide dismutase*)
- CW:** parede celular (*cell wall*)
- CWP:** proteína de parede celular (*cell wall protein*)
- CWP-GPI:** gene para proteína de parede celular dependente de GPI (*cell wall proteína-GPI*)
- Cys-box:** região rica em cisteína (*cysteine-rich region*)
- DAG:** diacilglicerol (*diacylglycerol*)
- DCW1:** parede celular defeituosa 1 (*defective cell wall 1*)
- DFG5:** Deficiente para o crescimento filamentososo 5 (*defective in filamentous growth*)
- DPM:** dolicol-fosfato-manose (*dolichol phosphate-mannose*)
- DPM(1-3):** proteína (1, 2 ou 3) regulatória da biossíntese de DPM (*dolichol phosphate-mannose biosynthesis regulatory protein*)
- ECM:** matriz extracelular (*extracellular matrix*)
- Ecm33:** proteína mutante extracelular 33 (*extracellular mutant 33 protein*)
- ELI-Ag1:** antígeno 1 identificado pela imunização de uma de biblioteca de expressão (*expression library immunization-antigen 1*)
- Emp:** proteína de matriz extracelular (*extracellular Matrix Protein*)
- EPD:** essencial para o desenvolvimento de pseudohifa (*essential for pseudohyphal development*)
- ER:** retículo endoplasmático (*endoplasmatic reticulum*)
- EtN:** etanolamina (*ethanolamine*)
- EtNP:** fosfato de etanolamina (*ethanolamine phosphate*)
- GAA1:** proteína de junção a âncora de GPI 1 (*GPI anchor attachment 1*)
- GAS:** glicofosfolípido ancorado à superfície (*glycophospholipid-anchored surface*)
- GEL:** beta-1,3-glicanosiltransferase (*glucan-elongating glucanosyltransferase*)
- GH:** família de glicosil hidrolase (*glycoside hydrolase family*)
- GlcN:** glicosamina (*glucosamine*)

**GlcNAc:** N-acetilglicosamina (*N-acetyl-glucosamine*)

**GlcNAc-PI:** N-acetilglicosaminil-fosfatidilinositol (*N-acetylglucosaminyl-phosphatidylinositol*)

**GPI:** glicosilfosfatidilinositol (*glycosylphosphatidylinositol*)

**GPI-CWP:** proteínas com âncoras de GPI ligadas à parede celular  
(*glycosylphosphatidylinositol-bound cell-wall protein*)

**GPI-PLC:** GPI fosfolipase C (*glycosylphosphatidylinositol phospholipase C*)

**GPI-PLD:** GPI fosfolipase D (*glycosylphosphatidylinositol phospholipase D*)

**GPI-PM:** proteínas com âncoras de GPI ligadas à membrana plasmática  
(*glycosylphosphatidylinositol-bound plasma membrane protein*)

**GPI-Ps:** proteínas acopladas à âncora de GPI (*glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins*)

**HF-piridina:** fluoreto hidrogenado de piridina (*hydrofluoride pyridine*)

**HWPI:** gene para proteína da parede de hifa 1 (*hyphal wall protein 1*)

**I:** Inositol (*inositol*)

**M:** manose (*mannose*)

**NtD:** Domínio N-terminal (*N-terminal domain*)

**P:** fosfato (*phosphate*)

**PA:** ácido fosfatídico (*phosphatidic acid*)

**Pb(01, 03 e 18):** isolado (01, 03 e 18) de *P. brasiliensis* (*P. brasiliensis isolate [01, 03, 18]*)

**PbGel3p:** proteína Gel3 de *P. brasiliensis* (*Gel3 protein of P. brasiliensis*)

**PbGEL3:** gene para proteína Gel3 de *P. brasiliensis* (*Gel3 gene of P. brasiliensis*)

**PbDfg5p:** proteína Dfg5 de *P. brasiliensis* (*Dfg5 protein of P. brasiliensis*)

**PbDFG5:** gene para proteína Dfg5 de *P. brasiliensis* (*DFG5 gene of P. brasiliensis*)

**PbrCHS(1-6):** genes para as proteínas quitina sintase (1 a 6) de *P. brasiliensis* (*Chitin synthesis [1 to 6] genes of P. brasiliensis*)

**PCM:** paracoccidiodomicose (*paracoccidiodomycosis*)

**PHR:** pH regulada (*pH-regulated*)

**PI:** fosfatidilinositol (*phosphatidylinositol*)

**PIG:** fosfatidilinositol-glicana (*phosphatidylinositol-glycan*)

**PI-PLC:** fosfolipase C fosfatidilinositol (*phosphatidylinositol phospholipase C*)

**PIR:** proteínas com repetições internas (*protein with internal repeats*)

**PIR-CWP:** proteínas da parede celular com repetições internas

**PL:** fosfolipase (*phospholipase*)

**PLB:** fosfolipase B (*phospholipase B*)

**PM:** membrana plasmática (*plasma membrane*)

**PRA/Ag2:** Antígeno rico em prolina/Antígeno 2 (*proline-rich antigen/antigen 2*)

**RGD:** motivo composto pelos aminoácidos: Arginina, Glicina e ácido aspártico (*Arg-Gly-Asp*)

**Ser-box:** região rica em serina (*region rich in serine*)

**Sítio  $\omega$ :** sítio omega ou sinal para ligação à GPI (*Omega site*)

**SOD:** superóxido dismutase (*superoxide dismutase*)

**SPB:** corpos polares do fuso (*spindle pole bodies*)

**TNF- $\alpha$ :** fator de necrose tumoral alfa (*tumor necrosis factor- $\alpha$* )

**WB2d:** linhagem haplóide de *Saccharomyces cerevisiae* tendo o gene *GAS1* ausente

## RESUMO

*Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo termodimórfico, agente etiológico da paracoccidioidomicose. Em humanos, a infecção inicia-se pela inalação de propágulos fúngicos que alcançam os pulmões. A parede dos microrganismos constitui um importante reservatório de macromoléculas imunoreativas e um potencial alvo para a procura de candidatos a vacinas. Em muitos patógenos, as proteínas com âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI) mostraram-se imunogênicas e importantes fatores de virulência. Assim, com o objetivo de estudar as proteínas de superfície foram efetuadas análises no banco de dados do transcriptoma de *P. brasiliensis*, onde pesquisou-se por proteínas GPI-ancoradas localizadas na membrana plasmática ou parede celular, bem como por proteínas que estivessem envolvidas na síntese, ligação e clivagem da âncora de GPI. Estas proteínas foram identificadas em várias categorias funcionais, tais como: (i) enzimas: glicosiltransferases (1-3), (ii) prováveis antígenos de superfície, (iii) proteínas com papel estrutural e envolvidas na biossíntese da parede celular. Foram identificados transcritos codificantes para proteínas da via de biossíntese e hidrólise da âncora de GPI. Visando o conhecimento de mecanismos moleculares que participem da montagem e morfogênese da parede celular de *P. brasiliensis*, foi realizado o estudo de  $\beta$ -1,3-glicosiltransferase 3 (*PbGel3*). *PbGel3* mostrou-se em cópia única no genoma deste fungo com maiores níveis do transcrito e de proteína na fase miceliana. A proteína foi imunolocalizada na superfície de células leveduriformes e de micélio de *P. brasiliensis*. O potencial papel de *PbGel3p* na biossíntese e remodelamento foi evidenciado pela habilidade em recuperar o fenótipo do mutante *gas1* $\Delta$  de *Saccharomyces cerevisiae*. O homólogo da proteína *DFG5* (deficiente para o crescimento filamentoso 5) de *P. brasiliensis*, uma proteína glicosilada provavelmente ligada à parede celular pela rede de  $\beta$ -glicana foi estudado. Estudos de interação demonstraram que a proteína *PbDfg5p* recombinante se liga aos componentes da matriz extracelular, sugerindo um papel importante nos passos iniciais de colonização e aderência de *P. brasiliensis* aos tecidos do hospedeiro. Em função de seu papel biológico, bioquímica única, organização estrutural e a ausência da maioria de seus constituintes em células de mamíferos, a parede celular é um alvo atraente para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos e essencial para o entendimento da patogênese fúngica.



## ABSTRACT

*Paracoccidioides brasiliensis* is a temperature dependent dimorphic fungus, the etiological agent of paracoccidioidomycosis. In human, infection starts by inhalation of fungal propagules reaching the pulmonary epithelium, where the morphogenetic conversion is correlated with changes in the cell wall composition, organization and structure. The cell wall constitute an important reservoir of immunoreactive molecules and potential target for the search of vaccine candidates. In many pathogens, the proteins with glycosilfosfatidilinositol (GPI)-anchors are immunogenic and important virulence factors. Thus, *P. brasiliensis* transcriptome data were analyzed for potential GPI-anchored proteins localized in plasma membrane or cell wall, as well as for proteins involved in synthesis, attachment and cleavage of the GPI anchor. The proteins were identified in several functional categories: (i) enzymes: glucanosyltransferases(1-3), (ii) probable surface antigens, (iii) proteins involved in cell wall biosynthesis and structural role. It was identified transcript encoding to proteins involved in GPI anchor biosynthesis and hydrolysis. In an effort to elucidate the molecular mechanisms involved in the fungus cell wall-assembling and morphogenesis it was performed the study of the  $\beta$ -1,3-glucanosyltransferase 3 (*PbGel3*). *PbGel3* showed one copy in genome of this fungus with the highest level of transcript and protein in the mycelium phase. The protein was immunolocalized at the surface in both mycelium and yeast phase. The potential role of *PbGel3p* in cell wall biosynthesis and remodeling was evidenced by its ability to rescue the phenotype of the *Saccharomyces cerevisiae gas1* $\Delta$  mutant. The *DFG5* (defective in filamentous growth) homologue of *P. brasiliensis*, a probably glycosylated and  $\beta$ -glucan linked cell-wall protein was also studied. Studies demonstrated that the recombinant *PbDfg5p* binds to extracellular matrix components, indicating that it can be important for initial steps leading of *P. brasiliensis* attachment and colonization of host tissues. Because of its essential biological role, unique biochemistry, structural organization and the absence of the most of their constituents in mammalians cells, the cell wall is an attractive target for the development of new antifungal agents and essential for understanding the fungal pathogenesis.

Capítulo

1

# *Considerações Gerais*



## **1. *Paracoccidioides brasiliensis***

### **1.1. Aspectos gerais**

*Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da Paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica humana, crônica e progressiva, geograficamente confinada a América Latina. Tendo sido isolado pela primeira vez em 1908, por Adolpho Lutz, *P. brasiliensis* é um fungo termodimórfico que sofre um complexo processo de transformação *in vivo* (Brummer *et al.*, 1993). Como um organismo dimórfico *P. brasiliensis* cresce na forma miceliana a temperatura ambiente e na forma de levedura *in vitro* e nos tecidos do hospedeiro.

A transição dimórfica se dá pela mudança na temperatura e ocorre simultaneamente a mudanças na composição da parede e membrana celulares, envolvendo alterações estruturais nos polímeros de carboidratos da parede e reorganização dos lipídios de membrana (Leverly *et al.*, 1998; Toledo *et al.*, 1999). Acredita-se que a morfogênese esteja ligada à virulência do fungo, pois isolados que não possuem a capacidade de se diferenciar em leveduras não são virulentos (De Moraes Borba & Schäffer, 2002).

Em temperaturas próximas a 25 °C as culturas de *P. brasiliensis* apresentam aspecto algodinoso e estruturas celulares que se apresentam sob a forma miceliana, com formação de hifas septadas, multinucleadas, com filamentos finos e artroconídios intercalares (Brummer *et al.*, 1993; San-Blas, 1993). Acredita-se que a fase miceliana seja saprofítica, encontrada principalmente no solo e em plantas, e que seria também a forma na qual o fungo se encontra quando ocorre o contágio do hospedeiro.

À temperatura de 36 °C o fungo promove uma transição da estrutura filamentosa para uma estrutura globular, assumindo a forma de levedura (San-Blas, 1993). Esta seria sua forma parasitária, que assume características peculiares: apresenta brotamentos múltiplos, resultado de exoesporulação; uma membrana birrefringente, além de cromatina evidente. A morfologia única desta levedura é determinante no diagnóstico laboratorial da PCM, e em uma avaliação comparativa se assemelha a uma "roda-de-leme" (Furtado *et al.*, 1967).

A infecção por *P. brasiliensis* ocorre pela inalação de propágulos infectantes, os quais representam a estrutura reprodutiva da fase miceliana do fungo. Para o

desenvolvimento da doença, é imprescindível que os conídeos alojados nos alvéolos pulmonares transitem para a fase leveduriforme. A mudança da fase infectante para a patogênica depende do aumento de temperatura. Após instalação do fungo nos pulmões, ocorre a formação de lesões que podem: (i) regredir com destruição do fungo, (ii) regredir com fungos latentes ou quiescentes, podendo desenvolver a PCM ativa posteriormente, ou (iii) progredir com o desenvolvimento dos sinais e sintomas da PCM (Lacaz, 1994). A doença é caracterizada por inflamação granulomatosa, supressão da imunidade celular e altos títulos de anticorpos (Rodrigues & Travassos, 1994; Dixon *et al.*, 1998).

A PCM pode se desenvolver como uma forma localizada e benigna ou em uma forma severa, disseminada e potencialmente letal (Franco *et al.*, 1993), afetando a pele, linfonodos e vários órgãos internos, incluindo os pulmões e o sistema nervoso central (Restrepo, 1985). A disseminação do fungo ocorre através das vias hematogênica e linfática (San-Blas, 1993; Camargo & de Franco, 2000). Na maior parte dos casos há uma infecção subclínica com cura espontânea (Lacaz, 1994), sugerindo uma predisposição genética para a progressão da doença (Brummer *et al.*, 1993).

## **1.2. Dimorfismo de *P. brasiliensis***

O dimorfismo ou conversão morfológica constitui um mecanismo de defesa importante para a adaptação de alguns fungos patogênicos às condições adversas do hospedeiro humano durante o estabelecimento da doença e invasão dos tecidos (Kurokawa *et al.*, 1998; San-Blas *et al.*, 2002; Nemecek *et al.*, 2006). As alterações morfológicas que o fungo sofre no hospedeiro são consequência de modificações bioquímicas e fisiológicas impostas pelas novas condições ambientais que, em última análise, estimulam uma adaptação no padrão transcricional e/ou regulatório de genes e proteínas (Parente *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2008).

*In vitro*, a transição de micélio para levedura em *P. brasiliensis*, é caracterizada pelo espessamento das regiões inter-septais das hifas, com surgimento de estruturas arredondadas, que se dividem por brotamento (San-Blas, 1982). No processo inverso, de levedura para micélio, ocorre, *in vitro*, a formação de brotos alongados, multinucleados, em forma de pêra, os quais gradativamente assumem o aspecto de uma hifa (Bartinick-Garcia *et al.*, 1995).

A variação de temperatura parece ser o principal fator responsável pela diferenciação celular de *P. brasiliensis*, uma vez que esta pode ser obtida, *in vitro*, apenas pela alteração da temperatura de incubação (San-Blas, 1993). No entanto, já foi demonstrado que fatores nutricionais, como a presença de aminoácidos, poderiam estar envolvidos na regulação deste processo (Paris *et al.*, 1985). Villar *et al.* (1988) observaram que a expressão fenotípica de células leveduriformes era preservada a 25°C pela adição de soro fetal bovino em meio de cultura complexo e quimicamente definido.

Estudos com o hormônio feminino 17- $\beta$ -estradiol mostraram a capacidade deste de inibir a transição de micélio para a fase leveduriforme tanto *in vitro* (Restrepo *et al.*, 1984), como *in vivo* (Sano *et al.*, 1999), sendo esse fato relacionado como possível fator de proteção à infecção em mulheres. Felipe *et al.* (2005) identificaram um gene expresso diferencialmente na fase leveduriforme que possivelmente codifica uma proteína de 60 kDa no citosol das células de *P. brasiliensis*, a qual se ligaria ao estradiol. Acredita-se que a interação do hormônio 17- $\beta$ -estradiol com esta proteína citoplasmática inibiria a transição de micélio para levedura, explicando a baixa incidência de PCM em mulheres.

As vias de sinalização que controlam a transição morfológica em *P. brasiliensis* são pouco conhecidas, mas o envolvimento do cAMP (adenosina 3',5' monofosfato cíclico), proteína quinase ativada por mitógeno e Ca<sup>2+</sup>/calmodulina nos caminhos de transdução de sinal são relatados em outros fungos dimórficos (Brown & Gow, 1999, Lengeler *et al.*, 2000). Foi demonstrado que o cAMP exógeno é capaz de inibir a transição (Levedura  $\rightarrow$  Micélio) mantendo assim a forma patogênica do fungo (Paris & Duran, 1985; Chen *et al.*, 2007).

A via de transdução Ca<sup>2+</sup>/Calmodulina também parece desempenhar papel na diferenciação celular de *P. brasiliensis*. Esta via está envolvida em vários aspectos no desenvolvimento fúngico, incluindo formação de conídios, extensão da hifa, dimorfismo e patogenicidade. A expressão da calmodulina e da subunidade regulatória da calcineurina mostraram-se aumentadas durante a transição dimórfica em *P. brasiliensis* (Nunes *et al.*, 2005), sugerindo importante papel na via de transdução de sinal associada com a morfogênese. Drogas que bloqueiam as quinases dependentes de Ca<sup>2+</sup>/Calmodulina inibem a diferenciação de micélio para levedura (Carvalho *et al.*, 2003).

O Projeto Genoma Funcional e Diferencial de *P. brasiliensis*, desenvolvido por pesquisadores da região Centro-Oeste do Brasil, resultou no seqüenciamento de 6.022

genes expressos nas fases miceliana e leveduriforme do isolado *Pb01*, possibilitando a detecção de genes diferencialmente transcritos (Felipe *et al.*, 2003, 2005). A diferenciação celular em *P. brasiliensis* requer mudança na temperatura, o que pode ser associado com a resposta ao estresse. Dessa forma, foram identificados 48 transcritos codificando chaperonas ou proteínas envolvidas no processo de estresse, sendo que oito desses genes foram transcritos diferencialmente. A análise do transcriptoma também revelou alguns prováveis componentes das vias de sinalização e seqüências gênicas consideradas como potenciais alvos para drogas antifúngicas em *P. brasiliensis*, não possuindo nenhum homólogo no genoma humano, como: quitina deacetilase, isocitrato liase e  $\alpha$ -1,3-glicana sintase, todos preferencialmente expressos na fase leveduriforme.

Outro projeto Genoma Funcional foi desenvolvido por pesquisadores do Estado de São Paulo, que identificaram 4.692 genes do isolado *Pb18*. Pela análise de ESTs, Goldman *et al.* (2003), identificaram vários genes potenciais de virulência em *P. brasiliensis* homólogos à *Candida albicans*. Os genes da via de transdução de sinal foram implicados na transição dimórfica. A identificação de alguns genes de *P. brasiliensis* homólogos aos genes envolvidos na via de transdução de sinal e relacionados à virulência de *C. albicans*, sugere que esta via possa estar atuando em *P. brasiliensis*, provavelmente controlando a diferenciação celular. Marques *et al.* (2004), utilizando biblioteca de subtração e microarranjos, identificaram genes preferencialmente expressos na fase leveduriforme de *P. brasiliensis* (isolado *Pb18*), proporcionando maiores informações acerca da patobiologia deste fungo. Dentre os genes identificados como diferencialmente expressos estão  $\beta$ -1,3-glicana sintetase, enzima relacionada ao metabolismo de parede celular; ERG25 que codifica uma C-4 esterol metil oxidase e atua no primeiro passo enzimático da síntese de ergosterol em fungos, além de genes envolvidos no metabolismo de enxofre, tais como metionina permease (Nunes *et al.*, 2005; Bastos *et al.*, 2007).

Durante a transição de micélio para levedura existe um aumento no conteúdo de quitina na parede celular (San-Blas & Niño-Vega, 2008). Nunes *et al.* (2005), observaram que houve um aumento na expressão de vários genes que codificam quitina sintases imediatamente após a elevação da temperatura, enquanto quitinases e endoquitinases apareceram menos reguladas. Por outro lado, outros três genes que codificam quitina sintases não mostraram variação na expressão durante a transição. Este fato sugere que a biossíntese de quitina pode também ocorrer através da ativação de genes alternativos que não respondem ao choque térmico (Nunes *et al.*, 2005).

O perfil transcricional de *P. brasiliensis* durante a diferenciação morfológica de micélio para levedura foi avaliado por Bastos *et al.* (2007). Vários genes potencialmente relacionados com a síntese de membrana e parede celulares mostraram-se aumentados durante a diferenciação celular de micélio para levedura, após 22 horas de indução da transição, indicando o remodelamento da superfície de *P. brasiliensis* nos estágios iniciais da morfogênese. Neste estudo, genes envolvidos na via de assimilação do enxofre como a sulfito redutase, mostraram-se super expressos durante a transição, sugerindo o envolvimento do metabolismo do enxofre durante o processo de diferenciação em *P. brasiliensis*. Durante a transição também foi verificada a presença de enzimas que participam do ciclo do glioxalato e de genes envolvidos em vias de transdução de sinal, o que indica que a via do glioxalato é funcional durante esse processo e que a transição morfológica em *P. brasiliensis* é mediada por vias de transdução de sinal, controlando a adaptação do fungo para sobrevivência no ambiente ou dentro do hospedeiro.

### **1.3. Parede celular de *P. brasiliensis***

A parede celular, que por muito tempo foi considerada como um exoesqueleto inerte, hoje é vista como uma estrutura dinâmica que se renova continuamente como resultado da modificação das tensões ambientais e condições de cultivo. Por causa de seu papel biológico essencial, bioquímica única, organização estrutural e a ausência da maioria de seus constituintes em células mamíferas, a parede celular é um alvo atraente para o desenvolvimento de novos agentes anti-fúngicos (Latgé, 2007). Embora a composição da parede celular de fungos varie entre as diferentes espécies, é composta basicamente por proteínas, glicoproteínas, lipídeos e principalmente por polissacarídeos do tipo quitina e glicanas, distribuídos diferencialmente ao longo da superfície (de Groot *et al.*, 2005).

Em *P. brasiliensis*, foi observado que a parede celular de micélio possui maior teor de proteínas (24-41%) do que a de levedura (7-14%). Foram encontradas taxas baixas de galactose e manose e 12 vezes mais ligações disulfetos na parede celular de micélio (Kanetsuna *et al.*, 1969). A composição de lipídeos da membrana celular também sofre mudanças durante o processo de dimorfismo em *P. brasiliensis*. A fase leveduriforme possui duas vezes mais lipídeos que a miceliana (Manocha, 1980). Ácido

linoléico e lipídeos insaturados são encontrados em maior quantidade na forma miceliana, enquanto que na forma de levedura o lipídeo predominante é o ácido oléico (San-Blas & San-Blas, 1977). Essa diferença possivelmente está relacionada à manutenção da permeabilidade normal da membrana, que é necessária a sobrevivência do fungo quando submetida à temperatura de 36 °C (Hamdan *et al.*, 1993).

Os componentes majoritários da parede celular de *P. brasiliensis* são os polissacarídeos quitina e glicanas, que variam em proporções de acordo com a fase morfológica e com o grau de virulência da linhagem fúngica (Kanetsuna & Carbonell, 1970). Assim, a quitina, que é constituída por resíduos de N-acetilglicosamina unidos por ligações  $\beta$ -1,4 (Bulawa, 1993; Munro & Gow, 2001), é encontrada em ambas as formas, sendo esta mais abundante na fase de levedura (43%) do que de micélio (13%) (San-Blas & San-Blas, 1977). Estruturalmente, a quitina da fase de levedura encontra-se associada a pequenas frações de  $\beta$ -1,3 e de  $\alpha$ -1,6-glicana e corresponde à camada interna da parede celular, logo abaixo a camada formada por  $\alpha$ -1,3-glicana. Já a quitina de micélio encontra-se associada às  $\beta$ -glicanas e proteínas em uma única camada da parede celular. Nesta última fase, as  $\beta$ -glicanas contém principalmente ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,3, com pequenas quantidades de  $\beta$ -1,6 (Carbonell, 1969; Kanetsuna *et al.*, 1969, 1972; San-Blas & San-Blas, 1977; San-Blas *et al.*, 1987).

Os polissacarídeos da parede celular são propostos como possíveis contribuintes para a transição dimórfica de *P. brasiliensis* (San-Blas & San-Blas, 1994), sendo a  $\beta$ -1,3-glicana adicionalmente vista como um importante imunomodulador enquanto que a  $\alpha$ -1,3-glicana está comumente relacionada à virulência (San-Blas & San-Blas, 1977; Hallak *et al.*, 1982; Restrepo-Moreno, 1993; Silva *et al.*, 1997). A mudança na composição da parede celular durante a infecção, como a que ocorre em *P. brasiliensis*, pode ser considerada como um mecanismo de escape da resposta imune inata, que é essencial para o controle de infecções fúngicas. Dessa forma, a  $\alpha$ -1,3-glicana localizada mais externamente na parede celular (Kanetsuna *et al.*, 1972), deve atuar como um protetor de  $\beta$ -1,3-glicana contra os mecanismos de defesa do hospedeiro (San-Blas, 1982), uma vez que a  $\beta$ -glicana é capaz de induzir um aumento da liberação do TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral-alfa), com conseqüente morte do fungo *P. brasiliensis* (Anjos *et al.*, 2002). Tem-se postulado que receptores para  $\beta$ -glicanas, tais como CR3, lactosilceramidas e dectina-1 contribuem para o reconhecimento e fagocitose de fungos (Brown & Gordon, 2003; Rubin-Bejerano *et al.*, 2007). Em *Histoplasma capsulatum* foi demonstrado que a  $\alpha$ -1,3-glicana que recobre a camada de  $\beta$ -1,3-glicana causa um



bloqueio na ligação a dectina-1 e inibe em 5 vezes a produção de TNF- $\alpha$  por células fagocíticas, com a conseqüente redução da eficácia da resposta imune (Rappleye *et al.*, 2007). Em *P. brasiliensis*, sabe-se que pelo menos parte da  $\beta$ -1,3-glicana pode estar acessível na superfície (Diniz *et al.*, 2004).

Além dos componentes já mencionados, estudos têm comprovado que enzimas glicolíticas e outras proteínas abundantes no citosol, como a gliceraldeído-fosfato-dehidrogenase e a mitochondrial DnaJ, se localizam na parede celular do fungo *P. brasiliensis* (Barbosa *et al.*, 2006; Batista *et al.*, 2006). Outras moléculas de superfície têm sido descritas em nosso laboratório, tais como proteína de choque térmico de 60 kDa (Passos *et al.*, 2003), formamidase (Borges *et al.*, manuscrito em redação), triose fosfato isomerase (Pereira *et al.*, 2007) e antígeno rico em prolina (PRA/Ag2) (Castro *et al.*, manuscrito em preparação).

Tomazett *et al.* (2005), identificaram no transcriptoma do fungo *P. brasiliensis* genes que codificam para proteínas envolvidas na estrutura, composição e organização da parede celular. Entre as seqüências identificadas estão: quitina sintase (*PbrCHS6*), a qual está presente apenas na fase miceliana de *P. brasiliensis*; manossiltransferase 9, cujo produto protéico está envolvido na síntese da cadeia externa de manana; glicanosiltransferases (*PbGEL1*, *PbGEL2* e *PbGEL3*), os quais codificam enzimas envolvidas na integração de  $\beta$ -1,3-glicana à parede celular; endoquitinase 1 e exoquitinase 1.

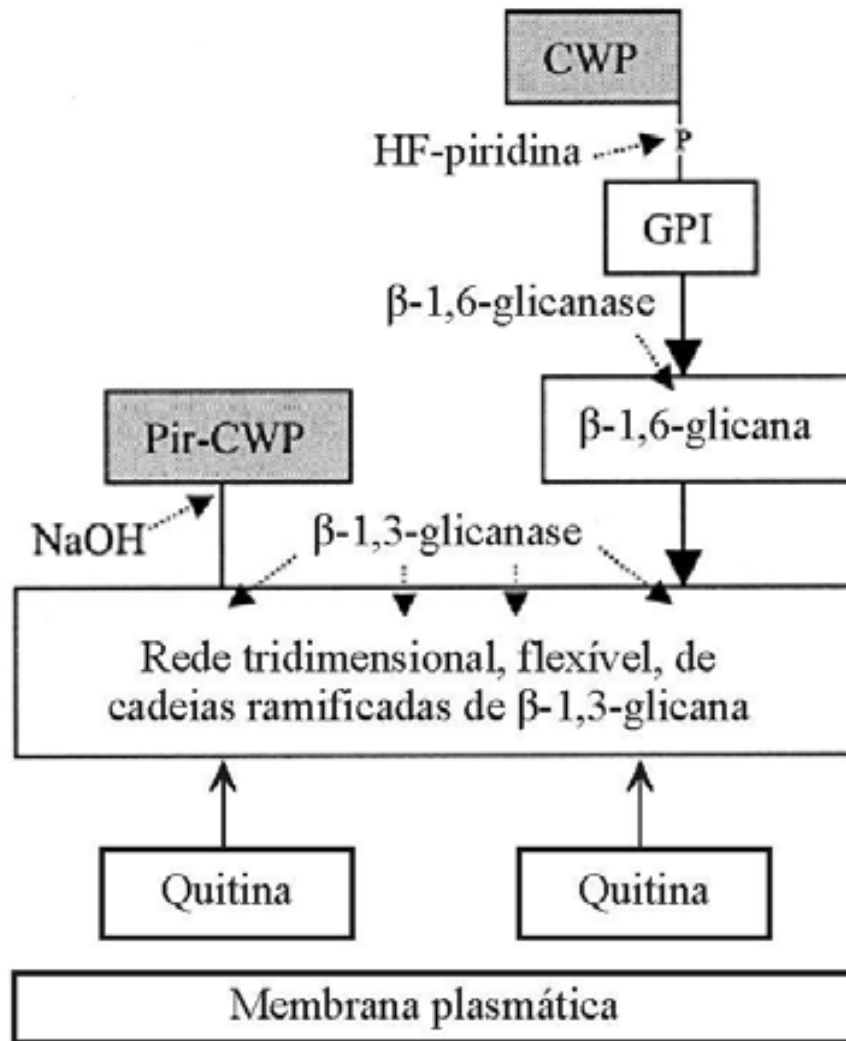
Seis genes codificantes para quitina sintase (*PbrCHS1*, *PbrCHS2*, *PbrCHS3*, *PbrCHS4*, *PbrCHS5* e *PbrCHS6*) são ativos em *P. brasiliensis*, sendo detectados em ambas as fases de micélio e levedura (Niño-Vega *et al.*, 1998, 2000, 2004; Tomazett *et al.*, 2005; San-Blas & Niño-Vega, 2008), com exceção de *PbrCHS3* que é expresso exclusivamente na fase leveduriforme (San-Blas & Niño-Vega, 2008).

## **2. Proteínas de parede celular e membrana plasmática em fungos**

A parede celular (CW) por localizar-se na interface entre o microrganismo e o meio ambiente (Firon *et al.*, 2004) desempenha importante papel para o crescimento, a morfogênese e as interações dos fungos com o ambiente e com outras células. Embora, a parede celular de fungos varie freqüentemente entre as diferentes espécies, ela é uma

estrutura complexa composta tipicamente de quitina,  $\beta$ -1,3- e  $\beta$ -1,6-glicanas, mananas e proteínas (de Groot *et al.*, 2005). Estas moléculas encontram-se dispostas em camadas, sendo que a camada mais interna consiste principalmente de moléculas de  $\beta$ -1,3-glicana, interligadas por pontes de hidrogênio, e ligadas covalentemente à  $\beta$ -1,6-glicana e a rede de quitina (Fig. 1.1) (Kapteyn *et al.*, 2000; Richard *et al.*, 2002). A camada externa, que determina as propriedades da superfície celular, consiste principalmente de manoproteínas que são ligadas covalentemente à  $\beta$ -1,6- ou  $\beta$ -1,3-glicanas (Fig. 1.1) (Klis *et al.*, 2001).

As manoproteínas de *C. albicans* e de *Saccharomyces cerevisiae* podem ser agrupadas em duas classes (Smits *et al.*, 2001; de Groot *et al.*, 2004). Uma classe composta por proteínas que são extraídas com SDS sendo, portanto consideradas como não covalentemente ligadas à parede celular. A outra classe é composta por proteínas resistentes à extração com SDS. Esta última classe contém proteínas de parede celular (CWPs) estruturais ligadas covalentemente a glicana da parede celular (Fig. 1.1). As CWPs por sua vez podem ser agrupadas dependendo da estrutura C-terminal e do tipo de ligação à glicana. O maior grupo compõe as GPI-CWPs que possuem uma estrutura dependente de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) ligada covalentemente à  $\beta$ -1,6-glicana. A  $\beta$ -1,6-glicana pode ser ligada à  $\beta$ -1,3-glicana ou quitina resultando em uma forte ligação covalente das GPI-CWPs à parede celular (Fig. 1.1) (Kapteyn *et al.*, 1996, 1997, 1999; Kollár *et al.*, 1997; de Groot *et al.*, 2004). O segundo grupo de proteínas, na qual se incluem as PIR-CWPs (proteínas da parede celular com repetições internas) é diretamente ligada à rede de  $\beta$ -1,3-glicana da parede celular através de uma ligação desconhecida, sensível a pH alcalino (Toh-e *et al.*, 1993; Mrsá *et al.*, 1997; Kapteyn *et al.*, 1999, 2000; Kandasamy *et al.*, 2000). As repetições presentes nas PIR-CWPs consistem de uma seqüência consenso rica em resíduos de glutamina (Q-I/V-X-D-G-Q-I/V-/P-Q), cujo número de repetições varia entre as diferentes proteínas PIR (Fig. 1.1) (Toh-e *et al.*, 1993). As proteínas PIR podem ser especificamente extraídas da parede celular utilizando NaOH (Mrsá *et al.*, 1997; Kapteyn *et al.*, 1999). HF-piridina (fluoreto hidrogenado de piridina) cliva especificamente ligações fosfodiéster, pela qual as GPI-CWPs estão ligadas às cadeias de  $\beta$ -1,6-glicana (Kapteyn *et al.*, 1996; de Groot *et al.*, 2004). Por outro lado, a  $\beta$ -1,3-glicanase solubiliza os tipos conhecidos de ligações covalentes das CWPs (Fig. 1.1) (Smits *et al.*, 2001; Pitarch *et al.*, 2002).



**Figura 1.1: Organização molecular das duas classes de proteínas ligadas covalentemente à parede celular de *C. albicans* e *S. cerevisiae*.** Uma camada interna consistindo de moléculas de  $\beta$ -1,3-glicana forma uma rede tridimensional que envolve a célula. Esta rede é fortalecida com múltiplas pontes de hidrogênio entre as moléculas de  $\beta$ -1,3-glicana. Do lado interno da camada, a cadeia é fortalecida pelo acoplamento de cadeias de quitina a extremidades não redutoras de cadeias de  $\beta$ -1,3-glicana. Enquanto que do lado externo da camada, as proteínas de parede celular são ligadas a extremidades não redutoras de moléculas de  $\beta$ -1,3-glicana através de uma interconexão direta (Pir-CWP) ou indiretamente (GPI-CWP) pelo motivo de  $\beta$ -1,6-glicana e pela âncora de GPI remanescente (GPI-CWPs). Assim, a  $\beta$ -1,6-glicana funciona provavelmente como uma malha flexível para GPI-CWPs. As setas sólidas denotam as orientações dos polissacarídeos da extremidade não redutora para a extremidade redutora da rede de  $\beta$ -1,3-glicana. Os efeitos de tratamentos enzimáticos e químicos para liberação de proteína são indicados pelas setas descontínuas. Adaptação: Smits *et al.* (2001) e de Groot *et al.* (2004).

Posteriormente, foi demonstrado por de Groot *et al.* (2004) e Yin *et al.* (2005) que a parede celular de *C. albicans* e *S. cerevisiae* contém proteínas que não demonstram homologia às PIR, mas são da mesma forma, ligadas covalentemente à  $\beta$ -

1,3-glicana da parede celular através de uma ligação sensível a pH alcalino. Por isso, essa classe de proteínas foi renomeada para ASL-CWPs (proteínas de parede celular sensíveis a álcali) (de Groot *et al.*, 2005). Além disso, proteínas da parede celular podem ser ligadas não apenas aos polissacarídeos da parede celular, como também a outras CWPs através de pontes dissulfeto (Mrsá *et al.*, 1997; Cappellaro *et al.*, 1998; Viudes *et al.*, 2001; Jaafar *et al.*, 2003).

Com relação a proteínas ligadas à membrana plasmática, dois tipos de moléculas são descritas: as proteínas integrais e aquelas ancoradas em lipídeos. As proteínas integrais contêm um ou mais domínios transmembrana que permitem a formação de  $\alpha$ -hélices hidrofóbicas, inserindo, ao final, a proteína em uma bicamada lipídica. Existem quatro tipos de proteínas ancoradas a lipídeos, sendo estas divididas dentro de dois grupos: um grupo geralmente ligado a proteínas do lado interno da membrana plasmática e outro grupo geralmente ligado ao lado externo. No primeiro grupo são encontradas âncoras de miristoil ligadas a amido (Boutin, 1997; Richard & Plaine, 2007), âncoras de grupos acil ligadas a tio-éster, e âncoras de prenil ligadas a tioéter (Dohlman, 2002). O segundo subgrupo é composto somente por proteínas que contêm uma seqüência sinal C-terminal que permite o acoplamento a âncora de GPI. A âncora destas proteínas pode ser removida pela ação de fosfolipases específicas (Griffith & Ryan, 1999), convertendo a proteína em uma forma solúvel em água. As proteínas GPI-ancoradas (GPI-Ps) associam-se à camada de lipídeos, que são regiões especializadas da membrana contendo níveis elevados de colesterol e esfingolipídeos, comum a células humanas, por exemplo (Sharom & Lehto, 2002).

*Justificativa  
&  
Objetivos*



## JUSTIFICATIVA

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose humana sistêmica que afeta principalmente a população rural da América Latina, sendo no Brasil registrados 80% dos casos da doença. A PCM possui importância em saúde coletiva, pois relaciona-se a custos sociais e econômicos, derivados não apenas de seu caráter endêmico e da atividade da doença, mas também por afetar indivíduos em fase produtiva e por deixar frequentemente seqüelas secundárias. Os constituintes da parede celular e a modulação de sua biossíntese entre as duas fases morfológicas do fungo são aspectos importantes relacionados à regulação do dimorfismo. Sabe-se que a diferenciação celular está intimamente relacionada à patogenicidade, pois linhagens de *P. brasiliensis* que não são capazes de transformar na forma leveduriforme são avirulentas. Além disso, a parede celular por ser uma estrutura de contato entre o hospedeiro e o microrganismo, funciona como um reservatório de moléculas antigênicas e de fatores de virulência, favorecendo assim, a instalação do fungo e o ajudando a resistir às agressões vindas do hospedeiro.

Dentre as proteínas de superfície de fungos, as proteínas glicosilfosfatidilinositol (GPI) são conhecidas por serem covalentemente incorporadas à parede celular ou por serem permanentemente fixadas à membrana plasmática. Muitas funções são sugeridas às proteínas com âncoras de GPI, tais como envolvimento na biossíntese e no remodelamento da parede celular, determinação de hidrofobicidade e antigenicidade da superfície, além de poder desempenhar papel na virulência e adesão. As glicosiltransferases são importantes representantes da família de proteínas com âncoras de GPI, sendo responsáveis pelo alongamento da cadeia de  $\beta$ -1,3-glicana, integridade da parede, proliferação, adaptação aos diferentes pHs ambientais. Além das considerações mencionadas, também já foi demonstrado seu papel imunogênico e como fator de virulência em diversos fungos.

Há ainda outra classe importante de proteínas de superfície, que são as proteínas com características de adesinas, sendo capazes de interagir com proteínas da matriz extracelular do hospedeiro, tais como laminina, fibronectina, colágeno e fibrinogênio. As adesinas são essenciais para a interação com o hospedeiro humano por permitir a aderência e invasão do fungo aos tecidos do hospedeiro e a evasão da resposta imune. A

aderência de microrganismos patogênicos a tecidos do hospedeiro é considerada indispensável para o início da colonização e futura disseminação.

Os eventos moleculares e bioquímicos que conduzem as alterações da parede celular entre as duas formas morfológicas em *P. brasiliensis* bem como os mecanismos de adesão e infecção ainda são pouco compreendidos. Desse modo, o estudo de moléculas envolvidas na biossíntese e remodelamento da parede celular ou proteínas que possam promover a interação entre o patógeno e o hospedeiro são alvos importantes para o conhecimento da patogênese de *P. brasiliensis* e para o desenho de novos antifúngicos.

## OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho foi estudar proteínas de *P. brasiliensis* localizadas na membrana plasmática ou parede celular. Para alcançar este objetivo estabelecemos:

- Identificar no transcriptoma de *P. brasiliensis* moléculas com sinais para adição de âncoras de GPI ou envolvidas na biossíntese e liberação da mesma;
- Caracterizar funcionalmente a proteína GPI-ancorada beta-1,3-glicosiltransferase 3 de *P. brasiliensis* pela análise da expressão diferencial durante a transição dimórfica e pela verificação de funcionalidade através de ensaios de complementação com o mutante *gas1Δ* de *Saccharomyces cerevisiae*;
- Estudar a molécula de parede celular de *P. brasiliensis*, Dfg5p, pela análise da expressão diferencial nas duas fases dimórficas e pela capacidade de interação desta proteína recombinante com componentes da matriz extracelular.



Capítulo

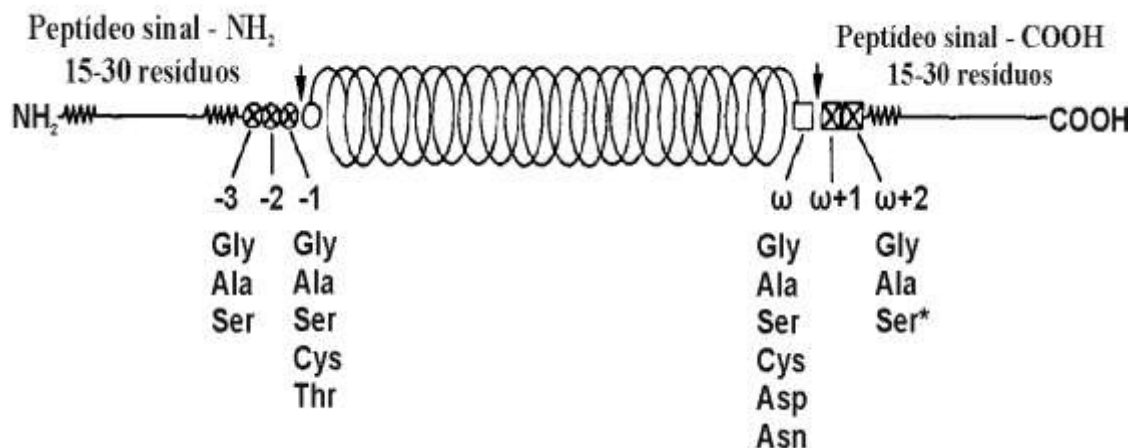
2

*Proteína com  
âncoras de GPI*



## 1. Proteínas com Âncoras de Glicosilfosfatidilinositol

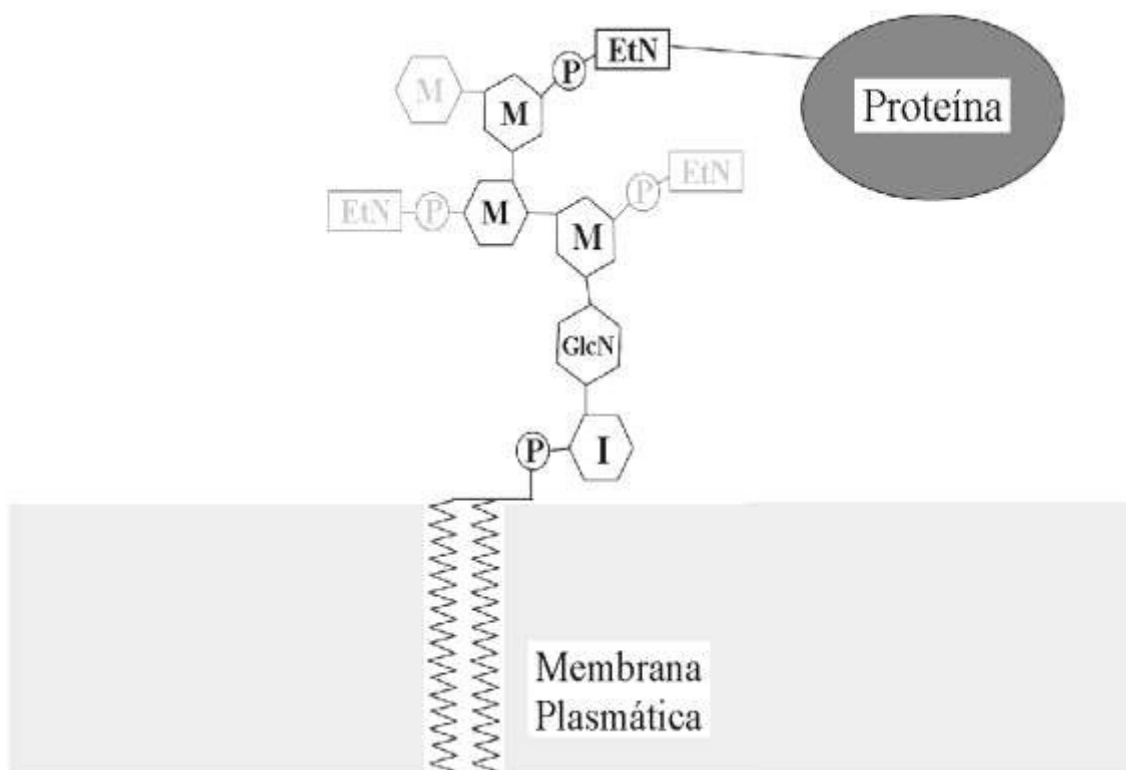
As proteínas de superfície celular constituem uma importante classe de biomoléculas por se localizarem na interface da célula com o meio ambiente. Muitas proteínas de membrana de eucariotos sofrem algum tipo de modificação pós-traducional e muitas delas são modificadas pela ligação de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) em um motivo existente na região C-terminal da proteína (Ferguson *et al.*, 1988). As proteínas acopladas à âncora de GPI (GPI-Ps) possuem características estruturais comuns: um peptídeo sinal N-terminal que direciona a proteína para o Retículo Endoplasmático (ER) e um segundo domínio hidrofóbico na porção C-terminal que é clivado e substituído pela âncora de GPI no resíduo de aminoácido designado sítio omega ( $\omega$ ), dentro do lúmen do ER (Fig. 2.1) (Orlean, 1997; Hamada *et al.*, 1998b). A região do sítio  $\omega$  é composta por aminoácidos pequenos ( $\omega+1$  e  $\omega+2$ ) para ajustarem-se ao sítio catalítico da protease transamidase (Fig. 2.1) (Eisenhaber *et al.*, 2004).



**Figura 2.1: Estrutura primária típica de uma proteína que receberá uma âncora de GPI.** As setas apontam para o sítio de clivagem de dois peptídeos que irão gerar a proteína madura (estrutura em hélice). As linhas retas nos peptídeos sinais representam domínios hidrofóbicos; áreas denteadas próximas aos sítios de clivagem representam domínios hidrofílicos, podendo ser prováveis regiões de enovelamento. Os aminoácidos mostrados nos sítios -1 e -3 são descritos para a maioria das proteínas nascentes (von Heijne, 1983), enquanto que os aminoácidos mostrados nas posições  $\omega$  e  $\omega+2$  são comuns para proteínas GPI ancoradas. Adaptação: Udenfriend & Kodukula (1995).

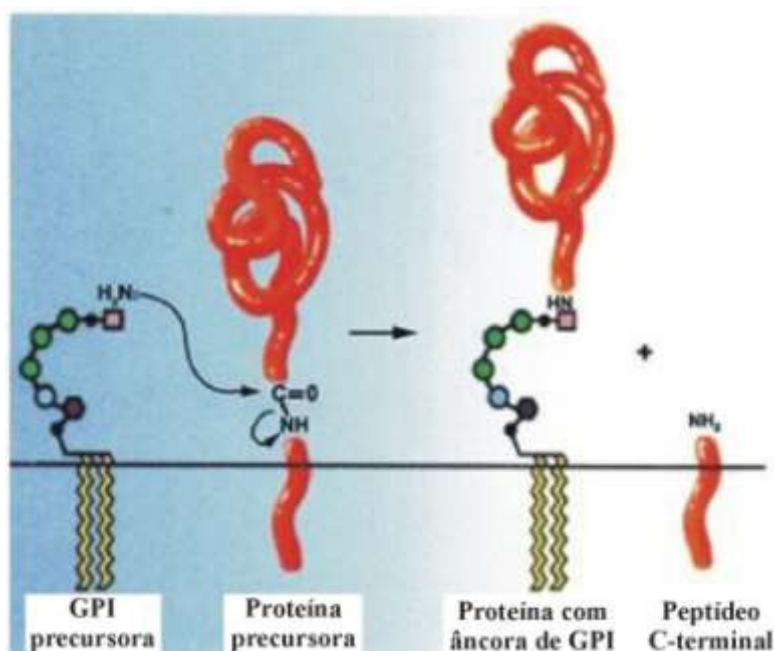
A estrutura central da âncora de GPI consiste de um grupo lipídico (servindo como âncora para ligação à membrana plasmática [PM]), um grupo inositol (I), um grupo glicosamina (GlcN), três grupos de manose (M) e por fim, um grupo

fosfoetanolamina (EtNP), que irá conectar a âncora de GPI a região C-terminal de uma proteína através de uma ligação amida (Fig. 2.2) (Tiede *et al.*, 1999). Esta estrutura de GPI recebe ainda a adição de EtNPs e carboidratos acessórios (Fig. 2.2) que se estendem a partir das manoses e variam com a proteína para a qual está sendo conectada, bem como para o tecido e organismo nos quais estão sendo expressos. Os carboidratos extras identificados nas âncoras de GPI-Ps incluem: manose, glicose, galactose, N-acetilgalactose, ácido N-acetilneuramínico e N-acetilglicosamina (GlcNAc) (Bangs *et al.*, 1985; Ferguson *et al.*, 1986; Tiede *et al.*, 1999; Richard & Plaine, 2007).



**Figura 2.2: Estrutura central de uma âncora de GPI.** A estrutura básica encontrada em algumas células eucarióticas é representada em preto. Os grupos adicionais em cinza ilustram as cadeias laterais acrescentadas na âncora de GPI em *Saccharomyces cerevisiae* (cadeias laterais são específicas para cada organismo). EtN, etanolamina; GlcN, glicosamina; M, manose; I, inositol; P, fósforo. Adaptação: Richard & Plaine (2007).

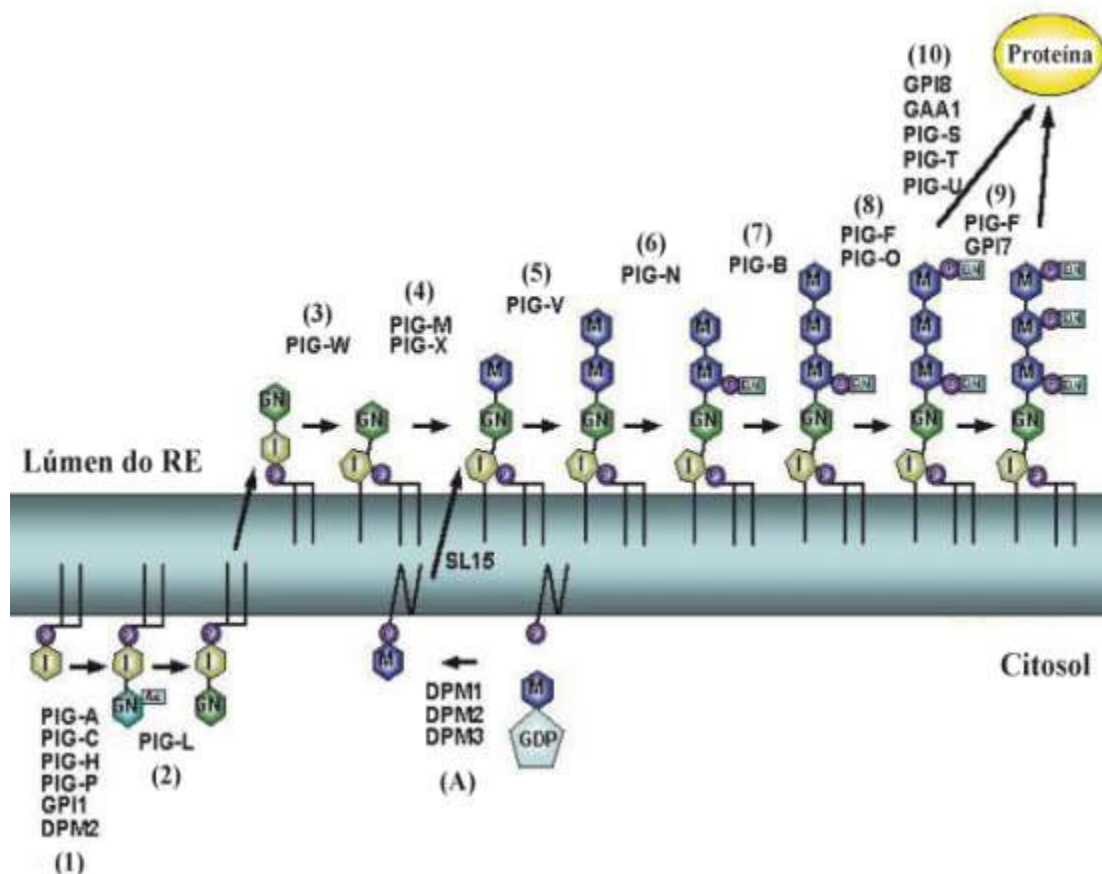
A síntese da âncora de GPI ocorre simultaneamente à tradução e clivagem proteolítica do propeptídeo C-terminal da futura GPI-Ps (Orlean, 1997). A âncora de GPI será covalentemente ligada ao sítio  $\omega$  de uma dada proteína (Fig. 2.3) por um complexo de transamidases (Fraering *et al.*, 2001; Hong *et al.*, 2003).



**Figura 2.3: Modelo para a transferência do precursor da âncora de GPI para o polipeptídeo recém sintetizado.** Ver texto para detalhes. Inositol (pentágono púrpura); Glicosamina (círculo azul); Manose (círculo verde); Fosfato (círculo preto); Etanolamina (quadrado rosa). Adaptação: Doering *et al.* (1990).

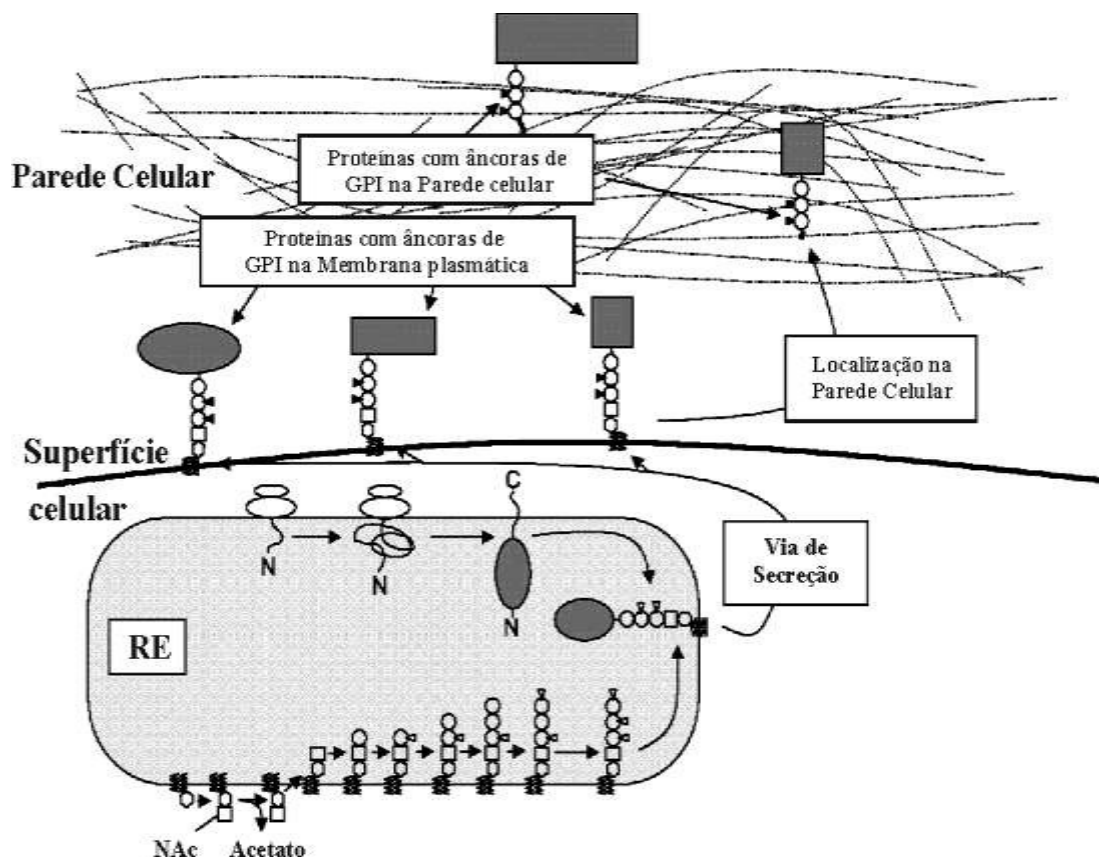
Cerca de 25 genes, dentre fosfatidilinositol-glicanas (PIGs), dolicol-fosfato manoses (DPMs) e transamidases, participam da via de biossíntese de GPI em *S. cerevisiae* e em mamíferos (Fig. 2.4) (Orlean & Menon, 2007; Pittet & Conzelmann, 2007). No primeiro passo, ocorre a transferência de N-acetilglicosamina (GlcNAc) ao fosfatidilinositol (PI) gerando GlcNAc-PI (N-acetilglicosaminil-fosfatidilinositol) (Masterson *et al.*, 1989). Esta reação é catalisada por um complexo enzimático constituído por seis proteínas: PIG-A, PIG-C, PIG-H, GPI1, PIG-P e DPM2 (proteína 2 regulatória da biossíntese de DPM) (Kinoshita & Inoue, 2000; Watanabe *et al.*, 1998, 2000). No passo seguinte, o grupo GlcNAc é de-N-acetilado por PIG-L. Estas duas reações ocorrem no citosol. A GPI intermediária é depois movida para o lúmen do ER, onde o grupo inositol é acetilado por PIG-W, gerando GlcN-acil-PI (Kinoshita & Inoue, 2000). Em seguida, três manoses e três etanolaminas (EtN) são sequencialmente acrescentadas. Três manosiltransferases distintas, PIG-M, PIG-V e PIG-B, são requeridas para a adição destas manoses, sendo que PIG-M necessita essencialmente de PIG-X. O substrato doador de DPM é sintetizado pelo complexo enzimático de DPM1, DPM2 e DPM3, e sua translocação para o lúmen do ER é mediada por SL15. A transferência de EtNP, à primeira, terceira e segunda manose, é catalisada por PIG-N, PIG-O e PIG-F, respectivamente. PIG-F, um componente essencial, liga a PIG-O e a

GPI7 de modo independente (Kinoshita & Inoue, 2000; Ikezawa, 2002; Pittet & Conzelmann, 2007). Por fim, o grupo EtNP da última manose é ligado à região carboxi terminal de proteínas contendo um sinal para GPI (sítio  $\omega$ ). Esta reação é catalisada por um complexo enzimático chamado GPI-transamidase, que é formado por quatro componentes essenciais, GAA1 (junção a âncora de GPI 1), PIG-S, PIG-T e PIG-U mais a subunidade catalítica de GPI8 (Ohishi *et al.*, 2000, 2001; Ikezawa, 2002; Pittet & Conzelmann, 2007). É importante notar que as âncoras de GPI são essenciais para a viabilidade em *S. cerevisiae* uma vez que a deleção de alguma proteína chave para biossíntese mostrou-se letal (Tiede *et al.*, 1999; Eisenhaber *et al.*, 2003; Mayor & Riezman, 2004).



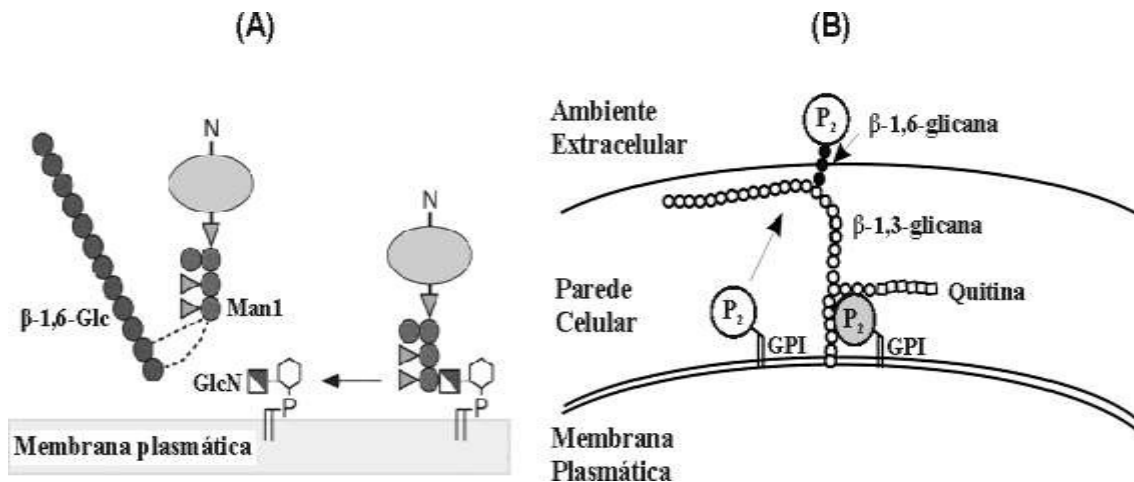
**Figura 2.4: Principal via de biossíntese da âncora de GPI.** Os passos sequenciais da via de biossíntese: (1) Adição de N-acetilglicosamina a fosfatidilinositol; (2) Retirada do grupo N-acetil do grupo N-acetilglicosamina; (3) Acilação do Inositol no ER; (4) Adição da primeira Manose (Man1) a glicosamina; (5) Adição da segunda Manose (Man2); (6) Adição de Etanolamina-fosfato a Man1; (7) Adição da terceira Manose (Man3); (8) Adição de Etanolamina-fosfato a Man3; (9) Adição de Etanolamina-fosfato a Man2; (10) Ligação da âncora de GPI à proteína. (A) Síntese do substrato Dolicol-fosfato-manose. Símbolos: Ac, N-acetil; EtN, etanolamina; GN, glicosamina; I, inositol; M, manose; P, fosfato; ER, retículo endoplasmático. Adaptação: [http://www.biken.osaka-u.ac.jp/biken/men-eki-huzen/index\\_e.html](http://www.biken.osaka-u.ac.jp/biken/men-eki-huzen/index_e.html).

Estas proteínas que receberam uma âncora de GPI no ER são então transportadas para o complexo de Golgi (Muñiz *et al.*, 2001). Sugere-se, então, que estas proteínas possam ter dois destinos: ou se ligam permanentemente à membrana plasmática (GPI-PM) ou se dirigem à parede celular (GPI-CWPs) (Fig. 2.5) (Lu *et al.*, 1994). Sabe-se que as GPI-CWPs encontram-se localizadas temporariamente na PM, pois a âncora de GPI será seccionada e depois transportada para a parede celular, onde é ligada covalentemente à  $\beta$ -1,6-glicana por uma proteína ou complexo protéico não identificado (Fig. 2.6) (Caro *et al.*, 1997). Em *S. cerevisiae*, este evento de clivagem ocorre entre o grupo glicosamina e o primeiro grupo manose da âncora (Fig. 2.6A); (Kollár *et al.*, 1997; Fujii *et al.*, 1999; Richard & Plaine, 2007). Em *Candida albicans* e *S. cerevisiae* a maior parte das GPI-CWPs está covalentemente ligada à  $\beta$ -1,6-glicana. A  $\beta$ -1,6-glicana por sua vez pode ser ligada à  $\beta$ -1,3-glicana ou quitina resultando em uma forte ligação covalente de GPI-CWPs à parede celular (Fig. 2.6B) (Kapteyn *et al.*, 1996, 1997; Kollár *et al.*, 1997; de Groot *et al.*, 2004).



**Figura 2.5: Diferentes passos da biossíntese e transporte de proteínas GPI ancoradas em fungos.** O primeiro passo da biossíntese da âncora de GPI ocorre no ER ou em sua superfície: (i) a síntese da estrutura central da âncora de GPI e (ii) a tradução através da membrana do ER da futura GPI-Ps. A subsequente ligação da âncora de GPI à proteína acontece no lúmen do ER. Depois as GPI-Ps seguem

uma via secretória para serem apresentadas na superfície celular. A particularidade de alguns fungos consiste de passos adicionais, em que a âncora de GPI é clivada depois da glicosamina e a proteína com a parte remanescente da âncora é direcionada para a parede celular e covalentemente ligada à  $\beta$ -1,6-glicana. Adaptação: Richard & Plaine (2007).

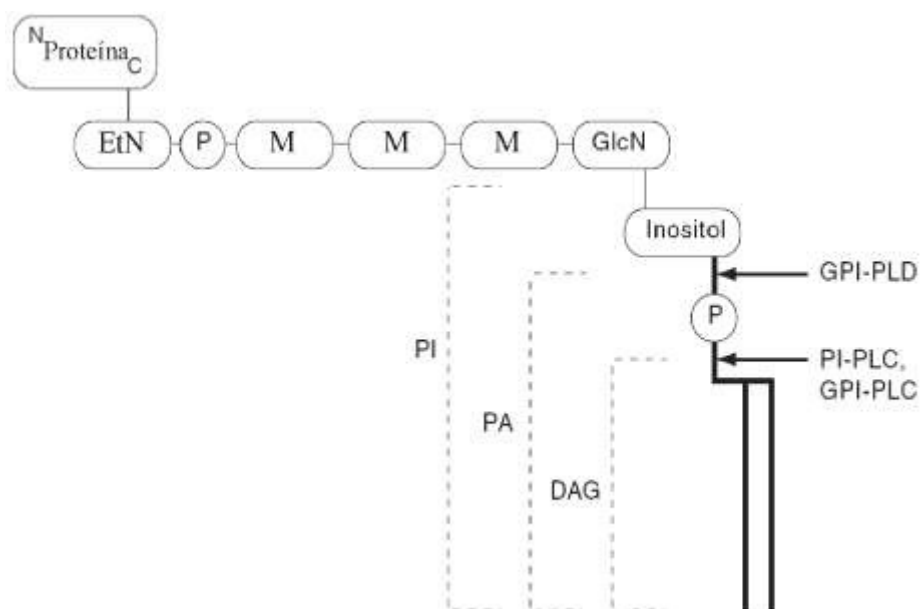


**Figura 2.6: Ligação covalente de GPI-CWP à  $\beta$ -1,6-glicana da parede celular.** (A) A âncora de GPI é provavelmente clivada entre a primeira manose (Man1) e a glicosamina (GlcN) e transferida para uma GlcN terminal ou interna da  $\beta$ -1,6-glicana ( $\beta$ -1,6-Glc) da parede celular. (B) A proteína  $P_1$  permanece ligada à membrana plasmática e participa do remodelamento da parede celular, enquanto que a proteína  $P_2$  é desligada da PM e passa a se ligar covalentemente à  $\beta$ -1,3-glicana por meio de  $\beta$ -1,6-glicanas. Uma vez na parede celular, a proteína pode desempenhar funções biológicas como interações célula-célula. Adaptação: Orlean & Menon (2007) e Latgé (2007).

Evidências indicam que a localização celular dessas proteínas parece ser, pelo menos parcialmente, determinada por resíduos básicos ou hidrofóbicos na região do sítio ômega (Caro *et al.*, 1997; Vossen *et al.*, 1997; Hamada *et al.*, 1998b, 1999). Assim, foram propostos, com base em análises *in silico* de proteínas GPI ancoradas, dois tipos de seqüência sinal para a localização celular de GPI-Ps: (i) os resíduos de aminoácidos específicos V, I ou L no sítio  $\omega$ -4 ou  $\omega$ -5, acima do sítio  $\omega$  e Y ou N no sítio  $\omega$ -2 para localização na parede celular e (ii) resíduos dibásicos, como por exemplo R e K, em uma pequena região acima do sítio  $\omega$  ( $\omega$ -menos) para localização na PM (Caro *et al.*, 1997; Vossen *et al.*, 1997; Hamada *et al.*, 1998b, 1999). Em adição a essas características, as proteínas GPI ancoradas podem apresentar uma seqüência rica em resíduos de serina e treonina, fornecendo assim sítios para glicosilação (Hamada *et al.*, 1998b, 1999).

A âncora de GPI é um substrato potencial para a hidrólise enzimática por fosfolipases (PL). A hidrólise do grupo PI é bem descrita e muito utilizado como ferramenta laboratorial para a liberação da âncora de GPI, devido principalmente à presença de dois sítios de clivagem existentes em ambos os lados do fosfato que liga o inositol ao glicerol (Fig. 2.7). A ligação entre o fosfato e o glicerol é clivada por fosfolipase C fosfatidilinositol (PI-PLC) ou GPI fosfolipase D (GPI-PLC), enquanto que a ligação entre o inositol e o fosfato é clivada por uma GPI fosfolipase D (GPI-PLD). Estas enzimas (PI-PLC e GPI-PLC) que geram um diacilglicerol (DAG) na membrana acabam produzindo também uma proteína contendo um epítipo de glicana imunoreativo, chamado determinante de reação cruzada (CRD) que pode ser detectado por *Western blot* com anticorpos produzidos contra GPI de tripanossomatídeos (Nosjean *et al.*, 1997).

As fosfolipases de origem bacteriana e de tripanossomatídeos são bem conhecidas e bastante úteis para se determinar a presença e a estrutura de âncoras de GPI e para se pesquisar intermediários no processo de biossíntese de GPI. A enzima PI-PLC de *Bacillus thuringiensis* (Taguchi *et al.*, 1980) é a fosfolipase mais usada para estes estudos. Entretanto, GPI-PLD mostra-se mais efetiva para a hidrólise de âncoras de GPI quando há um inositol acetilado que é resistente a PI-PLC e GPI-PLC (Ikezawa, 2002).



**Figura 2.7:** Esquema dos sítios de clivagem por fosfolipases na âncora de GPI. Os sítios de clivagem das enzimas PI-PLC, GPI-PLC e GPI-PLD são indicados. Os produtos lipídicos resultantes destas clivagens são: PA (ácido fosfatídico) e DAG (diacilglicerol). Outras abreviações: PI, fosfatidilinositol; M, Manose; GlcN (glicosamina); EtN, etanolamina; P, fosfato. Adaptação: Doering *et al.* (2003).



Estudos têm estabelecido uma série de funções às proteínas GPI-ancoradas. Elas podem ser enzimas, antígenos de superfície, moléculas de adesão ou receptores de superfície (Chatterjee & Mayor, 2001; Hoyer, 2001; Sundstrom, 2002). Elas são reportadas também em vários patógenos, como imunogênicas e sugere-se que sejam importantes fatores de virulência (Hung *et al.*, 2002; McGwire *et al.*, 2002). Além disso, sabe-se que algumas GPI-Ps com propriedades enzimáticas podem atuar na biossíntese e remodelamento da parede celular (Fig. 2.6B) (Hartland *et al.*, 1996; Mouyna *et al.*, 2000).



## Screening for glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome

Nadya da Silva Castro, Zilma Alves Maia, Maristela Pereira and Célia Maria de Almeida Soares

Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, 74001-970 Goiânia, GO, Brasil

Corresponding author: C.M.A. Soares

E-mail: celia@icb.ufg.br

Genet. Mol. Res. 4 (2): 326-345 (2005)

Received January 18, 2005

Accepted May 5, 2005

Published June 30, 2005

**ABSTRACT.** Open reading frames in the transcriptome of *Paracoccidioides brasiliensis* were screened for potential glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins, which are a functionally and structurally diverse family of post-translationally modified molecules found in a variety of eukaryotic cells. Numerous studies have demonstrated that various GPI anchor sequences can affect the localization of these proteins in the plasma membrane or the cell wall. The GPI anchor core is produced in the endoplasmic reticulum by sequential addition of monosaccharides and phospho-ethanolamine to phosphatidylinositol. The complete GPI anchor is post-translationally attached to the protein carboxyl-terminus by GPI transamidases. Removal of this GPI lipid moiety by phospholipases generates a soluble form of the protein. The identification of putative GPI-attached proteins in the *P. brasiliensis* transcriptome was based on the following criteria: the presence of an N-terminal signal peptide for secretion and a hydrophobic region in the C-terminus presenting the GPI-attachment site. The proteins that were identified were in several functional categories: i) eight proteins were predicted to be enzymes (Gel1, Gel2, Gel3,  $\alpha$ -amylase, aspartic proteinase, Cu-Zn

SOD, DFG5, PLB); ii) Ag2/PRA, ELI-Ag1 and Gel1 are probably surface antigens; iii) Crh-like and the GPI-anchored cell wall protein have a putative structural role; iv) ECM33 and Gels (1, 2 and 3) are possibly involved in cell wall biosynthesis, and v) extracellular matrix protein is considered to be an adhesion protein. In addition, eight deduced proteins were predicted to localize in the plasma membrane and six in the cell wall. We also identified proteins involved in the synthesis, attachment and cleaving of the GPI anchor in the *P. brasiliensis* transcriptome.

**Key words:** *Paracoccidioides brasiliensis*, GPI-anchored proteins, Plasma membrane, Cell wall

## INTRODUCTION

Cell surface membrane proteins constitute an important class of biomolecules in living cells, as they are at the interface with the surrounding environment. Most eukaryote membrane proteins are post-translationally modified, and a subset of them is modified by the attachment of a glycosylphosphatidylinositol (GPI) moiety at the C-terminal end of the protein (Ferguson et al., 1988). Although fungal and mammalian cells contain the same mechanism by which they attach carbohydrates to nascent proteins, mammalian GPI anchors tether proteins to cell membranes, whereas in fungal cells GPI anchors are also used to covalently link proteins to cell wall glucans (Varki et al., 1999).

GPI-modified proteins are widely found in lower and higher eukaryotes (Eisenhaber et al., 2001). The primary sequence of GPI proteins share a general pattern, with N-terminal signal peptides and C-terminal features that mediate GPI anchor addition at an amino acid residue designated the omega ( $\omega$ )-site (Hamada et al., 1998b). GPI anchor addition occurs in the endoplasmic reticulum (ER), following proteolytic cleavage of the C-terminal propeptide (Orlean, 1997). In addition to these signal sequences, the GPI proteins present a serine-threonine-rich sequence that provides sites for glycosylation. Moreover, the cellular localization of GPI-anchored proteins seems to be at least partly determined by basic or hydrophobic residues in the  $\omega$ -region (Caro et al., 1997; Vossen et al., 1997; Hamada et al., 1998b, 1999).

The core structure of the GPI anchor consists of a single phospholipid spanning the membrane and a head group consisting of a phosphodiester-linked inositol, to which a glucosamine is linked, a linear chain of three mannose sugars linked to glucosamine and an ethanolamine phosphate (EtNP) linked to the terminal mannose. Composition differences in the lipid portion and side chain substitutions in the tetrasaccharide backbone of the conserved head-group promote variants in the structure of the GPI anchor. One of the most prominent aspects of GPI anchor diversity is glycan substitution of the conserved mannose residues (McConville and Ferguson, 1993).

The biosynthesis of the GPI moiety occurs in the ER, and the complete GPI anchor is fully assembled prior to attachment to the protein. A series of sequential enzymatic steps adds the various GPI components. GPI proteins enter the ER where the GPI anchor is covalently added to the  $\omega$ -site by a transamidase complex of at least five proteins (Fraering et al., 2001;

Hong et al., 2003). The GPI-anchored proteins are transported from the ER to the Golgi apparatus in distinct vesicles from the non-GPI-anchored proteins (Muniz et al., 2001). A Rab GTPase is specifically required for GPI protein trafficking. Also, the tethering factors Vso1 and Sec34/35p are necessary for the sorting of GPI-anchored proteins upon ER exit (Morsomme and Riezman, 2002).

Most available evidence suggests that there are two terminal fates for GPI proteins. They can reside at the plasma membrane (GPI-anchored plasma membrane proteins) or reside at the cell wall (Lu et al., 1994). Caro et al. (1997) proposed, based on *in silico* analysis of GPI-anchored proteins of *Saccharomyces cerevisiae*, that a signal of two basic amino acids in the four residues upstream to the  $\omega$ -site acts to retain the protein at the plasma membrane. Hamada et al. (1998b, 1999) suggested that in the absence of this retention signal, hydrophobic amino acids at positions 2, 4, and 5, upstream to the  $\omega$ -site act positively to localize the protein to the cell wall.

The intact GPI anchor confers an amphiphilic character to the protein, which by the action of phospholipases (PLs) cleaving the ester bond of the phosphatidylinositol (PI), render the protein hydrophilic. In this way, a proposed role for the GPI anchor and their solubilizing PLs is that it may be an alternative to proteolysis for the regulated release of proteins from membranes (Ehlers and Riordan, 1991). The location of GPI proteins makes them ideal candidates for such function.

Several studies have now established that GPI-anchored proteins are a large class of functionally diverse proteins. They can be enzymes, surface antigens, adhesion molecules, or surface receptors (Chatterjee and Mayor, 2001; Hoyer, 2001; Sundstrom, 2002). GPI-anchored proteins reported in various microbial pathogens have been shown to be immunogenic and are suggested to be important virulence factors (Hung et al., 2002; McGwire et al., 2002). In addition, GPI-bound proteins can display enzymatic properties, playing an active role in cell wall biosynthesis (Hartland et al., 1996; Mouyna et al., 2000). In fungi, synthesis of GPI anchors is essential for viability, since their cell wall mannoproteins require a GPI anchor so that they can be covalently incorporated into the cell wall (Leidich et al., 1994).

Yeast has been extensively used to study the GPI-anchoring system, and it is now well understood (Ash et al., 1995; van der Vaart et al., 1995). However, in contrast to the case for *S. cerevisiae*, little is known about the structure and biosynthesis of the GPI anchor in filamentous fungi. *Aspergillus fumigatus* presents about nine GPI-anchored protein homologs to the yeast counterparts (Bruneau et al., 2001). Fontaine et al. (2003) characterized four GPI-anchored proteins from a membrane preparation of *A. fumigatus*. In contrast to yeast, only ceramide was found in the GPI anchor structure of *A. fumigatus*. The glycan moiety is mainly a linear pentomannose structure, linked to a glucosamine residue.

The thermal dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* causes paracoccidioidomycosis, the leading endemic deep mycosis in Latin America. The disease may develop as different forms, ranging from benign and localized to severe and disseminated forms (Franco et al., 1993). Fungal conidia start the infection, which undergo conversion to the yeast parasitic phase in human lungs (McEwen et al., 1987). The morphological switch from mycelia to yeasts is the most important biological feature that enables *P. brasiliensis* to colonize, invade and survive in host tissues during infection (San-Blas et al., 2002). Previous reports described that *P. brasiliensis* makes use of GPI as a means of membrane anchorage of surface proteins (Heise et al., 1995). The addition of complete GPI anchors is required for morphogenesis, virulence and

for host-fungus interactions (Richard et al., 2002; Sundstrom, 2002; Delgado et al., 2003). These reasons can be invoked to account for the importance of GPI-anchored proteins in *P. brasiliensis*.

An efficient method for retrieving novel GPI proteins is a genome sequence-based approach. Computational methods provide a useful starting point for genome-wide screening of potential GPIs in a variety of organisms. *Saccharomyces cerevisiae* DNA sequencing and Von Heijne algorithm studies identified 58 potential GPI-anchored proteins (Caro et al., 1997). Recently, *P. brasiliensis* transcriptome information (<https://www.biomol.unb.br/Pb>) have been obtained and released in public databases. The availability of this transcriptome gives us a new strategy for identifying genes that are likely GPI proteins. We report 20 putative GPI-anchored predicted proteins in the *P. brasiliensis* transcriptome.

## MATERIAL AND METHODS

Sequence and motif similarity is the most commonly used method for assigning a putative function to newly discovered genes. The identification of putative GPI-anchored proteins was based on the following criteria: i) the presence of an N-terminal signal peptide for secretion; ii) a hydrophobic tail, and iii) the GPI-attachment site.

Two GPI-anchored prediction tools, big-PI fungal predictor ([http://mendel.imp.univie.ac.at/gpi/fungi/gpi\\_fungi.html](http://mendel.imp.univie.ac.at/gpi/fungi/gpi_fungi.html)) (Eisenhaber et al., 2004) and DGPI ([http://129.194.185.165/dgpi/index\\_en.html](http://129.194.185.165/dgpi/index_en.html)) were used to screen the *P. brasiliensis* GPI-anchored proteins. The presence of a signal sequence for import into ER was confirmed by using SignalP version 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Nielsen et al., 1997; Bendtsen et al., 2004). The presence of hydrophobic regions was analyzed with DAS (<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>) (Cserzo et al., 1997) and PSORT II (<http://www.psort.org/>) (Horton and Nakai, 1997). PSORT II was also used for protein localization predictions. BLAST searches were performed at NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (Altschul et al., 1997) and Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/software/pfam/index.shtml>) (Bateman et al., 2002). A phylogenetic tree was constructed by multiple sequence alignments by using the Clustal X program, version 1.8 and the neighbor joining method (Thompson et al., 1997). Robustness of branches was estimated using 100-bootstrapped replicates. The amino acid sequences were visualized using the TreeView software.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Putative GPI-anchored proteins of *P. brasiliensis*

Several studies have now established that GPI-anchored proteins are a large class of functionally diverse proteins. The predicted GPI-anchored proteins of *P. brasiliensis* could be enzymes, surface antigens, or adhesion molecules, and they have a structural role in the cell wall biogenesis (Table 1). For instance,  $\alpha$ -amylase, proline-rich antigen/antigen 2 (PRA/Ag2), Cu-Zn superoxide dismutase (Cu-Zn SOD), GPI-anchored cell wall, ECM33, Crh-like, DFG5-like, PLB, extracellular matrix protein (EMP), aspartic proteinase precursor, expression library immunization antigen 1 (ELI Ag 1) and  $\beta$ -1,3-glucanosyltransferase (Gels 1, 2 and 3) proteins were found. Their predicted functions were obtained by comparison to the homologs for which a role has been defined.

**Table 1.** Functional diversity of GPI-anchored proteins of *Paracoccidioides brasiliensis*.

Putative function	Product	References
Enzymes	$\beta$ -1,3-glucanoyltransferases (Gel1, 2, 3)	Mouyna et al., 2000
	$\alpha$ -amylase	Nagamine et al., 2003
	Aspartic proteinase	Komano et al., 1999
	Cu-Zn superoxide dismutase	Martchenko et al., 2004
	DFG5-like	Kitagaki et al., 2002
	Phospholipase B ECM33	Mukherjee et al., 2001; Noverr et al., 2003 Lussier et al., 1997; Ross-MacDonald et al., 1999
Structural role	Crh-like	Rodrigues-Pena et al., 2000
	GPI-anchored cell wall protein	Moukadiri et al., 1997
Surface antigens	Expression library immunization antigen 1	Ivey et al., 2003
	Proline-rich antigen	Zhu et al., 1996, 1997; Peng et al., 2002
	$\beta$ -1,3-glucanoyltransferase 1	Delgado et al., 2003
Adhesion molecules	Extracellular matrix protein	Ahn et al., 2004
Unknown function	Hypothetical protein PbAEST 2445	
	Hypothetical protein PbAEST 61	
	Hypothetical protein PbAEST 2429	
	Hypothetical protein PbAEST 4050	
	Hypothetical protein PbAEST 3834 Hypothetical protein PbAEST 3516	

In our 20 predicted GPI-anchored proteins nine in our list are supposed to have enzymatic activity. The  $\alpha$ -amylase enzyme is located on the cell wall of fungi, and it plays a crucial role in the fermentation process in yeast (Yabuki and Fukui, 1970; Nagamine et al., 2003). Aspartic proteinase could act in the processing of cell wall precursors or precursors of enzymes involved in cell wall synthesis or remodeling (Komano et al., 1999). Eukaryotic Cu- and Zn-containing superoxide dismutase 1 (SOD1) is a key superoxide scavenging enzyme that is largely localized in the cytosol but is also found in the intermembrane space of mitochondria and in other organelles (Weisiger and Fridovich, 1973; Chang et al., 1988; Keller et al., 1991; Okado-Matsumoto and Fridovich, 2001; Sturtz et al., 2001).

Some of the newly identified proteins, ECM33 and DFG5-like, have been reported to be involved in cell wall biogenesis (Lussier et al., 1997; Ross-MacDonald et al., 1999; Kitagaki et al., 2002) and cell growth at high temperature (Terashima et al., 2003). In addition, the Gel family is also required for proper cell wall assembly and morphogenesis due to their activity elongating  $\beta$ -1,3-glucans of human fungal pathogens (Mouyna et al., 2000). Two proteins have been reported to have a structural role: Crh-like, which has a putative glycosidase domain and could be involved in the development of cell wall architecture (Rodriguez-Pena et al., 2000), and GPI-anchored cell wall protein, which has a structural role in association with the glucan network, since both have the same localization (Moukadiri et al., 1997).

All known GPI-anchored proteins share a number of common features, including the predominantly hydrophobic region in the C-terminus, which most likely functions as a recogni-



tion signal for a transamidase system, the absence of transmembrane domains in the mature molecule and the presence of a cleavable N-terminal secretion signal for translocation into the ER. Based on the algorithms described above, we detected 20 predicted GPI-anchored proteins in the *P. brasiliensis* transcriptome (Table 2). In mammalian cells, over 100 cell surface proteins are putative GPI-anchored proteins (Low, 1989; Kinoshita et al., 1995). Fifty-eight potential GPI-anchored proteins were identified in the *S. cerevisiae* genome (Caro et al., 1997).

Among the identified GPI proteins, 16 presented the N-terminal signal peptides (Table 2). Among the 20 *P. brasiliensis* GPI-anchored proteins we were able to detect C-terminal regions in 11 predicted proteins (Table 2). Several residues of S and T, potential sites for O-glycosylation, were detected, even in the partial sequences (Table 2). GPI proteins usually have a high percentage of S and T residues, the side-chains of which are potential sites for O-glycosylation (Klis et al., 2002). The S/T content in the putative *P. brasiliensis* GPI proteins varies from 9 to 28%, with an average of 20%, which is similar to predicted GPI-anchored proteins of *Neurospora crassa* (21%) and slightly lower than in *S. cerevisiae* (25%), *Candida albicans* (28%) and *Schizosaccharomyces pombe* (29%) (de Groot et al., 2003).

#### **Putative cellular localization of the predicted GPI-anchored proteins of *P. brasiliensis***

Although most GPI-anchored proteins in yeast and other fungi localize to the cell wall, some are believed to reside at the plasma membrane. Evidence indicates that the amino acids immediately upstream to the  $\omega$ -site serve as the signal determining protein localization. Two kinds of signals have been proposed for GPI-anchored protein cellular localization: i) dibasic residues (K and/or R) in a short  $\omega$ -minus region are favored in proteins that are predominantly localized in the plasma membrane (Caro et al., 1997; Vossen et al., 1997) and ii) the specific amino acid residues V, I or L 4 or 5 amino acids upstream of the GPI-attachment site (the  $\omega$ -site) and Y or N at the  $\omega$ -2 site have been shown to act as a positive signal for cell wall localization (Hamada et al., 1998b, 1999).

In order to predict the cellular localization of putative GPI-anchored proteins of the *P. brasiliensis* transcriptome, we analyzed the corresponding amino acids in the  $\omega$ -minus region and also examined the results of *k*-NN prediction (PSORT II server) (data not shown). We also compared those analyses to data from other organisms. Accordingly, among the 20 GPI-anchored proteins, 11 sequences which presented at least the 42 last amino acids in the C-terminal region were selected to study their putative localization (Table 2). The three proteins of the Gel family, the ECM33 protein and the hypothetical protein PbAEST 2429 presented basic motifs upstream to the predicted  $\omega$ -site, as detected by the big-PI fungal predictor (Eisenhaber et al., 2004). These results were compatible with the *k*-NN prediction (Horton and Nakai, 1997) and with the literature description of plasma membrane localization (Vai et al., 1991; Hamada et al., 1998a; Terashima et al., 2003). However, no basic amino acid was found in the  $\omega$ -minus region for the Cu-Zn SOD and DFG5-like proteins. In both, plasma membrane localization prevails, as described by Karpinska et al. (2001), Kitagaki et al. (2002) and Spreghini et al. (2003).

The PRA/Ag2 and GPI-anchored cell wall proteins were predicted as putatively anchored in the cell wall on the basis of descriptions from *Coccidioides immitis* (Zhu et al., 1996) and *S. cerevisiae* (Moukadiri et al., 1997; Hamada et al., 1998a), respectively. Two hypothetical proteins, PbEST 2445 and PbEST 61, were predicted as cell wall proteins, only by the PSORT II analysis.

**Table 2.** Putative GPI-anchored proteins of the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome.

Product/PbAEST/ GenBank accession number	% Amino acid identity by BLASTp analysis <sup>1</sup>	N- and C-terminus sequences <sup>2,3</sup>	Predicted cellular localization <sup>4</sup>	S/T content (%) <sup>3,5</sup>
Glucanoyltransferase Gel3p/PbAEST 1370/ AY324033	<i>Aspergillus nidulans</i> 311/543 (57%)	N- MKFASVLGAAALAGTAF A ADLDPVIVKGSK C- GPAGTSKGAASVGVAVPAVDFGMVRVGVAGVAGVAGMSILL	<b>PM</b> (Vai et al., 1991; Hamada et al., 1998a)	12
$\beta$ -1,3- glucanoyltransferase Gel2p/PbAEST 2375/ AY340235	<i>Aspergillus fumigatus</i> 156/272 (57%)	N- MTLRSFTVLFALVASTVHA VTPISIEGSQ C- GEKTSAGPAGAVKEKKKGAASTLSTSNALSLLAAVVGLTLLMV	<b>PM</b> (Vai et al., 1991; Hamada et al., 1998a)	13 (IC) 13 (IC)
$\beta$ -1,3- glucanoyltransferase I, Gel1/AY380566*	<i>Aspergillus fumigatus</i> 42/76 (55%)	N- MKAIAAASALSAAVLA SSALTGEASIIKSR C- KAGQLFALRTQSAAGLEPPKILSAFLYVPLLLERLRLSLAFH	<b>PM</b> (Vai et al., 1991; Hamada et al., 1998a)	14 (IC) 12 (IC)
ECM33/PbAEST 4500	<i>Aspergillus nidulans</i> 61/127 (48%)	N- IC C- TGTGTNSGPGKPKPSAAAMGPLSPPSGTMMLALAGGVLGFAL	<b>PM</b> (Hamada et al., 1998a; Terashima et al., 2003)	14 (IC)
Hypothetical protein/ PbAEST 2429	<i>Aspergillus nidulans</i> 84/202 (41%)	N- MFVFSVLLTVSVLSSLSS QGLDPNNIPLQ C- NPGMAPKGGRRNGAERGLVLEIGQVYGVGILVAVFKAGFSMVV	<b>PM</b>	19
Cu-Zn superoxide dismutase/ PbAEST 50	<i>Magnaporthe grisea</i> 71/159 (44%)	N- MKPTFSILACSLGFALRATA QVMMEAVTTE C- ASINGTAVPTFASQRPSPQANRVGAFGLGVMLAGVAAMIW	<b>PM</b> (Karpinska et al., 2001)	15
DFG5-like/AY307855*	<i>Magnaporthe grisea</i> 171/403 (42%)	N- MKSQLWAVLATVVSILGPWATVA LDGSDLDS C- VTQLPTGKSGQDEQAEILEEHRHLELHQLHLPAWPRRLWI	<b>PM</b> (Kitagaki et al., 2002; Spreghini et al., 2003)	13
Aspartic proteinase precursor/PbAEST 5557	<i>Magnaporthe grisea</i> 84/147 (57%)	IC	<b>PM</b> (Ash et al., 1995; Hamada et al., 1998a)	22 (IC)
Phospholipase B/ PbAEST 3306	<i>Aspergillus nidulans</i> 121/199 (60%)	IC	<b>PM</b> (Hamada et al., 1998a)	15 (IC)
Proline-rich antigen /antigen 2 (Ag2)/ PbAEST 5497	<i>Coccidioides immitis</i> 112/194 (57%)	N- MQFSHALIALVAASLANA QLPNPPCALSC C- SKPVPTSTPTTSRPAEFPAGSNLNLNANIGVAAALLAVAAYL	<b>CW</b> (Zhu et al., 1996; Peng et al., 2002)	22

N.S. Castro et al.



Table 2. Continued.

Product/PbAEST/ GenBank accession number	% Amino acid identity by BLASTp analysis <sup>1</sup>	N- and C-terminus sequences <sup>2,3</sup>	Predicted cellular localization <sup>4</sup>	S/T content (%) <sup>3,5</sup>
GPI-anchored cell wall protein/ PbAEST 440/ AY495673	<i>Aspergillus nidulans</i> 31/87 (35%)	N- MLAAKSIFFVALLALFNIVFA IPPGCLISA C- GSSSTSGSGASPTGSAGYVHKYDMSMAVTAIVAFVGFVSAL	CW (Moukadiri et al., 1997; Hamada et al., 1998a)	22
Hypothetical protein/ PbAEST 2445	<i>Aspergillus nidulans</i> 38/97 (39%)	N- MRLSMVLPSELLGLVAAQGLNG LPECAKSC C- CNTTQSSSTPTTSPVPSQNAAKIGVGAGLVLYMVAWGMF	CW	21
Hypothetical protein/ PbAEST 61	<i>Aspergillus nidulans</i> 40/86 (46%)	N- MKFFTLMALAGLFASAAA LPQENPATTTTT C- PPNGTSTGNFQTTPSGGAGVINVQLGSAAGIVGLLMAAVVL	CW	27
$\alpha$ -amylase/ PbAEST 5676	<i>Aspergillus nidulans</i> 120/189 (63%)	N- MLRLFILCYLAGLALA ADTVDWKRSIYQV C- IC	CW (Nagamine et al., 2003)	9 (IC)
Crh-like protein/ PbAEST 5441	<i>Magnaporthe grisea</i> 73/204 (35%)	N- MKVSSGSMASLALVLFSGSALYGA QTFTEC C- IC	CW (Hamada et al., 1998a)	16 (IC)
Expression library immunization antigen 1 /PbAEST 2838	<i>Coccidioides immitis</i> 91/158 (57%)	N- MRFQTTLLPLTGLTLTSA HFDLLQPPSRG C- IC		21 (IC)
Extracellular matrix protein/PbAEST 1208	<i>Aspergillus nidulans</i> 45/116 (38%)	N- MHLVKALVASALLVATAVA QGISFTSFPDN C- IC		28 (IC)
Hypothetical protein/ PbAEST 4050	<i>Magnaporthe grisea</i> 63/154 (40%)	N- MKSIFSTIALIATAIA ETIDVKVGENGLTI C- IC		18 (IC)
Hypothetical protein/ PbAEST 3834	<i>Aspergillus nidulans</i> 69/133 (51%)	N- MRLRHVALFSLSSSLCLARG HQDPGSPS C- IC		28 (IC)
Hypothetical protein/ PbAEST 3516	<i>Aspergillus nidulans</i> 66/137 (48%)	IC		27 (IC)

<sup>1</sup>Comparison by BLASTp to the nr database (GenBank).

<sup>2</sup>The predicted signal peptide cleavage sites indicated with a space between the first 30 amino acids. The best  $\omega$ -sites (fungal big-PI predicted) of each sequence are boxed and the hydrophobic regions are double underlined within the last 42 amino acids. The amino acid residue V at the  $\omega$ -5 site is underlined. The basic amino acid residues K and R in the short  $\omega$ -minus region are marked in bold.

<sup>3</sup>IC indicates incomplete cDNA.

<sup>4</sup>Predicted localization in plasma membrane (PM) and cell wall (CW).

<sup>5</sup>Percentage of S plus T amino acids along each open reading frame.

\*Not detected in the *P. brasiliensis* transcriptome; obtained by PCR of total DNA.

### GPI-anchored proteins putatively associated with the fungus host interaction

Recent studies suggest that the GPI proteins are instrumental in fungal adhesion, recognition by host receptors, and may play a role in cell wall expansion. GPI-anchored proteins are leading vaccine candidates that are thought to be of major importance for infection (Smythe et al., 1988; Delgado et al., 2003). Table 3 shows some *P. brasiliensis* proteins that could be involved in host interaction and virulence. Two of the newly identified proteins, PRA/Ag2 and ELI Ag1, have been reported to be surface antigens. PRA/Ag2 is a component of a glycopeptide, which is probably the main T-cell-reactive component of *C. immitis* cell walls (Zhu et al., 1996). Also, the recombinant PRA/Ag2 protein is reactive with sera from patients with active coccidioidomycosis (Zhu et al., 1997). This protein is suggested to have an endoglucanase activity and to be important for spherule cell-wall morphogenesis during the infection process by *C. immitis* (Zhu et al., 1996). It is located in the fungal cell wall (Galgiani et al., 1992), most probable attached to the cell wall matrix (Peng et al., 2002). The expression of this protein can be considered phase specific since it is up-regulated during the spherule phase in *C. immitis* (Galgiane et al., 1992; Peng et al., 1999). ELI Ag1 is the first protective *C. immitis* antigen that has been identified by expression library immunization, inducing a strong level of protection in BALB/c mice. The mechanism by which this antigen protects mice against a lethal challenge with *C. immitis* arthroconidia is not yet known (Ivey et al., 2003).

We identified EST homologs to the EMP of *Magnaporthe grisea*. Although the function of EMP1 remains unclear at the biochemical level, it is suggested that it has a role in sensing a surface signal and/or transmitting a signal into the cell to promote conidial adhesion and appressorium formation in *M. grisea* (Ahn et al., 2004).

Among the identified enzymes, PLB, Cu-Zn SOD and Gel1 are reported as necessary for the virulence of fungal pathogens. It has been postulated that PLs assist in the penetration of phospholipid-rich host barriers, such as membranes and lung surfactant (Cox et al., 2001). Supporting evidence for this role has been shown by deletion of the *PLB1* gene in *C. albicans*, which results in a significant reduction in the ability of the pathogen to traverse the stomach mucosa and disseminate hematogenously to the liver (Mukherjee et al., 2001). Furthermore, *PLB1* of *Cryptococcus neoformans* may act as a virulence factor, by enhancing the ability to survive the macrophage antifungal defenses, possibly by facilitating fungal eicosanoid production during cryptococcal infection (Noverr et al., 2003).

The main function of SOD is to scavenge  $O_2^-$  radicals generated in various physiological process, thus preventing the oxidation of biological molecules (Liochev and Fridovich, 1994; Fridovich, 1995). SOD can be classified according to metal co-factor(s) bound to them. Cu-Zn SOD has copper and zinc as metal co-factors (Martchenko et al., 2004). *Candida albicans* Sod1 was shown to protect cells against extracellular superoxide radicals produced by macrophages, and it was reported to be important for the virulence of *C. albicans* in a mouse model (Hwang et al., 2002).

It was found that mice immunized with the recombinant Gel1 of *Coccidioides posadasii* and infected against a lethal challenge of this pathogen had a significant reduction in fungal burden and increased survival compared to nonimmune mice. The mature Gel1 was immunolocalized to the surface of endospores, and the highest level of the Gel1 mRNA was detected during the endosporulation stage of the parasitic cycle (Delgado et al., 2003). Furthermore, it was found that two homologous genes in *C. albicans* are pH-regulated and required for viru-

**Table 3.** Putative role of GPI-anchored proteins in *Paracoccidioides brasiliensis*.

Product	Functional grouping	Putative role in <i>P. brasiliensis</i>	Reported relation to host interaction in the pathogens
Proline-rich antigen/ antigen 2/ immunoreactive protein precursor		Surface antigen	Major immunoreactive component of <i>Coccidioides immitis</i> mycelium- and spherule-phase cell walls (Zhu et al., 1996, 1997)
Expression library immunization antigen 1		Surface antigen	Induced a strong level of protection in BALB/c mice in <i>C. immitis</i> (Ivey et al., 2003)
Extracellular matrix protein		Adhesion molecule	Putative role in conidial adhesion and appressorium formation in <i>Magnaporthe grisea</i> (Ahn et al., 2004)
Phospholipase B (PLB)	Phospholipase	Virulence factor	<i>Cryptococcus neoformans</i> PLB1 may act as a virulence factor by enhancing the ability to survive macrophage antifungal defense (Noverr et al., 2003)
Cu-Zn superoxide dismutase	Cu-Zn superoxide dismutase	Virulence factor	Scavenging oxygen radicals: hypha-induced Sod5p is instrumental in virulence (Martchenko et al., 2004)
$\beta$ -1,3-glucanosyltransferase 1 (Gel1)	$\beta$ -1,3-Glucanosyl transferase, Gas/Phr/Epd CAZy family 72*	Virulence factor	Expressed in high levels during the endospore stage of the parasitic cycle and infection of host lung tissue of <i>C. posadasii</i> (Delgado et al., 2003)

\*CAZy, carbohydrate-active enzyme classification according to Coutinho and Henrissat, 1999.

lence. These genes nominally include *PHR1*, a gene expressed maximally at pH 5.5 to 8.0, which encodes a protein promoting systemic infection of mice, and a *PHR2* gene, the expression pattern of which is the inverse and is involved in pathogenesis in a mouse model of vaginal infection (Saporito-Irwin et al., 1995; Muhlschlegel and Fonzi, 1997; De Bernardis et al., 1998).

### Phosphatidylinositol-glycan proteins and transamidases

The biosynthesis of GPI occurs on the membrane of the ER by the sequential addition of sugar residues to PI by the action of glycosyltransferases (Stevens, 1995). The common core structure of GPI consists of inositol phospholipid, GlcN, three mannoses and EtNP (Ferguson and Williams, 1988).

Genes encoding the enzymes in GPI biosynthesis have been identified by cloning, sequencing and by using the techniques of knock out and rescue. In mammals, around 20 genes participate in this pathway and have been identified as phosphatidylinositol-glycan (PIG) gene products (Ferguson, 1999; Kinoshita and Inoue, 2000; McConville and Menon, 2000). The glycosyltransferase complex composed by the proteins PIG-A, PIG-C, PIG-H, GPI1, PIG-P, and DPM2 (dolichol-phosphate-mannose 2) catalyzes the first step in the GPI synthesis (Watanabe et al., 2000). PIG-A encodes a subunit of GPI-N-acetylglucosamine transferase (Mayor and Riezman, 2004).

Table 4 summarizes the PIGs found in the *P. brasiliensis* transcriptome. PIG-H and GPI1 encoding ESTs were not detected in the *P. brasiliensis* transcriptome. Studies on *S. cerevisiae* had shown that the Gpi12 homolog of PIG-L participates in the second step of GPI synthesis (Watanabe et al., 1999) and the mannosylation reactions are mediated by PIG-M (GPI- $\alpha$ -1-4 mannosyltransferase) and PIG-B (GPI- $\alpha$ -1-2 mannosyltransferase) (Kinoshita and Inoue, 2000). Only PIG-L was found in the *P. brasiliensis* transcriptome (Table 4). The EtNP transfer to the first and third mannose residues is mediated by PIG-N and PIG-F and PIG-O, respectively. The first two ESTs had not been detected in our analysis.

Attachment of the GPI to the protein involves cleavage of the lumenally located pre-protein at a hydrophobic stretch, followed by the attachment of the cleaved sequence to the fully assembled GPI via a transamidase reaction (Udenfriend and Kodukula, 1995). Components of the transamidase complex have been identified in yeast and other organisms (Hamburger et al., 1995; Ohishi et al., 2000). Humans and *S. cerevisiae* GPI transaminidases are well conserved, containing five homologous components (Hong et al., 2003). Five human components, GAA1 (glycosylphosphatidylinositol anchor attachment 1), GPI8, PIG-S, PIG-T, and PIG-U are homologous to yeast Gaa1p, Gpi8p, Gpi17p, Gpi16p, and Cdc91p, respectively (Fraering et al., 2001; Ohishi et al., 2001). Several lines of evidence indicate that GPI8/Gpi8p are the catalytic components responsible for the cleavage of the GPI-attachment signal sequences (Benghezal et al., 1996; Meyer et al., 2000; Ohishi et al., 2000; Spurway et al., 2001; Vidugiriene et al., 2001). All of those encoding transamidase ESTs were detected in our analysis of the *P. brasiliensis* transcriptome, with the exception of ESTs encoding PIG-U (Table 4).

Phylogenetic relationships of *Pb*PIGs were generated with PIGs available on the Pfam database. The PIGs were well resolved into clades corresponding respectively to PIG-C, PIG-DPM2, PIG-P, PIG-M, and PIG-L (Figure 1). Consequently, we suggest conservation of PIG sequences during evolution.

### GPI solubilizing phospholipases

The intact GPI anchor confers an amphiphilic character to the proteins, which by the action of PLs cleaving the ester bond of the PI, render the protein hydrophilic (Stambuk and Cardoso de Almeida, 1996). Thus, a proposed role for the GPI anchor and their solubilizing PLs is that it may be an alternative to proteolysis for the regulated release of proteins from membranes (Ehlers and Riordan, 1991).

The term “phospholipases” refers to a heterogeneous group of enzymes that are able to hydrolyze one or more ester linkages in glycerophospholipids (Cox et al., 2001). The action of PLs can result in the destabilization of membranes, cell lysis and release of lipid second messengers (Schmiel and Miller, 1999; Ghannoum, 2000). Although all PLs target phospholipids as

**Table 4.** *Paracoccidioides brasiliensis* phosphatidylinositol-glycan (PIG) biosynthesis and transamidases.

Protein/PbAEST	Amino acid length <sup>1</sup>	% Amino acid identity by BLASTp analysis <sup>2</sup>	Putative function in organisms
<b>PIGs</b>			
PIG-A/PbAEST 4859	141 - IC	<i>Aspergillus nidulans</i> 115/145 (79%)	Participates in catalysis of the first step in GPI anchor synthesis: transferring GlcNac (N-acetylglucosamine) from UDP-GlcNac to PI to form GPI. Probably provides the catalytic center (Kostova et al., 2000)
PIG-C/PbAEST 2893	186 - IC	<i>Aspergillus fumigatus</i> 133/183 (72%)	Participates in catalysis of the first step in GPI anchor synthesis: transfer of GlcNac from UDP-GlcNac to PI to form GPI (Delorenzi et al., 2002)
PIG-P/PbAEST 2368	342 - IC	<i>Aspergillus nidulans</i> 213/276 (77%)	Participates in catalysis of the first step in GPI anchor synthesis: transfer of GlcNac from UDP-GlcNac to PI to form GPI (Watanabe et al., 2000)
DPM2/PbAEST 3119	85	<i>Gibberella zeae</i> 53/75 (70%)	Implicated in first step of the GPI anchor biosynthesis (Watanabe et al., 2000) and is required for assisting the transfer of mannose units from dolichol phosphate by the catalytic DPM1 (dolichol-phosphate-mannose 1) (Maeda et al., 1998)
PIG-L (Gpi12)/PbAEST 3269	190 - IC	<i>Aspergillus nidulans</i> 124/195 (63%)	Catalyzes the second reaction in GPI anchor synthesis: deacetylation of GlcN-PI (glucosamine-phosphatidylinositol) (Watanabe et al., 1999)
PIG-O/PbAEST 4120	164	<i>Aspergillus nidulans</i> 109/187 (58%)	Involved in transferring EtNP (ethanolamine phosphate) to the third mannose of the GPI (Hong et al., 2000)
PIG-M	ND <sup>3</sup>		Mannosyltransferase that transfers the first mannose to GPI (Maeda et al., 2001)
PIG-F	ND <sup>3</sup>		Involved in the addition of EtNP to Man3 (Hong et al., 2000)
PIG-B	ND <sup>3</sup>		Involved in transferring the third mannose (Takahashi et al., 1996)
PIG-N	ND <sup>3</sup>		Involved in transferring EtNP to the first mannose of the GPI (Hong et al., 1999a)
PIG-H (Gpi15)	ND <sup>3</sup>		Participates in the catalysis of the first step in anchor synthesis: transfer of GlcNac from UDP-GlcNac to PI to form GPI (Watanabe et al., 2000)

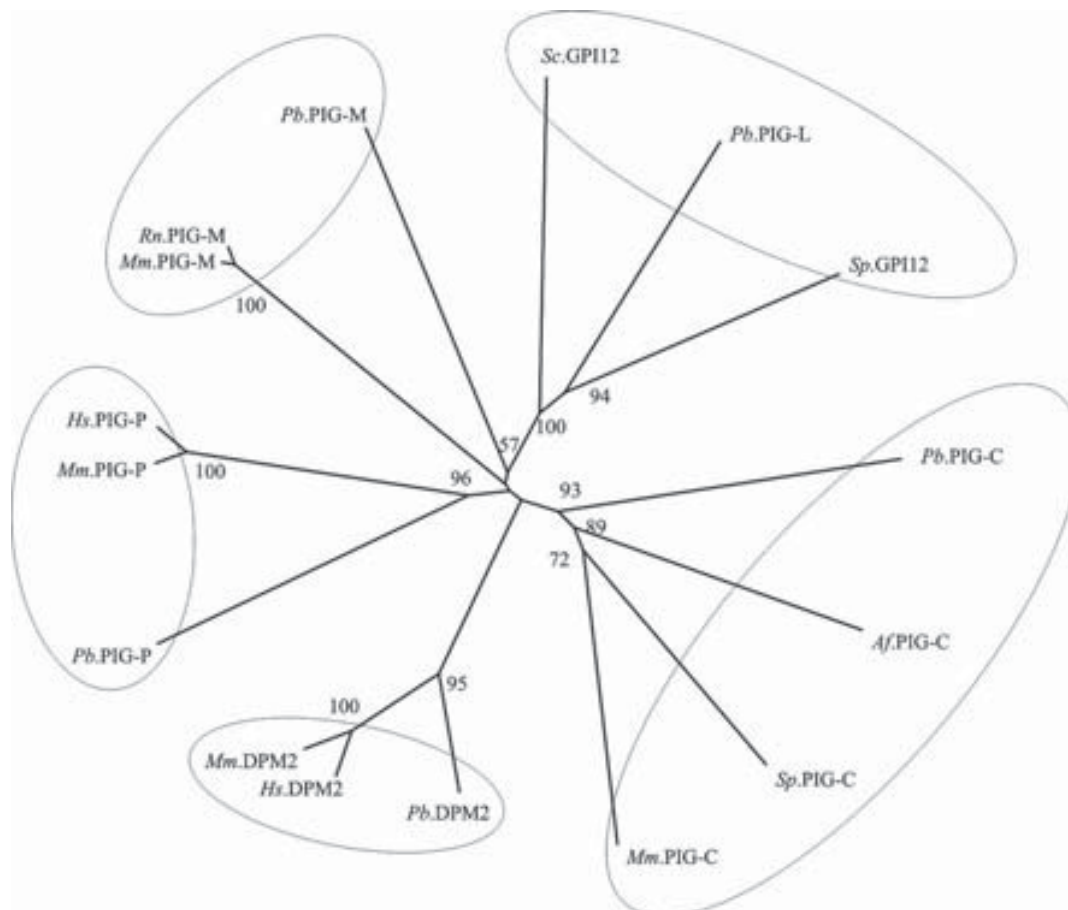
Continued on next page

Table 4. Continued.

Protein/PbAEST	Amino acid length <sup>1</sup>	% Amino acid identity by BLASTp analysis <sup>2</sup>	Putative function in organisms
GPII	ND <sup>3</sup>		Necessary for the stable formation of GPI-GnT (GPI-GlcNAc transferase) and probably required for the efficient association of PIG-C with a complex of PIG-A and PIG-H (Hong et al., 1999b)
TRANSAMIDASES			
GAA1/PbAEST 3403	231 - IC	<i>Aspergillus nidulans</i> 182/231 (78%)	Required for a terminal step of GPI anchor attachment (Hamburger et al., 1995)
GPI8 (PIG-K)/PbAEST 3107	179 - IC	<i>Aspergillus nidulans</i> 152/179 (84%)	Is intimately involved in the recognition of GPI precursor proteins (Meyer et al., 2002) and several lines of evidence indicate that GPI8 is responsible for the cleavage of the ω-site (Benghezal et al., 1996; Meyer et al., 2000; Ohishi et al., 2000; Spurway et al., 2001; Vidugiriene et al., 2001)
PIG-S (Gpi17)/PbAEST 3267 and PbAEST 3811	157 - IC 149 - IC	<i>Aspergillus nidulans</i> 112/157 (71%) <i>Aspergillus nidulans</i> 95/149 (63%)	Forms a protein complex with GAA1 and GPI8 (Ohishi et al., 2001)
PIG-T (Gpi16)/PbAEST 5428	139 - IC	<i>Aspergillus nidulans</i> 89/142 (62%)	PIG-T and PIG-S form a protein complex with GAA1 and GPI8, and PIG-T maintains the GPI transamidase complex by stabilizing the expression of GAA1 and GPI8 (Ohishi et al., 2001)
PIG-U	ND <sup>3</sup>		It is suggested that PIG-U is involved in an event preceding the cleavage of the ω-site in the precursor protein (Hong et al., 2003)

<sup>1</sup>IC: incomplete cDNA.<sup>2</sup>Comparison by BLASTp to the nr database (GenBank).<sup>3</sup>ND: not detected.





**Figure 1.** Phylogenetic tree of phosphatidylinositol-glycans (PIG). Sequences were aligned using the CLUSTAL X program. Sequences were taken from the Pfam database. *Pb*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Pb*PIG-P, *Pb*DPM2, *Pb*PIG-C, *Pb*PIG-L, and *Pb*PIG-M; *Rn*, *Rattus norvegicus*, *Rn*PIG-M (GenBank accession No. NP077058); *Hs*, *Homo sapiens*, *Hs*DPM2 (GenBank accession No. NP003854) and *Hs*PIG-P (GenBank accession No. P57054); *Sp*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Sp*PIG-C (GenBank accession No. NP588096) and *Sp*GPI12 (GenBank accession No. CAC21467); *Af*, *Aspergillus fumigatus*, *Af*PIG-C (GenBank accession No. AAS68361); *Mm*, *Mus musculus*, *Mm*DPM2 (GenBank Accession No. NP034203), *Mm*PIG-M (GenBank accession No. NP080510), *Mm*PIG-P (GenBank accession No. NP062416), and *Mm*PIG-C (GenBank accession No. NP080354); *Sc*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Sc*GPI12 (GenBank accession No. NP014008). DPM2 = dolichol-phosphate-mannose 2; GPI = glycosylphosphatidylinositol.

substrates, each enzyme has the ability to cleave a specific ester bond (Cox et al., 2001).

Several mammalian PL activities that seem to be capable of removing the GPI anchors from proteins have been reported (Low and Saltiel, 1988). In *P. brasiliensis*, Heise et al. (1995) reported the detection of a potent PLC capable of selectively hydrolyzing the GPI anchor, with the consequent release of proteins. The search for cDNAs homologous to PLs in the *P. brasiliensis* transcriptome revealed two open reading frames with high sequence homology to PI-PLC and PLD of *A. nidulans* and *A. oryzae*, respectively (Table 5). This finding suggests that PI-PLC and PLD could be capable of hydrolyzing the GPI anchor in *P. brasiliensis*. The GPI-specific PLC, which is another type of phospholipase C capable of cleaving the GPI anchor, was not found in the *P. brasiliensis* transcriptome.

**Table 5.** *Paracoccidioides brasiliensis* phospholipases capable of cleavage the  $\omega$ -site.

Product/PbAEST	Amino acid length <sup>1</sup>	% Amino acid identity by BLASTp analysis <sup>2</sup>	Putative functional
Phosphatidylinositol-specific phospholipase C/ PbAEST 2355	170 - IC	<i>Aspergillus nidulans</i> 88/174 (50%)	Hydrolyzes the phosphodiester bond in the phospholipid backbone to yield phosphatidic acid (Timpe et al., 2003)
Phospholipase D/ PbAEST 3496	173 - IC	<i>Aspergillus oryzae</i> 109/182 (59%)	Hydrolyzes the phosphodiester bond in the phospholipid backbone to yield 1,2-diacylglycerol (Timpe et al., 2003)

<sup>1</sup>Incomplete cDNAs are indicated by IC.

<sup>2</sup>Comparison by BLASTp to the nr database (GenBank).

## CONCLUDING REMARKS

The cell wall is a plastic and dynamic structure that is constantly changing in response to environmental signals and to different stages of the fungal cell cycle. GPI anchoring is a eukaryotic mechanism for attaching proteins to the cell surface. In fungi, GPI proteins are known to be either covalently incorporated into the cell wall network or to remain attached to the plasma membrane. The GPI-anchored proteins localized in the cell wall may determine surface hydrophobicity and antigenicity, and they are reported from various microbial pathogens as immunogenic and adhesion molecules; they have also been suggested to be important virulence factors. On the other hand, the GPI proteins localized in the plasma membrane are known to play a role in cell wall biosynthesis and remodeling.

This is the first analysis of *P. brasiliensis* GPI-anchored proteins in the fungus transcriptome. Many of the identified proteins can be broadly categorized as being involved in cell wall remodeling, in host-fungus interaction, providing some insight into the purposes of GPI-anchoring.

## ACKNOWLEDGMENTS

Research supported by MCT/CNPq, CNPq, CAPES, FUB, and UFG. We are thankful to Hugo Costa Paes for English revision.

## REFERENCES

- Ahn, N., Kim, S., Choi, W., Im, K.H. and Lee, Y.H. (2004). Extracellular matrix protein gene, *EMPI*, is required for appressorium formation and pathogenicity of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Mol. Cell* 17: 166-173.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Ash, J., Dominguez, M., Bergeron, J.J., Thomas, D.Y. and Bourbonnais, Y. (1995). The yeast proprotein



- convertase encoded by YAP3 is a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein that localizes to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 270: 20847-20854.
- Bateman, A., Birney, E., Cerruti, L., Durbin, R., Eddy, S.R., Griffiths-Jones, S., Howe, K.L., Marshall, M. and Sonnhammer, E.L.** (2002). The Pfam protein families Database. *Nucleic Acids Res.* 30: 276-280.
- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G. and Brunak, S.** (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* 40: 783-795.
- Benghezal, M., Benachour, A., Rusconi, S., Aebi, M. and Conzelmann, A.** (1996). Yeast Gpi8p is essential for GPI anchor attachment onto proteins. *EMBO J.* 15: 6575-6583.
- Bruneau, J.M., Magnin, T., Tagat, E., Legrand, R., Bernard, M., Diaquin, M., Fudali, C. and Latge, J.P.** (2001). Proteome analysis of *Aspergillus fumigatus* identifies glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins associated to the cell wall biosynthesis. *Electrophoresis* 22: 2812-2823.
- Caro, L.H., Tettelin, H., Vossen, J.H., Ram, A.F., van den Ende, H. and Klis, F.M.** (1997). *In silicio* identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13: 1477-1489.
- Chang, L.Y., Slot, J.W., Geuze, H.J. and Crapo, J.D.** (1988). Molecular immunocytochemistry of the CuZn superoxide dismutase in rat hepatocytes. *J. Cell Biol.* 107: 2169-2179.
- Chatterjee, S. and Mayor, S.** (2001). The GPI-anchor and protein sorting. *Cell. Mol. Life Sci.* 58: 1969-1987.
- Coutinho, P.M. and Henrissat, B.** (1999). Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. In: *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering* (Gilbert, H.J., Davics, G., Henrissat, B. and Svensson, B., eds.). The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp. 3-12.
- Cox, G.M., McDade, H.C., Chen, S.C., Tucker, S.C., Gottfredsson, M., Wright, L.C., Sorrell, T.C., Leidich, S.D., Casadevall, A., Ghannoum, M.A. and Perfect, J.R.** (2001). Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.* 39: 166-175.
- Cserzo, M., Wallin, E., Simon, I., von Heijne, G. and Elofsson, A.** (1997). Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Protein Eng.* 10: 673-676.
- De Bernardis, F., Muhlschlegel, F.A., Cassone, A. and Fonzi, W.A.** (1998). The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 66: 3317-3325.
- de Groot, P.W.J., Hellingwerf, K.J. and Klis, F.M.** (2003). Genome-wide identification of fungal GPI proteins. *Yeast* 20: 781-796.
- Delgado, N., Xue, J., Yu, J.J., Hung, C.Y. and Cole, G.T.** (2003). A recombinant beta-1,3-glucanosyltransferase homolog of *Coccidioides posadasii* protects mice against coccidioidomycosis. *Infect. Immun.* 71: 3010-3019.
- Delorenzi, M., Sexton, A., Shams-Eldin, H., Schwarz, R.T., Speed, T. and Schofield, L.** (2002). Genes for glycosylphosphatidylinositol toxin biosynthesis in *Plasmodium falciparum*. *Infect. Immun.* 70: 4510-4522.
- Ehlers, M.R.W. and Riordan, J.F.** (1991). Membrane proteins with soluble counterparts: role of proteolysis in the release of transmembrane proteins. *Biochemistry* 30: 10065-10074.
- Eisenhaber, B., Bork, P. and Eisenhaber, F.** (2001). Post-translational GPI lipid anchor modification of proteins in kingdoms of life: analysis of protein sequence data from complete genomes. *Protein Eng.* 14: 17-25.
- Eisenhaber, B., Schneider, G., Wildpaner, M. and Eisenhaber, F.** (2004). A sensitive predictor for potential GPI lipid modification sites in fungal protein sequences and its application to genome-wide studies for *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Mol. Biol.* 337: 243-253.
- Ferguson, M.A. and Williams, A.F.** (1988). Cell-surface anchoring of proteins via glycosyl-phosphatidylinositol structures. *Annu. Rev. Biochem.* 57: 285-320.
- Ferguson, M.A., Homans, S.W., Dwek, R.A. and Rademacher, T.W.** (1988). Glycosyl-phosphatidylinositol moiety that anchors *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein to the membrane. *Science* 239: 753-759.
- Ferguson, M.A.J.** (1999). The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *J. Cell. Sci.* 112: 2799-2809.
- Fontaine, T., Magnin, T., Melhert, A., Lamont, D., Latge, J.P. and Ferguson, M.A.J.** (2003). Structures of glycosylphosphatidylinositol membrane anchors from *Aspergillus fumigatus* membrane proteins. *Glycobiology* 13: 169-177.
- Fraering, P., Imhof, I., Meyer, V., Strub, J.M., van Dorsselaer, A., Vionnet, C. and Conzelmann, A.** (2001). The GPI transamidase complex of *Saccharomyces cerevisiae* contains Gaa1p, Gpi8p and Gpi16p.

- Mol. Biol. Cell* 12: 3295-3306.
- Franco, M., Peracoli, M.T., Soares, A., Montenegro, R., Mendes, R.P. and Meira, D.A.** (1993). Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr. Top. Med. Mycol.* 5: 115-149.
- Fridovich, I.** (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 97-112.
- Galgiani, J.N., Sun, S.H., Dugger, K.O., Ampel, N.M., Grace, G.G., Harrison, J. and Wieden, M.A.** (1992). An arthroconidial-spherule antigen of *Coccidioides immitis*: differential expression during *in vitro* fungal development and evidence for humoral response in humans after infection or vaccination. *Infect. Immun.* 60: 2627-2635.
- Ghannoum, M.A.** (2000). Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* 13: 122-143.
- Hamada, K., Fukuchi, S., Arisawa, M., Baba, M. and Kitada, K.** (1998a). Screening for glycosylphosphatidylinositol (GPI)-dependent cell wall proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 258: 53-59.
- Hamada, K., Terashima, H., Arisawa, M. and Kitada, K.** (1998b). Amino acid sequence requirement for efficient incorporation of glycosylphosphatidylinositol-associated proteins into the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273: 26946-26953.
- Hamada, K., Terashima, H., Arisawa, M., Yabuki, N. and Kitada, K.** (1999). Amino acid residues in the omega-minus region participate in cellular localization of yeast glycosylphosphatidylinositol-attached proteins. *J. Bacteriol.* 181: 3886-3889.
- Hamburger, D., Egerton, M. and Riezman, H.** (1995). Yeast Gaa1p is required for attachment of a completed GPI anchor onto proteins. *J. Cell Biol.* 129: 629-639.
- Hartland, R.P., Fontaine, T., Debeaupuis, J.P., Simenel, C., Delepierre, M. and Latgé, J.P.** (1996). A novel beta-(1-3)-glucanoyltransferase from the cell wall of *Aspergillus fumigatus*. *J. Biol. Chem.* 271: 26843-26849.
- Heise, N., Travassos, L.R. and de Almeida, M.L.** (1995). *Paracoccidioides brasiliensis* expresses both glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins and a potent phospholipase C. *Exp. Mycol.* 19: 111-119.
- Hong, Y., Maeda, Y., Watanabe, R., Ohishi, K., Mishkind, M., Riezman, H. and Kinoshita, T.** (1999a). Pign, a mammalian homologue of yeast Mcd4p, is involved in transferring phosphoethanolamine to the first mannose of the glycosylphosphatidylinositol. *J. Biol. Chem.* 274: 35099-35106.
- Hong, Y., Ohishi, K., Watanabe, R., Endo, Y., Maeda, Y. and Kinoshita, T.** (1999b). GPI1 stabilizes an enzyme essential in the first step of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 274: 18582-18588.
- Hong, Y., Maeda, Y., Watanabe, R., Inoue, N., Ohishi, K. and Kinoshita, T.** (2000). Requirement of PIG-F and PIG-O for transferring phosphoethanolamine to the third mannose in glycosylphosphatidylinositol. *J. Biol. Chem.* 275: 20911-20919.
- Hong, Y., Ohishi, K., Kang, J.Y., Tanaka, S., Inoue, N., Nishimura, J., Maeda, Y. and Kinoshita, T.** (2003). Human PIG-U and yeast Cdc91p are the fifth subunit of GPI transamidase that attaches GPI-anchors to proteins. *Mol. Biol. Cell* 14: 1780-1789.
- Horton, P. and Nakai, K.** (1997). Better prediction of protein cellular localization sites with the k nearest neighbors classifier. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* 5: 147-152.
- Hoyer, L.L.** (2001). The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 9: 176-180.
- Hung, C.Y., Yu, J.J., Seshan, K.R., Reichard, U. and Cole, G.T.** (2002). A parasitic phase-specific adhesin of *Coccidioides immitis* contributes to the virulence of this respiratory fungal pathogen. *Infect. Immun.* 70: 3443-3456.
- Hwang, C.S., Rhie, G.E., Oh, J.H., Huh, W.K., Yim, H.S. and Kang, S.O.** (2002). Copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence. *Microbiology* 148: 3705-3713.
- Ivey, F.D., Magee, D.M., Woitaske, M.D., Johnston, S.A. and Cox, R.A.** (2003). Identification of a protective antigen of *Coccidioides immitis* by expression library immunization. *Vaccine* 21: 4359-4367.
- Karpinska, B., Karlsson, M., Schinkel, H., Streller, S., Suss, K.H., Melzer, M. and Wingsle, G.** (2001). A novel superoxide dismutase with a high isoelectric point in higher plants. Expression, regulation, and protein localization. *Plant Physiol.* 126: 1668-1677.
- Keller, G.A., Warner, T.G., Steimer, K.S. and Hallelwell, R.A.** (1991). Cu,Zn superoxide dismutase is a peroxisomal enzyme in human fibroblasts and hepatoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7381-7385.
- Kinoshita, T. and Inoue, N.** (2000). Dissecting and manipulating the pathway for glycosylphosphatidylinositol-anchor biosynthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4: 632-638.
- Kinoshita, T., Inoue, N. and Takeda, J.** (1995). Defective glycosyl phosphatidylinositol anchor synthesis

- and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Adv. Immunol.* 60: 57-103.
- Kitagaki, H., Wu, H., Shimoi, H. and Ito, K.** (2002). Two homologous genes, *DCW1* (YKL046c) and *DFG5*, are essential for cell growth and encode glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored membrane proteins required for cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 46: 1011-1022.
- Klis, F.M., Mol, P., Hellingwerf, K. and Brul, S.** (2002). Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 26: 239-256.
- Komano, H., Rockwell, N., Wang, G.T., Krafft, G.A. and Fuller, R.S.** (1999). Purification and characterization of the yeast glycosylphosphatidylinositol-anchored, monobasic-specific aspartyl protease yapsin 2 (Mkc7p). *J. Biol. Chem.* 274: 24431-24437.
- Kostova, Z., Rancour, D.M., Menon, A.K. and Orlean, P.** (2000). Photoaffinity labelling with P3-(4-azidoanilido)uridine 5'-triphosphate identifies gpi3p as the UDP-GlcNAc-binding subunit of the enzyme that catalyses formation of GlcNAc-phosphatidylinositol, the first glycolipid intermediate in glycosylphosphatidylinositol synthesis. *Biochem. J.* 350: 815-822.
- Leidich, S.D., Drapp, D.A. and Orlean, P.** (1994). A conditionally lethal yeast mutant blocked at the first step in glycosyl phosphatidylinositol anchor synthesis. *J. Biol. Chem.* 269: 10193-10196.
- Liochev, S.I. and Fridovich, I.** (1994). The role of O<sub>2</sub><sup>•-</sup> in the production of HO<sub>2</sub>: *in vitro* and *in vivo*. *Free Radic. Biol. Med.* 16: 29-33.
- Low, M.G.** (1989). The glycosyl-phosphatidylinositol anchor of membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 988: 427-454.
- Low, M.G. and Saltiel, A.R.** (1988). Structural and functional roles of glycosyl-phosphatidylinositol in membranes. *Science* 239: 268-275.
- Lu, C.F., Kurjan, J. and Lipke, P.N.** (1994). A pathway for cell wall anchorage of *Saccharomyces cerevisiae* alpha-agglutinin. *Mol. Cell. Biol.* 14: 4825-4833.
- Lussier, M., White, A.M., Sheraton, J., di Paolo, T., Treadwell, J., Southard, S.B., Horenstein, C.I., Chen-Weiner, J., Ram, A.F., Kapteyn, J.C., Roemer, T.W., Vo, D.H., Bondoc, D.C., Hall, J., Zhong, W.W., Sdicu, A.M., Davies, J., Klis, F.M., Robbins, P.W. and Bussey, H.** (1997). Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 147: 435-450.
- Maeda, Y., Tomita, S., Watanabe, R., Ohishi, K. and Kinoshita, T.** (1998). DPM2 regulates biosynthesis of dolichol phosphate-mannose in mammalian cells: correct subcellular localization and stabilization of DPM1, and binding of dolichol phosphate. *EMBO J.* 17: 4920-4929.
- Maeda, Y., Watanabe, R., Harris, C.L., Hong, Y., Ohishi, K., Kinoshita, K. and Kinoshita, T.** (2001). PIG-M transfers the first mannose to glycosylphosphatidylinositol on the luminal side of the ER. *EMBO J.* 20: 250-261.
- Martchenko, M., Alarco, A.M., Harcus, D. and Whiteway, M.** (2004). Superoxide dismutases in *Candida albicans*: transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-induced *SOD5* gene. *Mol. Biol. Cell* 15: 456-467.
- Mayor, S. and Riezman, H.** (2004). Sorting GPI-anchored proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 110-120.
- McConville, M.J. and Ferguson, M.A.** (1993). The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochem. J.* 294: 305-324.
- McConville, M.J. and Menon, A.K.** (2000). Recent developments in the cell biology and biochemistry of glycosylphosphatidylinositol lipids. *Mol. Membr. Biol.* 17: 1-16.
- McEwen, J.G., Bedoya, V., Patino, M.M., Salazar, M.E. and Restrepo, A.E.** (1987). Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. *J. Med. Vet. Mycol.* 25: 165-175.
- McGwire, B.S., O'Connell, W.A., Chang, K.P. and Engman, D.M.** (2002). Extracellular release of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked *Leishmania* surface metalloprotease, gp63, is independent of GPI phospholipolysis: implications for parasite virulence. *J. Biol. Chem.* 277: 8802-8809.
- Meyer, U., Benghezal, M., Imhof, I. and Conzelmann, A.** (2000). Active site determination of Gpi8p, a caspase-related enzyme required for glycosylphosphatidylinositol anchor addition to proteins. *Biochemistry* 39: 3461-3471.
- Meyer, U., Fraering, P., Bosson, R., Imhof, I., Benghezal, M., Vionnet, C. and Conzelmann, A.** (2002). The glycosylphosphatidylinositol (GPI) signal sequence of human placental alkaline phosphatase is not recognized by human Gpi8p in the context of the yeast GPI anchoring machinery. *Mol. Microbiol.* 46: 745-748.
- Morsomme, P. and Riezman, H.** (2002). The Rab GTPase Ypt1p and tethering factors couple protein sorting at the ER to vesicle targeting to the Golgi apparatus. *Dev. Cell* 2: 307-317.
- Moukadiri, I., Armero, J., Abad, A., Sentandreu, R. and Zueco, J.** (1997). Identification of a mannoprotein present in the inner layer of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 179: 2154-2162.

- Mouyna, I., Fontaine, T., Vai, M., Monod, M., Fonzi, W.A., Diaquin, M., Popolo, L., Hartland, R.P. and Latge, J.P. (2000). Glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanoyltransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. *J. Biol. Chem.* 275: 14882-14889.
- Muhlschlegel, F.A. and Fonzi, W.A. (1997). *PHR2* of *Candida albicans* encodes a functional homolog of the pH-regulated gene *PHR1* with an inverted pattern of pH-dependent expression. *Mol. Cell. Biol.* 17: 5960-5967.
- Mukherjee, P.K., Seshan, K.R., Leidich, S.D., Chandra, J., Cole, G.T. and Ghannoum, M.A. (2001). Reintroduction of the *PLB1* gene into *Candida albicans* restores virulence *in vivo*. *Microbiology* 147: 2585-2597.
- Muniz, M., Morsomme, P. and Riezman, H. (2001). Protein sorting upon exit from the endoplasmic reticulum. *Cell* 104: 313-320.
- Nagamine, K., Murashima, K., Kato, T., Shimoi, H. and Ito, K. (2003). Mode of alpha-amylase production by the shochu koji mold *Aspergillus kawachii*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67: 2194-2202.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. and von Heijne, G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* 10: 1-6.
- Noverr, M.C., Cox, G.M., Perfect, J.R. and Huffnagle, G.B. (2003). Role of *PLB1* in pulmonary inflammation and cryptococcal eicosanoid production. *Infect. Immun.* 71: 1538-1547.
- Ohishi, K., Inoue, N., Maeda, Y., Takeda, J., Riezman, H. and Kinoshita, T. (2000). *Gaa1p* and *gpi8p* are components of a glycosylphosphatidylinositol (GPI) transamidase that mediates attachment of GPI to proteins. *Mol. Biol. Cell* 11: 1523-1533.
- Ohishi, K., Inoue, N. and Kinoshita, T. (2001). *PIG-S* and *PIG-T*, essential for GPI anchor attachment to proteins, form a complex with *GAA1* and *GPI8*. *EMBO J.* 20: 4088-4098.
- Okado-Matsumoto, A. and Fridovich, I. (2001). Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J. Biol. Chem.* 276: 38388-38393.
- Orlean, P. (1997). Biogenesis of yeast cell wall and surface components. In: *The Molecular Biology of Yeast Saccharomyces* (Pringle, J.R., Broch, J.R. and Jones, E.W., eds.). Vol. 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, pp. 229-362.
- Peng, T., Orsborn, K.I., Orbach, M.J. and Galgiani, J.N. (1999). Proline-rich vaccine candidate antigen of *Coccidioides immitis*: conservation among isolates and differential expression with spherule maturation. *J. Infect. Dis.* 179: 518-521.
- Peng, T., Shubitz, L., Simons, J., Perrill, R., Orsborn, K.I. and Galgiani, J.N. (2002). Localization within a proline-rich antigen (Ag2/PRA) of protective antigenicity against infection with *Coccidioides immitis* in mice. *Infect. Immun.* 70: 3330-3335.
- Richard, M., Ibata-Ombetta, S., Dromer, F., Bordon-Pallier, F., Jouault, T. and Gaillardin, C. (2002). Complete glycosylphosphatidylinositol anchors are required in *Candida albicans* for full morphogenesis, virulence and resistance to macrophages. *Mol. Microbiol.* 44: 841-853.
- Rodriguez-Pena, J.M., Cid, V.J., Arroyo, J. and Nombela, C. (2000). A novel family of cell wall-related proteins regulated differently during the yeast life cycle. *Mol. Cell. Biol.* 20: 3245-3255.
- Ross-MacDonald, P., Coelho, P.S., Roemer, T., Agarwal, S., Kumar, A., Jansen, R., Cheung, K.H., Sheehan, A., Symoniatis, D., Umansky, L., Heidtman, M., Nelson, F.K., Iwasaki, H., Hager, K., Gerstein, M., Miller, P., Roeder, G.S. and Snyder, M. (1999). Large-scale analysis of the yeast genome by transposon tagging and gene disruption. *Nature* 402: 413-418.
- San-Blas, G., Nino-Vega, G. and Iturriaga, T. (2002). *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med. Mycol.* 40: 225-242.
- Saporito-Irwin, S.M., Birse, C.E., Sypherd, P.S. and Fonzi, W.A. (1995). *PHR1*, a pH-regulated gene of *Candida albicans*, is required for morphogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 15: 601-613.
- Schmiel, D.H. and Miller, V.L. (1999). Bacterial phospholipases and pathogenesis. *Microbes Infect.* 1: 1103-1112.
- Smythe, J.A., Coppel, R.L., Brown, G.V., Ramasamy, R., Kemp, D.J. and Anders, R.F. (1988). Identification of two integral membrane proteins of *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5195-5199.
- Spreghini, E., Davis, D.A., Subaran, R., Kim, M. and Mitchell, A.P. (2003). Roles of *Candida albicans* Dfg5p and Dcw1p cell surface proteins in growth and hypha formation. *Eukaryot. Cell* 2: 746-755.
- Spurway, T.D., Dalley, J.A., High, S. and Bulleid, N.J. (2001). Early events in glycosylphosphatidylinositol anchor addition: substrate proteins associate with the transamidase subunit *gpi8p*. *J. Biol. Chem.* 276: 15975-15982.
- Stambuk, B.U. and Cardoso de Almeida, M.L. (1996). An assay for glycosylphosphatidylinositol-anchor degrading phospholipases. *J. Biochem. Biophys. Methods* 33: 105-115.



- Stevens, V.L. (1995). Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol membrane anchors. *Biochem. J.* 310: 361-370.
- Sturtz, L.A., Diekert, K., Jensen, L.T., Lill, R. and Culotta, V.C. (2001). A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J. Biol. Chem.* 276: 38084-38089.
- Sundstrom, P. (2002). Adhesion in *Candida* spp. *Cell. Microbiol.* 4: 461-469.
- Takahashi, M., Inoue, N., Ohishi, K., Maeda, Y., Nakamura, N., Endo, Y., Fujita, T., Takeda, J. and Kinoshita, T. (1996). PIG-B, a membrane protein of the endoplasmic reticulum with a large luminal domain, is involved in transferring the third mannose of the GPI anchor. *EMBO J.* 15: 4254-4261.
- Terashima, H., Hamada, K. and Kitada, K. (2003). The localization change of Ybr078w/Ecm33, a yeast GPI-associated protein, from the plasma membrane to the cell wall, affecting the cellular function. *FEMS Microbiol. Lett.* 218: 175-180.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. (1997). The CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25: 4876-4882.
- Timpe, J.M., Holm, M.M., Vanlerberg, S.L., Basrur, V. and Lafontaine, E.R. (2003). Identification of a *Moraxella catarrhalis* outer membrane protein exhibiting both adhesin and lipolytic activities. *Infect. Immun.* 71: 4341-4350.
- Udenfriend, S. and Kodukula, K. (1995). How glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 563-591.
- Vai, M., Gatti, E., Lacana, E., Popolo, L. and Alberghina, L. (1991). Isolation and deduced amino acid sequence of the gene encoding gp115, a yeast glycosphospholipid-anchored protein containing a serine-rich region. *J. Biol. Chem.* 266: 12242-12248.
- van der Vaart, J.M., Caro, L.H., Chapman, J.W., Klis, F.M. and Verrips, C.T. (1995). Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 177: 3104-3110.
- Varki Ajit, R.C., Esko, J., Freeze, H., Hart, G. and Marth, J. (1999). *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Vidugiriene, J., Vainauskas, S., Johnson, A.E. and Menon, A.K. (2001). Endoplasmic reticulum proteins involved in glycosylphosphatidylinositol-anchor attachment: photocrosslinking studies in a cell-free system. *Eur. J. Biochem.* 268: 2290-2300.
- Vossen, J.H., Muller, W.H., Lipke, P.N. and Klis, F.M. (1997). Restrictive glycosylphosphatidylinositol anchor synthesis in *cwh6/gpi3* yeast cells causes aberrant biogenesis of cell wall proteins. *J. Bacteriol.* 179: 2202-2209.
- Watanabe, R., Ohishi, K., Maeda, Y., Nakamura, N. and Kinoshita, T. (1999). Mammalian PIG-L and its yeast homologue Gpi12p are N-acetylglucosaminylphosphatidylinositol de-N-acetylases essential in glycosylphosphatidylinositol biosynthesis. *Biochem. J.* 339: 185-192.
- Watanabe, R., Murakami, Y., Marmor, M.D., Inoue, N., Maeda, Y., Hino, J., Kangawa, K., Julius, M. and Kinoshita, T. (2000). Initial enzyme for glycosylphosphatidylinositol biosynthesis requires PIG-P and is regulated by DPM2. *EMBO J.* 19: 4402-4411.
- Weisiger, R.A. and Fridovich, I. (1973). Mitochondrial superoxide dismutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J. Biol. Chem.* 248: 4793-4796.
- Yabuki, M. and Fukui, S. (1970). Presence of binding site for alpha-amylase and of masking protein for this site on mycelial cell wall of *Aspergillus oryzae*. *J. Bacteriol.* 104: 138-144.
- Zhu, Y., Yang, C., Magee, D.M. and Cox, R.A. (1996). *Coccidioides immitis* antigen 2: analysis of gene and protein. *Gene* 181: 121-125.
- Zhu, Y., Tryon, V., Magee, D.M. and Cox, R.A. (1997). Identification of a *Coccidioides immitis* antigen 2 domain that expresses B-cell-reactive epitopes. *Infect. Immun.* 65: 3376-3380.

## **Rastreamento de proteínas ancoradas por Glicosilfosfatidilinositol (GPI) no transcriptoma de *Paracoccidioides brasiliensis***

Nadya da Silva Castro, ZA Maia, M Pereira, CMA Soares

*Genetics and Molecular Research* (2005) 4(2): 326-345.

### **DISCUSSÃO**

#### **Prováveis proteínas GPI-ancoradas (GPI-Ps) de *P. brasiliensis***

As GPI-Ps compreendem uma classe de proteínas com diversas funções, tais como: enzimas, antígenos de superfície, moléculas de adesão, e apresentando também um papel estrutural na biogênese da parede celular. Estas proteínas que possuem uma âncora de GPI compartilham algumas características comuns: (i) a presença de um peptídeo sinal N-terminal para secreção; (ii) uma cauda C-terminal hidrofóbica; e (iii) uma seqüência sinal para a adição de GPI. Baseados nestes critérios e com o uso de programas de bioinformática, foram encontradas no transcriptoma de *P. brasiliensis* (<https://dna.biomol.unb.br/Pb/>) 20 possíveis GPI-Ps, seis das quais, são hipotéticas. No genoma de *Saccharomyces cerevisiae*, cinquenta e oito GPI-Ps potenciais foram identificadas (Caro *et al.*, 1997), enquanto que em células de mamíferos, cerca de 100 proteínas de superfície são prováveis GPI-Ps (Low, 1989; Kinoshita *et al.*, 1995; de Groot *et al.*, 2003).

Visto que alguns cDNAs não continham a seqüência de aminoácidos completa, observou-se então a presença de motivo característico na porção N- ou C-terminal, considerando-se também a homologia com GPI-Ps de outros organismos bem como relatos na literatura para a presença de âncora de GPI. Assim, onze das vinte proteínas selecionadas apresentaram pelo menos os 42 últimos aminoácidos na região C-terminal que foram utilizados para o estudo da provável localização. Os três membros da família Gel ( $\beta$ -1,3-glicosiltransferase), a proteína Ecm33 (proteína mutante extracelular 33) e a proteína hipotética PbEST\_2429 apresentaram motivos básicos, acima do sítio  $\omega$  predito, sugestivos para localização na membrana plasmática. Estes resultados estiveram de acordo com os dados existentes na literatura para estas proteínas (Vai *et al.*, 1991; Hamada *et al.*, 1998a; Terashima *et al.*, 2003). No entanto, nenhum aminoácido básico foi encontrado na região  $\omega$ -menos para a proteína Cu-Zn SOD

(cobre-zinco superóxido dismutase), embora a mesma seja descrita como localizada na membrana plasmática (Karpinska *et al.*, 2001). As proteínas PRA/Ag2 (Antígeno rico em prolina/Antígeno 2) e CWP-GPIp (proteína de parede celular GPI-ancorada) foram preditas como provavelmente ancoradas à parede celular com base nas descrições existentes para *Coccidioides immitis* (Zhu *et al.*, 1996) e *S. cerevisiae* (Moukadiri *et al.*, 1997; Hamada *et al.*, 1998a), respectivamente. Duas proteínas hipotéticas, PbEST\_2445 e PbEST\_61, foram preditas como proteínas de parede celular pela análise através do algoritmo PSORT II.

As GPI-Ps normalmente apresentam alta porcentagem de resíduos de S e T, que são potenciais sítios para O-glicosilação (Klis *et al.*, 2002). O conteúdo de S/T nas prováveis GPI-Ps de *P. brasiliensis* variou de 9 a 28%, com uma média de 20%, sendo assim, similar a GPI-Ps preditas de *Neurospora crassa* (21%) e ligeiramente menor que em *S. cerevisiae* (25%), *C. albicans* (28%) e *Schizosaccharomyces pombe* (29%) (de Groot *et al.*, 2003).

Estudos sugerem que as proteínas GPI são relevantes para adesão fúngica, reconhecimento pelos receptores do hospedeiro, e podem desempenhar um papel na expansão da parede celular (Smythe *et al.*, 1988; Delgado *et al.*, 2003). Duas das proteínas identificadas, PRA/Ag2 e ELI-Ag1, são descritas como antígenos de superfície. PRA/Ag2 é um dos principais componentes reativos com células T da parede celular de *C. immitis* e um importante fator de virulência (Galgiani *et al.*, 1992; Zhu *et al.*, 1996; Hung *et al.*, 2007). Também, a proteína recombinante PRA/Ag2 mostrou-se reativa com o soro de pacientes com coccidioidomicose e um bom candidato à vacina (Zhu *et al.*, 1996; Herr *et al.*, 2007). Sugere-se que esta proteína tenha uma atividade de endoglicanase e seja importante para a morfogênese da parede celular da esférula durante o processo de infecção por *C. immitis* (Zhu *et al.*, 1996). A expressão desta proteína pode ser considerada fase específica, uma vez que é altamente regulada durante a fase de esférula de *C. immitis* (Galgiani *et al.*, 1992; Peng *et al.*, 1999). ELI-Ag1 foi o primeiro antígeno de proteção contra *C. immitis* identificado pela imunização de uma biblioteca de expressão em camundongos BALB/c. ELI-Ag1 foi capaz de induzir um forte nível de proteção nestes camundongos quando submetidos a um desafio letal com artroconídios de *C. immitis* (Ivey *et al.*, 2003).

Também foi identificada uma EST homóloga a proteína de matriz extracelular (Emp) de *Magnaporthe grisea*. Embora a função de *EMPI* permaneça obscura a nível bioquímico, é sugerido que tenha um papel na percepção de algum sinal de superfície

e/ou transmissão do sinal para dentro da célula a fim de promover uma adesão conidial e formação de apressório em *M. grisea* (Ahn *et al.*, 2004).

Dentre as proteínas identificadas, Cu-Zn SOD, Plb (fosfolipase B) e Gell são reportadas como necessárias para virulência em fungos patogênicos (Xue *et al.*, 2005; Siafakas *et al.*, 2006). A função principal de SOD é retirar radicais  $O_2^-$  gerados em vários processos fisiológicos, prevenindo assim, a oxidação de moléculas biológicas (Liochev & Fridovich, 1994; Fridovich, 1995). Cu-Zn SOD possui o cobre e o zinco como co-fatores (Martchenko *et al.*, 2004). Em *C. albicans* foi observado que Sod1 protegia a célula contra radicais superóxido produzidos por macrófagos (Hwang *et al.*, 2002). Com relação as PLs, foi postulado que estas enzimas participam na penetração de barreiras do hospedeiro ricas em fosfolipídeos, tais como membranas e surfactantes do pulmão, podendo causar uma supressão da atividade fagocítica do hospedeiro com conseqüente diminuição da resposta imune (Cox *et al.*, 2001; Wright *et al.*, 2007). A deleção do gene *PLB1* em *C. albicans* resultou em uma redução significativa na habilidade deste patógeno de atravessar a mucosa estomacal e de se propagar por via hematogênica para o fígado (Mukherjee *et al.*, 2001; Ganendren *et al.*, 2006). Além disso, *PLB1* de *Cryptococcus neoformans* pode agir como um fator de virulência, por aumentar sua habilidade para sobreviver perante as defesas antifúngicas de macrófagos (Noverr *et al.*, 2003; Siafakas *et al.*, 2006; Wright *et al.*, 2007). Recentemente foi comprovado que Plb1 também contribui para a integridade da parede celular e conseqüente sobrevivência do fungo (Siafakas *et al.*, 2007).

Estudos de mutantes para alguns membros da família de Gelp mostraram virulência reduzida em modelos de infecção animal e em plantas (Caracuel *et al.*, 2005; Mouyna *et al.*, 2005). Em *C. albicans* foi observado que dois homólogos destes genes, *PHR1* e *PHR2* (pH regulados), além de requeridos para a virulência podem também serem regulados pelo pH do ambiente. Assim, o mutante nulo *PHR1* foi avirulento em um modelo animal de infecção sistêmica (pH próximo ao neutro) mas não comprometeu sua habilidade para causar infecção vaginal (pH em torno de 4,5) em camundongos, enquanto que o fenótipo do mutante nulo *PHR2* foi o inverso (Saporito-Irwin *et al.*, 1995; Mühlischlegel & Fonzi, 1997; de Bernardis *et al.*, 1998). Também foi observado, através de ensaios de imunoproteção em camundongos com a proteína recombinante Gell de *Coccidioides posadasii*, uma significativa redução na carga fúngica e uma sobrevida aumentada em camundongos pré-imunizados com a molécula (Delgado *et al.*, 2003; Cox & Magee, 2004; Xue *et al.*, 2005). Recentemente foi descrito que as



proteínas Gas1 e Gas4 participam da maturação da parede do ascósporo e são essenciais para a viabilidade do esporo (Ragni *et al.*, 2007; de Medina-Redondo *et al.*, 2008).

Estudo recente de deleção do gene *ECM33* de *Aspergillus fumigatus* resultaram em rápida germinação conidial, aumento da adesão célula-célula, resistência a agente antifúngico e virulência aumentada (Romano *et al.*, 2006). Esta proteína também foi encontrada em um rastreamento proteômico em condições que simulam a infecção vaginal (Sosinska *et al.*, 2008).

Outras GPI-Ps por estarem ancoradas à membrana plasmática ou à parede celular desempenham um papel importante para a manutenção e estrutura da parede celular. As aspartil proteinases podem agir no processamento de precursores da parede celular ou de precursores de enzimas envolvidos na síntese ou remodelamento da parede celular, sendo também requeridas para virulência em *Candida glabrata* (Krysan *et al.*, 2005; Albrecht *et al.*, 2006; Kaur *et al.*, 2007). A proteína Ecm33 está envolvida na biogênese e arquitetura normal da parede celular e interações com as células hospedeiras (Chabane *et al.*, 2006; Martinez-Lopez *et al.*, 2006). De maneira similar, a família Gel é também requerida para a propriedade de biossíntese e morfogênese da parede celular devido a sua atividade de alongamento de cadeias de  $\beta$ -1,3-glicanas em fungos patogênicos (Mouyna *et al.*, 2000, 2005). A proteína Crh (hipersensíveis a “Congo red”) é requerida para a ligação de quitina à  $\beta$ -1,6-glicana na arquitetura da parede celular (Rodríguez-Peña *et al.*, 2000; Cabib *et al.*, 2007) e apresenta relevante reatividade imunológica podendo desempenhar papel durante infecções fúngicas (Arroyo *et al.*, 2007). A proteína CWP-GPI desempenha papel estrutural na associação com a rede de glicana (Moukadiri *et al.*, 1997).

A enzima alfa-amilase também é uma GPI-Ps que está localizada na parede celular de fungos e desempenha um papel crucial em processos de fermentação em *S. cerevisiae* (Yabuki & Fukui, 1970; Nagamine *et al.*, 2003).

### **Proteínas fosfatidilinositol-glicana (PIG) e transamidases**

A biossíntese de GPI ocorre pela adição seqüencial de resíduos de açúcar a PI pela ação de glicosiltransferases (Stevens, 1995). Participam desta via, em mamíferos e em *S. cerevisiae*, cerca de 25 genes, que foram identificadas como produtos gênicos de PIGs (Ferguson, 1999; Kinoshita & Inoue, 2000; McConville & Menon, 2000; Orlean & Menon, 2007; Pittet & Conzelmann, 2007). O complexo glicosiltransferase composto por proteínas PIG-A, PIG-C, PIG-H, GPI1, PIG-P e DPM2 catalisam o primeiro passo

na síntese de GPI (Watanabe *et al.*, 2000). No transcriptoma de *P. brasiliensis* foram identificados cDNAs codificantes para PIG-A, PIG-C, PIG-P e DPM2 bem como o transcrito homólogo a PIG-L, que participa no segundo passo da síntese de GPI (Watanabe *et al.*, 1999). Dentre os genes envolvidos na transferência de EtNP a resíduos de manose, que são *PIG-N*, *PIG-F* e *PIG-O*, somente o homólogo ao último gene foi encontrado nesta análise.

Após a biossíntese, a âncora de GPI é transferida para a região C-terminal de GPI-Ps pela ação de transamidases (Udenfriend & Kodukula, 1995). Um complexo protéico de cinco genes, *GAA1*, *GPI8*, *PIG-S*, *PIG-T*, e *PIG-U*, compõem a enzima GPI-transamidase que é capaz de reconhecer o sinal de GPI e substituí-lo pela âncora de GPI (Fraering *et al.*, 2001; Ohishi *et al.*, 2001; Hong *et al.*, 2003). Todos os componentes do complexo transamidase, com exceção de PIG-U foram identificados no transcriptoma de *P. brasiliensis*.

Possivelmente os transcritos codificantes para PIG-N, PIG-F e PIG-U não tenham sido seqüenciados neste estudo, uma vez que são descritos como genes essenciais. Uma possível explicação para a ausência destes transcritos seria devido à fase do ciclo celular de *P. brasiliensis* escolhida para construção desta biblioteca, como por exemplo, a fase estacionária, onde já tivesse acontecido a síntese e remodelamento da parede celular e os genes para biossíntese da âncora de GPI estivessem sendo transcritos em quantidade menor. PIG-F é absolutamente requerido para adição de EtNP a terceira manose em células de mamíferos (Hong *et al.*, 2000; Taron *et al.*, 2000; Shishioh *et al.*, 2005), enquanto que PIG-N é essencial para a adição de fosforiletanolamina a primeira manose (Sütterlin *et al.*, 1997). Já os quatro componentes, *GAA1*, *PIG-S*, *PIG-T* e *PIG-U* são essenciais para formar este complexo enzimático juntamente com a subunidade catalítica do gene *GPI8* (Ohishi *et al.*, 2000, 2001; Hong *et al.*, 2003). Com relação ao gene *GPI1*, já foi observado em estudos de deleção que a sua ausência não foi absolutamente requerida embora atue estabilizando PIG-H e PIG-C (Watanabe *et al.*, 1998; Hong *et al.*, 1999).

Relações filogenéticas de *PbPIGs* foram geradas com as PIGs disponíveis no banco de dados do Pfam. Foi sugerida a conservação de seqüências de PIGs durante a evolução, uma vez que as mesmas estiveram bem resolvidas dentro dos clados correspondentes a PIG-C, DPM2, PIG-P, PIG-M e PIG-L.

### **Solubilização de GPI por fosfolipases**

O termo “fosfolipases” refere-se a um grupo heterogêneo de enzimas que são capazes de hidrolisar uma ou mais ligações éster em glicerofosfolipídeos. Embora todas as PLs objetivem fosfolipídeos como substrato, cada enzima tem a habilidade de clivar uma ligação éster específica (Cox *et al.*, 2001). As GPI-Ps adquirem um caráter hidrofílico pela ação das PLs (Stambuk & Cardoso de Almeida, 1996).

Em *P. brasiliensis*, Heise *et al.* (1995) relataram a detecção de uma potente PLC capaz de hidrolisar seletivamente a âncora de GPI, com conseqüente liberação de proteínas. Dois quadros abertos de leitura com alta homologia para PI-PLC e PLD de *Aspergillus nidulans* e *Aspergillus oryzae*, respectivamente foram detectadas no transcriptoma de *P. brasiliensis*. Este achado sugere que PI-PLC e PLD poderiam ser capazes de hidrolisar a âncora de GPI em *P. brasiliensis*.

### **Considerações finais**

A parede celular é uma estrutura resistente e dinâmica que está constantemente em mudança em resposta a sinais ambientais e a diferentes estágios do ciclo celular fúngico. A ligação a GPI é um mecanismo de eucariotos para a conexão de proteínas a membrana plasmática ou parede celular. As proteínas GPI ancoradas localizadas na parede celular contribuem para a hidrofobicidade e antigenicidade da superfície, sendo relatadas a partir de vários patógenos como moléculas de adesão e importantes fatores de virulência. Por outro lado, as proteínas com âncoras de GPI localizadas na membrana plasmática são fundamentais para a biossíntese e o remodelamento da parede celular.

No estudo do transcriptoma de *P. brasiliensis* este foi a primeira análise de possíveis proteínas GPI ancoradas bem como proteínas que possam estar envolvidas no processo de biossíntese, ligação e desligamento da âncora de GPI. Com a recente finalização do seqüenciamento genômico dos isolados *Pb01*, *Pb03* e *Pb18* de *P. brasiliensis* (Broad Institute, <http://www.broad.mit.edu/tools/data/seq.html>) torna-se possível a obtenção de maiores informações sobre novas proteínas GPI ancoradas e sobre o entendimento da estrutura e composição da parede celular deste patógeno humano.

Capítulo

3

*Beta-1,3-glicano-  
siltransferases*



## 1. Beta-1,3-Glicosiltransferases

A parede celular dos fungos é constituída principalmente por glicana, manoproteínas e uma fina camada de quitina, formando uma estrutura rígida a partir de uma complexa rede de polímeros ligados transversalmente. A proteína  $\beta$ -1,3-glicana, principal componente da parede celular de fungos filamentosos e de levedura (Latgé *et al.*, 1991; Hearn & Sietsma, 1994), é sintetizada por um complexo de glicana sintase ligadas à membrana plasmática, tendo como supostas subunidades catalíticas as proteínas Fks (Fig. 3.1) (Klis *et al.*, 2006; Lesage & Bussey, 2006). Este complexo de glicana sintase usa UDP-glicose como substrato e catalisa a síntese e o deslocamento das cadeias de glicana geradas para dentro do espaço periplasmático. Depois, as cadeias de  $\beta$ -1,3-glicanas são ramificadas, alongadas e remodeladas a fim de criar uma estrutura robusta capaz de neutralizar a pressão osmótica interna e determinar a morfologia celular (Lesage & Bussey, 2006).

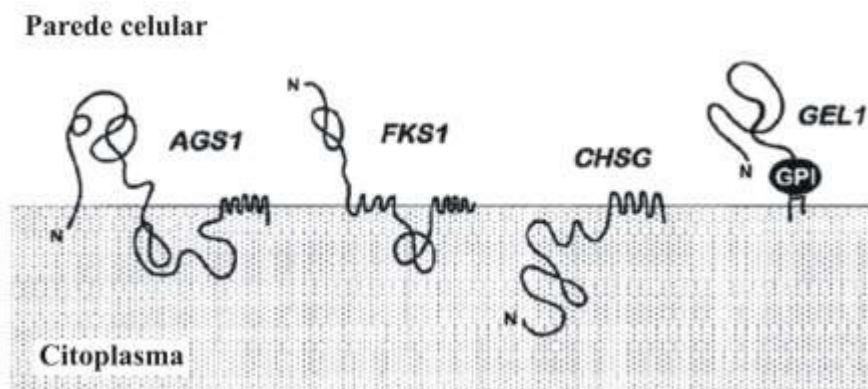


Figura 3.1: Predição topológica de enzimas da membrana envolvidas na biossíntese de polissacarídeos da parede celular. AGS, alfa-1,3-glicana sintase; FKS,  $\beta$ -1,3-glicana sintase; CHS, quitina sintase; GEL,  $\beta$ -1,3-glicosiltransferase. Adaptação: Bernard & Latgé (2001).

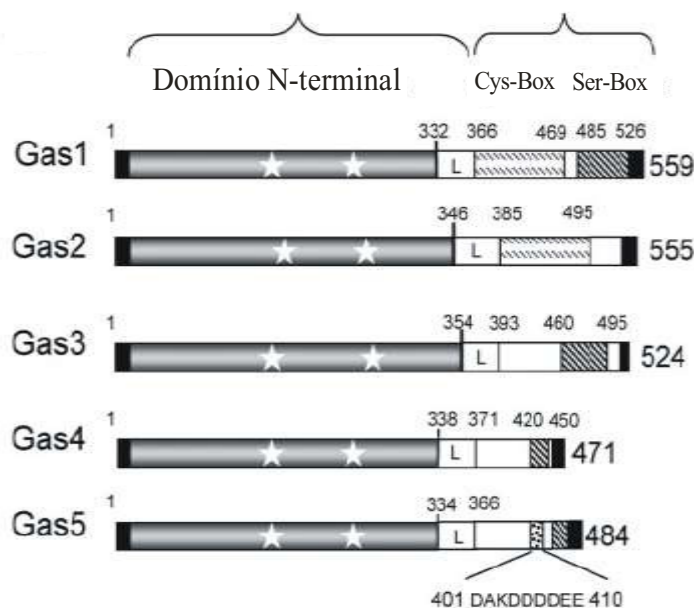
Em trabalho enfocando atividades enzimáticas envolvidas na modificação de  $\beta$ -1,3-glicanas no espaço periplasmático, tais como glicanases e transglicosidases, uma nova atividade de  $\beta$ -1,3-glicosiltransferase foi identificada bioquimicamente em *Aspergillus fumigatus* (Hartland *et al.*, 1996) e o gene Gell (Glicosiltransferase alongando glicana) foi caracterizado (Mouyna *et al.*, 2000a). Os genes *GELs* são homólogos às famílias gênicas *GAS* (glicofosfolípido ancorado à superfície)/ *PHR* (pH-regulado)/ *EPD* (essencial para o desenvolvimento de pseudohifa) de *Saccharomyces cerevisiae* (Nuoffer *et al.*, 1991; Vai *et al.*, 1991; Popolo *et al.*, 1993;

Saporito-Irwin *et al.*, 1995; Mühlshlegel & Fonzi, 1997; Nakazawa *et al.*, 1998, 2000). Todos estes genes pertencem a Família 72 de glicosil-hidrolase (GH72, CAZy) da classificação de Coutinho & Henrissat (1999) (<http://www.cazy.org/fam/GH72.html>) e codificam para proteínas GPI (glicosilfosfatidilinositol)-ancoradas requeridas para a correta morfogênese da parede celular em *S. cerevisiae*.

No genoma de *A. fumigatus* foram encontrados sete genes pertencentes a família GEL e de acordo com o grau de identidade, foram agrupados dentro de duas subfamílias: Gel3, Gel4, Gel5 e Gel7 (53 a 65% de identidade entre si) e Gel1, Gel2 e Gel6 (de 36 a 38% de identidade entre os membros) (Mouyna *et al.*, 2005). Em *S. cerevisiae*, esta família inclui cinco proteínas homólogas (Gas1-Gas5) que podem ser divididas em dois grupos de acordo com as diferenças apresentadas na arquitetura modular (Popolo & Vai, 1999; Ragni *et al.*, 2007b). Assim, todas as cinco proteínas de *S. cerevisiae* exibem, em sua estrutura protéica, uma seqüência sinal secretória e um domínio N-terminal chamado NtD (Fig. 3.2). O domínio NtD é o provável domínio catalítico, uma vez que os dois resíduos conservados de glutamato são essenciais para a catálise (Fonzi, 1999; Mouyna *et al.*, 2000b; Carotti *et al.*, 2004). Um segmento rico nos aminoácidos T, G, A, P e S, que conectam NtD a região C-terminal (Fig. 3.2).

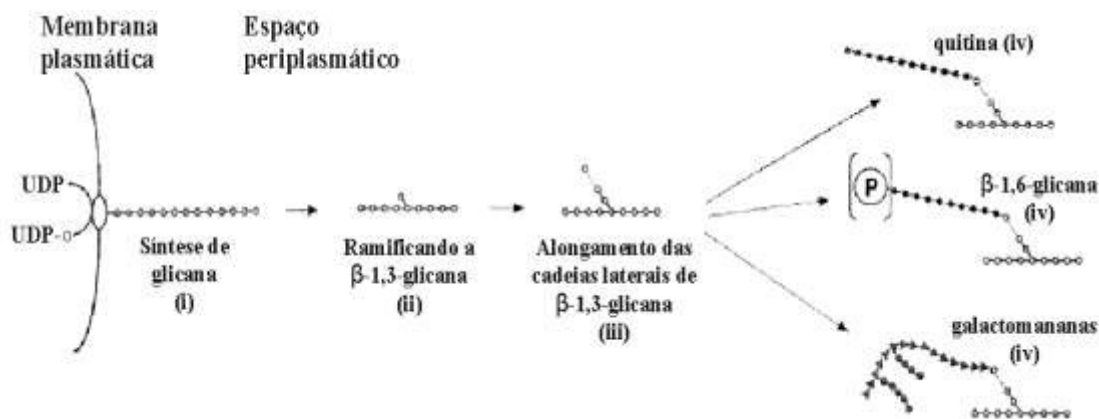
A região C-terminal varia em comprimento e é muito diferente entre as várias proteínas Gas. Somente as proteínas Gas1 e Gas2 compartilham uma alta identidade (41%), devido à presença de um domínio chamado Cys-box, com cerca de 100 aminoácidos (Fig. 3.2). Este domínio contém um motivo de seis resíduos de cisteína que é compartilhado por alguns membros da família GH72 (subfamília 72<sup>+</sup>) e por algumas  $\beta$ -1,3-glicanases de plantas (família GH17). Este domínio foi a bem pouco tempo definido como uma nova família do Módulo de Ligação a Carboidratos (CBM43, CAZy), uma vez que foi demonstrado que age como um domínio não catalítico autônomo para ligação a laminarina na proteína “Ole e 10” de pólen de oliva (Palomares *et al.*, 2003, 2005; Barral *et al.*, 2005). Estudos preliminares com a proteína Gas1 truncada de *S. cerevisiae* revelaram que a remoção do módulo Cys-box não afetou significativamente a estabilidade térmica e nem os níveis de expressão e secreção da proteína mutante, contudo foi capaz de abolir totalmente a atividade enzimática, mostrando-se assim, essencial para a função e estabilidade da proteína (Carotti *et al.*, 2006; Ragni *et al.*, 2007b). Uma árvore filogenética construída a partir do domínio N-terminal dos membros da família GH72 permitiu a distinção de duas subfamílias: (i) uma subfamília GH72<sup>+</sup>, contendo proteínas que possuem o domínio Cys-box na região

C-terminal, (ii) e a subfamília GH72<sup>7</sup> compreendendo proteínas que não possuem Cys-box (Ragni *et al.*, 2007b). Ao final da região C-terminal também foi encontrado um cluster de resíduos de serina chamado Ser-box. Este segmento de comprimento variável foi ausente apenas para a proteína Gas2. É sabido que a presença de Ser-box não é requerida para atividade em Gas1 (Gatti *et al.*, 1994). Um pequeno segmento ácido de função desconhecida foi encontrado em Gas5 (Ragni *et al.*, 2007b).



**Figura 3.2: Arquitetura modular das proteínas Gas de *S. cerevisiae*.** As caixas negras nas regiões N- e C-terminal correspondem ao peptídeo sinal e ao sinal para GPI, respectivamente. As estrelas indicam os resíduos catalíticos. L é o provável segmento de ligação do domínio N-terminal a extremidade carboxi. Cys-Box é o módulo enriquecido de cisteína, similar a CBM43, e Ser-box é a região rica em serina. Uma pequena região ácida em Gas5p é também mostrada. Adaptação: Ragni *et al.* (2007b).

A enzima Gel/Gas catalisa *in vitro* dois passos da reação de  $\beta$ -1,3-glicosiltransferase: (i) primeiro, uma ligação glicosídica interna de uma cadeia de  $\beta$ -1,3-glicana doadora é clivada e a porção redutora é liberada; (ii) depois, essa extremidade é transferida para uma extremidade não redutora de uma cadeia de  $\beta$ -1,3-glicana receptora, resultando assim em seu alongamento (Fig. 3.3). Desta forma, foi proposto que estas proteínas poderiam agir *in vivo* como um grupo de enzimas que transferem segmentos de  $\beta$ -1,3-glicana em pontos ramificados de outras glicanas, criando assim múltiplos sítios de ancoragem para manoproteínas, quitina ou para galactomananas (Fig. 3.3) (Mouyna *et al.*, 2000a).



**Figura 3.3: Eventos sequenciais envolvidos na síntese e modificações pós-síntese das  $\beta$ -1,3-glicanas da parede celular.** (i) Biossíntese da cadeia de  $\beta$ -1,3-glicana; (ii) ramificação de  $\beta$ -1,3-glicanas em ligações  $\beta$ -1,6; (iii) alongamento da cadeia lateral de  $\beta$ -1,3-glicana; e (iv) ligação transversal de outros polímeros (quitina, galactomanana,  $\beta$ -1,6-glicana) em extremidades não reduzidas de cadeias laterais de  $\beta$ -1,3-glicana. P, proteínas. Adaptação: Mouyna *et al.* (2000a).

Para todas as diferentes  $\beta$ -1,3-glicanosiltransferases de espécies fúngicas dois resíduos catalíticos são bem conservados, sugerindo que estas proteínas têm a mesma atividade de  $\beta$ -1,3-glicanosiltransferase, o que já foi demonstrado para os membros Gas da família em *S. cerevisiae* bem como para Gel1 e Gel2 de *A. fumigatus* e Phr1 e Phr2 de *Candida albicans* (Mouyna *et al.*, 2000a, 2000b, 2005; Ragni *et al.*, 2007b). Além disso, outra evidência que estas proteínas participam da mesma atividade enzimática, é que, apesar das variações na seqüência de aminoácidos, as proteínas Gel1 e Gel2 de *A. fumigatus* e Phr1 e Phr2 de *C. albicans* foram capazes de restaurar o defeito morfológico da linhagem WB2d, mutante para *gas1* $\Delta$  de *S. cerevisiae* (Vai *et al.*, 1996). Uma mutação nula no gene *GAS1* causa vários defeitos morfogênicos, como células com morfologia anormal, tornando-se circulares e maiores. Também são observados defeitos na maturação do brotamento e separação celular, causando assim um aspecto agrupado na fase estacionária. As células se tornam mais sensíveis à presença de SDS ou “Calcofluor White” e mais resistentes a enzimas hidrolíticas como Zimoliase (Ram *et al.*, 1994; Popolo *et al.*, 1997). Estes defeitos refletem mudanças na parede celular e uma situação que demanda uma resposta ao estresse. De fato, os mutantes *gas1* $\Delta$  além de exibirem um crescimento reduzido apresentam também alterações estruturais na parede celular, incluindo uma diminuição do conteúdo de glicana, principalmente de  $\beta$ -1,6-glicana e aumento no conteúdo de quitina (Popolo *et al.*, 1993, 1997; Ram *et al.*, 1995).



Outra característica da família 72 é que alguns membros são regulados por pH. No entanto, esta característica é espécie dependente. Por exemplo, *AfGEL1* e *AfGEL2* são constitutivamente expressos independente do pH do meio de cultura (Mouyna *et al.*, 2005). *GAS1* em *S. cerevisiae*, *CgGAS1* e *CgGAS2* em *Candida glabrata* (Popolo *et al.*, 1993; Weig *et al.*, 2001) não foram pH-regulados. Em contraste, em *C. albicans*, *Candida maltosa* e *Pneumocystis carinii*, o pH do meio de cultura desempenha um papel fundamental (Saporito-Irwin *et al.*, 1995; Mühlischlegel & Fonzi, 1997; Nakazawa *et al.*, 1998; Kottom *et al.*, 2001). Em *C. albicans*, *PHR1* é expresso em valores de pH de 5,5 ou mais alto e o *PHR2* em valores de pH abaixo de 5,5 (Saporito-Irwin *et al.*, 1995; Mühlischlegel & Fonzi, 1997). Apesar do fato destas proteínas serem encontradas como sendo funcionalmente permutáveis, foi proposto que seus modelos particulares de expressão exaltam a adaptação destes organismos aos diferentes nichos de pH colonizados (de Bernardis *et al.*, 1998).

Estudos de mutantes para os genes desta família mostraram que as  $\beta$ -1,3-glicosiltransferases além de serem cruciais para a montagem e morfogênese da parede celular são também requeridas para a virulência durante infecções fúngicas. Os mutantes nulos de *C. albicans* para *PHR1* são avirulentos em um modelo de infecção sistêmica em camundongo, em um ambiente de pH neutro, enquanto que mutantes deletados de *PHR2* apresentaram redução na virulência em um modelo de infecção vaginal, em níveis de pH ácido (de Bernardis *et al.*, 1998; Ghannoum *et al.*, 1995). Em *A. fumigatus*, o rompimento do gene *GEL1* não resultou em fenótipo anormal, enquanto que o mutante *gel2* $\Delta$  e o mutante duplo *gel1* $\Delta$ *gel2* $\Delta$  exibiram crescimento mais lento, conidiogênese anormal e uma composição alterada da parede celular. Além disso, os mutantes *gel2* $\Delta$  e *gel1* $\Delta$ *gel2* $\Delta$  apresentaram virulência reduzida em um modelo de camundongo com aspergilose invasiva (Mouyna *et al.*, 2005). Em plantas, o mutante *gas1* $\Delta$  mostrou dramática redução na virulência em tomates, tanto para ensaios de infecção na raiz quanto em um modelo de invasão do tecido da fruta (Caracuel *et al.*, 2005). Ensaios de imunoproteção em camundongos com a proteína recombinante Gell1 de *Coccidioides posadasii* demonstraram que a molécula foi capaz de protegê-los contra a coccidioidomicose (Delgado *et al.*, 2003; Cox & Magee, 2004; Xue *et al.*, 2005).

Recentemente, foi descrito que as proteínas Gas2 e Gas4 são expressas exclusivamente durante a esporulação e que ambas as proteínas desempenham funções redundantes na maturação da parede do esporo. Mutantes duplos para *gas2* $\Delta$  e *gas4* $\Delta$  mostraram uma severa redução na eficiência de esporulação, uma permeabilidade

aumentada para substâncias exógenas e a produção de esporos inviáveis. Análises da ultraestrutura do esporo indicaram que a perda das proteínas Gas2 e Gas4 também afetou a propriedade de ligação da glicana à camada de quitosano (Ragni *et al.*, 2007a; de Medina-Redondo *et al.*, 2008).

**Assunto:**Manuscript submitted - FEMSYR-08-04-0068

**Data:**Thu, 17 Apr 2008 14:11:15 -0400 (EDT)

**De:**[femsyr@fems-microbiology.org](mailto:femsyr@fems-microbiology.org)

**Para:**[celia@icb.ufg.br](mailto:celia@icb.ufg.br)

17-Apr-2008

Dear Dr. Célia M.A. Soares,

The manuscript you submitted to our journal, The beta-1,3-glucanosyltransferase 3 of *Paracoccidioides brasiliensis* is involved in cell wall biosynthesis and morphogenesis, by Castro, Nadya; Castro, Kelly; Orlandi, Ivan; Feitosa, Luciano; Silva, Livia; Vainstein, Marilene; Bão, Sonia; Vai, Marina; Soares, Célia M.A., has been uploaded to Manuscript Central.

As the submitting author, you will receive future communications via e-mail. Your manuscript number is FEMSYR-08-04-0068.

We thank you for submitting your work for publication in one of the FEMS Microbiology journals.

Please be sure to save the word processing and graphics files from your manuscript. You may need them later again for production purposes if your manuscript is accepted.

You can keep track of your manuscript by logging on periodically to our site (<http://mc.manuscriptcentral.com/femsyr>), where the status will be displayed in your Submitting Author Center.

Again, thank you for the submission of your manuscript.

Best wishes,

Dr. Frédérique Belliard  
FEMS Editorial Administrator

On behalf of Chief Editor,  
Dr Teun Boekhout  
FEMS Yeast Research

Note: It is the responsibility of the corresponding author (or submitting author if different) that all authors of this submitted manuscript are informed about its submission and its subsequent progress.

## **A proteína beta-1,3-glicosiltransferase 3 de *Paracoccidioides brasiliensis* está envolvida na biossíntese da parede celular e morfogênese**

Nadya da Silva Castro, KP Castro, I Orlandi, LS Feitosa, LK Rosa e Silva, MH Vainstein, SN Bão, M Vai, CMA Soares.

Artigo submetido para a revista *FEMS Yeast Research* (*Federation of European Microbiological Societies - FEMS*).

### **DISCUSSÃO**

Com o objetivo de entender melhor os mecanismos que estão envolvidos na montagem e manutenção da integridade da célula, nós inicialmente procuramos por cDNAs que codificassem para proteínas associadas à parede celular de *P. brasiliensis* (Castro *et al.*, 2005). Um fragmento de uma ORF de 812 pb do homólogo Gel3p de *A. fumigatus* (Mouyna *et al.*, 2000b) foi identificado no transcriptoma de *P. brasiliensis* depositado no banco de dados de ESTs do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Um produto de PCR correspondente à ORF descrita foi utilizado como sonda a fim de se obter o cDNA completo através de rastreamento de uma biblioteca de cDNA de *P. brasiliensis*. O cDNA completo consiste de 2.057 pb, codificando para um polipeptídeo de 529 aminoácidos com uma massa molecular teórica de 57,1 kDa e um pI de 6.1. A seqüência genômica completa, presente como cópia única e contendo quatro íntrons, foi obtida através de amplificação por PCR de DNA genômico de *P. brasiliensis* pelo uso de oligonucleotídeos complementares à seqüência codificante.

A seqüência deduzida de aminoácidos de *PbGEL3* mostrou homologia com proteínas Gel3 e com todas as quatro proteínas homólogas, Gel/Gas/Phr/Epd, todas pertencentes a família GH72 (CAZy). Estas enzimas encontram-se associadas à membrana plasmática e/ou parede celular por meio de âncora de GPI e são responsáveis pelo alongamento das cadeias de  $\beta$ -1,3-glicanas (Mouyna *et al.*, 2000a). Dois módulos básicos característicos da família de  $\beta$ -1,3-glicosiltransferases foram encontrados na arquitetura modular de *PbGel3p*: (i) o primeiro na região N-terminal contendo um peptídeo sinal e um domínio catalítico com dois resíduos conservados de glutamato

(E<sup>159</sup> e E<sup>260</sup>) essenciais para a catálise e (ii) o segundo na região C-terminal, onde encontra-se o potencial sítio de ligação à GPI (S<sup>498</sup>) seguido pelo sinal hidrofóbico (V<sup>512</sup>-L<sup>528</sup>) característico de proteínas GPI ancoradas (Mouyna *et al.*, 2000a, 2000b; Carotti *et al.*, 2004; Ragni *et al.*, 2007b). Também foi encontrado, dentro da região C-terminal, um domínio particular chamado Cys-Box, contendo seis resíduos conservados de cisteína presumivelmente envolvidos na formação de três pontes dissulfeto (Palomares *et al.*, 2003; Carotti *et al.*, 2004). Este domínio é também comum a algumas  $\beta$ -1,3-glicanases de plantas (GH17) e está relacionado a atividade da enzima (Palomares *et al.*, 2003; Barral *et al.*, 2005). Apenas alguns membros da família GH72 (subfamília 72<sup>+</sup>) contêm este domínio, como por exemplo, as proteínas Gas1 e Gas2 da família de glicosiltransferases de *S. cerevisiae* (Ragni *et al.*, 2007b). Estudos prévios revelaram que a remoção deste módulo da proteína Gas1 de *S. cerevisiae* foi capaz de abolir totalmente a atividade enzimática, mostrando-se, portanto essencial para a função e estabilidade da proteína (Carotti *et al.*, 2006).

Análises dos níveis de transcrito e da proteína demonstraram que *PbGel3p* é expressa em todas as fases avaliadas, com picos relativamente altos na fase de micélio. Uma drástica redução nos níveis de expressão foi verificada durante as primeiras 24 horas após a mudança de temperatura de 22 para 36 °C, alcançando baixos níveis na fase de levedura. Assim, os níveis de expressão mais abundantes de *PbGel3p* na fase micelial estão em concordância com altos níveis de proteína  $\beta$ -1,3-glicana, principal constituinte da fase de micélio (San-Blas & San-Blas, 1994). A confirmação da localização preferencial desta proteína na superfície celular fornece mais evidências para um provável papel de *PbGel3p* na morfologia e manutenção da parede celular em *P. brasiliensis*. De fato, esta família de proteína foi descrita como localizada na membrana plasmática (Popolo *et al.*, 1988; Fankhauser & Conzelmann, 1991), bem como covalentemente ligada à parede celular via âncora de GPI remanescente (de Sampaio *et al.*, 1999; Yin *et al.*, 2005).

Embora a ausência de uma ferramenta molecular eficiente para o nocaute gênico em *P. brasiliensis* tenha limitado os estudos funcionais neste organismo (Leal *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2007), foi investigado neste trabalho o papel potencial de *PbGel3p* na biossíntese e morfogênese da parede celular pela restauração do fenótipo *in vivo* do mutante de *S. cerevisiae* *gas1* $\Delta$ . De fato, em *S. cerevisiae* a ausência da atividade de  $\beta$ -1,3-glicosiltransferase Gas1 afeta profundamente a proporção relativa correta e o grau de ligação dos constituintes da parede celular (Popolo *et al.*, 1997; Ram

*et al.*, 1998). Isto conduz a um fenótipo mutante detectável caracterizado pelo crescimento reduzido, morfologia arredondada, sensibilidade a Calcofluor White, aumento da permeabilidade da parede celular (Popolo & Vai, 1999). Foi observado que *PbGEL3* foi capaz de complementar parcialmente o fenótipo mutante de *gas1Δ* em meio não tamponado, enquanto que a complementação foi completa em valores de pH mais altos. Resultados similares foram encontrados para *GAS4* de *S. cerevisiae*, um parálogo de *GAS1*, codificando uma proteína especializada para funcionar em um valor de pH próximo a neutro (Ragni *et al.*, 2007a). Nestas condições de crescimento, *PbGEL3* foi capaz de corrigir alterações dos constituintes da parede celular decorrentes da inativação de *GAS1*, como observado para a morfologia elipsoidal e o tempo de duplicação (Td) similar ao tipo selvagem. Da mesma forma, o fenótipo reconstituído apresentou habilidade para crescer na presença de SDS e quantidade e localização normais das moléculas de quitina. Os resultados indicam que a expressão de *PbGEL3* anula os defeitos estruturais de *gas1Δ* decorrentes de conexões alteradas entre glicanas e manoproteínas que são requeridas para formar uma barreira seletiva na superfície externa da parede celular. No todo, nossos resultados revelaram que *PbGel3p* é funcional em *S. cerevisiae* e suprime ambos defeitos morfológicos e a resposta compensatória induzida pela ausência de *Gas1p*. A completa funcionalidade de *PbGel3p* é detectada em valores de pH acima de 5,0. Esta necessidade poderia refletir as condições ambientais de crescimento de *P. brasiliensis* e o pH dos nichos colonizados por este patógeno dimórfico. De fato, formas leveduriformes não crescem em pHs abaixo de 3,6 para a maioria dos isolados clínicos e o estabelecimento de infecção acontece nos tecidos do hospedeiro em valores de pH próximos ao neutro (Franco, 1986; Sano *et al.*, 1997; Restrepo *et al.*, 2001).

Em conclusão, nossos resultados sugerem que, similarmente à *Gas1p* de *S. cerevisiae*, *PbGel3p* pode ter papel ativo na biossíntese e morfologia da parede celular de *P. brasiliensis*, especialmente em células de micélio, a fase infectiva do fungo. A elucidação destes mecanismos moleculares envolvidos na montagem da parede celular de *P. brasiliensis* é importante e necessária uma vez que a patogenicidade deste fungo parece estar correlacionada com mudanças na composição, organização e estrutura da parede celular que ocorrem durante a conversão morfofogenética da forma miceliana para leveduriforme.

Capítulo 4

*Proteína Dfg5*



## 1. Parede celular e adesão

O primeiro contato entre fungos patogênicos e os tecidos do hospedeiro ocorre pela superfície celular, sendo atribuída a componentes da parede celular (CW). A formação da parede celular é estritamente coordenada com as fases do ciclo celular e fortemente afetada pelos níveis de oxigênio (Klis *et al.*, 2006). Essas características são observadas pelo requerimento de proteínas específicas da parede celular durante fases consecutivas do ciclo celular, sugerindo que a maioria dos genes codificantes para proteínas de parede celular são regulados de acordo com as fases do ciclo (Smits *et al.*, 1999; Bähler, 2005). Em *Saccharomyces cerevisiae*, as células transitam entre o crescimento isotrópico e o apical durante o ciclo celular. As células-filhas crescem isotropicamente, requerendo a inserção de novas macromoléculas da parede celular dentro da rede de polissacarídeos já existentes na “fase G<sub>1</sub>” (Klis *et al.*, 2006). No entanto, pouco se conhece sobre o controle da construção da parede durante o ciclo celular. Há descrição da existência de um “ponto de checagem da integridade da parede celular” que opera quando o tamanho do broto corresponde a aproximadamente um terço do tamanho da célula-mãe (Suzuki *et al.*, 2004). Esse ponto de checagem faz o monitoramento do progresso da síntese da parede celular causando uma parada do ciclo celular depois da replicação do DNA e antes da separação dos corpos polares do fuso (SPB), acoplando assim a síntese da parede celular à mitose. Possivelmente esse ponto de checagem esteja envolvido na transição do crescimento apical para o isotrópico (Klis *et al.*, 2006).

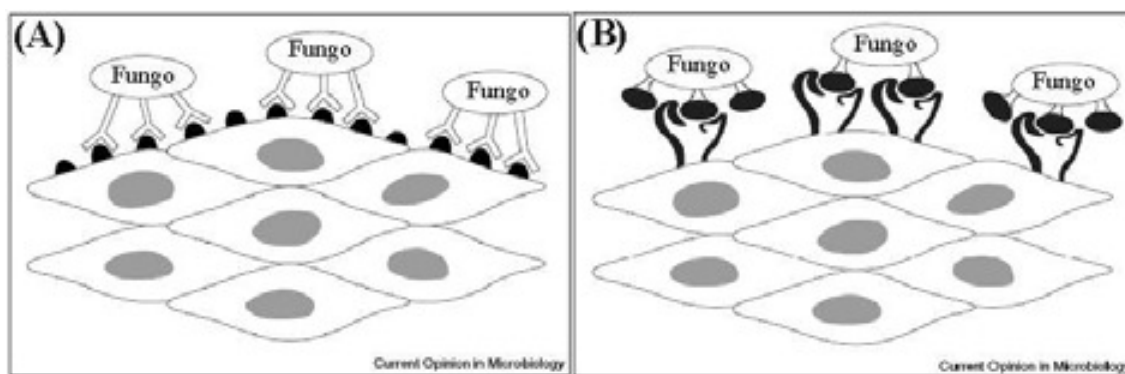
Os componentes principais da parede celular são os polissacarídeos  $\beta$ -1,3- e  $\beta$ -1,6-glicana, quitina e de vários tipos proteínas. As proteínas solúveis da parede celular são um grupo importante de proteínas ligadas de modo não covalente à parede celular e podem ser extraídas com SDS sob condições redutoras (Mrsá *et al.*, 1997). Algumas destas proteínas são provavelmente glicanases com ação de remodelamento da parede celular (Sestak *et al.*, 2004). Já as proteínas ligadas covalentemente à parede celular são divididas em duas classes principais, de acordo com o tipo de ligação à glicana. Estas proteínas sofrem modificações pós-traducionais durante a secreção e são com frequência fortemente manossiladas. A parte interna da parede forma uma camada conectada covalentemente a moléculas de  $\beta$ -1,3-glicana e quitina para as quais moléculas de  $\beta$ -1,6-glicana serão ligadas. O maior grupo compõe as proteínas



dependentes de glicosilfosfatidilinositol na parede celular (GPI-CWPs). Estas proteínas são ligadas à  $\beta$ -1,3-glicana por meio de uma âncora de GPI e estão associadas com várias funções, tais como biossíntese e remodelamento da parede celular, limite da permeabilidade, manutenção da hidrofobicidade e da forma da célula (Zlotnik *et al.*, 1984; van der Vaart *et al.*, 1995; Mouyna *et al.*, 2000; Rodríguez-Peña *et al.*, 2000). O segundo grupo compreende as proteínas com repetições internas (PIR) que pertencem à fração de proteínas da parede celular solúveis em álcali (ASL-CWPs) e estão diretamente conectadas à  $\beta$ -1,3-glicana via uma ligação ainda desconhecida (Toh-e *et al.*, 1993; Mersã & Tanner, 1999; Castillo *et al.*, 2003; de Groot *et al.*, 2004; Ecker *et al.*, 2006). Em *Candida albicans*, muitas proteínas de parede celular (CWPs) participam nos processos de virulência e adesão a tecidos do hospedeiro, como por exemplo, as adesinas da família Als (seqüência semelhante à aglutinina) e Hwp1p (proteína da parede de hifa 1) (Hoyer *et al.*, 1999; Hoyer, 2001; Sundstrom, 2002; Cheng *et al.*, 2003). Outras funções também relacionadas à virulência, tais como formação de biofilmes, adesão a plásticos e antigenicidade podem ser atribuídas a CWPs (Gomez *et al.*, 1996; Chaffin *et al.*, 1998; Nisini *et al.*, 2001; Li & Palecek, 2003; García-Sánchez *et al.*, 2004).

A aderência de microrganismos patogênicos à tecidos do hospedeiro é considerada indispensável para o início da colonização e futura disseminação. A adesão implica que o patógeno reconheça carboidratos ou proteínas ligantes na superfície da célula do hospedeiro ou proteínas constituintes da membrana basal (Patti *et al.*, 1994). Três são os tipos de componentes do hospedeiro que os microrganismos podem interagir: (i) produtos secretados pelas células, (ii) superfície celular do hospedeiro (ii) e proteínas da matriz extracelular (ECM), tais como: colágeno tipo I e IV, fibrinogênio, fibronectina e laminina (Mendes-Giannini *et al.*, 2006, 2008). A laminina é encontrada na membrana basal (Beck *et al.*, 1990), enquanto que a fibronectina está presente na forma solúvel no plasma sanguíneo e outros fluidos e na forma fibrilar na ECM (Mohri, 1996). Já o colágeno por ser o principal constituinte da ECM representa um importante alvo para adesão de muitas espécies de microrganismos. O colágeno tipo IV é encontrado principalmente na membrana basal e o colágeno tipo I é abundante na matriz intersticial (Gil *et al.*, 1996). Estas proteínas da ECM, normalmente não são expostas na superfície do epitélio e endotélio. Entretanto, qualquer tipo de trauma que altere o tecido do hospedeiro pode levar a exposição de membranas basais e tornar acessíveis seus componentes (Finlay, 1990; Kottom *et al.*, 2003).

Moléculas com característica de receptores para proteínas da ECM têm sido descritas em fungos patogênicos (Filler, 2006; Ganendren *et al.*, 2006; Mendes-Giannini *et al.*, 2008). A maioria dessas moléculas microbianas são glicoproteínas presentes na parede celular e são conhecidas como adesinas, apresentando características similares a integrinas ou lectinas (Lima *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2003). As integrinas das células hospedeiras reconhecem proteínas da ECM que contém a seqüência de aminoácidos do tripeptídeo arginina, glicina e ácido aspártico (RGD) (Ruoslahti, 1996; Pae *et al.*, 2008). Estudos têm demonstrado que os fungos não apenas empregam a interação mediada por RGD para aderir à tecidos do hospedeiros como também expressam um subgrupo de adesinas que contém a seqüência RGD (Fig. 4.1) (Hostetter, 1999, 2000; Bae *et al.*, 2007).



**Figura 4.1: Adesão mediada por RGD.** (A) Proteínas da superfície de fungos interagem com substrato contendo RGD (semi-círculos pretos) na superfície da célula hospedeira. (B) Proteínas de superfície de célula fúngica contendo a seqüência RGD (estruturas ovais em preto) são reconhecidas pela estrutura heterotrimérica de integrinas na célula hospedeira. Adaptação: Hostetter (2000).

## 2. Proteína Dfg5p

Dfg5p (proteína deficiente para o crescimento filamentoso 5) é uma enzima pertencente à família glicosil hidrolase 76 (GH76, CAZy) e encontra-se associada à membrana plasmática (PM) e à parede celular em *C. albicans* (Spregnini *et al.*, 2003). Esta proteína foi primeiro descrita por Mösch & Fink (1997) quando relatou, durante um rastreamento de mutantes apresentando defeito para crescimento filamentoso, que o nocaute gênico de *DFG5* era prejudicial também para a polaridade e alongamento celular em *S. cerevisiae*.

Seqüências dos homólogos Dfg5p e Dcw1p (parede celular defeituosa) foram encontradas posteriormente no banco de dados genômico de *S. cerevisiae* em pesquisas por proteínas homólogas à manosidases de outros organismos. Estudos com mutantes para estes genes mostraram viabilidade para as células contendo deleção individual de *DFG5* e de *DCW1*, e letalidade para o rompimento duplo de *dcw1Δdfg5Δ*, indicando, portanto que as funções destes produtos gênicos são redundantes, e que pelo menos um deles é requerido para o crescimento celular (Kitagaki *et al.*, 2002). Além disso, células deficientes em Dfg5p e Dcw1p apresentaram muitas características fenotípicas semelhantes ao mutante *gas1Δ*, cujo produto gênico está envolvido com o remodelamento da CW. Dentre as semelhanças foi observado elevado conteúdo de quitina, liberação da proteína Cwp1 no meio de cultura e células com morfologia arredondadas e maiores (Ram *et al.*, 1998; Kitagaki *et al.*, 2002). Por outro lado, também se verificou um perfil fenotípico contrário para os mutantes *dcw1Δ* (sensibilidade aumentada para zimoliase e normal para Calcofluor white) e *gas1Δ* (resistência a zimoliase e hipersensibilidade a Calcofluor white) quando submetido a agentes que geram perturbações na parede celular (Ram *et al.*, 1998; de Nobel *et al.*, 2000; Kitagaki *et al.*, 2002). Estes achados indicam que os genes *DCW1/DFG5* e *GAS1* estão provavelmente envolvidos no remodelamento da parede celular, mas em passos diferentes (Ram *et al.*, 1998; Kitagaki *et al.*, 2002).

Estudos com mutantes em *C. albicans* indicam que Dfg5p e Dcw1p compartilham uma função essencial e requerida para o crescimento, uma vez que células ausentes de ambos os produtos gênicos mostraram-se inviáveis. Além das funções anteriormente citadas, observou-se que Dfg5p de *C. albicans* é necessária para formação de hifa em condições alcalinas e requerida para expressão de *HWPI*, gene hifa-específico, o que sugere que Dfg5p funciona em alguma via como um regulador do desenvolvimento de hifa nesse fungo (Spreghini *et al.*, 2003). Hwp1p é uma adesina de *C. albicans* que participa na formação de biofilme (Nobile *et al.*, 2006).

Estudos têm mostrado que genes envolvidos na síntese da parede celular em *S. cerevisiae* são transcritos diferencialmente em fases diferentes de crescimento (Smits *et al.*, 1999; Bähler, 2005). Entre os genes envolvidos na biossíntese da parede celular, aqueles requeridos para o crescimento e proliferação são transcritos durante a fase exponencial (Zhao *et al.*, 1998), enquanto aqueles requeridos para proteção contra o meio ambiente e para sobrevivência são transcritos na fase estacionária (Shimoi *et al.*, 1998; Werner-Washburne *et al.*, 1993, 1996). Assim, foi encontrado que, em *S.*

*cerevisiae*, os níveis de RNA mensageiro de *DCW1* e *DFG5* foram abundantes na fase G1 e S, respectivamente e na fase exponencial do ciclo celular (Kitagaki *et al.*, 2004). Corroborando com estes resultados, foi verificado que mutantes para estes genes estavam envolvidos no crescimento e formação da parede celular do broto pela observação de três fenótipos nos mutantes: (i) parada do crescimento do broto, (ii) brotos com parede celular defeituosa, como observado pelo acúmulo de quitina e (iii) ciclo celular interrompido depois da replicação do DNA e antes da separação do SPB. Uma possível explicação para esse fenômeno seria o “ponto de checagem da parede celular”, descrito por Suzuki *et al.* (2004), que faz monitoramento do progresso da síntese da parede celular e acopla a síntese da parede celular à mitose (Kitagaki *et al.*, 2004).

## Research Article

# Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* PbDfg5p, a cell-wall protein implicated in filamentous growth

Nadya da Silva Castro<sup>1</sup>, Mônica Santiago Barbosa<sup>1</sup>, Zilma Alves Maia<sup>1</sup>, Sonia Nair Bão<sup>2</sup>, Maria Sueli Soares Felipe<sup>3</sup>, Jaime Martins Santana<sup>4</sup>, Maria José Soares Mendes-Giannini<sup>5</sup>, Maristela Pereira<sup>1</sup> and Célia Maria de Almeida Soares<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, 74001-970, Goiânia, Goiás, Brazil

<sup>2</sup>Laboratório de Microscopia Eletrônica, Universidade de Brasília, Brazil

<sup>3</sup>Laboratório de Biologia Molecular, Universidade de Brasília, Brazil

<sup>4</sup>Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas, Universidade de Brasília, Brazil

<sup>5</sup>Laboratório de Micologia Clínica, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, São Paulo, Brazil

\*Correspondence to:

Célia Maria de Almeida Soares,  
Laboratório de Biologia  
Molecular, ICB II, Campus II,  
Universidade Federal de Goiás,  
74001-970,  
Goiânia-Goiás, Brazil.  
E-mail: celia@icb.ufg.br

## Abstract

The dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* is the causative agent of the most frequent systemic mycosis in Latin America. In humans, infection starts by inhalation of fungal propagules, which reach the pulmonary epithelium and differentiate into the yeast parasitic phase. Here we describe the characterization of a Dfg5p (defective for filamentous growth) homologue of *P. brasiliensis*, a predictable cell wall protein, first identified in *Saccharomyces cerevisiae*. The protein, the cDNA and genomic sequences were analysed. The cloned cDNA was expressed in *Escherichia coli* and the purified rPbDfg5p was used to obtain polyclonal antibodies. Immunoelectron microscopy and biochemical studies demonstrated the presence of PbDfg5p in the fungal cell wall. Enzymatic treatments identified PbDfg5p as a  $\beta$ -glucan linked protein that undergoes N-glycosylation. The rPbDfg5p bound to extracellular matrix components, indicating that those interactions could be important for initial steps leading to *P. brasiliensis* attachment and colonization of host tissues. The *P. brasiliensis* *dfg5* nucleotide and deduced protein, PbDfg5p, sequences reported in this paper had been submitted to the GenBank database under Accession Nos AY307855 (cDNA) and DQ534495 (genomic). Copyright © 2007 John Wiley & Sons, Ltd.

**Keywords:** *Paracoccidioides brasiliensis*; Dfg5p; glycoprotein; cell wall

Received: 7 February 2007

Accepted: 11 October 2007

## Introduction

The defective for filamentous growth protein Dfg5p is classified as a member of the glycosyl hydrolase family 76 and presents homology to mannosidases, which mediate random hydrolysis of 1,6- $\alpha$ -D-mannosidic linkages in unbranched 1,6-mannans. Studies had shown that Dfg5p and its homologous defective cell wall protein (Dcw1p) of *Saccharomyces cerevisiae* are required for cell growth and cell wall biogenesis and are localized

in the membrane fraction, including the cell surface (Kitagaki *et al.*, 2002). In addition, Dcw1p and Dfg5p had been implicated in *S. cerevisiae* bud formation through their involvement in biogenesis of the bud cell wall (Kitagaki *et al.*, 2004). It has been recently demonstrated that alkaline stress activates Slr2, the MAP kinase cascade component, resulting in increase in the repression of several genes related to cell wall biogenesis, such as *dfg5*, and that mutation of the *dfg5* gene results in yeast cells growing poorly at pH 7.8 (Serrano *et al.*,

2006). Moreover, the Dfg5p of *Candida albicans* is required for hypha formation at alkaline pH and is found in the cell membrane and cell wall extract fractions (Spreghini *et al.*, 2003).

The cell walls of many ascomycetes consist of an internal network of stress-bearing polysaccharides in which cell wall proteins (CWPs) can be covalently bound (De Groot *et al.*, 2005). In *S. cerevisiae*, three types of covalently linked CWPs have been described. The major class, GPI-CWP (GPI, modified cell wall protein; GPI, glycosylphosphatidylinositol) is covalently linked to  $\beta$ -1,6-glucan through a trimmed form of their original GPI-anchor. The  $\beta$ -1,6-glucan can be further linked to  $\beta$ -1,3-glucan or chitin, resulting in a strong covalent attachment of GPI-CWPs to the cell wall (Kapteyn *et al.*, 1996, 1997; Kollar *et al.*, 1997). A second class of proteins, which includes the PIR-CWP (protein with internal repeats), is directly linked to the cell wall  $\beta$ -1,3-glucan networks, through a mild-alkali-sensitive linkage (ASL) (Kandasamy *et al.*, 2000; Kapteyn *et al.*, 1999; Kapteyn *et al.*, 2000; Mrsa *et al.*, 1997; Toh-e *et al.*, 1993). This ASL was recently found to involve specific glutamine residues (Ecker *et al.*, 2006). Moreover, a new type of covalently linked CWPs designated 'alkali-sensitive linkage' cell wall proteins (ASL-CWPs) was described in the cell wall of both *C. albicans* and *S. cerevisiae*, which contain proteins that do not show homology to PIR-proteins but are covalently linked through an mild alkali-sensitive bond (De Groot *et al.*, 2004; Yin *et al.*, 2005).

*Paracoccidioides brasiliensis* is a thermomorphous fungus causing paracoccidioidomycosis (PCM), the most prevalent human systemic mycosis in Latin America. The fungus grows either as a multicellular mycelium at 22–26 °C or as multinucleated yeast at 36 °C. Airborne propagules of mycelial phase initiate the infection after inhalation and reach the lung alveoli. Subsequently these fungal elements undergo differentiation into the yeast phase, the parasitic form of *P. brasiliensis*. The infection, which starts in the lung, may progress to eventual metastases in other tissues and organs (Franco *et al.*, 1993).

In *P. brasiliensis*, the cell wall composition, mainly the polysaccharides, varies according to the morphological fungal phase (Kanetsuna and Carbonell, 1970). Yeast and mycelia forms present chitin as a common structural polysaccharide

(Kanetsuna *et al.*, 1969). The chitin content in the cell wall of *P. brasiliensis* yeast form (37–48%) is higher than in the mycelium (7–18%) cell wall (San-Blas and San-Blas, 1977).  $\alpha$ -1,3-Glucan is the major cell wall neutral polysaccharide constituent of the yeast phase (San-Blas *et al.*, 1977) and there are amounts (up to 5%) of  $\beta$ -1,3-glucan. The latter polymer is the only glucan present in the mycelium cell wall (Davila *et al.*, 1986; San-Blas *et al.*, 1987). Low amounts of galactose and mannose were also observed in the cell wall of the mycelium (molar ratio, glucose : galactose : mannose = 1 : 0.3 : 0.6). The mycelium cell wall proteins contained 12 times more disulphide linkages than its yeast counterpart (Kanetsuna *et al.*, 1969, 1972). The total lipid content of yeast cells is twice more than in the mycelium phase (Manocha, 1980).

We are interested in the *P. brasiliensis* cell wall for several reasons. First, it may play a role in morphogenesis, since *P. brasiliensis* produces distinct types of cells, which differ in cell wall architecture and composition, as cited above. Second, the cell wall is continuously in contact with the host and acts as a sieve and reservoir of molecules such as adhesins (Barbosa *et al.*, 2006). Finally, as an essential pathogen-specific structure, the cell wall is conceptually attractive as a target for drugs or vaccine therapy. In the present study we report the cloning and characterization of the cDNA and gene encoding the homologue of Dfg5p in *P. brasiliensis*. The cloned gene was expressed in *Escherichia coli* and the purified recombinant defective for filamentous growth protein (rPbDfg5p) was used to elicit humoral response in mice. The specific antibody was also reactive with Dfg5p in *P. brasiliensis* cells by Western blotting. Immuno-electron microscopy and Western blot analysis demonstrated that PbDfg5p is present in the cell wall of the yeast phase of *P. brasiliensis*. Endoglycosidase H digestion showed that PbDfg5p undergoes N-linked glycosylation. In addition,  $\beta$ -1,3-glucanase treatment indicated that PbDfg5p is linked to the glucan network in the fungal cell wall. Computational analysis demonstrated that the PbDfg5p has an integrin-like RGD (amino acid sequence Arg–Gly–Asp) motif. Furthermore, we demonstrated that rPbDfg5p binds laminin, fibronectin and types I and IV collagen and is reactive with the sera of PCM patients but not with control sera.

## Dfg5 protein of *Paracoccidioides brasiliensis*

It should be postulated that *PbDfg5p* plays a role in *P. brasiliensis*–host cell interactions.

### Materials and methods

#### Microorganism growth and cultivation

The cells of *P. brasiliensis* isolate *Pb01* (ATCC MYA 826) were grown at 36 °C for the yeast phase and at 22 °C for mycelium in Fava Netto's medium, as described (Barbosa *et al.*, 2006).

#### Extraction of nucleic acids from *P. brasiliensis*

*P. brasiliensis* yeast cells were harvested, washed and frozen in liquid nitrogen. Grinding with a mortar and pestle broke the cells, and the genomic DNA was obtained according to Del Sal *et al.* (1989). Total RNA was obtained from the mycelium and yeast cells using the Trizol method (Invitrogen, CA, USA).

#### Cloning of the cDNA and genomic sequences encoding *PbDfg5p*

The amplification of a partial DNA fragment encoding a mannosyltransferase of *P. brasiliensis* (GenBank Accession No. AF374353), using sense (5'-TCAAACAGGAGCTCGCCATGTAA-3', nucleotides 565–587) and antisense (5'-ACTCGTCGGCAGAGTCGTCAGT-3', nucleotides 1374–1395) primers, using the Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), resulted in a product of 831 bp additional to the predicted DNA fragment, which was further characterized as a homologue of *dfg5*. A *P. brasiliensis* isolate, *Pb01*, yeast cDNA library, constructed in *EcoRI* and *XhoI* sites of Lambda ZAP II (Stratagene, La Jolla, CA, USA) (Felipe *et al.*, 2003), was screened with the PCR probe described above. Plating of the  $5 \times 10^6$  plaque-forming units (pfu), DNA transfer to membranes and hybridization were performed as described in standard procedures (Sambrook and Russell, 2001). Two positives clones were obtained and phage particles were released from the plaques. The *in vivo* excision of pBluescript phagemids (Stratagene) carrying the cloned insert in the *E. coli* XL-1 Blue cells was performed. Automated DNA sequencing was performed for the two clones.

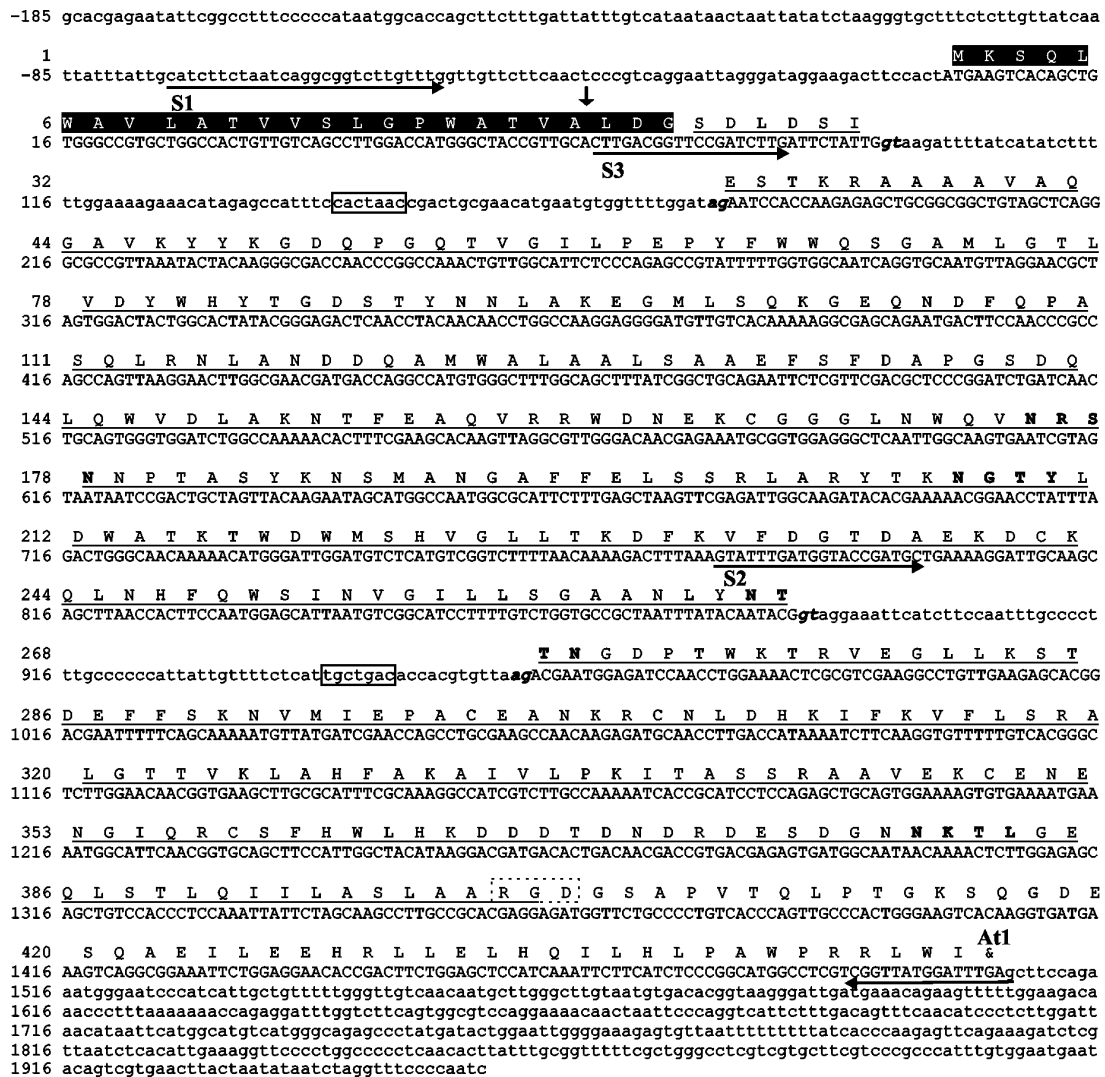
The genomic sequence encoding *Dfg5p* was obtained by PCR, using the total DNA of *P. brasiliensis* as a template. Primers were designed based on the cDNA sequence, as follows: sense (S1) primer (5'-CATCTTCTAATCAGGCGGTCT-TGTTTG-3') and antisense (At1) (5'-CTCAAATC-CATAACCG-3'). The PCR reaction was performed with 10 ng total DNA of *P. brasiliensis*, and the amplified PCR product of 1582 bp was gel-purified, subcloned into pGEM-T-Easy vector (Promega, Madison, WI, USA). Three clones were selected and sequenced on both strands.

#### DNA sequencing and sequence analysis

DNA sequencing was performed by using a MegaBACE 1000 sequencer (GE Healthcare, Amersham Biosciences) for automated sequence analysis. The cDNA and genomic DNA sequences were translated and compared to all non-redundant polypeptides in the translated NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) database. The PROSITE (<http://us.expasy.org/prosite>) and Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>) databases were used for the analysis of the deduced protein.

#### Expression and purification of the recombinant *PbDfg5p*

*SalI* and *NotI* restriction sites were introduced into the oligonucleotides prior to amplify a 1282 bp cDNA fragment of the *dfg5* gene, which encodes amino acids 23–448 (predicted mature protein; see Figure 1). The PCR product was subcloned into the *SalI/NotI* sites of pGEX-4T-3 (GE Healthcare). The plasmid was sequenced in both strands and used to transform the *E. coli* DH5 $\alpha$ . The transformant cells were grown at 37 °C, induced with 0.4 mM isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) and the bacterial extract was pelleted and resuspended in phosphate-buffered saline (PBS 1 $\times$ ). Afterward, the cells were sonicated in PBS 1 $\times$  containing 5 mM DTT (dithiothreitol) and 0.3% v/v Sarcosyl at 4 °C. The sonicated cells were pelleted and resuspended in PBS 1 $\times$  containing 0.6% v/v Triton X-100. The fusion protein was purified using glutathione-sepharose 4B (GE Healthcare) at 4 °C and subsequently cleaved by the addition of thrombin protease (50 U/ml).



**Figure 1.** Nucleotide sequences of the cDNA of the gene and the deduced amino acids of *PbDfg5p*. Nucleotide and amino acid numbers are shown on the left. The intron sequences are represented in lower case. Primers S1, S2, S3 and At1 are underlined. Nucleotides in bold italics represent the conserved 5' and 3' consensus of the introns. The putative splice boxes in the intron sequences are marked by rectangles. The amino acid sequence is shown above the nucleotide sequence by a single letter code. White letters and black block indicate the predicted signal peptide, and the putative signal peptide cleavage site of the deduced *PbDfg5p* is indicated between A<sup>22</sup> and L<sup>23</sup> by an arrow. The underlined amino acid residues represent the conserved domain of the glycosyl hydrolase family 76. The putative *N*-glycosylation sites are indicated by bold amino acids. A predicted cell attachment sequence (RGD) is enclosed by dotted rectangle

### Antibody production

The purified recombinant *PbDfg5p* was used to generate specific mouse polyclonal serum. Mouse preimmune serum was obtained and stored at -20 °C. The purified protein (300 µg) in its denatured state was injected into a mouse with Freund's adjuvant three times at 2-week intervals. The

obtained serum, containing anti-r*PbDfg5p* polyclonal antibody, was sampled and stored at -20 °C.

### Southern blot analysis

Total DNA, 30 µg, was digested with the restriction enzymes *Xho*I, *Eco*RV, *Sal*I and *Dra*I. Standard conditions for electrophoresis were used (Sambrook and Russell, 2001). The complete *Pbdfg5*



## Dfg5 protein of *Paracoccidioides brasiliensis*

ORF was labelled using the Gene Images random prime labelling module (GE Healthcare). The membranes were washed in high-stringency conditions [60 °C, 1.0× SSC (0.15 M NaCl, 0.015 M sodium citrate), 0.1% w/v SDS and 0.5× SSC, 0.1% w/v SDS]. Hybridization was detected using the Gene Images CDP-star detection module (GE Healthcare).

### Semi-quantitative RT-PCR analysis

cDNAs were synthesized by reverse transcription, using the Superscript II RNase H<sup>-</sup> reverse transcriptase (Invitrogen). The cDNA was used for PCR in 30 µl reaction mixture containing specific sense (S2) (5'-GTATTTGATGGTACCGATGC-3') and antisense (At1) (5'-CTCAAATCCATAACCG-3'), rendering a fragment of 659 bp. A second primer pair (sense, 5'-CAAGACTCCAGGCGGC-AAC-3', and antisense, 5'-GCACCGCCATGACT-GACG-3'), which amplified a 398 bp cDNA fragment of the L34 protein of *P. brasiliensis* (Bailão *et al.*, 2006), was included as control.

### Preparation of *P. brasiliensis* total cell extracts

*P. brasiliensis* yeast and mycelium protein crude extracts were obtained by disruption of frozen cells in the presence of protease inhibitors: 50 µg/ml N $\alpha$ -p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK), 1 mM 4-chloromercuribenzoic acid (PCMB), 20 mM leupeptin, 20 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) and 5 mM iodoacetamide in homogenization buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.8, 2 mM CaCl<sub>2</sub>). The mixture was centrifuged at 12 000 × g at 4 °C for 10 min, and the supernatant was used for further analysis of proteins.

### Transmission electron microscopy of *P. brasiliensis* yeast cells and immunocytochemistry of the Dfg5p

For the ultrastructural and immunocytochemistry studies, we employed the protocols previously described in Barbosa *et al.* (2006). The ultrathin sections were incubated for 1 h with the polyclonal antibody against the recombinant PbDfg5p (diluted 1:100). After washing, the grids were incubated for 1 h with the labelled secondary antibody (anti-mouse IgG, Au-conjugated, 10 nm average size; 1:20 diluted). The grids were observed with a Jeol 1011 transmission electron microscope

(Jeol, Tokyo, Japan). Controls were incubated with mouse preimmune serum (1:100 diluted).

### Cell wall protein extractions and enzymatic treatments

Yeast cells were frozen in liquid nitrogen and disrupted using a pestle and mortar. This procedure was carried out until complete cell rupture, verified by microscopic analysis, and by the failure of cells to grow on Fava Netto's medium. Ground material was lyophilized, weighed and resuspended in 25 µl Tris buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.8) for each milligram of dry weight, as described by Damveld *et al.* (2005). The supernatant was separated from the cell wall fraction by centrifugation at 10 000 × g for 10 min at 4 °C. A new protein extraction was performed with Tris buffer as described above. To remove non-covalently linked proteins and intracellular contaminants, isolated cell wall fraction was washed extensively with 1 M NaCl and boiled three times in SDS-extraction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 2% w/v SDS, 100 mM Na-EDTA, and 40 mM  $\beta$ -mercaptoethanol) and pelleted after the extractions by centrifugation at 10 000 × g for 10 min (Montijn *et al.*, 1994). The washed pellet containing the cell wall-enriched fraction was washed six times with water, lyophilized and weighed. The cell wall fraction, prepared as described above, was incubated with the recombinant endo- $\beta$ -1,3-glucanase (Qbiogene; Morgan Irvine, CA, USA) (1500 U/mg dry weight of cell walls) at 25 °C overnight, according to the description of Spreghini *et al.* (2003). Part of lyophilized cell wall fraction, prepared as described above, was resuspended in 10× pellet volume in 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.5, containing PMSF, and treated with endoglycosidase H (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; 8 mU/µg of protein extract) for 2 h at 37 °C.

### Immunoblot assay and reactivity of the recombinant PbDfg5p with human sera

The purified rPbDfg5 protein was electrophoretically separated and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were blocked with 5% PBS-milk and used to test the reactivity of six serum samples of paracoccidioidomycosis patients. Human control sera obtained from healthy individuals were also used in the immunoblot assays.

### Western blotting analysis

SDS-PAGE was performed in 12% polyacrylamide gels according to Laemmli (1970). The proteins were electrophoresed and stained with Coomassie brilliant blue or transferred to a nylon membrane and checked by Ponceau S to determine equal loading. *P. brasiliensis* Dfg5p, as well as the recombinant protein, were detected with the polyclonal antibody raised against the recombinant protein (diluted 1:250). Reactions were also performed with sera from patients with PCM and from control individuals (diluted 1:500). After reaction with alkaline phosphatase anti-mouse immunoglobulin G (IgG) or alkaline phosphatase anti-human IgG, the reaction was developed with 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate–nitroblue tetrazolium (BCIP–NBT).

### Affinity ligand assays

Far-Western assays were carried out as previously described (Guichet *et al.*, 1997; Barbosa *et al.*, 2006). Recombinant *PbDfg5p* was submitted to SDS-PAGE and blotted onto nitrocellulose membrane. The membranes were incubated with 30 µg/ml laminin, 30 µg/ml fibronectin, 20 µg/ml type I or IV collagen for 90 min. The membranes were incubated for 1 h with rabbit antibodies (Sigma-Aldrich) antilaminin, antifibronectin, or mouse antibodies (Sigma-Aldrich) anti-type I and IV collagen (diluted 1:100). Sequentially, the blots were incubated with peroxidase-labelled goat anti-rabbit IgG (diluted 1:1000) or peroxidase-labelled goat anti-mouse IgG (Santa Cruz Biotechnology). The reactive bands were developed with hydrogen peroxide and diaminobenzidine (Sigma-Aldrich) as the chromogenic reagent. Controls were obtained.

### Effect of RGD synthetic peptide in the interactions assays

*rPbDfg5p* was fractionated by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. Immunoblotting analysis was carried out and membrane strips were blocked for 4 h and then probed with laminin (30 µg/ml). Laminin was co-incubated with RGD (Sigma; 100 µg/ml) for 90 min prior to the reaction with the *rPbDfg5p* strip. The membrane strips were washed and then incubated for 2 h with rabbit anti-laminin antibody (1:100). The membranes were incubated with goat anti-rabbit

IgG peroxidase conjugate diluted 1:2000. Peroxidase activity was detected as described.

## Results and discussion

### Identification of the cDNA and the gene encoding *PbDfg5p* and characterization of the deduced amino acid sequence

In this study we identified a new gene of *P. brasiliensis*, designated *dfg5*. The complete cDNA encoding the homologue of *P. brasiliensis* Dfg5p presented 2006 nucleotides in length and contained 185 bases at the 5' UTR (untranslated region), as shown in Figure 1. The open reading frame was 1344 bp in length and coded for a 448 amino acid protein. The ATG codon at base 186 encoded the presumed initiation methionine that was in the appropriate position of a consensus translation start codon (Kozak, 1986). The cDNA included 450 bp in the 3' UTR, exclusive of the poly-A tail. The stop codon TGA was located at position 1530. The complete genomic sequence was obtained by PCR amplification and was compared to the cDNA. The *Pbdfg5* presented introns, a characteristic of the *P. brasiliensis* ORFs sequenced so far. The genomic sequence included two introns, of 85 and 74 bp, at positions 95–179 and 887–960. All the intron–exon boundaries conformed to the basic consensus GT/AG for eukaryotic splice donor and acceptor sites (Breathnach and Chambon, 1981) and presented a putative splice box, which matched the filamentous fungus consensus sequence (NNCTPuAPy) located at the 3' terminus of the introns (Gurr *et al.*, 1987).

Sequence analysis of the deduced *P. brasiliensis* Dfg5p, performed by PSORT, revealed that 22 amino acids at the N terminus presented the characteristics of a signal peptide with a predicted cleavage site between A<sup>22</sup> and L<sup>23</sup>, as shown in Figure 1. A search of the PROSITE database showed the presence of a domain characteristic of the glycosyl hydrolase family 76 in *PbDfg5p*. Of special note was the presence of a putative cell attachment sequence RGD at positions 400–402 in the *PbDfg5p*. Moreover, four N-glycosylation sites, at amino acid positions 175, 207, 266 and 380, were predicted by protein sequence analysis, using the PROSITE algorithm (Figure 1). The translated amino acid sequence predicted a protein with a molecular mass around 49 kDa. A Blastp pairwise

## Dfg5 protein of *Paracoccidioides brasiliensis*

comparison of the deduced *PbDfg5p* exhibited 33% identity and 51% similarity to *S. cerevisiae* Dfg5p, and 35% identity and 52% similarity to *C. albicans* Dfg5p. Also, 37% and 57% of identity and similarity, respectively, to *S. cerevisiae* Dcw1p and 35% and 51% similarity to *C. albicans* Dcw1p were observed. The alignment of *PbDfg5p* with the cited sequences is shown in Figure 2. It has been pointed out that Dfg5p and Dcw1p are homologous to each other (about 50% of amino acid identity) and both present homology to  $\alpha$ -1,6-mannosidase (Kitagaki *et al.*, 2002; Spreghini *et al.*, 2003).

### Expression and purification of the recombinant *PbDfg5p* and production of polyclonal antibody

The cDNA encoding the *P. brasiliensis* Dfg5p was subcloned into the expression vector pGEX-4T-3 to obtain the recombinant fusion protein. After induction with IPTG, a 75 kDa recombinant protein was detected in bacterial lysates (Figure 3A, lane 2). The predicted molecular size of the recombinant protein included the vector-encoded fusion peptide of 26 kDa at its *N*-terminus. The fusion protein was purified using glutathione-sepharose-4B and cleaved by the addition of thrombin protease to remove the 26 kDa GST (Figure 3A, lanes 3 and 4). As observed, the cleaved recombinant protein migrated as a ca. 49 kDa species in SDS-PAGE (Figure 3A, lane 4).

The purified recombinant protein was used to generate polyclonal antibody. *P. brasiliensis* total yeast cells proteins extracts and the fused and the purified recombinant protein were subjected to SDS-PAGE analysis, blotted onto nitrocellulose membrane and reacted to the polyclonal antibody (Figure 3B). As demonstrated, the polyclonal antibody recognized a single protein species of ca. 75 kDa in *P. brasiliensis* yeast cell extracts (Figure 3B, lane 1). The antibody was also reacted with the fusion protein (Figure 3B, lane 2). The cleaved protein was detected as a species of ca. 49 kDa (Figure 3B, lane 3). No cross-reactivity to the mouse preimmune serum was evidenced with the same samples (Figure 3C, lanes 1–3). The produced polyclonal antibody seems to be specific to *P. brasiliensis*, since it does not recognize any protein species in *S. cerevisiae* cellular extracts (data not shown).

Although the predicted molecular mass of *PbDfg5p* was ca. 49 kDa, we detected in immuno-

blot assays a protein species of 75 kDa, suggesting post-translational modification of the native protein. This aspect will be further investigated in this study.

### Genomic organization of *Pbdfg5* and expression analysis

The genomic organization of *Pbdfg5* was investigated by Southern blot analysis. Total DNA was digested with the restriction endonucleases *Xho*I, *Eco*RV, *Sal*I and *Dra*I. Southern blot analysis using the cDNA insert under high-stringency conditions was able to detect a single DNA fragment in the *P. brasiliensis* DNA digested with the restriction enzymes *Xho*I, *Eco*RV and *Sal*I (Figure 4A, lanes 1–3). *Dra*I digestion produced fragments consistent in number with the single restriction site presumed to occur in *Pbdfg5* (Figure 4A, lane 4). The obtained restriction profiles indicated that the *P. brasiliensis* genome contained a single copy of the *Pbdfg5* gene.

The expression of *Pbdfg5* in both the saprobe and parasitic phases of *P. brasiliensis* was investigated. The transcript is more abundant in yeast than in mycelium form, as demonstrated in sq-RT-PCR analysis (Figure 4B). A second oligonucleotide pair, which amplified a fragment (398 bp) of the ribosomal protein L34 of *P. brasiliensis*, was included as control (Bailão *et al.*, 2006). Protein crude extracts of mycelium and yeast were subjected to Western blot analysis (Figure 4C). As demonstrated, a single protein species of 75 kDa was detected in extracts of both mycelium and yeast (Figure 4C, lanes 1 and 2). The results presented here suggest that *Pbdfg5* is preferentially expressed in the yeast phase of *P. brasiliensis* and reinforce the presence of only one gene in the fungus genome.

### Detection of *PbDfg5p* by immuno-electron microscopy of *P. brasiliensis* yeast cells

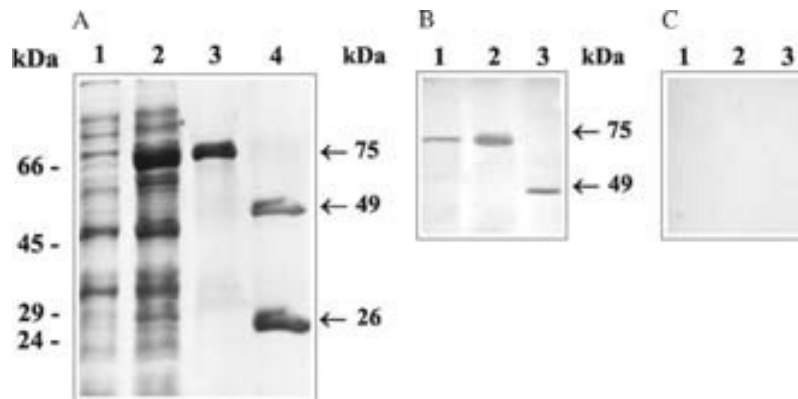
In order to define the cellular localization of the Dfg5p in *P. brasiliensis*, we performed immunocytochemistry experiments using the anti-r*PbDfg5p* antibody. Electron microscopy of conventionally embedded cells revealed the ultrastructure of *P. brasiliensis* yeast cells (Figure 5A). Gold particles were detected in the cytoplasm and extending through the cell wall, indicating the double localization of the Dfg5p in *P. brasiliensis*



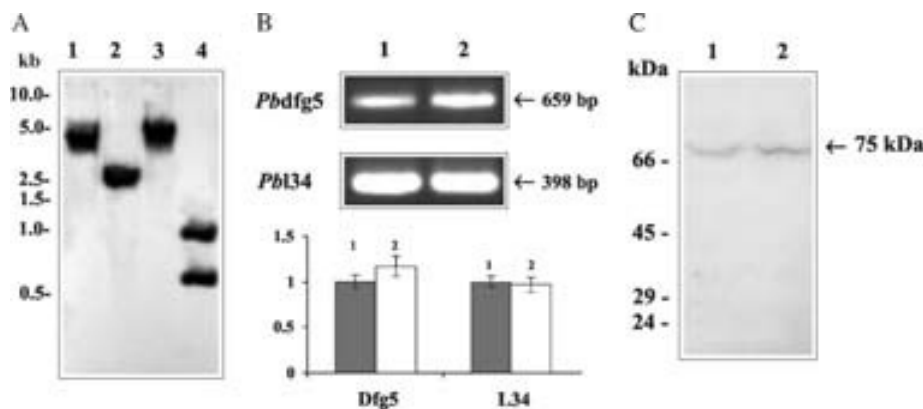
**Figure 2.** Clustal X alignment of *P. basiliensis* Dfg5p and homologues. The sequences of reported Dfg5p of *S. cerevisiae* (ScDfg5p; GenBank NP\_013965), Dfg5p of *C. albicans* (CaDfg5p; GenBank XP\_719646), Dcw1p of *S. cerevisiae* (ScDcw1p; GenBank NP\_012878) and Dcw1p of *C. albicans* (CaDcw1p; GenBank XP\_719567) were compared to the translated full-length ORF of the *dfg5* gene of *P. brasiliensis* (PbDfg5p). Asterisks indicate conserved amino acid residues. Double and single dots denote a decreasing order of matching similarity between each corresponding amino acid pair

(Figure 5B, C). The presence in the deduced protein of a conventional *N*-terminus signal peptide, which is responsible for introducing proteins into the secretion pathway (Conesa *et al.*, 2001; Muesch

### Dfg5 protein of *Paracoccidioides brasiliensis*



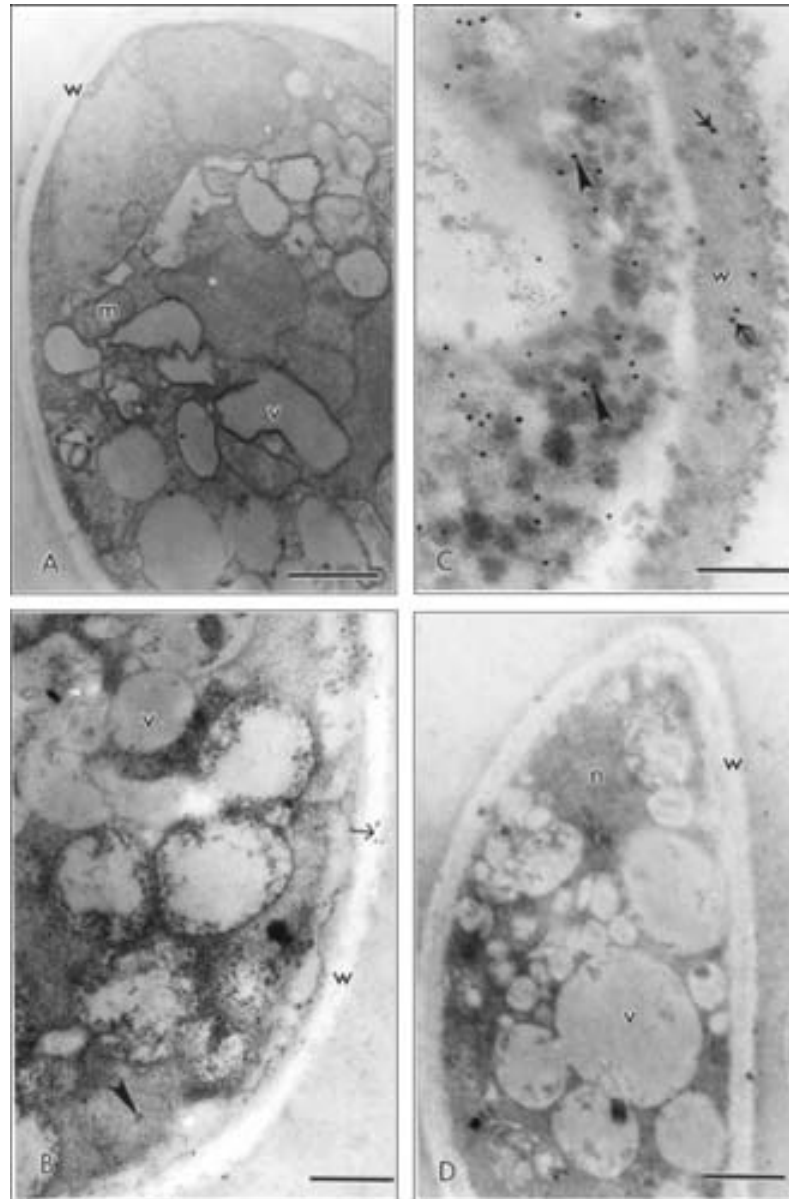
**Figure 3.** Expression and purification of the recombinant *PbDfg5p* and generation of mouse polyclonal antibody. (A) SDS-PAGE analysis of *P. brasiliensis* recombinant *Dfg5p*. *E. coli* cells harbouring the pGEX-4T-3-*dfg5* plasmid were grown to  $A_{600} = 0.6$  and harvested before (lane 1) or after (lane 2) 2 h incubation with IPTG (0.4 mM). The cells were lysed by sonication. Lane 3, the affinity-isolated recombinant *PbDfg5p*; lane 4, the recombinant fusion protein was cleaved by thrombin digestion. Electrophoresis was carried out on 10% SDS-PAGE and the proteins stained by Coomassie blue R-250. (B, C) Western blot analysis of the native and recombinant *PbDfg5p*. *P. brasiliensis* yeast cell extracts were fractionated by one-dimensional gel electrophoresis, blotted onto a nitrocellulose membrane and detected by using (B) the mouse polyclonal anti-r*PbDfg5p* antibody or (C) mouse preimmune serum. (B, C) Lanes 1, total protein extracts from yeast cells (30  $\mu$ g); lanes 2, the affinity-isolated recombinant GST-*PbDfg5p* (2.0  $\mu$ g); lanes 3, the recombinant fusion protein cleaved by thrombin (2.0  $\mu$ g). After reaction with the anti-mouse IgG alkaline phosphatase-coupled antibody (diluted 1 : 2000), the reaction was developed with BCIP-NBT. Arrows indicate the deduced molecular mass of the proteins. Molecular markers are indicated



**Figure 4.** Analysis of the *P. brasiliensis dfg5* gene organization, the levels of the transcript and the protein in developmental fungal phases. (A) Southern blot analysis for determination of the copy number of *P. brasiliensis dfg5* gene. Total DNA (30  $\mu$ g) was digested with restriction enzymes *Xho*I, *Eco*RV, *Sal*I and *Dra*I (lanes 1–4, respectively). The blot was hybridized to the labelled insert of the cDNA. The position of the size markers is indicated on the left. (B) Expression analysis of the of *Pbdfg5* transcript in mycelium (lane 1) and yeast cells (lane 2) of *P. brasiliensis* performed by semi-quantitative RT-PCR. Sq-RT-PCR analysis was carried out with specific primers, as described. Using varied cycle numbers, the exponential phase of amplification was determined and used to allow semi-quantitative analysis of the respective reactions. The transcript encoding the L34 protein of *P. brasiliensis* was included as control. Analyses of relative differences of the transcripts were made using the Scion Image Beta 4.03 program. Bars indicate SD of three independent experiments. (C) Western blot analysis of *P. brasiliensis Dfg5p*. Lane 1, protein crude extracts from mycelium (45  $\mu$ g); lane 2, protein crude extracts from yeast cells (45  $\mu$ g)

*et al.*, 1990), as well as the putative signal peptide cleavage site, indicates the probable protein route to the fungal cell wall. The presence of cytoplasmic

gold particles could be accounted for the protein trafficking to the cell surface, as described for *S. cerevisiae* (Harsay and Bretscher, 1995). The small



**Figure 5.** Immuno-electron microscopy detection of Dfg5p in *P. brasiliensis* yeast cells. (A) Transmission electron microscopy of *P. brasiliensis* yeast cells. (B, C) Gold particles (arrow) are observed at the fungus cell wall (w) and in the cytoplasm (arrowheads). (D) Negative control exposed to the mouse preimmune serum. Bars: (A) 1  $\mu\text{m}$ ; (B, D) 0.5  $\mu\text{m}$ ; (C) 0.2  $\mu\text{m}$

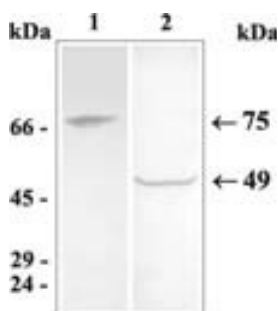
number of gold particles is indicative of a faint expression of the Dfg5p in cells of *P. brasiliensis*, corroborating the data presented in Figure 4C. This suggestion is also corroborated by the absence of the cognate transcript in the described transcriptome of *P. brasiliensis*, yeast and mycelium forms (Felipe *et al.*, 2005). No gold labels were detected in control experiments obtained by incubation of

the yeast cells with the mouse pre-immune serum (Figure 5D).

#### *PbDfg5p* treatment with $\beta$ -1,3-glucanase and endoglycosidase H

To continue to determine the subcellular distribution of Dfg5p, a cell wall-enriched fraction of

## Dfg5 protein of *Paracoccidioides brasiliensis*



**Figure 6.** Analysis of *PbDfg5p* localization and processing. Cell wall fraction was obtained and analysed by Western blotting with the anti-*rPbDfg5p* polyclonal antibody. Proteins obtained from the cell wall were extracted using  $\beta$ -1,3-glucanase digestion and analysed (lane 1). Part of glucanase extract was submitted to treatment with endoglycosidase H (lane 2)

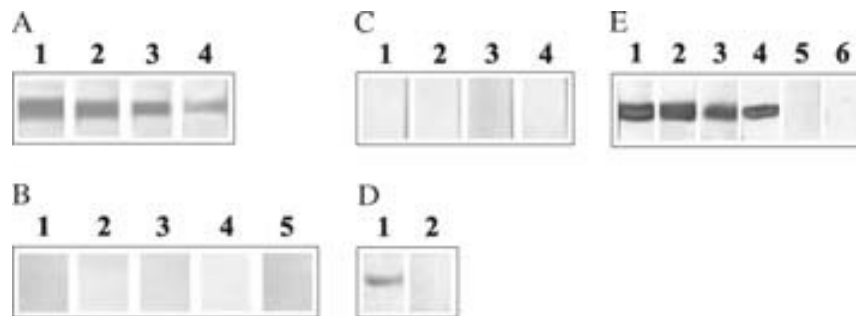
*P. brasiliensis* yeast cells was obtained. The cell wall fraction was analysed by Western blot analysis after treatment with Quantazyme (a recombinant endo- $\beta$ -1,3-glucanase; Figure 6, lane 1), using the polyclonal antibody against Dfg5p of *P. brasiliensis*. The Dfg5p of *P. brasiliensis* seems to be covalently linked to the cell wall through the glucan network. Two pieces of evidence corroborate this assertion. First, the protein was not present in the SDS-soluble fraction (data not shown). Second, treatment of the fungal cell wall with  $\beta$ -1,3-glucanase resulted in the liberation of *PbDfg5p* in the supernatant, as observed for Dfg5p of *C. albicans* (Spreghini *et al.*, 2003). It can be observed that the cell wall of *P. brasiliensis* yeast cells presents small amounts of  $\beta$ -1,3-glucan (Kanetsuma *et al.*, 1969).

Many cell surface proteins are modified by *N*-linked glycosylation. In the deduced *PbDfg5p*, we found four potential *N*-glycosylation sites at positions 175, 207, 266 and 380 (Figure 1). It is estimated that 90% proteins with the sequence *N*-X-S/T are glycosylated (Gavel and von Heijne, 1990). The apparent molecular mass (75 kDa) of the *PbDfg5* protein in *P. brasiliensis* yeast cell wall extracts (Figure 6, lane 1) is altered by digestion with endoglycosidase H, which removes *N*-linked carbohydrate residues, yielding a protein species of ca. 49 kDa, indicating that *PbDfg5p* undergoes *N*-linked glycosylation (Figure 6, lane 2). In agreement with our data, the homologue of Dfg5p of *C. albicans* is also a glycosylated protein (Spreghini *et al.*, 2003).

Although the Dfg5p of *C. albicans* and *S. cerevisiae* have features of GPI-linked cell surface proteins (Kitagaki *et al.*, 2002; Spreghini *et al.*, 2003), the *P. brasiliensis* cell wall treatment with HF-pyridine did not result in the liberation of the protein (data not shown), suggesting that *PbDfg5p* does not present a GPI anchor. This finding was consistent with extensive sequencing of the two clones encoding *PbDfg5p* and computational analysis of the deduced protein of *P. brasiliensis* using the fungal big-II predictor (Eisenhaber *et al.*, 2004; available at [http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi/gpi\\_fungi.html](http://mendel.imp.ac.at/gpi/fungi/gpi_fungi.html)), which did not indicate recognition sequences for GPI anchorage (data not shown). It has to be pointed out that identical nucleotide sequences were obtained by sequencing the two cDNA clones obtained by the screening of the *P. brasiliensis* cDNA library. According to our data, *PbDfg5p* was shown not to be a GPI-anchored protein. These data are in agreement with others found in *Aspergillus niger*, in which nine genes are described as members of the Dfg family and five of these genes do not code GPI-anchored proteins, since the *N*-terminal signal is absent or the *C*-terminal hydrophobic area is too short (Pel *et al.*, 2007).

### Binding of the recombinant *PbDfg5p* to extracellular matrix proteins and the reactivity to sera of PCM patients

The ability of the recombinant Dfg5p of *P. brasiliensis* to bind laminin, fibronectin and types I and IV collagen was determined by far-Western blotting assays, as shown in Figure 7A. The recombinant protein presents the ability of binding to laminin (lane 1), fibronectin (lane 2) and types I (lane 3) and IV (lane 4) collagen. The negative control was obtained by incubating the *rPbDfg5p* only with antilaminin, antifibronectin, anti-type I and IV collagen antibodies, in the absence of the extracellular matrix (ECM) proteins (Figure 7B, lanes 1–4). An additional negative control was obtained by incubating *rPbDfg5p* with peroxidase-labelled goat anti-rabbit immunoglobulin (Figure 7B, lane 5). The specificity of the binding of *rPbDfg5p* to the ECM proteins was also demonstrated by the binding assay of the ECM components to BSA (Figure 7C, lanes 1–4). No reactivity between BSA and the ECM proteins was demonstrated.



**Figure 7.** Binding of *P. brasiliensis* recombinant Dfg5p to extracellular matrix components and reactivity to PCM patients' sera. (A) The recombinant *PbDfg5p* (0.5  $\mu$ g) was subjected to SDS-PAGE and electroblotted. Membranes were reacted with laminin (lane 1), fibronectin (lane 2) and types I and IV collagen (lanes 3 and 4, respectively) and subsequently incubated with rabbit IgG antilaminin, antifibronectin, and mouse anti-type I and anti-type IV collagen antibodies, respectively. Use of peroxidase-conjugated anti-rabbit and anti-mouse IgG revealed the reactions. (B) Recombinant *PbDfg5p* (0.5  $\mu$ g) was subjected to SDS-PAGE and electroblotted. The membranes were incubated only with antilaminin, antifibronectin, anti-type I collagen and anti-type IV collagen antibodies (lanes 1, 2, 3 and 4, respectively) in the absence of the ECM proteins. Additional negative control was obtained by incubating the *rPbDfg5p* with peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (lane 5). (C) BSA (0.5  $\mu$ g) was subjected to SDS-PAGE and electroblotted. The membranes were reacted with laminin (lane 1), fibronectin (lane 2), types I and IV collagen (lanes 3 and 4) and subsequently incubated with rabbit IgG antilaminin, antifibronectin, and mouse anti-collagen type I and IV antibodies, respectively. Use of peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG revealed the reaction. (D) Influence of the RGD synthetic peptide on the binding of laminin to *rPbDfg5p* (lane 1, control; lane 2, laminin was co-incubated with the RGD peptide). After reaction with rabbit IgG antilaminin, the reaction was developed. (E) Reactivity of the *rPbDfg5p* to PCM patients sera. 1.0  $\mu$ g purified *rPbDfg5p* was electrophoresed and reacted to sera of PCM patients, diluted 1 : 100 (lanes 1–4) and to control sera, diluted 1 : 100 (lanes 5 and 6). After reaction to the anti-human IgG alkaline phosphatase-coupled antibody (diluted 1 : 2000), the reaction was developed with BCIP-NBT

Adhesion to the extracellular matrix of the host tissue is an indispensable initial step in microbial pathogens for colonization and establishing an infection. Multifunctional adhesins have been described at the surface of pathogens, including *P. brasiliensis* (Barbosa *et al.*, 2006; González *et al.*, 2005; Mendes-Giannini *et al.*, 2006). Corroborating the potential adhesin properties of *PbDfg5p* we demonstrated by far-Western assays that the recombinant protein recognized the ECM proteins laminin, fibronectin and types I and IV collagen.

Laminin, the main component of the basement membranes, seems to be important for *P. brasiliensis* adhesion (Mendes-Giannini *et al.*, 2006), playing a role in fungal dissemination and tissue invasion (Andreotti *et al.*, 2005; Vicentini *et al.*, 1994). Nevertheless, the fungal binding to laminin could occur during infection due to tissue injury, leading to the exposition of the laminin-rich basement membrane. We also demonstrated that *PbDfg5p* binds to the ECM component fibronectin. Studies had indicated that *P. brasiliensis* interacts with human fibronectin in the process of adhesion to host cells (Barbosa *et al.*, 2006; Mendes-Giannini *et al.*, 2006). The outer surface localization of

*PbDfg5p* lends critical support to the putative physiological role of this protein in binding fibronectin.

The deduced *PbDfg5p* presents a RGD motif similar to those involved in the binding of adhesins to integrins as the primary recognition sequence. Recent data suggested that yeast species and filamentous fungi not only employ RGD-mediated interactions to adhere to host tissues but also may express a subset of adhesins that themselves contain an RGD sequence (Hostetter, 1999, 2000). *PbDfg5p* expresses a RGD motif that could mediate adherence to the ECM proteins in an integrin-like fashion. To investigate the contribution of the RGD motif to the interaction of *PbDfg5p* with ECM proteins, the ability of the synthetic peptide RGD to inhibit the interaction with laminin was investigated (Figure 7D). As demonstrated, the attachment of the *rPbDfg5p* to laminin was found to be mediated by the integrin recognition RGD sequence (Figure 7D, lane 2), since in our experimental conditions the RGD peptide inhibited the protein interaction.

Four serum samples from *P. brasiliensis*-infected individuals and two serum samples from control individuals were reacted in immunoblot assays



## Dfg5 protein of *Paracoccidioides brasiliensis*

with 1.0 µg rPbDfg5p (Figure 7E). Strong reactivity was observed with sera of PCM patients (Figure 7E, lanes 1–4). No cross-reactivity was observed with control sera (Figure 7E, lanes 5–6). This result reinforces a predictable role of PbDfg5p in the fungus–host interaction.

### Acknowledgements

Zilma A. Maia and Nadya da S. Castro are fellows of Coordenação de Aperfeiçoamento de Ensino Superior (CAPES). This investigation at Universidade Federal de Goiás was financially supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Grant No. 505658/2004-6), FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos) and SECTEC-GO (Grant No. 01/04/0775/00).

### References

- Andreotti PF, Monteiro da Silva JL, Bailão AM, *et al.* 2005. Isolation and partial characterization of a 30 kDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect* **7**: 875–881.
- Bailão AM, Schrank A, Borges CL, *et al.* 2006. Differential gene expression by *Paracoccidioides brasiliensis* in host interaction conditions: representational difference analysis identifies candidate genes associated with fungal pathogenesis. *Microbes Infect* **8**: 2686–2697.
- Barbosa MS, Bao SN, Andreotti PF, *et al.* 2006. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. *Infect Immun* **74**: 382–389.
- Breathnach R, Chambon P. 1981. Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins. *Annu Rev Biochem* **50**: 349–383.
- Conesa A, Punt PJ, van Luijk N, van den Hondel CA. 2001. The secretion pathway in filamentous fungi: a biotechnological view. *Fungal Genet Biol* **33**: 155–171.
- Damveld RA, Arentshorst M, VanKuyk PA, *et al.* 2005. Characterization of CwpA, a putative glycosylphosphatidylinositol-anchored cell wall mannoprotein in the filamentous fungus *Aspergillus niger*. *Fungal Genet Biol* **42**: 873–885.
- Davila T, San-Blas G, San-Blas F. 1986. Effect of papulacandin B on glucan synthesis in *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol* **24**: 193–202.
- De Groot PW, de Boer AD, Cunningham J, *et al.* 2004. Proteomic analysis of *Candida albicans* cell walls reveals covalently bound carbohydrate-active enzymes and adhesins. *Eukaryot Cell* **3**: 955–965.
- De Groot PW, Ram AF, Klis FM. 2005. Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. *Fungal Genet Biol* **42**: 657–675.
- Del Sal G, Manfioletti G, Schneider C. 1989. The CTAB-DNA precipitation method: a common mini-scale preparation of template DNA from phagemids, phages or plasmids suitable for sequencing. *Biotechniques* **7**: 514–520.
- Ecker M, Deutzmann R, Lehle L, *et al.* 2006. Pir proteins of *Saccharomyces cerevisiae* are attached to  $\beta$ -1,3-glucan by a new protein-carbohydrate linkage. *J Biol Chem* **281**: 11523–11529.
- Eisenhaber B, Schneider G, Wildpaner M, Eisenhaber F. 2004. A sensitive predictor for potential GPI lipid modification sites in fungal protein sequences and its application to genome-wide studies for *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *J Mol Biol* **337**: 243–253.
- Felipe MS, Andrade RV, Arraes FB, *et al.* 2005. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *J Biol Chem* **280**: 24706–24714.
- Felipe MSS, Andrade RV, Petrofeza SS, *et al.* 2003. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. *Yeast* **20**: 263–271.
- Franco M, Peracoli MT, Soares A, *et al.* 1993. Host–parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr Top Med Mycol* **5**: 115–149.
- Gavel Y, von Heijne G. 1990. Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn–X–Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Eng* **3**: 433–442.
- González A, Gómez BL, Diez S, *et al.* 2005. Purification and partial characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* protein with capacity to bind to extracellular matrix proteins. *Infect Immun* **73**: 2486–2495.
- Guichet A, Copeland JW, Erdelyi M, *et al.* 1997. The nuclear receptor homologue Ftz-F1 and the homeodomain protein Ftz are mutually dependent cofactors. *Nature* **385**: 548–552.
- Gurr SJ, Unkles SE, Kinghorn JR. 1987. The structure and organization of nuclear genes of filamentous fungi. In *Gene Structure in Eukaryotic Microbes*, Kinghorn, JR (ed.). IRL Press: Oxford; 93–139.
- Harsay E, Bretscher A. 1995. Parallel secretory pathways to the cell surface in yeast. *J Cell Biol* **131**: 297–310.
- Hostetter MK. 1999. Integrin-like proteins in *Candida* spp. and other microorganisms. *Fungal Genet Biol* **28**: 135–145.
- Hostetter MK. 2000. RGD-mediated adhesion in fungal pathogens of humans, plants and insects. *Curr Opin Microbiol* **3**: 344–348.
- Kandasamy R, Vedyappan G, Chaffin WL. 2000. Evidence for the presence of pir-like proteins in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett* **186**: 239–243.
- Kanetsuna F, Carbonell LM, Azuma I, Yamamura Y. 1972. Biochemical studies on the thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* **110**: 208–218.
- Kanetsuna F, Carbonell LM, Moreno RE, Rodriguez J. 1969. Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* **97**: 1036–1041.
- Kanetsuna F, Carbonell LM. 1970. Cell wall glucans of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* **101**: 675–680.
- Kapteyn JC, Hoyer LL, Hecht JE, *et al.* 2000. The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. *Mol Microbiol* **35**: 601–611.
- Kapteyn JC, Montijn RC, Vink E, *et al.* 1996. Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a phosphodiester-linked  $\beta$ -1,3- $\beta$ -1,6-glucan heteropolymer. *Glycobiology* **6**: 337–345.

- Kapteyn JC, Ram AF, Groos EM, et al. 1997. Altered extent of cross-linking of  $\beta$ -1,6-glucosylated mannoproteins to chitin in *Saccharomyces cerevisiae* mutants with reduced cell wall  $\beta$ -1,3-glucan content. *J Bacteriol* **179**: 279–284.
- Kapteyn JC, Van Egmond P, Sievi E, et al. 1999. The contribution of the *O*-glycosylated protein Pir2p/Hsp150 to the construction of the yeast cell wall in wild-type cells and  $\beta$ -1,6-glucan-deficient mutants. *Mol Microbiol* **31**: 1835–1844.
- Kitagaki H, Ito K, Shimoi H. 2004. A temperature-sensitive *dcw1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* is cell cycle arrested with small buds which have aberrant cell walls. *Eukaryot Cell* **3**: 1297–1306.
- Kitagaki H, Wu H, Shimoi H, Ito K. 2002. Two homologous genes, *DCW1* (YKL046c) and *DFG5*, are essential for cell growth and encode glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored membrane proteins required for cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **46**: 1011–1022.
- Kollar R, Reinhold BB, Petrakova E, et al. 1997. Architecture of the yeast cell wall.  $\beta$ (1  $\rightarrow$  6)-glucan interconnects mannoprotein,  $\beta$ (1  $\rightarrow$  3)-glucan, and chitin. *J Biol Chem* **272**: 17762–17775.
- Kozak M. 1986. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* **44**: 283–292.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- Manocha MS. 1980. Lipid composition of *Paracoccidioides brasiliensis*: comparison between the yeast and mycelial forms. *Sabouraudia* **18**: 281–286.
- Mendes-Giannini MJ, Andreotti PF, Vincenzi LR, et al. 2006. Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect* **8**: 1550–1559.
- Montijn RC, van Rinsum J, van Schagen FA, Klis FM. 1994. Glucmannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* contain a novel type of carbohydrate side chain. *J Biol Chem* **269**: 19338–19342.
- Mrsa V, Seidl T, Gentzsch M, Tanner W. 1997. Specific labelling of cell wall proteins by biotinylation. Identification of four covalently linked *O*-mannosylated proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**: 1145–1154.
- Muesch A, Hartmann E, Rohde K, et al. 1990. A novel pathway for secretory proteins? *Trends Biochem Sci* **15**: 86–88.
- Pel HJ, Winde JH, Archer DB, et al. 2007. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nat Biotechnol* **25**: 221–231.
- Sambrook J, Russell DW (eds). 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY.
- San-Blas G, San-Blas F, Rodriguez LE, Castro CJ. 1987. A model of dimorphism in pathogenic fungi: *Paracoccidioides brasiliensis*. *Acta Cient Venez* **38**: 202–211.
- San-Blas G, San-Blas F, Serrano LE. 1977. Host–parasite relationships in the yeast-like form of *Paracoccidioides brasiliensis* strain IVIC Pb9. *Infect Immun* **15**: 343–346.
- San-Blas G, San-Blas F. 1977. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence. A review. *Mycopathologia* **62**: 77–86.
- Serrano R, Martin H, Casamayor A, Arino J. 2006. Signaling alkaline pH stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* through the Wsc1 cell surface sensor and the Slr2 MAPK pathway. *J Biol Chem* **281**: 39785–39795.
- Spreghini E, Davis DA, Subaran R, et al. 2003. Roles of *Candida albicans* Dfg5p and Dcw1p cell surface proteins in growth and hypha formation. *Eukaryot Cell* **2**: 746–755.
- Toh-e A, Yasunaga S, Nisogi H, et al. 1993. Three yeast genes, *PIR1*, *PIR2* and *PIR3*, containing internal tandem repeats, are related to each other, and *PIR1* and *PIR2* are required for tolerance to heat shock. *Yeast* **9**: 481–494.
- Vicentini AP, Gesztes JL, Franco MF, et al. 1994. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infect Immun* **62**: 1465–1469.
- Yin QY, de Groot PW, Dekker HL, et al. 2005. Comprehensive proteomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: identification of proteins covalently attached via glycosylphosphatidylinositol remnants or mild alkali-sensitive linkages. *J Biol Chem* **280**: 20894–20901.

## **Caracterização de *PbDfg5p* de *Paracoccidioides brasiliensis*, uma proteína de parede celular implicada no crescimento filamentoso**

Nadya da Silva Castro, MS Barbosa, ZA Maia, SN Bão, MSS Felipe, JM Santana, MJA Mendes-Giannini, M Pereira, CMA Soares.

*Yeast* (2008) **25**(2): 141-154.

### **DISCUSSÃO**

Nesse estudo foi identificado um novo gene de *P. brasiliensis*, codificante para a possível proteína de parede celular, Dfg5p. O cDNA completo *PbDFG5* apresentou 2006 nucleotídeos, codificando para uma proteína de 448 aminoácidos, dos quais 22 correspondem a um peptídeo sinal N-terminal. A seqüência genômica completa, obtida pela amplificação por PCR, revelou a presença de dois íntrons na seqüência genômica. Uma pesquisa no banco de dados PROSITE revelou a presença de um domínio característico da família 76 de glicosil hidrolase em *PbDfg5p* (Coutinho & Henrissat, 1999).

Os dados obtidos a partir do experimento de *Southern blot*, evidenciaram que o gene *PbDFG5* provavelmente está presente em apenas uma cópia no genoma de *P. brasiliensis*. Além disso, análises através de RT-PCR semi-quantitativa revelaram um único transcrito, sendo este mais expresso em células leveduriformes de *P. brasiliensis*. Esses dados reforçam a presença de um único gene *PbDFG5* no genoma do fungo.

Nossos resultados demonstram que *PbDfg5p* é uma proteína de parede celular, devido a presença de um peptídeo sinal N-terminal convencional e pela localização da proteína na superfície celular verificada por microscopia eletrônica. Embora tenha se observado também a localização intracelular da proteína, como demonstrado pela presença de algumas partículas de ouro no citoplasma, *PbDfg5p* foi detectada com mais abundância na camada mais externa da parede celular da fase leveduriforme de *P. brasiliensis*. A presença de partículas de ouro no citoplasma pode ser devido ao tráfego para a superfície celular, como descrito para *S. cerevisiae* (Harsay & Bretscher, 1995).

Dfg5p de *P. brasiliensis* parece estar covalentemente ligada à parede celular por meio de uma rede de glicana. Duas evidências corroboram para esta afirmativa: (i) a proteína nativa não esteve presente na fração solúvel à SDS (dados não mostrados); (ii)

o tratamento da parede celular fúngica com  $\beta$ -1,3-endoglicanase resultou na liberação de *PbDfg5p* no sobrenadante, como observado anteriormente para *Dfg5p* de *C. albicans* (Spreghini *et al.*, 2003). É conhecido que a parede celular de células leveduriformes de *P. brasiliensis* é composta principalmente por  $\alpha$ -1,3-glicana, entretanto quantidades de  $\beta$ -1,3-glicana também podem ser observadas (Kanetsuma *et al.*, 1969; San-Blas & Niño-Vega, 2008).

Como ocorre para muitas proteínas de superfície, *PbDfg5p* é possivelmente uma proteína N-glicosilada devido a presença de quatro potenciais sítios para N-glicosilação. Estima-se que 90% das proteínas que apresentem a seqüência N-X-S/T sejam glicosiladas (Gavel & von Heijne, 1990). Neste sentido, uma alteração da massa molecular da proteína nativa de 75 para 49 kDa foi observada em ensaios de *Western blot* desenvolvidos com extratos de parede celular de *P. brasiliensis* tratados com endoglicosidase H, enzima que remove resíduos de carboidratos N-ligados. Sabe-se que a N-glicosilação é uma modificação que ocorre durante o trânsito das proteínas para a superfície celular (Hammond & Helenius, 1994). O homólogo *Dfg5p* de *C. albicans* também é uma proteína glicosilada (Spreghini *et al.*, 2003).

Embora as proteínas *Dfg5* de *C. albicans* e de *S. cerevisiae* possuam características de proteínas de superfície ligadas à GPI (Kitagaki *et al.*, 2002; Spreghini *et al.*, 2003), o tratamento da parede celular de *P. brasiliensis* com HF-piridina (fluoreto hidrogenado de piridina) não resultou na liberação da proteína nativa, o que exclui a possibilidade de *PbDfg5p* ter uma âncora de GPI. Estes achados são consistentes com o seqüenciamento extensivo de dois clones codificantes para *PbDfg5p* e com análises computacionais da proteína deduzida de *P. brasiliensis*, os quais não reconheceram a seqüência necessária à adição da âncora de GPI (dados não mostrados). Assim, de acordo com nossos estudos *PbDfg5p* não pode ser classificada como uma proteína GPI ancorada. Em *A. niger*, nove genes são descritos como membros da família *Dfg*, sendo que cinco destes genes não codificam para proteínas GPI-ancoradas, uma vez que os sinais característicos N- ou C-terminal estiveram ausentes (Pel *et al.*, 2007).

Uma especulação sobre um provável papel de *PbDfg5p* na interação do fungo com o hospedeiro foi possível devido a presença de um motivo RGD (Arg-Gly-Asp) similar ao motivo envolvido no processo de adesão. Sabe-se que o motivo RGD, presente em algumas adesinas, funciona como uma seqüência primária de reconhecimento pela maioria das integrinas do hospedeiro (Hostetter, 2000). Dessa forma, a propriedade de adesina da *PbDfg5p* foi demonstrada pelo experimento de *Far-*

*western blotting*, no qual a proteína recombinante reconheceu as seguintes proteínas da matriz extracelular: laminina, fibronectina e colágeno do tipo I e IV. A importância do motivo RGD na interação entre a *PbDfg5p* e proteínas da matriz extracelular foi comprovada pela habilidade do peptídeo sintético RGD de inibir a interação da laminina com a proteína *PbDfg5*. A forte reatividade observada em experimento com o soro de pacientes com PCM somada a localização de *PbDfg5p* na superfície reforçam a hipótese de um possível papel de *PbDfg5p* na interação do fungo com o hospedeiro.

A adesão aos componentes da matriz extracelular do tecido hospedeiro é um passo inicial e indispensável em patógenos para colonização e estabelecimento da infecção. As adesinas, proteínas de parede celular com propriedades análogas a integrinas, participam ativamente deste processo de interação patógeno-hospedeiro (Lima *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2003). A laminina, principal componente da membrana basal, parece contribuir para a adesão de *P. brasiliensis* (Mendes-Giannini *et al.*, 2006) favorecendo assim, a invasão tecidual e disseminação do fungo (Vicentini *et al.*, 1994; Andreotti *et al.*, 2005). Dessa forma, a ligação do fungo a laminina poderia ocorrer durante a infecção em decorrência da exposição, ocasionada pela injúria tecidual, da membrana basal rica em laminina. Estudos indicam que *P. brasiliensis* interage também com a fibronectina e o colágeno humano no processo de adesão à célula hospedeira (Mendes-Giannini *et al.*, 2000, 2006, 2008). Nosso grupo recentemente caracterizou duas moléculas de *P. brasiliensis* com características de adesão similares a *PbDfg5p*: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Barbosa *et al.*, 2006) e a triose fosfato isomerase (Pereira *et al.*, 2007).

*Considerações  
finais  
&  
Perspectivas*



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo deste trabalho foi estudar as proteínas de superfície de *P. brasiliensis* visando, sobretudo o entendimento da organização e composição da parede celular. Pelos resultados obtidos podemos concluir que:

- *P. brasiliensis*, a exemplo de outros fungos patogênicos, possui a via de biossíntese, ligação e desligamento da âncora de GPI ativa. Estas proteínas são distribuídas na membrana plasmática e parede celular;
- As proteínas com âncoras de GPI apresentam as mais diversas funções celulares, tais como: enzimas, adesinas, fatores de virulência, proteínas estruturais e envolvidas no remodelamento da parede celular;
- *PbGel3* é uma proteína de superfície, abundante em micélio, possivelmente devido a maior quantidade de  $\beta$ -glicana existente na parede celular desta fase morfológica;
- *PbGel3p* pode ter papel ativo na biossíntese e morfologia da parede celular de *P. brasiliensis* uma vez que é descrita como responsável pelo alongamento da cadeia de  $\beta$ -glicana. Ensaio de complementação gênica, demonstraram a sua capacidade em restaurar fenótipo de linhagem mutante de *S. cerevisiae* em presença de agentes desestabilizantes da parede celular;
- Os resultados obtidos com o homólogo *Dfg5p* de *P. brasiliensis* sugerem que *PbDfg5p* é uma proteína glicosilada, ligada provavelmente à rede de  $\beta$ -glicana da parede celular e que pode participar do processo de interação entre o fungo e a matriz extracelular do hospedeiro.

O desenvolvimento de ferramentas genéticas tais como a interferência para a tradução de transcritos ou a inativação pelo rompimento gênico, poderia revelar a real função e conseqüentemente importância destes genes de superfície para a patogênese de *P. brasiliensis*.

## **PERSPECTIVAS**

- Análises proteômicas das proteínas GPI ancoradas por meio de solubilização diferencial de proteínas de membrana plasmática e de parede celular;
- Estudos de interação das beta-1,3-glicosiltransferases com outras proteínas de *P. brasiliensis* através da utilização de biblioteca de duplo híbrido;
- Caracterização de outras proteínas GPI ancoradas através de análises *in silico* nos genomas recém seqüenciados de isolados de *P. brasiliensis*.



# *Aferências Bibliográficas*



## Capítulo 1: Considerações gerais

- Anjos AR, Calvi SA, Ferracini R, Peraçoli MT, Silva CL, Soares AM. 2002. Role of *Paracoccidioides brasiliensis* cell wall fraction containing beta-glucan in tumor necrosis factor-alpha production by human monocytes: correlation with fungicidal activity. *Med Mycol* **40**:377-82.
- Barbosa MS, Bão SN, Andreotti PF, de Faria FP, Felipe MS, dos Santos Feitosa L, Mendes-Giannini MJ, Soares CM. 2006. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. *Infect Immun* **74**:382-9.
- Bartinick-Garcia S, Martinick DD, Gierz G 1995. Determinants of fungal cell wall morphology: the vesicle supply center. *Can J Bot* **73**:372-8.
- Bastos KP, Bailão AM, Borges CL, Faria FP, Felipe MSS, Silva MG, Martins WS, Fiúza RB, Pereira M, Soares CMA. 2007. The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. *BMC Microbiol* **7**:29.
- Batista WL, Matsuo AL, Ganiko L, Barros TF, Veiga TR, Freymüller E, Puccia R. 2006. The *PbMDJI* gene belongs to a conserved *MDJI/LON* locus in thermodimorphic pathogenic fungi and encodes a heat shock protein that localizes to both the mitochondria and cell wall of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Eukaryot Cell* **5**:379-90.
- Boutin JA. 1997. Myristoylation. *Cell Signal* **9**:15-35.
- Brown AJ, Gow NA. 1999. Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends Microbiol* **7**:333-8.
- Brown GD, Gordon S. 2003. Fungal beta-glucans and mammalian immunity. *Immunity* **19**:311-5.
- Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. 1993. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev* **6**:89-117.
- Bulawa CE. 1993. Genetics and molecular biology of chitin synthesis in fungi. *Annu Rev Microbiol* **47**:505-34.
- Camargo ZP, de Franco MF. 2000. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev Iberoam Micol* **17**:41-8.
- Cappellaro C, Mrsa V, Tanner W. 1998. New potential cell wall glucanases of *Saccharomyces cerevisiae* and their involvement in mating. *J Bacteriol* **180**:5030-7.
- Carbonell LM. 1969. Ultrastructure of dimorphic transformation in *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* **100**:1076-82.
- Carvalho MJ, Jesuino RSA, Daher BS, Silva-Pereira I, Freitas SM, Soares CMA, Felipe MSS. 2003. Functional and genetic characterization of calmodulin from the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol* **39**:204-10.
- Castro KP, Castro NS, Feitosa LS, Rosa e Silva LK, Vainstein MH, Bão SN, Soares CMA. 2008. The proline-rich cell-wall protein of *Paracoccidioides brasiliensis*. (em preparação).
- Chen D, Janganan TK, Chen G, Marques ER, Kress MR, Goldman GH, Walmsley AR, Borges-Walmsley MI. 2007. The cAMP pathway is important for controlling the morphological switch to the pathogenic yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mol Microbiol* **65**:761-79.
- de Groot PW, de Boer AD, Cunningham J, Dekker HL, de Jong L, Hellingwerf KJ, de Koster C, Klis FM. 2004. Proteomic analysis of *Candida albicans* cell walls reveals covalently bound carbohydrate-active enzymes and adhesins. *Eukaryot Cell* **3**:955-65.
- de Groot PW, Ram AF, Klis FM. 2005. Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. *Fungal Genet Biol* **42**:657-75.
- De Moraes Borba C, Schäffer GM. 2002. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and an attempt to induce the dimorphic process with fetal calf serum. *Mycoses* **45**:174-9.
- Diniz SN, Nomizo R, Cisalpino PS, Teixeira MM, Brown GD, Mantovani A, Gordon S, Reis LF, Dias AA. 2004. PTX3 function as an opsonin for the dectin-1-dependent internalization of zymosan by macrophages. *J Leukoc Biol* **75**:649-56.

- Dixon DM, Casadevall A, Klein B, Mendoza L, Travassos L, Deepe GS Jr. 1998. Development of vaccines and their use in the prevention of fungal infections. *Med Mycol* **36**:57-67.
- Dohlman HG. 2002. G proteins and pheromone signaling. *Annu Rev Physiol* **64**:129-52.
- Felipe MSS, Andrade RV, Petrofeza SS, Maranhão AQ, Torres FA, Albuquerque P, Arraes FB, Arruda M, Azevedo MO, Baptista AJ, Bataus LA, Borges CL, Campos EG, Cruz MR, Daher BS, Dantas A, Ferreira MA, Ghil GV, Jesuino RS, Kyaw CM, et al. 2003. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. *Yeast* **20**:263-71.
- Felipe MSS, Torres FA, Maranhão AQ, Silva-Pereira I, Poças-Fonseca MJ, Campos EG, Moraes LM, Arraes FB, Carvalho MJ, Andrade RV, Nicola AM, Teixeira MM, Jesuino RS, Pereira M, Soares CMA, Brígido MM. 2005. Functional genome of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **45**:369-81.
- Firon A, Lesage G, Bussey H. 2004. Integrative studies put cell wall synthesis on the yeast functional map. *Curr Opin Microbiol* **7**:617-23.
- Franco M, Peracoli MT, Soares A, Montenegro R, Mendes RP, Meira DA. 1993. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr Top Med Mycol* **5**:115-49.
- Furtado JS, de Brito T, Freymuller E. 1967. The structure and reproduction of *Paracoccidioides brasiliensis* in human tissue. *Sabouraudia* **5**:226-9.
- Goldman GH, Marques ER, Ribeiro DCD, Bernardes LAS, Quiapin AC, Vitorelli PM, Savoldi M, Semighini CP, Oliveira RC, Nunes LR, Travassos LR, Puccia R, Batista WL, Ferreira LE, Moreira JC, Bogossian AP, Tekaia F, Nobrega MP, Nobrega FG, Goldman MH. 2003. Expressed sequence tag analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence and pathogenicity genes. *Eukaryot Cell* **2**:34-48.
- Griffith OH, Ryan M. 1999. Bacterial phosphatidylinositol-specific phospholipase C: structure, function, and interaction with lipids. *Biochim Biophys Acta* **1441**:237-54.
- Hallak J, San-Blas F, San-Blas G. 1982. Isolation and wall analysis of dimorphic mutants of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia* **20**:51-62.
- Hamdan JS, Resende MA, Cunha Jr AL, Alves CH, Cisalpino EO. 1993. Partial biochemical characterization of five *Paracoccidioides brasiliensis* strains. *Curr Microbiol* **27**:91-5.
- Jaafar L, Moukadiri I, Zueco J. 2003. Characterization of a disulphide-bound Pir-cell wall protein (Pir-CWP) of *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* **20**:417-26.
- Kandasamy R, Vedyappan G, Chaffin WL. 2000. Evidence for the presence of pir-like proteins in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett* **186**:239-43.
- Kanetsuna F, Carbonell LM, Azuma I, Yamamura Y. 1972. Biochemical studies on the thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* **110**:208-18.
- Kanetsuna F, Carbonell LM, Moreno RE, Rodriguez J. 1969. Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* **97**:1036-41.
- Kanetsuna F, Carbonell LM. 1970. Cell wall glucans of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* **101**:675-80.
- Kapteyn JC, Hoyer LL, Hecht JE, Müller WH, Andel A, Verkleij AJ, Makarow M, Van Den Ende H, Klis FM. 2000. The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. *Mol Microbiol* **35**:601-11.
- Kapteyn JC, Montijn RC, Vink E, de la Cruz J, Llobell A, Douwes JE, Shimoi H, Lipke PN, Klis FM. 1996. Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a phosphodiester-linked beta-1,3-/beta-1,6-glucan heteropolymer. *Glycobiology* **6**:337-45.
- Kapteyn JC, Ram AF, Groos EM, Kollar R, Montijn RC, Van Den Ende H, Llobell A, Cabib E, Klis FM. 1997. Altered extent of cross-linking of beta1,6-glucosylated mannoproteins to chitin in *Saccharomyces cerevisiae* mutants with reduced cell wall beta1,3-glucan content. *J Bacteriol* **179**:6279-84.
- Kapteyn JC, Van Egmond P, Sievi E, Van Den Ende H, Makarow M, Klis FM. 1999. The contribution of the O-glycosylated protein Pir2p/Hsp150 to the construction of the yeast cell wall in wild-type cells and beta 1,6-glucan-deficient mutants. *Mol Microbiol* **31**:1835-44.
- Klis FM, de Groot P, Hellingwerf K. 2001. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Med Mycol* **39**:1-8.

- Kollár R, Reinhold BB, Petráková E, Yeh HJ, Ashwell G, Drgonová J, Kapteyn JC, Klis FM, Cabib E. 1997. Architecture of the yeast cell wall. Beta(1-->6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1-->3)-glucan, and chitin. *J Biol Chem* **272**:17762-75.
- Kurokawa CS, Sugizaki MF, Peraçoli MT. 1998. Virulence factors in fungi of systemic mycoses. *Rev Inst Med Trop São Paulo* **40**:125-35.
- Lacaz CS. 1994. *Paracoccidioides brasiliensis*: morphology, evolutionary cycle, maintenance during saprophytic life, biology, virulence, taxonomy. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G (Eds). *Paracoccidioidomycosis*, CRC Press, Boca Raton, Chapter 2, pp. 13-25.
- Latgé JP. 2007. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol Microbiol* **66**:279-90.
- Lengeler KB, Davidson RC, D'souza C, Harashima T, Shen WC, Wang P, Pan X, Waugh M, Heitman J. 2000. Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**:746-85.
- Leverly SB, Toledo MS, Straus AH, Takahashi HK. 1998. Structure elucidation of sphingolipids from the mycopathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: an immunodominant beta-galactofuranose residue is carried by a novel glycosylinositol phosphorylceramide antigen. *Biochemistry* **37**:8764-75.
- Manocha MS. 1980. Lipid composition of *Paracoccidioides brasiliensis*: comparison between the yeast and mycelial forms. *Sabouraudia* **18**:281-6.
- Marques ER, Ferreira ME, Drummond RD, Felix JM, Menossi M, Savoldi M, Travassos LR, Puccia R, Batista WL, Carvalho KC, Goldman MH, Goldman GH. 2004. Identification of genes preferentially expressed in the pathogenic yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis*, using suppression subtraction hybridization and differential macroarray analysis. *Mol Genet Genomics* **271**:667-77.
- Mrsá V, Seidl T, Gentsch M, Tanner W. 1997. Specific labelling of cell wall proteins by biotinylation. Identification of four covalently linked O-mannosylated proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**:1145-54.
- Munro CA, Gow NA. 2001. Chitin synthesis in human pathogenic fungi. *Med Mycol* **39**:41-53.
- Nemecek JC, Wüthrich M, Klein BS. 2006. Global control of dimorphism and virulence in fungi. *Science* **312**:583-8.
- Niño-Vega GA, Buurman ET, Gooday GW, San-Blas G, Gow NA. 1998. Molecular cloning and sequencing of a chitin synthase gene (*CHS2*) of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast* **14**:181-7.
- Niño-Vega GA, Carrero L, San-Blas G. 2004. Isolation of the *CHS4* gene of *Paracoccidioides brasiliensis* and its accommodation in a new class of chitin synthases. *Med Mycol* **42**:51-7.
- Niño-Vega GA, Munro CA, San-Blas G, Gooday GW, Gow NA. 2000. Differential expression of chitin synthase genes during temperature-induced dimorphic transitions in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol* **38**:31-9.
- Nunes LR, Oliveira RC, Leite DB, da Silva VS, Marques ER, Ferreira MES, Ribeiro DC, Bernardes LAS, Goldman MH, Puccia R, Travassos LR, Batista WL, Nóbrega MP, Nobrega FG, Yang DY, Pereira CAB, Goldman GH. 2005. Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. *Eukaryot Cell* **4**:2115-28.
- Parente JA, Borges CL, Bailão AM, Felipe MSS, Pereira M, Soares CMA. 2008. Comparison of transcription of multiple genes during mycelia transition to yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis* reveals insights to fungal differentiation and pathogenesis. *Mycopathologia* **165**:259-73.
- Paris S, Duran S. 1985. Cyclic adenosine 3',5' monophosphate (cAMP) and dimorphism in the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia* **92**:115-20.
- Paris S, Duran-Gonzalez S, Mariat F. 1985. Nutritional studies on *Paracoccidioides brasiliensis*: the role of organic sulfur in dimorphism. *Sabouraudia* **23**:85-92.
- Passos DAC, Bão SN, Chagas RF, Felipe MSS, Soares CMA. 2003. Cellular localization of the HSP60 of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Anais do XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia*.
- Pereira LA, Bão SN, Barbosa MS, da Silva JL, Felipe MSS, de Santana JM, Mendes-Giannini MJ, Soares CMA. 2007. Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function. *FEMS Yeast Res* **7**:1381-8.
- Pitarch A, Sánchez M, Nombela C, Gil C. 2002. Sequential fractionation and two-dimensional gel analysis unravels the complexity of the dimorphic fungus *Candida albicans* cell wall proteome. *Mol Cell Proteomics* **1**:967-82.

- Rappleye CA, Eissenberg LG, Goldman WE. 2007. *Histoplasma capsulatum* alpha-(1,3)-glucan blocks innate immune recognition by the beta-glucan receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**:1366-70.
- Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover EP, Feldman D, Stevens DA. 1984. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect Immun* **46**:346-53.
- Restrepo A. 1985. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Sabouraudia* **23**:323-34.
- Restrepo-Moreno A. 1993. Paracoccidioidomycosis In: Murphy JW, Friedman H, Berdinelli M (Eds). *Fungal Infections and Immune Responses Plenum Press*. New York, NY, USA, pp. 251-76.
- Richard M, De Groot P, Courtin O, Poulain D, Klis F, Gaillardin C. 2002. GPI7 affects cell-wall protein anchorage in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Microbiology* **148**:2125-33.
- Richard ML, Plaine A. 2007. Comprehensive analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **6**:119-33.
- Rodrigues EG, Travassos LR. 1994. Nature of the reactive epitopes in *Paracoccidioides brasiliensis* polysaccharide antigen. *J Med Vet Mycol* **32**:77-81.
- Rubin-Bejerano I, Abeijon C, Magnelli P, Grisafi P, Fink GR. 2007. Phagocytosis by human neutrophils is stimulated by a unique fungal cell wall component. *Cell Host Microbe* **2**:55-67.
- San-Blas G, Niño-Vega G, Iturriaga T. 2002. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol* **40**:225-42.
- San-Blas G, Niño-Vega G. 2008. *Paracoccidioides brasiliensis*: chemical and molecular tools for research on cell walls, antifungals, diagnosis, taxonomy. *Mycopathologia* **165**:183-95.
- San-Blas G, San-Blas F, Rodríguez LE, Castro CJ. 1987. Un modelo de dimorfismo en hongos patógenos: *Paracoccidioides brasiliensis*. *Acta Cient Venez* **38**:202-11.
- San-Blas G, San-Blas F. 1977. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence. A review. *Mycopathologia* **62**:77-86.
- San-Blas G, San-Blas F. 1994. Biochemistry of *Paracoccidioides brasiliensis* dimorphism. In: Franco M, Lacaz C, Restrepo-Moreno A, Del Negro A (Eds). *Paracoccidioidomycosis*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 49-66.
- San-Blas G. 1982. The cell wall of fungal human pathogens: its possible role in host-parasite relationships. *Mycopathologia* **79**:159-84.
- San-Blas G. 1993. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol* **31**:99-113.
- Sano A, Tanaka R, Yokoyama K, Franco M, Bagagli E, Montenegro MR, Mikami Y, Miyaji M, Nishimura K. 1999. Comparison between human and armadillo *Paracoccidioides brasiliensis* isolates by random amplified polymorphic DNA analysis. *Mycopathologia* **143**:165-9.
- Sharom FJ, Lehto MT. 2002. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins: structure, function, and cleavage by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Biochem Cell Biol* **80**:535-49.
- Silva MF, Bocca AL, Ferracini R Jr, Figueiredo F, Silva CL. 1997. Cellular requirements for immunomodulatory effects caused by cell wall components of *Paracoccidioides brasiliensis* on antibody production. *Clin Exp Immunol* **109**:261-71.
- Silva SS, Paes HC, Soares CMA, Fernandes L, Felipe MSS. 2008. Insights into the pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis* from transcriptome analysis—advances and perspectives. *Mycopathologia* **165**:249-58.
- Smits GJ, van den Ende H, Klis FM. 2001. Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. *Microbiology* **147**:781-94.
- Toh-e A, Yasunaga S, Nisogi H, Tanaka K, Oguchi T, Matsui Y. 1993. Three yeast genes, *PIR1*, *PIR2* and *PIR3*, containing internal tandem repeats, are related to each other, and *PIR1* and *PIR2* are required for tolerance to heat shock. *Yeast* **9**:481-94.
- Toledo MS, Lavery SB, Straus AH, Suzuki E, Momany M, Glushka J, Moulton JM, Takahashi HK. 1999. Characterization of sphingolipids from mycopathogens: factors correlating with expression of 2-hydroxy fatty acyl (E)-Delta 3-unsaturation in cerebrosides of *Paracoccidioides brasiliensis* and *Aspergillus fumigatus*. *Biochemistry* **38**:7294-306.

- Tomazett PK, Cruz AH, Bonfim SM, Soares CMA, Pereira M. 2005. The cell wall of *Paracoccidioides brasiliensis*: insights from its transcriptome. *Genet Mol Res* **4**:309-25.
- Villar LA, Salazar ME, Restrepo A. 1988. Morphological study of a variant of *Paracoccidioides brasiliensis* that exists in the yeast form at room temperature. *J Med Vet Mycol* **26**:269-76.
- Viudes A, Perea S, Lopez-Ribot JL. 2001. Identification of continuous B-cell epitopes on the protein moiety of the 58-kiloDalton cell wall mannoprotein of *Candida albicans* belonging to a family of immunodominant fungal antigens. *Infect Immun* **69**:2909-19.
- Yin QY, de Groot PW, Dekker HL, de Jong L, Klis FM, de Koster CG. 2005. Comprehensive proteomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: identification of proteins covalently attached via glycosylphosphatidylinositol remnants or mild alkali-sensitive linkages. *J Biol Chem* **280**:20894-901.

## Capítulo 2: Proteínas GPI ancoradas

- Ahn N, Kim S, Choi W, Im KH, Lee YH. 2004. Extracellular matrix protein gene, *EMPI1*, is required for appressorium formation and pathogenicity of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Mol Cells* **17**:166-73.
- Albrecht A, Felk A, Pichova I, Naglik JR, Schaller M, de Groot P, Maccallum D, Odds FC, Schäfer W, Klis F, Monod M, Hube B. 2006. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions. *J Biol Chem* **281**:688-94.
- Arroyo J, Sarfati J, Baixench MT, Ragni E, Guillén M, Rodríguez-Peña JM, Popolo L, Latgé JP. 2007. The GPI-anchored Gas and Crh families are fungal antigens. *Yeast* **24**:289-96.
- Bangs JD, Hereld D, Krakow JL, Hart GW, Englund PT. 1985. Rapid processing of the carboxyl terminus of a trypanosome variant surface glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**:3207-11.
- Cabib E, Blanco N, Grau C, Rodríguez-Peña JM, Arroyo J. 2007. Crh1p and Crh2p are required for the cross-linking of chitin to beta(1-6)glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Mol Microbiol* **63**:921-35.
- Caracuel Z, Martínez-Rocha AL, Di Pietro A, Madrid MP, Roncero MI. 2005. *Fusarium oxysporum gas1* encodes a putative beta-1,3-glucanosyltransferase required for virulence on tomato plants. *Mol Plant Microbe Interact* **18**:1140-7.
- Caro LH, Tettelin H, Vossen JH, Ram AF, van den Ende H, Klis FM. 1997. *In silicio* identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**:1477-89.
- Chabane S, Sarfati J, Ibrahim-Granet O, Du C, Schmidt C, Mouyna I, Prevost MC, Calderone R, Latgé JP. 2006. Glycosylphosphatidylinositol-anchored Ecm33p influences conidial cell wall biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol* **72**:3259-67.
- Chatterjee S, Mayor S. 2001. The GPI-anchor and protein sorting. *Cell Mol Life Sci* **58**:1969-87.
- Cox GM, McDade HC, Chen SC, Tucker SC, Gottfredsson M, Wright LC, Sorrell TC, Leidich SD, Casadevall A, Ghannoum MA, Perfect JR. 2001. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* **39**:166-75.
- Cox RA, Magee DM. 2004. Coccidioidomycosis: host response and vaccine development. *Clin Microbiol Rev* **17**:804-39.
- de Bernardis F, Mühlischlegel FA, Cassone A, Fonzi WA. 1998. The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun* **66**:3317-25.
- de Groot PW, de Boer AD, Cunningham J, Dekker HL, de Jong L, Hellingwerf KJ, de Koster C, Klis FM. 2004. Proteomic analysis of *Candida albicans* cell walls reveals covalently bound carbohydrate-active enzymes and adhesins. *Eukaryot Cell* **3**:955-65.
- de Groot PW, Hellingwerf KJ, Klis FM. 2003. Genome-wide identification of fungal GPI proteins. *Yeast* **20**:781-96.

- de Medina-Redondo M, Arnáiz-Pita Y, Fontaine T, Del Rey F, Latgé JP, de Aldana CR. 2008. The beta-1,3-glucanosyltransferase gas4p is essential for ascospore wall maturation and spore viability in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Microbiol* **68**:1283-99.
- Delgado N, Xue J, Yu JJ, Hung CY, Cole GT. 2003. A recombinant beta-1,3-glucanosyltransferase homolog of *Coccidioides posadasii* protects mice against coccidioidomycosis. *Infect Immun* **71**:3010-9.
- Doering TL, Englund PT, Hart GW. 2003. Detection of glycosylphospholipid anchors on proteins. In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (Eds). *Curr Protoc Mol Biol*, John Wiley & Sons, Inc., California, pp. 17.8.1.
- Doering TL, Masterson WJ, Hart GW, Englund PT. 1990. Biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol membrane anchors. *J Biol Chem* **265**:611-4.
- Eisenhaber B, Maurer-Stroh S, Novatchkova M, Schneider G, Eisenhaber F. 2003. Enzymes and auxiliary factors for GPI lipid anchor biosynthesis and post-translational transfer to proteins. *Bioessays* **25**:367-85.
- Eisenhaber B, Schneider G, Wildpaner M, Eisenhaber F. 2004. A sensitive predictor for potential GPI lipid modification sites in fungal protein sequences and its application to genome-wide studies for *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *J Mol Biol* **337**:243-53.
- Ferguson MA, Duszenko M, Lamont GS, Overath P, Cross GA. 1986. Biosynthesis of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoproteins. N-glycosylation and addition of a phosphatidylinositol membrane anchor. *J Biol Chem* **261**:356-62.
- Ferguson MA, Homans SW, Dwek RA, Rademacher TW. 1988. Glycosyl-phosphatidylinositol moiety that anchors *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein to the membrane. *Science* **239**:753-9.
- Ferguson MA. 1999. The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *J Cell Sci* **112**:2799-809.
- Fraering P, Imhof I, Meyer U, Strub JM, van Dorsselaer A, Vionnet C, Conzelmann A. 2001. The GPI transamidase complex of *Saccharomyces cerevisiae* contains Gaa1p, Gpi8p, and Gpi16p. *Mol Biol Cell* **12**:3295-306.
- Fridovich I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* **64**:97-112.
- Fujii T, Shimoi H, Iimura Y. 1999. Structure of the glucan-binding sugar chain of Tip1p, a cell wall protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1427**:133-44.
- Galgiani JN, Sun SH, Dugger KO, Ampel NM, Grace GG, Harrison J, Wieden MA. 1992. An arthroconidial-spherule antigen of *Coccidioides immitis*: differential expression during *in vitro* fungal development and evidence for humoral response in humans after infection or vaccination. *Infect Immun* **60**:2627-35.
- Ganendren R, Carter E, Sorrell T, Widmer F, Wright L. 2006. Phospholipase B activity enhances adhesion of *Cryptococcus neoformans* to a human lung epithelial cell line. *Microbes Infect* **8**:1006-15.
- Hamada K, Fukuchi S, Arisawa M, Baba M, Kitada K. 1998a. Screening for glycosylphosphatidylinositol (GPI)-dependent cell wall proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **258**:53-9.
- Hamada K, Terashima H, Arisawa M, Kitada K. 1998b. Amino acid sequence requirement for efficient incorporation of glycosylphosphatidylinositol-associated proteins into the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **273**:26946-53.
- Hamada K, Terashima H, Arisawa M, Yabuki N, Kitada K. 1999. Amino acid residues in the omega-minus region participate in cellular localization of yeast glycosylphosphatidylinositol-attached proteins. *J Bacteriol* **181**:3886-9.
- Hartland RP, Fontaine T, Debeaupuis JP, Simenel C, Delepierre M, Latgé JP. 1996. A novel beta-(1-3)-glucanosyltransferase from the cell wall of *Aspergillus fumigatus*. *J Biol Chem* **271**:26843-9.
- Heise N, Travassos LR, de Almeida ML. 1995. *Paracoccidioides brasiliensis* expresses both glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins and a potent phospholipase C. *Exp Mycol* **19**:111-9.
- Herr RA, Hung CY, Cole GT. 2007. Evaluation of two homologous proline-rich proteins of *Coccidioides posadasii* as candidate vaccines against coccidioidomycosis. *Infect Immun* **75**:5777-87.

- Hong Y, Maeda Y, Watanabe R, Inoue N, Ohishi K, Kinoshita T. 2000. Requirement of PIG-F and PIG-O for transferring phosphoethanolamine to the third mannose in glycosylphosphatidylinositol. *J Biol Chem* **275**:20911-9.
- Hong Y, Ohishi K, Kang JY, Tanaka S, Inoue N, Nishimura J, Maeda Y, Kinoshita T. 2003. Human PIG-U and yeast Cdc91p are the fifth subunit of GPI transamidase that attaches GPI-anchors to proteins. *Mol Biol Cell* **14**:1780-9.
- Hong Y, Ohishi K, Watanabe R, Endo Y, Maeda Y, Kinoshita T. 1999. GPI1 stabilizes an enzyme essential in the first step of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis. *J Biol Chem* **274**:18582-8.
- Hoyer LL. 2001. The *ALS* gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **9**:176-80.
- Hung CY, Xue J, Cole GT. 2007. Virulence mechanisms of *Coccidioides*. *Ann N Y Acad Sci* **1111**:225-35.
- Hung CY, Yu JJ, Seshan KR, Reichard U, Cole GT. 2002. A parasitic phase-specific adhesin of *Coccidioides immitis* contributes to the virulence of this respiratory Fungal pathogen. *Infect Immun* **70**:3443-56.
- Hwang CS, Rhie GE, Oh JH, Huh WK, Yim HS, Kang SO. 2002. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence. *Microbiology* **148**:3705-13.
- Ikezawa H. 2002. Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins. *Biol Pharm Bull* **25**:409-17.
- Ivey FD, Magee DM, Woitaske MD, Johnston SA, Cox RA. 2003. Identification of a protective antigen of *Coccidioides immitis* by expression library immunization. *Vaccine* **21**:4359-67.
- Kapteyn JC, Montijn RC, Vink E, de la Cruz J, Llobell A, Douwes JE, Shimoi H, Lipke PN, Klis FM. 1996. Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a phosphodiester-linked beta-1,3-/beta-1,6-glucan heteropolymer. *Glycobiology* **6**:337-45.
- Kapteyn JC, Ram AF, Groos EM, Kollar R, Montijn RC, Van Den Ende H, Llobell A, Cabib E, Klis FM. 1997. Altered extent of cross-linking of beta1,6-glucosylated mannoproteins to chitin in *Saccharomyces cerevisiae* mutants with reduced cell wall beta1,3-glucan content. *J Bacteriol* **179**:6279-84.
- Karpinska B, Karlsson M, Schinkel H, Steller S, Süß KH, Melzer M, Wingsle G. 2001. A novel superoxide dismutase with a high isoelectric point in higher plants. Expression, regulation, and protein localization. *Plant Physiol* **126**:1668-77.
- Kaur R, Ma B, Cormack BP. 2007. A family of glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl proteases is required for virulence of *Candida glabrata*. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**:7628-33.
- Kinoshita T, Inoue N, Takeda J. 1995. Defective glycosyl phosphatidylinositol anchor synthesis and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Adv Immunol* **60**:57-103.
- Kinoshita T, Inoue N. 2000. Dissecting and manipulating the pathway for glycosylphosphatidy linositol-anchor biosynthesis. *Curr Opin Chem Biol* **4**:632-8.
- Klis FM, Mol P, Hellingwerf K, Brul S. 2002. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **26**:239-56.
- Kollár R, Reinhold BB, Petráková E, Yeh HJ, Ashwell G, Drgonová J, Kapteyn JC, Klis FM, Cabib E. 1997. Architecture of the yeast cell wall. Beta(1-->6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1-->3)-glucan, and chitin. *J Biol Chem* **272**:17762-75.
- Krysan DJ, Ting EL, Abeijon C, Kroos L, Fuller RS. 2005. Yapsins are a family of aspartyl proteases required for cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **4**:1364-74.
- Latgé JP. 2007. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol Microbiol* **66**:279-90.
- Liochev SI, Fridovich I. 1994. The role of O<sub>2</sub><sup>-</sup> in the production of HO<sub>2</sub>·: *in vitro* and *in vivo*. *Free Radic Biol Med* **16**:29-33.
- Low MG. 1989. The glycosyl-phosphatidylinositol anchor of membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* **988**:427-54.
- Lu CF, Kurjan J, Lipke PN. 1994. A pathway for cell wall anchorage of *Saccharomyces cerevisiae* alpha-agglutinin. *Mol Cell Biol* **14**:4825-33.
- Martchenko M, Alarco AM, Harcus D, Whiteway M. 2004. Superoxide dismutases in *Candida albicans*: transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-induced *SOD5* gene. *Mol Biol Cell* **15**:456-67.



- Martinez-Lopez R, Park H, Myers CL, Gil C, Filler SG. 2006. *Candida albicans* Ecm33p is important for normal cell wall architecture and interactions with host cells. *Eukaryot Cell* **5**:140-7.
- Masterson WJ, Doering TL, Hart GW, Englund PT. 1989. A novel pathway for glycan assembly: biosynthesis of the glycosyl-phosphatidylinositol anchor of the trypanosome variant surface glycoprotein. *Cell* **56**:793-800.
- Mayor S, Riezman H. 2004. Sorting GPI-anchored proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**:110-20.
- McConville MJ, Menon AK. 2000. Recent developments in the cell biology and biochemistry of glycosylphosphatidylinositol lipids. *Mol Membr Biol* **17**:1-16.
- McGwire BS, O'Connell WA, Chang KP, Engman DM. 2002. Extracellular release of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked *Leishmania* surface metalloprotease, gp63, is independent of GPI phospholipolysis: implications for parasite virulence. *J Biol Chem* **277**:8802-9
- Moukadiri I, Armero J, Abad A, Sentandreu R, Zueco J. 1997. Identification of a mannoprotein present in the inner layer of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **179**:2154-62.
- Mouyna I, Fontaine T, Vai M, Monod M, Fonzi WA, Diaquin M, Popolo L, Hartland RP, Latgé JP. 2000. Glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanoyltransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. *J Biol Chem* **275**:14882-9.
- Mouyna I, Morelle W, Vai M, Monod M, Léchenne B, Fontaine T, Beauvais A, Sarfati J, Prévost MC, Henry C, Latgé JP. 2005 Deletion of *GEL2* encoding for a beta(1-3)glucanoyltransferase affects morphogenesis and virulence in *Aspergillus fumigatus*. *Mol Microbiol* **56**:1675-88.
- Mühlschlegel FA, Fonzi WA. 1997. *PHR2* of *Candida albicans* encodes a functional homolog of the pH-regulated gene *PHR1* with an inverted pattern of pH-dependent expression. *Mol Cell Biol* **17**:5960-7.
- Mukherjee PK, Seshan KR, Leidich SD, Chandra J, Cole GT, Ghannoum MA. 2001. Reintroduction of the *PLB1* gene into *Candida albicans* restores virulence *in vivo*. *Microbiology* **147**:2585-97.
- Muñiz M, Morsomme P, Riezman H. 2001. Protein sorting upon exit from the endoplasmic reticulum. *Cell* **104**:313-20.
- Nagamine K, Murashima K, Kato T, Shimoi H, Ito K. 2003. Mode of alpha-amylase production by the shochu koji mold *Aspergillus kawachii*. *Biosci Biotechnol Biochem* **67**:2194-202.
- Nosjean O, Briolay A, Roux B. 1997. Mammalian GPI proteins: sorting, membrane residence and functions. *Biochim Biophys Acta* **1331**:153-86.
- Noverr MC, Cox GM, Perfect JR, Huffnagle GB. 2003. Role of *PLB1* in pulmonary inflammation and cryptococcal eicosanoid production. *Infect Immun* **71**:1538-47.
- Ohishi K, Inoue N, Kinoshita T. 2001. PIG-S and PIG-T, essential for GPI anchor attachment to proteins, form a complex with GAA1 and GPI8. *EMBO J* **20**:4088-98.
- Ohishi K, Inoue N, Maeda Y, Takeda J, Riezman H, Kinoshita T. 2000. Gaa1p and gpi8p are components of a glycosylphosphatidylinositol (GPI) transamidase that mediates attachment of GPI to proteins. *Mol Biol Cell* **11**:1523-33.
- Orlean P, Menon AK. 2007. Thematic review series: lipid posttranslational modifications. GPI anchoring of protein in yeast and mammalian cells, or: how we learned to stop worrying and love glycopospholipids. *J Lipid Res* **48**:993-1011.
- Orlean P. 1997. Biogenesis of yeast cell wall and surface components. In: Pringle JR, Broch JR, Jones EW (Eds). *The Molecular Biology of Yeast Saccharomyces*. Vol. 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, pp. 229-62.
- Peng T, Orsborn KI, Orbach MJ, Galgiani JN. 1999. Proline-rich vaccine candidate antigen of *Coccidioides immitis*: conservation among isolates and differential expression with spherule maturation. *J Infect Dis* **179**:518-21.
- Pittet M, Conzelmann A. 2007. Biosynthesis and function of GPI proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1771**:405-20.
- Ragni E, Coluccio A, Rolli E, Rodriguez-Peña JM, Colasante G, Arroyo J, Neiman AM, Popolo L. 2007. *GAS2* and *GAS4*, a pair of developmentally regulated genes required for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **6**:302-16.
- Richard ML, Plaine A. 2007. Comprehensive analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **6**:119-33.

- Rodríguez-Peña JM, Cid VJ, Arroyo J, Nombela C. 2000. A novel family of cell wall-related proteins regulated differently during the yeast life cycle. *Mol Cell Biol* **20**:3245-55.
- Romano J, Nimrod G, Ben-Tal N, Shadkchan Y, Baruch K, Sharon H, Osherov N. 2006. Disruption of the *Aspergillus fumigatus* ECM33 homologue results in rapid conidial germination, antifungal resistance and hypervirulence. *Microbiology* **152**:1919-28.
- Saporito-Irwin SM, Birse CE, Sypherd PS, Fonzi WA. 1995. *PHR1*, a pH-regulated gene of *Candida albicans*, is required for morphogenesis. *Mol Cell Biol* **15**: 601-13.
- Shishioh N, Hong Y, Ohishi K, Ashida H, Maeda Y, Kinoshita T. 2005. GPI7 is the second partner of PIG-F and involved in modification of glycosylphosphatidylinositol. *J Biol Chem* **280**:9728-34.
- Siafakas AR, Sorrell TC, Wright LC, Wilson C, Larsen M, Boadle R, Williamson PR, Djordjevic JT. 2007. Cell wall-linked cryptococcal phospholipase B1 is a source of secreted enzyme and a determinant of cell wall integrity. *J Biol Chem* **282**:37508-14.
- Siafakas AR, Wright LC, Sorrell TC, Djordjevic JT. 2006. Lipid rafts in *Cryptococcus neoformans* concentrate the virulence determinants phospholipase B1 and Cu/Zn superoxide dismutase. *Eukaryot Cell* **5**:488-98.
- Smythe JA, Coppel RL, Brown GV, Ramasamy R, Kemp DJ, Anders RF. 1988. Identification of two integral membrane proteins of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**:5195-9.
- Sosinska GJ, de Groot PW, Teixeira de Mattos MJ, Dekker HL, de Koster CG, Hellingwerf KJ, Klis FM. 2008. Hypoxic conditions and iron restriction affect the cell-wall proteome of *Candida albicans* grown under vagina-simulative conditions. *Microbiology* **154**:510-20.
- Stambuk BU, Cardoso de Almeida ML. 1996. An assay for glycosylphosphatidylinositol-anchor degrading phospholipases. *J Biochem Biophys Methods* **33**:105-15.
- Stevens VL. 1995. Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol membrane anchors. *Biochem J* **310**:361-70.
- Sundstrom P. 2002. Adhesion in *Candida* spp. *Cell Microbiol* **4**:461-9.
- Sütterlin C, Horvath A, Gerold P, Schwarz RT, Wang Y, Dreyfuss M, Riezman H. 1997. Identification of a species-specific inhibitor of glycosylphosphatidylinositol synthesis. *EMBO J* **16**:6374-83.
- Taguchi R, Asahi Y, Ikezawa H. 1980. Purification and properties of phosphatidylinositol-specific phospholipase C of *Bacillus thuringiensis*. *Biochim Biophys Acta* **619**:48-57.
- Taron CH, Wiedman JM, Grimme SJ, Orlean P. 2000. Glycosylphosphatidylinositol biosynthesis defects in Gpi11p- and Gpi13p-deficient yeast suggest a branched pathway and implicate gpi13p in phosphoethanolamine transfer to the third mannose. *Mol Biol Cell* **11**:1611-30.
- Terashima H, Hamada K, Kitada K. 2003. The localization change of Ybr078w/Ecm33, a yeast GPI associated protein, from the plasma membrane to the cell wall, affecting the cellular function. *FEMS Microbiol Lett* **218**:175-80.
- Tiede A, Bastisch I, Schubert J, Orlean P, Schmidt RE. 1999. Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositols in mammals and unicellular microbes. *Biol Chem* **380**:503-23.
- Udenfriend S, Kodukula K. 1995. How glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. *Annu Rev Biochem* **64**:563-91.
- Vai M, Gatti E, Lacanà E, Popolo L, Alberghina L. 1991. Isolation and deduced amino acid sequence of the gene encoding gp115, a yeast glycosylphospholipid-anchored protein containing a serine-rich region. *J Biol Chem* **266**:12242-8.
- von Heijne G. 1983. Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *Eur J Biochem* **133**:17-21.
- Vossen JH, Müller WH, Lipke PN, Klis FM. 1997. Restrictive glycosylphosphatidylinositol anchor synthesis in cwh6/gpi3 yeast cells causes aberrant biogenesis of cell wall proteins. *J Bacteriol* **179**:2202-9.
- Watanabe R, Inoue N, Westfall B, Taron CH, Orlean P, Takeda J, Kinoshita T. 1998. The first step of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis is mediated by a complex of PIG-A, PIG-H, PIG-C and GPI1. *EMBO J* **17**:877-85.
- Watanabe R, Murakami Y, Marmor MD, Inoue N, Maeda Y, Hino J, Kangawa K, Julius M, Kinoshita T. 2000. Initial enzyme for glycosylphosphatidylinositol biosynthesis requires PIG-P and is regulated by DPM2. *EMBO J* **19**:4402-11.

- Watanabe R, Ohishi K, Maeda Y, Nakamura N, Kinoshita T. 1999. Mammalian PIG-L and its yeast homologue Gpi12p are N-acetylglucosaminylphosphatidylinositol de-N-acetylases essential in glycosylphosphatidylinositol biosynthesis. *Biochem J* **339**:185-92.
- Wright LC, Santangelo RM, Ganendren R, Payne J, Djordjevic JT, Sorrell TC. 2007. Cryptococcal lipid metabolism: phospholipase B1 is implicated in transcellular metabolism of macrophage-derived lipids. *Eukaryot Cell* **6**:37-47.
- Xue J, Hung CY, Yu JJ, Cole GT. 2005. Immune response of vaccinated and non-vaccinated mice to *Coccidioides posadasii* infection. *Vaccine* **23**:3535-44.
- Yabuki M, Fukui S. 1970. Presence of binding site for alpha-amylase and of masking protein for this site on mycelial cell wall of *Aspergillus oryzae*. *J Bacteriol* **104**:138-44.
- Zhu Y, Yang C, Magee DM, Cox RA. 1996. *Coccidioides immitis* antigen 2: analysis of gene and protein. *Gene* **181**:121-5.

Site: [http://www.biken.osaka-u.ac.jp/biken/men-eki-huzen/index\\_e.html](http://www.biken.osaka-u.ac.jp/biken/men-eki-huzen/index_e.html).

### Capítulo 3: Beta-1,3-glicanosiltransferases

- Almeida AJ, Carmona JA, Cunha C, Carvalho A, Rappleye CA, Goldman WE, Hooykaas PJ, Leão C, Ludovico P, Rodrigues F. 2007. Towards a molecular genetic system for the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol* **44**:1387-98.
- Barral P, Suárez C, Batanero E, Alfonso C, Alché Jde D, Rodríguez-García MI, Villalba M, Rivas G, Rodríguez R. 2005. An olive pollen protein with allergenic activity, Ole e 10, defines a novel family of carbohydrate-binding modules and is potentially implicated in pollen germination. *Biochem J* **390**:77-84.
- Bernard M, Latgé JP. 2001. *Aspergillus fumigatus* cell wall: composition and biosynthesis. *Med Mycol* **39**:9-17.
- Caracuel Z, Martínez-Rocha AL, Di Pietro A, Madrid MP, Roncero MI. 2005. *Fusarium oxysporum* gas1 encodes a putative beta-1,3-glucanosyltransferase required for virulence on tomato plants. *Mol Plant Microbe Interact* **18**:1140-7.
- Carotti C, Ragni E, Palomares O, Fontaine T, Tedeschi G, Rodríguez R, Latgé JP, Vai M, Popolo L. 2004. Characterization of recombinant forms of the yeast Gas1 protein and identification of residues essential for glucanosyltransferase activity and folding. *Eur J Biochem* **271**:3635-45.
- Carotti C, Ragni E, Palomares O, Gissi C, Latgé J, Fontaine T, Popolo L. 2006. A Cys-enriched domain related to a novel plant carbohydrate-binding module is essential for the glucan-transferase activity of a Phr/Gel/Gas protein subfamily. In: *8th ASM Conference on Candida and Candidiasis*. Washington, DC: American Society for Microbiology, pp. 83.
- Castro NS, Maia ZA, Pereira M, Soares CMA. 2005. Screening for glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome. *Genet Mol Res* **4**:326-45.
- Coutinho PM, Henrissat B. 1999. Carbohydrate-active Enzymes: An Integrated Database Approach. In: Gilbert HJ, Davies G, Henrissat B, Svensson (Eds). *The Royal Society of Chemistry, Cambridge: London*, pp. 3-12.
- Cox RA, Magee DM. 2004. Coccidioidomycosis: host response and vaccine development. *Clin Microbiol Rev* **17**:804-39.
- de Bernardis F, Mühlischlegel FA, Cassone A, Fonzi WA. 1998. The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun* **66**:3317-25.
- de Medina-Redondo M, Arnáiz-Pita Y, Fontaine T, Del Rey F, Latgé JP, de Aldana CR. 2008. The beta-1,3-glucanosyltransferase gas4p is essential for ascospore wall maturation and spore viability in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Microbiol* **68**:1283-99.
- de Sampaio G, Bourdineaud JP, Lauquin GJ. 1999. A constitutive role for GPI anchors in *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall targeting. *Mol Microbiol* **34**:247-56.

- Delgado N, Xue J, Yu JJ, Hung CY, Cole GT. 2003. A recombinant beta-1,3-glucanosyltransferase homolog of *Coccidioides posadasii* protects mice against coccidioidomycosis. *Infect Immun* **71**:3010-9.
- Fankhauser C, Conzelmann A. 1991. Purification, biosynthesis and cellular localization of a major 125-kDa glycoposphatidylinositol-anchored membrane glycoprotein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **195**:439-48.
- Fonzi WA. 1999. *PHR1* and *PHR2* of *Candida albicans* encode putative glycosidases required for proper cross-linking of beta-1,3- and beta-1,6-glucans. *J Bacteriol* **181**:7070-9.
- Franco M. 1986. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol* **25**:5-18.
- Gatti E, Popolo L, Vai M, Rota N, Alberghina L. 1994. O-linked oligosaccharides in yeast glycosyl phosphatidylinositol-anchored protein gp115 are clustered in a serine-rich region not essential for its function. *J Biol Chem* **269**:19695-700.
- Ghannoum MA, Spellberg B, Saporito-Irwin SM, Fonzi WA. 1995. Reduced virulence of *Candida albicans* *PHR1* mutants. *Infect Immun* **63**:4528-30.
- Hartland RP, Fontaine T, Debeaupuis JP, Simenel C, Delepierre M, Latgé JP. 1996. A novel beta-(1-3)-glucanosyltransferase from the cell wall of *Aspergillus fumigatus*. *J Biol Chem* **271**:26843-9.
- Hearn VM, Sietsma JH. 1994. Chemical and immunological analysis of the *Aspergillus fumigatus* cell wall. *Microbiology* **140**:789-95.
- Klis FM, Boorsma A, De Groot PW. 2006. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23**:185-202.
- Kottom TJ, Thomas CF Jr, Limper AH. 2001. Characterization of *Pneumocystis carinii* *PHR1*, a pH-regulated gene important for cell wall integrity. *J Bacteriol* **183**:6740-5.
- Latgé JP, Debeaupuis JP, Moutaouakil M, Diaquin M, Sarfati J, Prévost MC, Wieruszkeski JM, Leroy Y, Fournet B. 1991. Galactomannan and the circulating Antigens of *Aspergillus fumigatus*. In: Latgé JP, Boucias D (Eds). *Fungal Cell Wall and Immune response. NATO ASI series*. Heidelberg: Springer-Verlag, Berlin, pp. 143-55.
- Leal CV, Montes BA, Mesa AC, Rua AL, Corredor M, Restrepo A, McEwen JG. 2004. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol* **42**:391-5.
- Lesage G, Bussey H. 2006. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**:317-43.
- Mouyna I, Fontaine T, Vai M, Monod M, Fonzi WA, Diaquin M, Popolo L, Hartland RP, Latgé JP. 2000a. Glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanosyltransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. *J Biol Chem* **275**:14882-9.
- Mouyna I, Monod M, Fontaine T, Henrissat B, Léchenne B, Latgé JP. 2000b. Identification of the catalytic residues of the first family of beta(1-3)glucanosyltransferases identified in fungi. *Biochem J* **347**:741-7.
- Mouyna I, Morelle W, Vai M, Monod M, Léchenne B, Fontaine T, Beauvais A, Sarfati J, Prévost MC, Henry C, Latgé JP. 2005 Deletion of *GEL2* encoding for a beta(1-3)glucanosyltransferase affects morphogenesis and virulence in *Aspergillus fumigatus*. *Mol Microbiol* **56**:1675-88.
- M  hlschlegel FA, Fonzi WA. 1997. *PHR2* of *Candida albicans* encodes a functional homolog of the pH-regulated gene *PHR1* with an inverted pattern of pH-dependent expression. *Mol Cell Biol* **17**:5960-7.
- Nakazawa T, Horiuchi H, Ohta A, Takagi M. 1998. Isolation and characterization of *EPD1*, an essential gene for pseudohyphal growth of a dimorphic yeast, *Candida maltosa*. *J Bacteriol* **180**:2079-86.
- Nakazawa T, Takahashi M, Horiuchi H, Ohta A, Takagi M. 2000. Cloning and characterization of *EPD2*, a gene required for efficient pseudohyphal formation of a dimorphic yeast, *Candida maltosa*. *Biosci Biotechnol Biochem* **64**:369-77.
- Nuoffer C, Jeno P, Conzelmann A, Riezman H. 1991. Determinants for glycopospholipid anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* *GAS1* protein to the plasma membrane. *Mol Cell Biol* **11**:27-37.
- Palomares O, Villalba M, Quiralte J, Polo F, Rodríguez R. 2005. 1,3-beta-glucanases as candidates in latex-pollen-vegetable food cross-reactivity. *Clin Exp Allergy* **35**:345-51.
- Palomares O, Villalba M, Rodríguez R. 2003. The C-terminal segment of the 1,3-beta-glucanase Ole e 9 from olive (*Olea europaea*) pollen is an independent domain with allergenic activity: expression in *Pichia pastoris* and characterization. *Biochem J* **369**:593-601.

- Popolo L, Gilardelli D, Bonfante P, Vai M. 1997. Increase in chitin as an essential response to defects in assembly of cell wall polymers in the *ggp1delta* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **179**:463-9.
- Popolo L, Grandori R, Vai M, Lacanà E, Alberghina L. 1988. Immunochemical characterization of gp115, a yeast glycoprotein modulated by the cell cycle. *Eur J Cell Biol* **47**:173-80.
- Popolo L, Vai M, Gatti E, Porello S, Bonfante P, Balestrini R, Alberghina L. 1993. Physiological analysis of mutants indicates involvement of the *Saccharomyces cerevisiae* GPI-anchored protein gp115 in morphogenesis and cell separation. *J Bacteriol* **175**:1879-85.
- Popolo L, Vai M. 1999. The Gas1 glycoprotein, a putative wall polymer cross-linker. *Biochim Biophys Acta* **1426**:385-400.
- Ragni E, Coluccio A, Rolli E, Rodriguez-Peña JM, Colasante G, Arroyo J, Neiman AM, Popolo L. 2007a. *GAS2* and *GAS4*, a pair of developmentally regulated genes required for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **6**:302-16.
- Ragni E, Fontaine T, Gissi C, Latgé JP, Popolo L. 2007b. The Gas family of proteins of *Saccharomyces cerevisiae*: characterization and evolutionary analysis. *Yeast* **24**:297-308.
- Ram AF, Brekelmans SS, Oehlen LJ, Klis FM. 1995. Identification of two cell cycle regulated genes affecting the beta 1,3-glucan content of cell walls in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **358**:165-70.
- Ram AF, Kapteyn JC, Montijn RC, Caro LH, Douwes JE, Baginsky W, Mazur P, van den Ende H, Klis FM. 1998. 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**:1418-24.
- Ram AF, Wolters A, Ten Hoopen R, Klis FM. 1994. A new approach for isolating cell wall mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by screening for hypersensitivity to calcofluor white. *Yeast* **10**:1019-30.
- Restrepo AM, McEwen JG, Castaneda E. 2001. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med Mycol* **39**:233-41.
- San-Blas G, San-Blas F. 1994. Biochemistry of *Paracoccidioides brasiliensis* dimorphism. In: Franco MF, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro A (Eds). *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 49-66.
- Sano A, Tanaka R, Nishimura K, Kurokawa CS, Coelho KIR, Franco M, Montenegro MR, Miyaji M. 1997. Characteristics of 17 *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. *Mycoscience* **38**:117-22.
- Saporito-Irwin SM, Birse CE, Sypherd PS, Fonzi WA. 1995. *PHR1*, a pH-regulated gene of *Candida albicans*, is required for morphogenesis. *Mol Cell Biol* **15**:601-13.
- Vai M, Gatti E, Lacana E, Popolo L, Alberghina L. 1991. Isolation and deduced amino acid sequence of the gene encoding gp115, a yeast glycopospholipid-anchored protein containing a serine-rich region. *J Biol Chem* **266**:12242-8.
- Vai M, Orlandi I, Cavadini P, Alberghina L, Popolo L. 1996. *Candida albicans* homologue of *GGPI/GAS1* gene is functional in *Saccharomyces cerevisiae* and contains the determinants for glycosylphosphatidylinositol attachment. *Yeast* **12**:361-8.
- Weig M, Haynes K, Rogers TR, Kurzai O, Frosch M, Mühlshlegel FA. 2001. A *GAS*-like gene family in the pathogenic fungus *Candida glabrata*. *Microbiology* **147**:2007-19.
- Xue J, Hung CY, Yu JJ, Cole GT. 2005. Immune response of vaccinated and non-vaccinated mice to *Coccidioides posadasii* infection. *Vaccine* **23**:3535-44.
- Yin QY, de Groot PW, Dekker HL, de Jong L, Klis FM, de Koster CG. 2005. Comprehensive proteomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: identification of proteins covalently attached via glycosylphosphatidylinositol remnants or mild alkali-sensitive linkages. *J Biol Chem* **280**:20894-901.

## Capítulo 4: Dfg5p

- Andreotti PF, Monteiro da Silva JL, Bailão AM, Soares CM, Benard G, Soares CP, Mendes-Giannini MJ. 2005. Isolation and partial characterization of a 30 kDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect* **7**:875-81.
- Bae CY, Kim S, Choi WB, Lee YH. 2007. Involvement of extracellular matrix and integrin-like proteins on conidial adhesion and appressorium differentiation in *Magnaporthe oryzae*. *J Microbiol Biotechnol* **17**:1198-203
- Bähler J. 2005. Cell-cycle control of gene expression in budding and fission yeast. *Annu Rev Genet* **39**:69-94.
- Barbosa MS, Bão SN, Andreotti PF, de Faria FP, Felipe MS, Feitosa LS, Mendes-Giannini MJS, Soares CMA. 2006. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. *Infect Immun* **74**:382-9.
- Beck K, Hunter I, Engel J. 1990. Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. *FASEB J* **4**:148-60.
- Castillo L, Martínez AI, Garcerá A, Elorza MV, Valentín E, Sentandreu R. 2003. Functional analysis of the cysteine residues and the repetitive sequence of *Saccharomyces cerevisiae* Pir4/Cis3: the repetitive sequence is needed for binding to the cell wall beta-1,3-glucan. *Yeast* **20**:973-83.
- Chaffin WL, López-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martínez JP. 1998. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:130-80.
- Cheng S, Clancy CJ, Checkley MA, Handfield M, Hillman JD, Progulske-Fox A, Lewin AS, Fidel PL, Nguyen MH. 2003. Identification of *Candida albicans* genes induced during thrush offers insight into pathogenesis. *Mol Microbiol* **48**:1275-88.
- Coutinho PM, Henrissat B. 1999. Carbohydrate-active Enzymes: An Integrated Database Approach. In: Gilbert HJ, Davies G, Henrissat B, Svensson (Eds). *The Royal Society of Chemistry*. Cambridge: London, pp. 3-12.
- de Groot PW, de Boer AD, Cunningham J, Dekker HL, de Jong L, Hellingwerf KJ, de Koster C, Klis FM. 2004. Proteomic analysis of *Candida albicans* cell walls reveals covalently bound carbohydrate-active enzymes and adhesins. *Eukaryot Cell* **3**:955-65.
- de Nobel H, Ruiz C, Martin H, Morris W, Brul S, Molina M, Klis FM. 2000. Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slt2/Mpk1 MAP kinase and in an Slt2-mediated increase in *FKS2-lacZ* expression, glucanase resistance and thermotolerance. *Microbiology* **146**:2121-32.
- Ecker M, Deutzmann R, Lehle L, Mersa V, Tanner W. 2006. Pir proteins of *Saccharomyces cerevisiae* are attached to beta-1,3-glucan by a new protein-carbohydrate linkage. *J Biol Chem* **281**:11523-9.
- Filler SG. 2006. *Candida*-host cell receptor-ligand interactions. *Curr Opin Microbiol* **9**:333-9.
- Finlay BB. 1990. Cell adhesion and invasion mechanisms in microbial pathogenesis. *Curr Opin Cell Biol* **2**:815-20.
- Ganendren R, Carter E, Sorrell T, Widmer F, Wright L. 2006. Phospholipase B activity enhances adhesion of *Cryptococcus neoformans* to a human lung epithelial cell line. *Microbes Infect* **8**:1006-15.
- García-Sánchez S, Aubert S, Iraqui I, Janbon G, Ghigo JM, d'Enfert C. 2004. *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. *Eukaryot Cell* **3**:536-45.
- Gavel Y, von Heijne G. 1990. Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Eng* **3**:433-42.
- Gil ML, Peñalver MC, Lopez-Ribot JL, O'Connor JE, Martínez JP. 1996. Binding of extracellular matrix proteins to *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect Immun* **64**:5239-47.
- Gomez MJ, Torosantucci A, Arancia S, Maras B, Parisi L, Cassone A. 1996. Purification and biochemical characterization of a 65-kilodalton mannoprotein (MP65), a main target of anti-*Candida* cell-mediated immune responses in humans. *Infect Immun* **64**:2577-84.
- Hammond C, Helenius A. 1994. Quality control in the secretory pathway: retention of a misfolded viral membrane glycoprotein involves cycling between the ER, intermediate compartment, and Golgi apparatus. *J Cell Biol* **126**:41-52.

- Harsay E, Bretscher A. 1995. Parallel secretory pathways to the cell surface in yeast. *J Cell Biol* **131**:297-310.
- Hostetter MK. 1999. Integrin-like proteins in *Candida spp.* and other microorganisms. *Fungal Genet Biol* **28**:135-45.
- Hostetter MK. 2000. RGD-mediated adhesion in fungal pathogens of humans, plants and insects. *Curr Opin Microbiol* **3**:344-8.
- Hoyer LL, Clevenger J, Hecht JE, Ehrhart EJ, Poulet FM. 1999. Detection of Als proteins on the cell wall of *Candida albicans* in murine tissues. *Infect Immun* **67**:4251-5.
- Hoyer LL. 2001. The *ALS* gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **9**:176-80.
- Huang G, Zhang M, Erdman SE. 2003. Posttranslational modifications required for cell surface localization and function of the fungal adhesin Aga1p. *Eukaryot Cell* **2**:1099-114.
- Kanetsuna F, Carbonell LM, Moreno RE, Rodriguez J. 1969. Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* **97**:1036-41.
- Kitagaki H, Ito K, Shimoi H. 2004. A temperature-sensitive *dcw1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* is cell cycle arrested with small buds which have aberrant cell walls. *Eukaryot Cell* **3**:1297-306.
- Kitagaki H, Wu H, Shimoi H, Ito K. 2002. Two homologous genes, *DCW1* (*YKL046c*) and *DFG5*, are essential for cell growth and encode glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored membrane proteins required for cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **46**:1011-22.
- Klis FM, Boorsma A, de Groot PW. 2006. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23**:185-202.
- Kottom TJ, Köhler JR, Thomas CF Jr, Fink GR, Limper AH. 2003. Lung epithelial cells and extracellular matrix components induce expression of *Pneumocystis carinii* *STE20*, a gene complementing the mating and pseudohyphal growth defects of *STE20* mutant yeast. *Infect Immun* **71**:6463-71.
- Li F, Palecek SP. 2003. *EAP1*, a *Candida albicans* gene involved in binding human epithelial cells. *Eukaryot Cell* **2**:1266-73.
- Lima OC, Figueiredo CC, Previato JO, Mendonca-Previato L, Morandi V, Lopes Bezerra LM. 2001. Involvement of fungal cell wall components in adhesion of *Sporothrix schenckii* to human fibronectin. *Infect Immun* **69**:6874-80.
- Mendes-Giannini MJS, Andreotti PF, Vincenzi LR, da Silva JL, Lenzi HL, Benard G, Zancopé-Oliveira R, Guedes HLM, Soares CP. 2006. Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect* **8**:1550-9.
- Mendes-Giannini MJS, Monteiro da Silva JL, da Silva JF, Donofrio FC, Miranda ET, Andreotti PF, Soares CP. 2008. Interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* with host cells: recent advances. *Mycopathologia* **165**:237-48.
- Mendes-Giannini MJS, Taylor ML, Bouchara JB, Burger E, Calich VL, Escalante ED, Hanna SA, Lenzi HL, Machado MP, Miyaji M, Monteiro da Silva JL, Mota EM, Restrepo A, Restrepo S, Tronchin G, Vincenzi LR, Xidieh CF, Zenteno E. 2000. Pathogenesis II: fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. *Med Mycol* **38**:113-23.
- Mohri H. 1996. Fibronectin and integrins interactions. *J Invest Med* **44**:429-41.
- Mösch HU, Fink GR. 1997. Dissection of filamentous growth by transposon mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **145**:671-84.
- Mouyna I, Monod M, Fontaine T, Henrissat B, Léchenne B, Latgé JP. 2000. Identification of the catalytic residues of the first family of beta(1-3)glucanosyltransferases identified in fungi. *Biochem J* **347**:741-7.
- Mrsá V, Seidl T, Gentzsch M, Tanner W. 1997. Specific labelling of cell wall proteins by biotinylation. Identification of four covalently linked O-mannosylated proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**:1145-54.
- Mrsá V, Tanner W. 1999. Role of NaOH-extractable cell wall proteins Ccw5p, Ccw6p, Ccw7p and Ccw8p (members of the Pir protein family) in stability of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Yeast* **15**:813-20.
- Nisini R, Romagnoli G, Gomez MJ, La Valle R, Torosantucci A, Mariotti S, Teloni R, Cassone A. 2001. Antigenic properties and processing requirements of 65-kilodalton mannoprotein, a major antigen

- target of anti-*Candida* human T-cell response, as disclosed by specific human T-cell clones. *Infect Immun* **69**:3728-36.
- Nobile CJ, Nett JE, Andes DR, Mitchell AP. 2006. Function of *Candida albicans* adhesin Hwp1 in biofilm formation. *Eukaryot Cell* **5**:1604-10.
- Pae SH, Dokic D, Dettman RW. 2008. Communication between integrin receptors facilitates epicardial cell adhesion and matrix organization. *Dev Dyn* **237**:962-78.
- Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Höök M. 1994. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol* **48**:585-617.
- Pel HJ, de Winde JH, Archer DB, Dyer PS, Hofmann G, Schaap PJ, Turner G, de Vries RP, Albang R, Albermann K, Andersen MR, Bendtsen JD, Benen JA, van den Berg M, Breestraat S, Caddick MX, Contreras R, Cornell M, Coutinho PM, Danchin EG, *et al.* 2007. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nat Biotechnol* **25**:221-31.
- Pereira LA, Bão SN, Barbosa MS, da Silva JL, Felipe MS, Santana JM, Mendes-Giannini MJS, Soares CMA. 2007. Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function. *FEMS Yeast Res* **7**:1381-8.
- Ram AF, Kapteyn JC, Montijn RC, Caro LH, Douwes JE, Baginsky W, Mazur P, van den Ende H, Klis FM. 1998. 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**:1418-24.
- Rodríguez-Peña JM, Cid VJ, Arroyo J, Nombela C. 2000. A novel family of cell wall-related proteins regulated differently during the yeast life cycle. *Mol Cell Biol* **20**:3245-55.
- Ruoslahti E. 1996. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**:697-715.
- San-Blas G, Niño-Vega G. 2008. *Paracoccidioides brasiliensis*: chemical and molecular tools for research on cell walls, antifungals, diagnosis, taxonomy. *Mycopathologia* **165**:183-95.
- Sestak S, Hagen I, Tanner W, Strahl S. 2004. Scw10p, a cell-wall glucanase/transglucosidase important for cell-wall stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **150**:3197-208.
- Shimoi H, Kitagaki H, Ohmori H, Iimura Y, Ito K. 1998. Sed1p is a major cell wall protein of *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase and is involved in lytic enzyme resistance. *J Bacteriol* **180**:3381-7.
- Smits GJ, Kapteyn JC, van den Ende H, Klis FM. 1999. Cell wall dynamics in yeast. *Curr Opin Microbiol* **2**:348-52.
- Spreghini E, Davis DA, Subaran R, Kim M, Mitchell AP. 2003. Roles of *Candida albicans* Dfg5p and Dcw1p cell surface proteins in growth and hypha formation. *Eukaryot Cell* **2**:746-55.
- Sundstrom P. 2002. Adhesion in *Candida* spp. *Cell Microbiol* **4**:461-9.
- Suzuki M, Igarashi R, Sekiya M, Utsugi T, Morishita S, Yukawa M, Ohya Y. 2004. Dynactin is involved in a checkpoint to monitor cell wall synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Cell Biol* **6**:861-71.
- Toh-e A, Yasunaga S, Nisogi H, Tanaka K, Oguchi T, Matsui Y. 1993. Three yeast genes, *PIR1*, *PIR2* and *PIR3*, containing internal tandem repeats, are related to each other, and *PIR1* and *PIR2* are required for tolerance to heat shock. *Yeast* **9**:481-94.
- van der Vaart JM, Caro LH, Chapman JW, Klis FM, Verrips CT. 1995. Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **177**:3104-10.
- Vicentini AP, Gesztesi JL, Franco MF, de Souza W, de Moraes JZ, Travassos LR, Lopes JD. 1994. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infect Immun* **62**:1465-9.
- Werner-Washburne M, Braun E, Johnston GC, Singer RA. 1993. Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **57**:383-401.
- Werner-Washburne M, Braun EL, Crawford ME, Peck VM. 1996. Stationary phase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **19**:1159-66.
- Zhao C, Jung US, Garrett-Engle P, Roe T, Cyert MS, Levin DE. 1998. Temperature-induced expression of yeast *FKS2* is under the dual control of protein kinase C and calcineurin. *Mol Cell Biol* **18**:1013-22.
- Zlotnik H, Fernandez MP, Bowers B, Cabib E. 1984. *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins form an external cell wall layer that determines wall porosity. *J Bacteriol* **159**:1018-26.